

Tesis Doctoral

Evolución morfológica asociada al proceso de divergencia entre especies: el cluster *Drosophila buzzatii* (Diptera, Drosophilidae)

Soto, Ignacio M.

2008

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Soto, Ignacio M.. (2008). Evolución morfológica asociada al proceso de divergencia entre especies: el cluster *Drosophila buzzatii* (Diptera, Drosophilidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Soto, Ignacio M.. "Evolución morfológica asociada al proceso de divergencia entre especies: el cluster *Drosophila buzzatii* (Diptera, Drosophilidae)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2008.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ecología, Genética y Evolución

Evolución morfológica asociada al proceso de
divergencia entre especies: el cluster
Drosophila buzzatii (Diptera, Drosophilidae).

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

Ignacio M. Soto

Director de tesis: Esteban Hasson
Consejero de Estudios: Esteban Hasson

Lugar de trabajo: Departamento de Ecología, Genética y Evolución.
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires

Ciudad de Buenos Aires, República Argentina.
Marzo de 2008

Evolución morfológica asociada al proceso de
divergencia entre especies: el cluster
Drosophila buzzatii (Diptera, Drosophilidae).

Reservado para uso de los Jurados

Evolución morfológica asociada al proceso de divergencia entre especies: el cluster *Drosophila buzzatii* (Diptera, Drosophilidae).

Resumen

¿Porqué hay especies morfológicamente crípticas sólo diferenciables por su genitalia? ¿Qué procesos están involucrados en la diferenciación morfológica de las especies y cuál es la importancia relativa de cada uno de ellos? ¿Qué patrones determinan estos procesos cuando se analizan en escalas micro y macroevolutivas? Muchos de los mecanismos por los que se producen los cambios morfo-fisiológicos que acompañan a la especiación permanecen largamente desconocidos por la biología. Más aún, las bases genéticas de la divergencia morfológica que acompaña a la cladogénesis sigue siendo una cuestión controvertida, tanto en lo que concierne al número de genes implicados como a la magnitud de sus efectos.

En los últimos años se ha profundizado en el conocimiento de la genética, la biogeografía, la sistemática y la ecología del cluster *buzzatii*. El simple hecho de que este cluster incluya especies en diferentes etapas de la divergencia interespecífica ofrece la oportunidad de investigar las bases genéticas de la evolución de la morfología en un grupo en activa cladogénesis. Esto se suma a la posibilidad de generar híbridos interespecíficos en el laboratorio y al conocimiento acumulado sobre su ecología, lo que convierte al cluster en un excelente modelo biológico-evolutivo. Además, la fertilidad de las hembras híbridas posibilita experimentos de introgresión de material genético de una especie en el genoma de otra y la oportunidad de buscar loci que afectan caracteres cuantitativos como la forma y el tamaño de las alas y los órganos sexuales.

El objetivo primario de esta tesis es comprender los factores causales, tanto genéticos como ecológicos, de las diferencias fenotípicas entre las especies cactófilas del cluster *Drosophila buzzatii* mediante el análisis de la variabilidad genética y la plasticidad fenotípica de caracteres de distinta naturaleza. Por un lado analizamos la morfología del ala, el tiempo de desarrollo y la viabilidad, que son caracteres íntimamente relacionados con la eficacia biológica. Por otro lado estudiamos la morfología del órgano copulador masculino (*aedeagus*), un carácter diagnóstico posiblemente blanco de la selección sexual. Asimismo, nos interesa conocer las relaciones entre la morfología, caracteres de historia de vida y el aprovechamiento de la planta hospedadora para determinar si existen correlaciones que puedan limitar o dirigir los cambios en forma y tamaño de los distintos órganos. Finalmente, estimando el grado de divergencia entre especies buscamos estudiar el patrón de evolución morfológica y poder determinar qué aspectos pueden ser atribuidos a la inercia filogenética y cuáles a procesos selectivos actuando en taxa específicos.

Los resultados principales fueron:

-La base genética de las diferencias morfológicas interespecíficas del ala y la genitalia masculina no sigue un modelo aditivo según el aporte de ensayos de hibridación. Existen elementos segregantes con fuertes efectos epistáticos y de dominancia.

-Los sustratos de cría, distintas especies de cactus hospedadores, afectaron dramáticamente todos los caracteres estudiados. Quedan consolidados como un factor biótico central a considerar en cualquier estudio evolutivo en este modelo.

- Se detectó plasticidad fenotípica en la genitalia masculina en respuesta a la planta hospedadora por primera vez en el género *Drosophila*.

- Se obtuvo evidencia de que las plantas hospedadoras pueden perturbar diferencialmente el normal desarrollo larvario y constituir un factor de stress, posiblemente relacionado con la química de los cactus.

-Las especies difirieron en los patrones de variación, plasticidad fenotípica y en el porcentaje de las diferencias de conformación debidas a la alometría para los caracteres medidos en ambos órganos.

-En *D. buzzatii* y *D. serido* las diferencias genitales entre poblaciones siguen un modelo de aislamiento por distancia y un patrón de evolución morfológica congruente con un modelo neutro.

-La evolución morfológica del cluster *buzzatii* presenta evidencia de divergencia por procesos selectivos. Esto se aplica tanto al ala como a la genitalia masculina aunque en este último carácter sólo valdría cuando está incluida *D. buzzatii* ya que las especies del "set" *D. serido* se ajustaron a un patrón de evolución neutra.

Palabras clave: *Morfología – Drosophila – Cactus hospedador – Especiación – Ala - Genitalia*

Morphological evolution associated with the divergence process among species: the *Drosophila buzzatii* cluster (Diptera, Drosophilidae)

Abstract

Why do we have morphologically cryptic species that exclusively differ in the morphology of their genitalia? Which are the processes involved in morphological divergence between species? and which is the relevance of adaptive vs stochastic differentiation? What are the patterns established by these processes in both a micro and macroevolutionary scales? The mechanisms that drive morpho-physiological changes accompanying speciation remain largely unknown by biologists. Besides, there is still a controversy regarding the genetic basis of morphological divergence during cladogenesis and the number of genes involved and the magnitude of their effects

In recent years it has been an increment in the knowledge about the genetics, biogeography, systematics and ecology of species that belong to the *buzzatii* cluster. The mere fact that this cluster comprises species in different stages of interspecific divergence offers the chance to study genetic basis of morphological evolution in a group in active cladogenesis. Additionally, the possibility of producing interspecific hybrids in the laboratory sets the cluster as an excellent biological model for the study the genetic basis of interspecific divergence during different stages of cladogenesis. Moreover, hybrid females are fertile allowing experiments of introgression of genetic material from one species to another and the chance to search for quantitative trait loci affecting wing and genital size and shape.

The primary objective of this thesis is to comprehend the causal factors, both genetic and ecological, of phenotypic differences among cactophilic species of the *Drosophila buzzatii* cluster by means of the estimation of the relative contribution of genetic variation and phenotypic plasticity to phenotypic variation in morphological and life history traits. On one hand, we analyzed wing morphology, developmental time and viability, as representatives of fitness related traits, and, on the other hand, we studied the morphology of male copulatory organ (*aedeagus*), a diagnostic trait a possible target of sexual selection. As well, we are interested in knowing the relationship between morphological and life-history traits and the influence of host plant use to determine if correlations exists that might limit or drive the shape and size changes in different organs. Alternatively, we seek to understand morphological evolution and to establish which aspects of the evolution of the organ might be attributed to phylogenetic inertia and which to adaptive processes acting in specific taxa.

Main results:

- According to hybridization essays, the genetic basis of interspecific morphological differences in wing and genitalia did not respond to an additive model. Our results suggest the existence of segregating factors with dominant and epistatic effects.
- The breeding substrates, different host cacti, affected dramatically all studied traits. Thus, our study emphasizes the position of host cacti as a central biotic factor to be taken into account in any evolutionary study with this model.
- We report phenotypic plasticity in male genitalia associated to host plants for the first time in the genus *Drosophila*.
- We obtained evidence that host plants may differentially affect normal development and represent a factor of stress which might be related to cactus chemistry.
- Species differed in patterns of trait variation, phenotypic plasticity and the percentage of shape differences due to allometry for morphological traits in both organs.
- Interpopulational genital differences in *D. buzzatii* and *D. serido* follow an “isolation by distance” model and a pattern of morphological evolution that is congruent with neutrality.
- Morphological divergence in the *buzzatii* cluster appears to be largely due to adaptive processes for both wing and genitalia. This is true for the *D. buzzatii* cluster as a whole, while divergence of male genitalia in the *D. serido* sibling set appears to have evolved under random drift.

Keywords: Morphology – *Drosophila* – Cactus host – Speciation – Wing - Genitalia

Me encuentro en el grato problema de intentar agradecer a quienes han colaborado con mis investigaciones y mi formación en estos años. Intentaré utilizar justicia, medida y sinceridad, y si no, fracasaré estrepitosamente con actos de irreprochable humanidad. Grato problema en verdad el de agradecer porque en un breve repaso mental se ha agolpado una multitud y, a medida que ganen precisión sus rostros, pasaré a nombrarlos. Así será evidente que esta tesis es gracias al aporte de muchos. Espero sepan disculpar ese cierto regusto a letanía que tiene este tipo de enumeraciones.

Esteban Hasson redondeó, durante mi doctorado, lo que inició durante mis años de estudiante y pasante en su laboratorio. Reforzó mi espíritu crítico y fortaleció mis conocimientos de biología evolutiva hasta en charlas improvisadas, mate de por medio en un laboratorio atestado de libros, papeles y becarios. Sobre todo le agradezco la libertad ofrecida y su confianza en mi capacidad de llevar adelante un proyecto “riesgoso” según su propia definición. Siempre voy a valorar su tendencia a generar continuamente nuevas preguntas y su paciencia, que supe poner a prueba en no pocas ocasiones.

Hace unos años mi hermano decidió que no era suficiente acompañarme en la vida y se sumó al laboratorio como colega. Mi doctorado abarcó su licenciatura y primeros pasos oficiales de biólogo. Tengo el orgullo de presentar parte de los resultados de sus (nuestros) primeros experimentos (no de los caseros, de esos no quedaron registros). Desafiando los genes y crianza compartidos, me ofreció pareceres muy distintos a los propios en varias oportunidades y eso no hizo más que enriquecer mi trabajo y fortalecer el amor que le tengo.

Todo este trabajo descansa sobre la inquebrantable espalda de Valeria Carreira. Compañera en todos los aspectos no para de enseñarme ejemplos de profesionalidad y entrega. Midió, calculó, fotografió, transpiró y hasta maldijo a la par mía (estrictamente en los momentos oportunos y fiel a su estilo teniendo extremo cuidado en no pasarse en el tenor de los improperios) durante la experimentación y luego me ayudó en los análisis encarnándose definitivamente en mi doctorado. Como si eso fuera poco, en esta tesis sólo vuelco la fracción de información y pensamientos que pasaron su exigente escrutinio (o exactamente lo contrario, aquellos que no me animé siquiera a comentarle). Hace años que le hago saber lo agradecido que estoy de poder trabajar junto a ella. Hoy lo pongo por escrito.

Estoy confiado en que en años venideros me envidiarán justificadamente cuando cuente quienes fueron mis compañeros de laboratorio durante estos años. Marcelo Cortese, Julián Mensch, Guillermo Folguera y Romina Piccinali me recibieron afectuosamente para inmediatamente comenzar a sazonar mi sentido crítico. Edu, Vale, Juan José Fanara, Nicolás Lavagnino, Ana Massaldi, Luciana Spezzi, Santiago Ceballos, Cristian Corio, Julieta Goenaga, Alejandra Korovaichuk, Juan Hurtado, Marcos Imberti, Paula Lipko y María Betti se fueron sumando luego, de distintas maneras y con sus tiempos y no hicieron más que jerarquizar y enriquecer mis días de trabajo. Felizmente, hemos sido cultores más o menos inconcientes de la diversidad, desplegando un caleidoscopio de opiniones y enfoques disparejos, afortunadamente, ya que, como es sabido, sin variabilidad no hay evolución.

Otros colegas, abocados a entender otros organismos (“bichos armados y realmente vivos” me llegaron a explicar), también aportaron opiniones y miradas alternativas cuando no proyectos conjuntos. Mariela Nieves, Diego Tuero y Walter “Tito” Svagelj, levanto una

cerveza fría por todos los experimentos pensados juntos. Ana Barreira, gracias por la compañía en los primeros pasos y el interés constante. A Camila Rodríguez porque desinteresadamente me acercó consejos de edición, citas de último momento y muchísima reflexión sobre la naturaleza de la investigación biológica al hacerme siempre esas preguntas sencillas que cuesta responder

Quiero agradecer también a la Dra Marta Mudry por facilitarme equipos del GIBE con el que hice los primeros ensayos fotográficos exploratorios y al Dr Daniel Roccatagliata por prestarme (de manera permanente) algunos elementos casi alquímicos para el medio de montaje. La Dra. Inés Camilloni me proveyó de datos meteorológicos históricos de las distintas localidades de estudio que si bien no son estrictamente usados aquí fueron útiles para las discusiones volcadas. También estoy profundamente en deuda con el laboratorio de Genética Evolutiva de Ribeirão Preto (Universidad de São Paulo) por permitirme el acceso a las especies de territorio brasileiro. Especialmente a Fernando de Faria Franco por la cálida amistad ofrecida y a Adriana Morales Colleto por su disposición y afecto.

Por último, debo admitir que llevado por cierta sensación de un Equilibrio Superior, quiero expresar mi aprecio a la multitud de moscas que entregaron su cuerpo involuntariamente en mis estudios. Destrozadas para entenderlas para entendernos realmente espero que su nombre no sea Legión. Sin embargo, expreso aprecio y no disculpas porque cuando yo ya no disponga de este cuerpo ellas lo harán en eficiente retribución de favores. Como ya lo sospechaba Poe:

Out—out are the lights—out all!
And over each quivering form,
The curtain, a funeral pall,
Comes down with the rush of a storm,
And the angels, all pallid and wan,
Uprising, unveiling, affirm
That the play is the tragedy "Man,"
And its hero the Conqueror Worm..

- He realizado este trabajo bajo el oportuno amparo concedido por las siguientes becas:

Beca Interna Doctoral otorgada por el Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Tema: Genética y evolución del proceso de especiación de *Drosophila buzzatii* y *D. koepferae* (grupo repleta, género *Drosophila*). 2003- 2008

Beca de Investigación otorgada por la Cordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal do Nivel Superior. CAPES. Ministerio de Educación de Brasil. Proyecto Colaborativo CAPES-SECYT N° 074/04. Diciembre de 2004 a Marzo de 2005

- Esta tesis ha sido posible gracias al financiamiento recibido a través de los siguientes subsidios:

Arquitectura genética de caracteres asociados a la divergencia y la adaptación en el modelo *Drosophila*. 2007-2010

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. PICT 32146/05.

Genómica, adaptación y especiación en *Drosophila*. 2005-2008
CONICET.

Biología Comparada en Dípteros e Himenópteros del Cono Sur: estudios genéticos, fisiológicos y comportamentales en especies autóctonas. 2004-2007

Programa CAPES-SECyT.

Bases genéticas y moleculares de la adaptación en *Drosophila*. Un enfoque experimental para el estudio de la biodiversidad y los recursos genéticos. 2004

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. PICT 11084/02.

Las clinas latitudinales en *Drosophila* como posibles indicadores del cambio climático.

UBACyT X-199. 2004-2007

A mis padres

A mi abuela

A la memoria de Francisco Font Comas

*El tío Font, que mientras esta tesis me ocupaba se fue a milonguear por otros
arrabales*

*A mis hermanos de patria que con su trabajo y sin sospecharlo me acercaron los
libros y los maestros de una universidad pública y gratuita*

Al hogar de la infancia con hormigas en su patio

Capítulo I: Drosófilas cactófilas de América del Sur

Resumen	19
Dípteros	20
El género <i>Drosophila</i>	20
El cluster <i>D. buzzatii</i>	22
Asociación con los sustratos de cría: las <i>Drosophilas</i> cactófilas.	23
Generalidades morfológicas del cluster	27
<i>La morfología alar</i>	28
<i>La morfología genital masculina</i>	29
Evidencias de hibridación pasada y presente	31

Capítulo II: Viabilidad y tiempo de desarrollo asociado al cactus hospedador.

Caso de estudio: Primera evaluación de caracteres de historia de vida asociados al hospedador en *D. antonietae* y *D. gouveai*

Resumen	35
Materiales y métodos	37
<i>Medición de los caracteres y análisis de datos</i>	38
<i>Correlación entre el tiempo de desarrollo y el tamaño de ala</i>	39
<i>Viabilidad y tiempo de desarrollo de híbridos interespecíficos</i>	40
Resultados	40
<i>Viabilidad</i>	42
<i>Tiempo de desarrollo</i>	43
<i>Correlación entre el tiempo de desarrollo y el tamaño de ala</i>	44
<i>Viabilidad y tiempo de desarrollo de híbridos interespecíficos</i>	45
Discusión	47

Capítulo III: Morfología alar asociada al hospedador

Fuentes de variación fenotípica, normas de reacción y covariación entre partes

Resumen	51
Diseño experimental: ‘stocks’ estudiados y obtención de los individuos experimentales	56
El tamaño del ala	58
La conformación alar	61
Análisis de los patrones alométricos	65
<i>Relación entre conformación y tamaño de ala: La variación alométrica y no alométrica del patrón de venación</i>	67
Las diferencias conformacionales específicas	68
<i>D. buzzatii-D koepferae</i>	70
<i>D. gouveai-D antonietae</i>	71
Covariación de distintas porciones del ala	72
Patrones de asimetría fluctuante	76

Capítulo IV: Variación morfológica de la genitalia masculina en el cluster *buzzatii*:

Fuentes de variación fenotípica, normas de reacción y covariación entre partes

Resumen	87
La divergencia genital entre especies	89
Diseño experimental	91
<i>Cuantificación morfológica</i>	91
<i>Variación en tamaño y conformación</i>	92
<i>Relaciones alométricas</i>	92
Resultados	93
Variación en tamaño y conformación	93
A- <i>Drosophila buzzatii-D. koepferae</i>	93
A1- Tamaño genital	93
A2- Conformación genital	96

B- <i>Drosophila gouveai</i> - <i>D. antonietae</i>	97
<i>B1- Tamaño genital</i>	97
<i>B2- Conformación genital</i>	99
Relaciones alométricas	100
<i>Relación entre el tamaño y la conformación del aedeago.</i>	100
<i>Alometrías entre la genitalia y el tamaño general del cuerpo</i>	102
Discusión	102
<i>Las relaciones alométricas.</i>	104
<i>Las hipótesis de evolución genital</i>	106
<i>¿En qué consisten las diferencias interespecíficas del aedeago?</i>	107

Capítulo V: Efectos fenotípicos de la hibridación interespecífica

Un caso de estudio: El tiempo de desarrollo, la morfología y la viabilidad en *D. buzzatii* y *D. koepferae* e híbridos interespecíficos.

Resumen	109
<i>Obtención de los híbridos</i>	112
Caracteres de historia de vida: La viabilidad y el tiempo de desarrollo larvario de los híbridos	113
Los componentes de la variación en la morfología del ala de los híbridos interespecíficos	123
<i>Discusión</i>	128
La morfología genital masculina de los híbridos interespecíficos	131
<i>El tamaño de la genitalia en los híbridos</i>	131
<i>La conformación de la genitalia en los híbridos</i>	132
<i>Discusión</i>	134
Conclusiones generales	137

Capítulo VI: Patrones geográficos de la variación en la morfología genital en *Drosophila buzzatii*

Resumen	139
Patrones interpoblacionales de divergencia genital	143
Correlación entre la morfología genital y el polimorfismo de inversión	147
Poblaciones en simpatria con <i>D. koepferae</i>.	153
¿Qué procesos evolutivos rigen la divergencia genital entre poblaciones de <i>D. buzzatii</i>?	155
<i>El caso de <i>Drosophila serido</i></i>	157

Capítulo VII: La selección versus la deriva génica como mecanismos causales de la divergencia morfológica en drosófilas cactófilas neotropicales

Tiempo y modo de evolución morfológica en el cluster *buzzatii*

Resumen	161
El papel de la deriva génica en la diversificación morfológica	166
<i>La coselección de variables conformacionales como desvíos de la proporcionalidad.</i>	167
Evolución de la morfología del ala en el cluster <i>D. buzzatii</i>	169
Evolución de la morfología genital en el cluster <i>D. buzzatii</i>	174
<i>Patrones de divergencia intraespecífica: <i>D. buzzatii</i></i>	179
Discusión	180
Conclusiones generales	189
Anexo metodológico	195
A-Comentarios generales sobre los análisis de varianza: ANOVA – MANOVA- MANCOVA	196
B- Morfometría geométrica	197
Métodos de referencias anatómicas	198
<i>Concepto de espacio. Los espacios conformacionales y sus relaciones</i>	200
B 1: La técnica de Procrustes aplicada a la morfometría del ala	202
<i>Covariación de conformaciones basado en una técnica de cuadrados mínimos parciales</i>	204
Métodos de contornos	204

B2: Uso de descriptores elípticos de Fourier para la cuantificación de la morfología genital masculina en <i>Drosophila</i>	206
Prueba piloto	207
<i>Resultados y discusión</i>	209
Publicaciones derivadas	210
Bibliografía	212

Capítulo I: Drosófilas cactófilas de América del Sur

Resumen

En este capítulo se reseña el estado del conocimiento de la historia evolutiva, relaciones filogenéticas, ecología y morfología de las 7 especies que forman el llamado cluster *Drosophila buzzatii*. Por un lado, se encuentra *D. buzzatii*, una especie de amplia distribución geográfica y baja diferenciación genética interpoblacional. Las restantes seis especies, agrupadas en el denominado “*D. serido* sibling set” se caracterizan por un alto potencial de diferenciación genética pero una baja diferenciación morfológica incluso en los caracteres diagnósticos.

La característica ecológica más relevante del grupo es su alto grado de especialización, ya que todas las especies explotan, como sitios de cría y alimentación, los tejidos necróticos de diferentes especies de cactáceas. Esta particularidad es determinante en la distribución del cluster y, muy probablemente, de los patrones de diversificación y evolución de las especies. Entre las especies mejor estudiadas del grupo, en cuanto a sus aspectos genético-ecológicos se encuentra el par *D. buzzatii* y *D. koepferae*, que son las únicas representantes de este grupo que tienen una amplia distribución en territorio argentino.

Dípteros

Los dípteros son un linaje muy antiguo de insectos. La evidencia fósil más temprana del orden Diptera proviene de estratos del Triásico inferior de unos 240 millones de años (Krzemiński & Krzemińska 2003) y sugiere una radiación temprana del grupo de linajes reconocibles en la actualidad. De modo que no es imprudente arriesgar que el grupo se habría originado en el Pérmico tardío. El grupo hermano de los dípteros sería Permochoristidae, una familia perteneciente al orden Mecoptera (moscas escorpión), aparentemente, muy común durante el Pérmico (Krzemiński & Krzemińska 2003)

Ya dentro del orden Diptera, la evidencia fósil, basada en especímenes conservados en ámbar identificados como pertenecientes al género extinto *Electrophortica* (Hennig, 1965), sugiere que la antigüedad de la familia Drosophilidae se remontaría al Eoceno, es decir que podría superar los 50 millones de años. En base a la distribución de *Lissocephala*, un grupo basal de drosófilidos, la familia tendría un origen tropical (Throckmorton 1975).

El género *Drosophila*

El género *Drosophila* cuenta con unas 1500 especies descritas. Actualmente el género está subdividido en 10 subgéneros (Ashburner 1989, 2004); los subgéneros *Drosophila* y *Sophophora* son, en ese orden, los más diversos ya que, en conjunto, incluyen el 90 % de la diversidad.

Dentro del subgénero *Drosophila*, el grupo de *repleta* es de los más grandes y más extensamente estudiados incluyendo cerca de 100 especies (Baechli 2005). Las especies de este grupo han servido como modelos de estudios ecológicos y evolutivos por décadas (Patterson & Stone 1952, Barker & Starmer 1982, Barker *et al.* 1990).

El estudio de las relaciones filogenéticas en el grupo *repleta* ha sido objeto de intensos y variados estudios. Por un lado los trabajos de Wasserman (1982, 1992) usando los patrones de bandas de los cromosomas politénicos sentaron las primeras bases. Más recientemente, otros autores re-codificaron los caracteres cromosómicos para analizarlos siguiendo el criterio de parsimonia (O'Grady *et al.* 2001). A su vez, Durango y colaboradores (2000) produjeron un árbol filogenético que incluía los principales subgrupos del grupo *repleta* utilizando información molecular de tres loci génicos. Este último trabajo resultó ser muy informativo, ya que permitió definir mejor las relaciones entre los taxa más derivados. Por ejemplo, los complejos *mulleri* y

buzzatii aparecen como grupos monofiléticos y taxa hermanos. A su vez, otros complejos y subgrupos como *eremophila*, *hydei*, *mercatorum* y *meridiana* también fueron monofiléticos, aunque las relaciones dentro de ellos no resultaron muy claras (Figura 1.1).

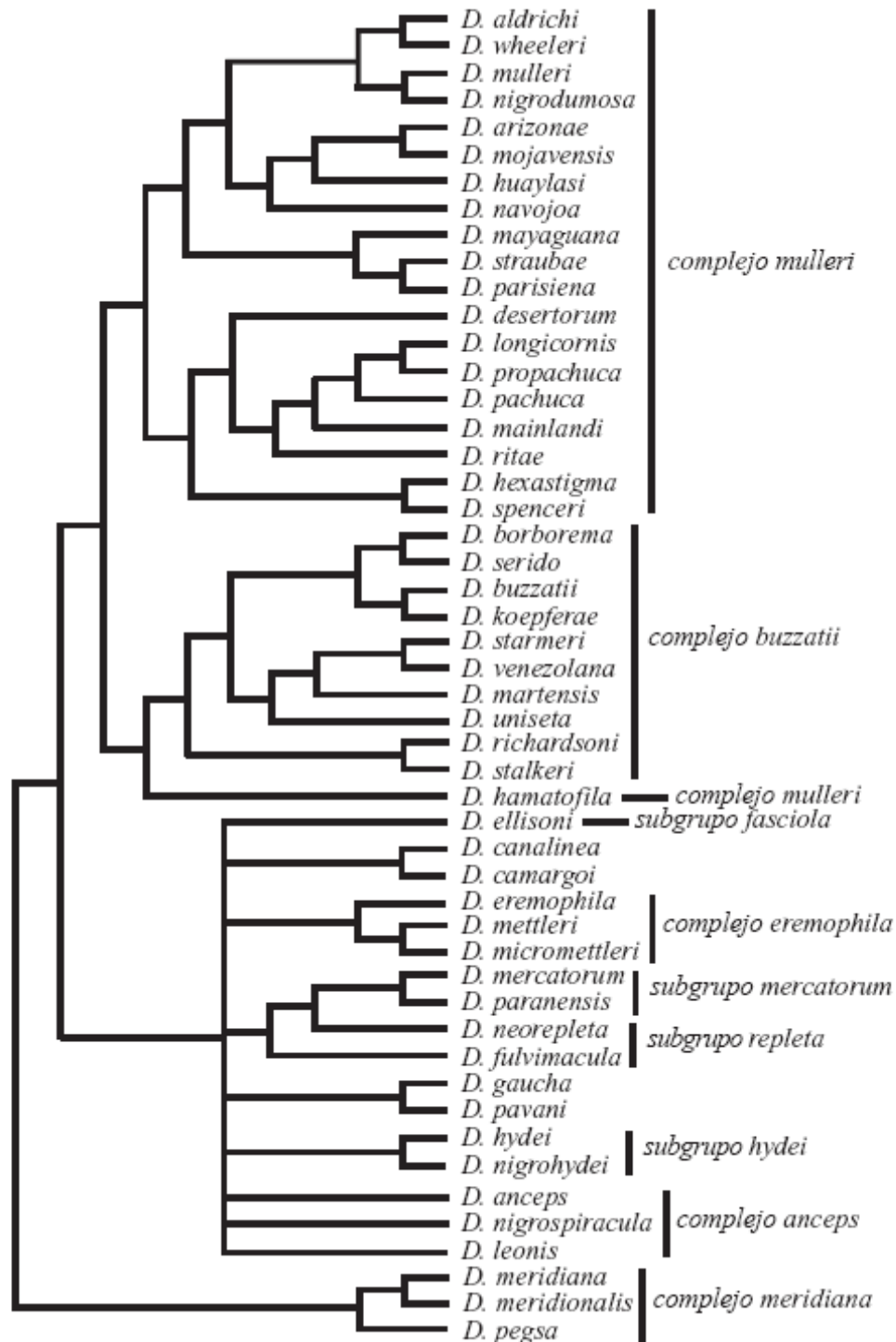


Figura 1.1. Relaciones filogenéticas entre las especies del grupo *repleta* (Modificado de Durango 2000)

El cluster *D. buzzatii*.

El cluster *buzzatii* junto con los clusters *stalker*i y *martensis* forman el complejo *buzzatii*. La relación de aquél con el resto del grupo *repleta* se ha establecido mediante la comparación del patrón de bandas de los cromosomas politénicos. Las inversiones que caracterizan a las especies del complejo se han superpuesto a otras inversiones fijadas que son características de la forma ancestral hipotética denominada PRIMITIVO I (Ruiz & Wasserman 1993).

Los estudios citológicos del complejo *buzzatii* sugieren que el grupo más ancestral sería el cluster *stalker*i, el cual se encuentra distribuido en el Caribe y la península de Florida, en tanto que el más derivado sería el cluster *martensis*, que se encuentra en Venezuela, Colombia y Perú. Y, finalmente, el cluster *buzzatii*, distribuido en Brasil, Argentina, Paraguay y Bolivia, ocuparía una posición intermedia entre los dos taxa anteriores (Ruiz & Wasserman 1993).

Hasta 1988, las únicas especies reconocidas como integrantes del cluster *buzzatii* eran *D. buzzatii*, *D. serido* y *D. borborema* (Vilela & Sene 1977, Wasserman 1982, Vilela *et al.* 1983). Sin embargo, estudios posteriores de los cromosomas politénicos (Ruiz *et al.* 1982, Tosi & Sene 1989), el cariotipo metafásico (Baimai *et al.* 1983), la morfología de la genitalia masculina (Fontdevila *et al.* 1988, Silva & Sene 1991) y el aislamiento reproductivo (Bizzo 1983, Hasson 1988, Fontdevila *et al.* 1988), llamaron la atención sobre ciertas poblaciones del noroeste argentino y el nordeste brasilero que parecían indicar la presencia de más de 3 especies en el cluster. Así es como la evidencia, en una primera instancia, llevó a considerar, a *D. serido* como una especie politípica (Sene *et al.* 1982, 1988). Años más tarde algunos de los morfotipos descritos por Sene y colaboradores dentro de la denominada “superespecie” *D. serido* se elevaron a la categoría de especie. Estas especies nuevas fueron denominadas *D. koepferae*, *D. seriema*, *D. gouveai* y *D. antonietae*, las que junto a *D. serido* y *D. borborema* constituyen actualmente el denominado “*D. serido* sibling set” (Tidon-Sklorz y Sene 2001). De esta manera se puede decir que, en la actualidad, el cluster *buzzatii* está conformado por *D. buzzatii* y las seis especies del set *D. serido*.

Sin embargo, las relaciones filogenéticas dentro del cluster *buzzatii* todavía no han sido totalmente dilucidadas ya que los datos moleculares, cromosómicos y morfológicos han provisto evidencia contradictoria (Figura 1.2, Manfrin & Sene 2006). Si bien hay un consenso general en la posición basal de *D. buzzatii*, todavía se discute si *D. koepferae* debe ser considerada la especie hermana de ésta o, por el contrario, sería la

especie más basal del set *D. serido*. La morfología externa y los estudios de ADN mitocondrial apoyan la primer hipótesis (Fontdevila *et al.* 1988, Manfrin *et al.* 2001), en tanto que el análisis de la morfología del aedeago apoya el segundo escenario (Silva & Sene 1991).

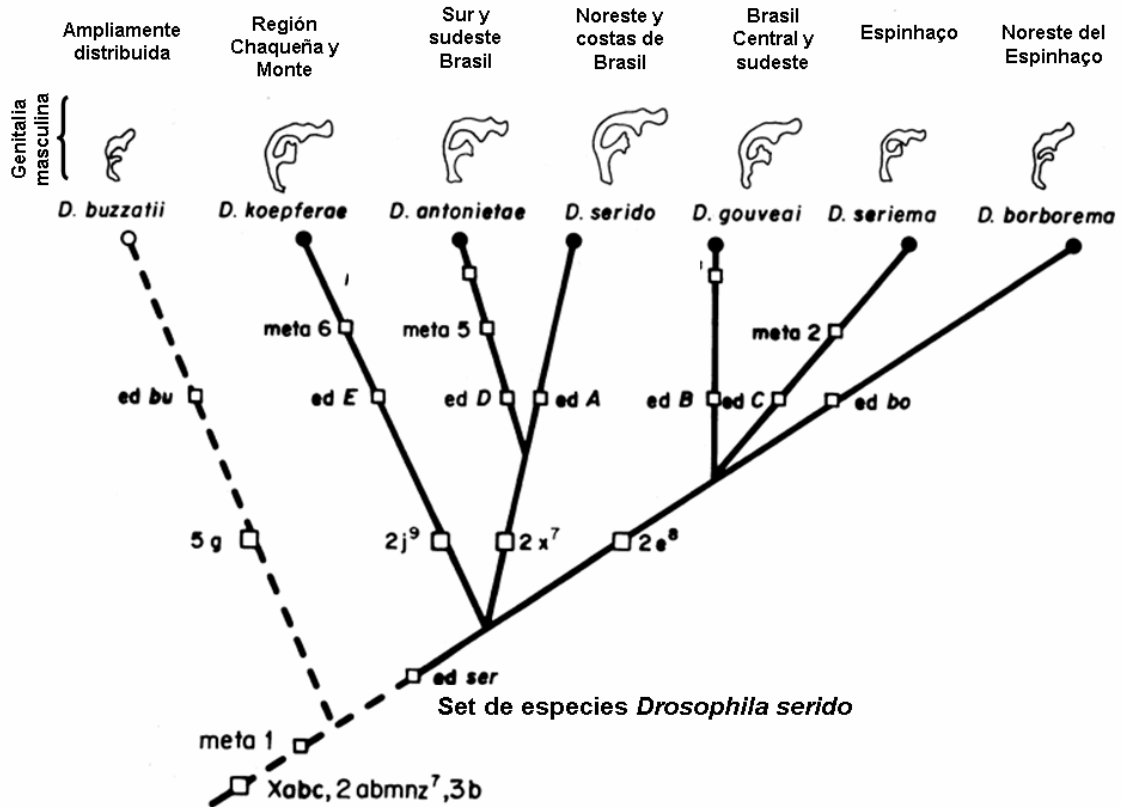


Figura 1.2: Árbol filogenético del cluster *buzzatii* basado principalmente en inversiones cromosómicas. **ed A–E:** morfotipos de aedeagos (genitalia masculina) según Silva & Sene (1991). **bu:** *D. buzzatii*; **bo:** *D. borborema*; **meta:** tipos de cromosomas metafásicos según (Baimai *et al.* 1983). La línea llena indica las relaciones de las especies incluidas dentro del grupo denominado “sibling set de *D. serido*” (Tidon-Sklorz & Sene 1995b). Sobre los nombres de las especies se ilustran los contornos de los aedeagos y se indica la distribución geográfica en Sudamérica. Figura modificada de Manfrin & Sene (2006)

Asociación con los sustratos de cría: las *Drosophilas* cactófilas.

Drosophila ha tenido un rol históricamente central en el desarrollo de la genética y la biología evolutiva (Patterson & Stone 1952, Carson 1971, Powell 1997). Las especies colectadas con facilidad en la naturaleza a partir de cebos fermentados de fruta y criados en condiciones de laboratorio rápidamente se volvieron organismos modelo. Sin embargo, se hizo evidente que especies cosmopolitas y comensales que se crían fácilmente en el laboratorio como *D. melanogaster* no se prestaban para abarcar el

estudio de todos los aspectos del proceso evolutivo. En cambio, otras especies “enteramente salvajes” y cuyas historia de vida no están tan relacionadas con las actividades humanas (Sturtevant 1921) son más adecuadas para estudios evolutivos que incluyan la dimensión ecológica. Si los estudios genético-poblacionales se realizan en especies en las que se desconocen la ecología o las condiciones específicas que moldearon la historia evolutiva de los organismos los resultados nunca van a ser concluyentes. En los modelos de *Drosophila* tradicionales de la Genética Evolutiva, el interés en el estudio de los sitios de cría ha sido relativamente menor. Sin embargo, el modelo ideal no existe ya que aquellas especies para las cuales se conocen los sitios de cría naturales no pueden criarse en el laboratorio, mientras que los sustratos de cría de las que pueden mantenerse fácilmente en el laboratorio (*D. pseudoobscura*, *D. robusta*, *D. subobscura*) son desconocidos o experimentalmente intratables. Sólo en algunos grupos de especies esta vertiente temática es abordable tanto a través de estudios de campo como experimental.

En las zonas áridas de América se encuentran, como una parte conspicua de la flora, cientos de especies de cactáceas que, a su vez, son los hospedadores naturales de una gran variedad de especies de *Drosophila*, principalmente del extenso grupo *D. repleta*. Estas moscas pertenecen a un grupo de especies adaptadas a vivir en condiciones hostiles para otras especies del género (Patterson & Stone 1952, Heed 1982, 1989). En ese sentido, las moscas cactófilas adquieren relevancia por cumplir con los requisitos necesarios para convertirse en modelos de estudios evolutivos: no son, en líneas generales, especies comensales del hombre, tienen sustratos de cría conocidos, accesibles y además, algunas de estas moscas son relativamente fáciles de mantener en laboratorio.

En el continente americano hay tres regiones donde las comunidades de drosófilas cactófilas se han estudiado exhaustivamente. En Norteamérica, el sistema *Drosophila*-cactus mejor conocido es el conjunto de especies que habitan el desierto de Sonora. En tanto que en Sudamérica se conocen con un cierto grado de detalle por un lado, las especies que habitan las tierras áridas del norte de Venezuela y Colombia y por otro, aquellas que se han diversificado en asociación con las áreas desérticas de Argentina y Brasil. Además, varias especies del grupo *D. repleta* han sido introducidas involuntariamente por el hombre en otros continentes (Oceanía, Asia, Europa y África) a través del transporte pasivo junto con sus plantas hospedadoras.

Un aspecto interesante de la naturaleza cactofílica de estas moscas es la posibilidad de relacionar los procesos de diferenciación del grupo con los periodos de expansión y retracción de la vegetación xérica en Sudamérica, durante los periodos de cambio climático ocasionados, por ejemplo, por las glaciaciones (Sene *et al.* 1988). El hecho que las especies del cluster *D. buzzatii* dependan de tejidos necróticos de cactus como recurso de alimentación es lo que determina que la actual distribución del grupo esté restringida a regiones donde abundan las cactáceas como la Caatinga brasilera, el Monte argentino, el Chaco xérico y otras áreas donde hay menos cactus que sin embargo sirven de sustento a poblaciones de menor tamaño de estos drosófilidos.

El conocimiento de la ecología, en relación al uso de plantas hospedadoras, en el cluster *buzzatii* está principalmente limitado a *D. buzzatii* y *D. koepferae* (Hasson *et al.* 1992, Fanara *et al.* 1999, 2006). Dentro de su rango de distribución ancestral, estas especies son simpátricas en el noroeste argentino y en el sur de Bolivia (Figura 1.3, Fontdevila *et al.* 1988; Hasson *et al.* 1992) y los registros de emergencia en la naturaleza indican que ambas especies son capaces de aprovechar los cladodios en descomposición de varias especies del género *Opuntia* (tunas) así como los brazos necróticos de cactus columnares (cardones) de los géneros *Cereus* y *Trichocereus* (Fontdevila *et al.* 1988, Hasson *et al.* 1992). Sin embargo, *D. buzzatii* y *D. koepferae* exhiben diferencias interespecíficas en la viabilidad larvaria, el tamaño corporal, el tamaño del ala, el tiempo de desarrollo y las preferencias de oviposición que son dependientes del hospedador utilizado y que sugieren la evolución de adaptaciones que les permitieron explotar recursos con características diferentes en lo que hace a su composición química y predictibilidad espacio-temporal (Fanara *et al.* 1999, 2004). Por esta razón, y a modo de simplificación, podemos considerar que mientras *D. buzzatii* se cría principalmente en *Opuntia*, los hospedadores primarios de *D. koepferae* son cactus de tipo columnar como los cardones de los géneros *Cereus* y *Trichocereus*.

Los estudios de los polimorfismos de inversión en *D. buzzatii* han provisto de evidencia suficiente que permite inferir que la selección natural actúa en distintos estadios del ciclo de vida (Ruiz *et al.* 1986, Hasson *et al.* 1991). Sin embargo, la explotación de diferentes especies de *Opuntia* no parece imponer presiones de selección diferencial a lo largo del ciclo de vida de esta especie (Fanara *et al.* 1996). En efecto, las frecuencias de los ordenamientos cromosómicos más frecuentes en diferentes estadios del ciclo de vida no difieren entre muestras de individuos asociados a los cladodios en descomposición de *Opuntia ficus-indica* y *O. quimilo*. A su vez, en Australia donde se

han introducido en tiempos recientes varias especies de *Opuntia* se ha observado que *D. buzzatii* (involuntariamente también introducida) no muestra preferencia por alguna de las especies en el momento de elegir sitios para la oviposición (selección de hábitat), sino que diferentes genotipos multiloci (a nivel de varios loci aloenzimáticos) muestran diferente preferencia por las levaduras específicas que habitan los tejidos necrosados (Barker *et al.* 1994). En general, estos resultados sugieren que las opuntias, representativas de las cactáceas químicamente más sencillas y quizás de las plantas hospedadoras ancestrales para muchas especies del grupo *D. repleta*, no parecen imponer un desafío adaptativo diferencial para las moscas que las utilizan, a diferencia de las que se crían en cactáceas químicamente más complejas como los columnares (Ruiz y Heed 1988).

En las otras especies, la información con que se cuenta acerca de los sitios de cría en la naturaleza es escasa y limitada a registros de emergencia en el campo o inferencias basadas en la co-distribución de especies de moscas y cactus (revisado en Manfrin y Sene 2006). Por ejemplo, *D. serido*, *D. seriema* y *D. borborema* coexisten en vastas regiones del noreste brasileño donde la diversidad específica de cactáceas es muy alta (Vilela & Sene 1977, Vilela *et al.* 1983, Tidon-Sklorz & Sene 1995a), pero debido a la falta de estudios enfocados en la ecología de estas especies, todavía no contamos con información sobre cuales de ellas son sus hospedadores específicos. En este sentido, el único aporte es el de Vilela y Sene (1977), quienes reportaron la emergencia de *D. borborema* de *Pilosocereus piauhyensis*. Un poco más preciso es el caso de *D. serido*, la cual parece estar asociada a *Cereus pernanbucensis* en el sur del estado de Sao Paulo y a *Opuntia monacantha* en las regiones costeras de Santa Catarina (Vilela & Sene 1977, Bizzo & Sene 1982, Ruiz *et al.* 2000).

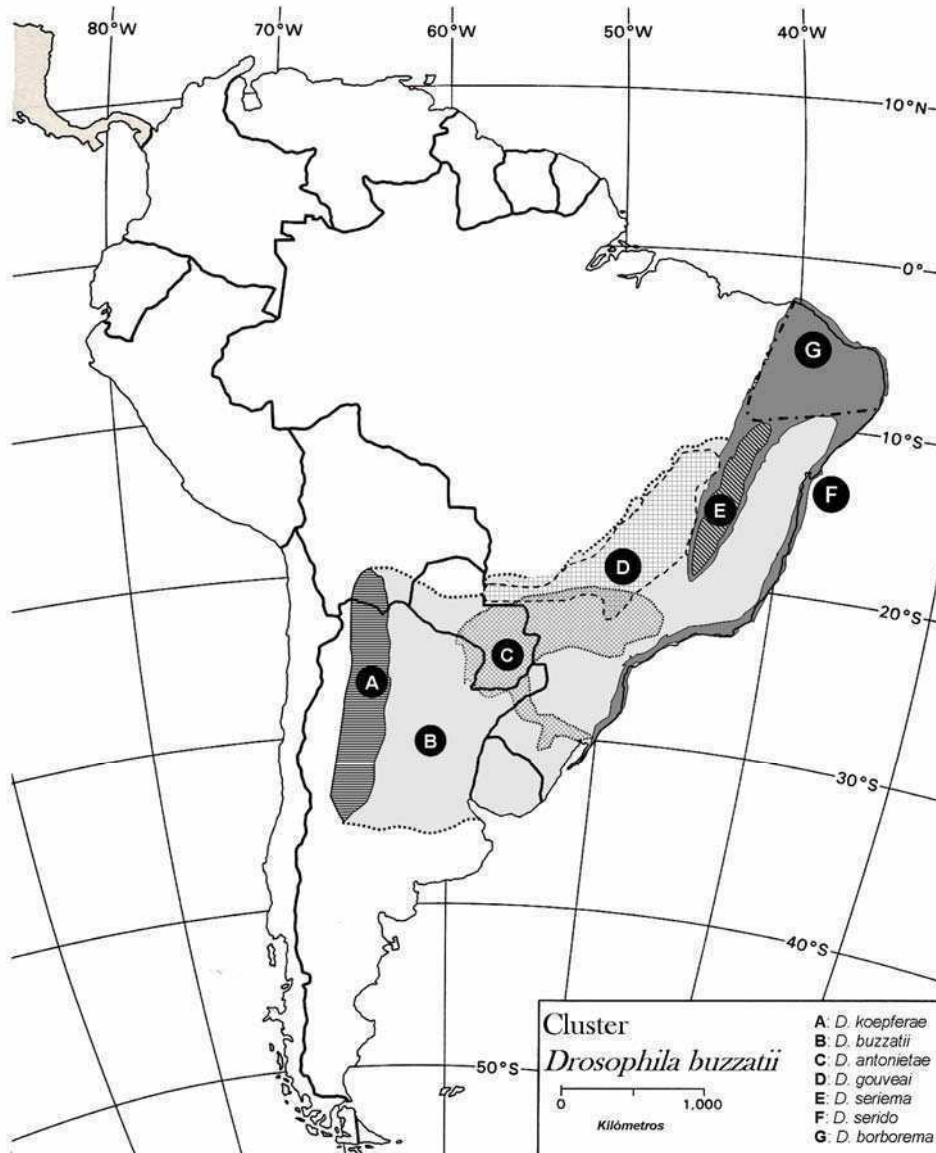


Figura 1.3: Distribución geográfica de las especies que conforman el cluster *D. buzzatii*. La distribución de *D. buzzatii* incluye al del resto de las especies del cluster. También se encuentra distribuida en Europa y Australia por introducción antrópica.

Generalidades morfológicas del cluster

Siguiendo el patrón morfológico típico de los insectos, los cuerpos de las moscas adultas se pueden dividir en tres tagmas o regiones principales: cabeza, tórax y abdomen. En cada tagma hay gran variedad de estructuras que han sido descriptas, estudiadas y utilizadas como caracteres de importancia taxonómica en la familia Drosophilidae (McAlpine 1981). Actualmente existen varias revisiones de la morfología de los drosófilidos (ver por ejemplo Sturtevant 1942, Ferris 1950, Wheeler 1982, Grimaldi 1990). El aspecto general de todas las especies del cluster es muy similar. De hecho, las hembras de las diferentes especies son prácticamente indistinguibles entre sí

y cuando son colectadas en las poblaciones naturales sólo pueden identificarse a través de la inspección de la genitalia de los machos de su descendencia. En la Figura 1.4 se puede observar el aspecto típico de los machos del cluster. Pasaremos a detallar a continuación los aspectos morfológicos más relevantes para los estudios del presente trabajo.

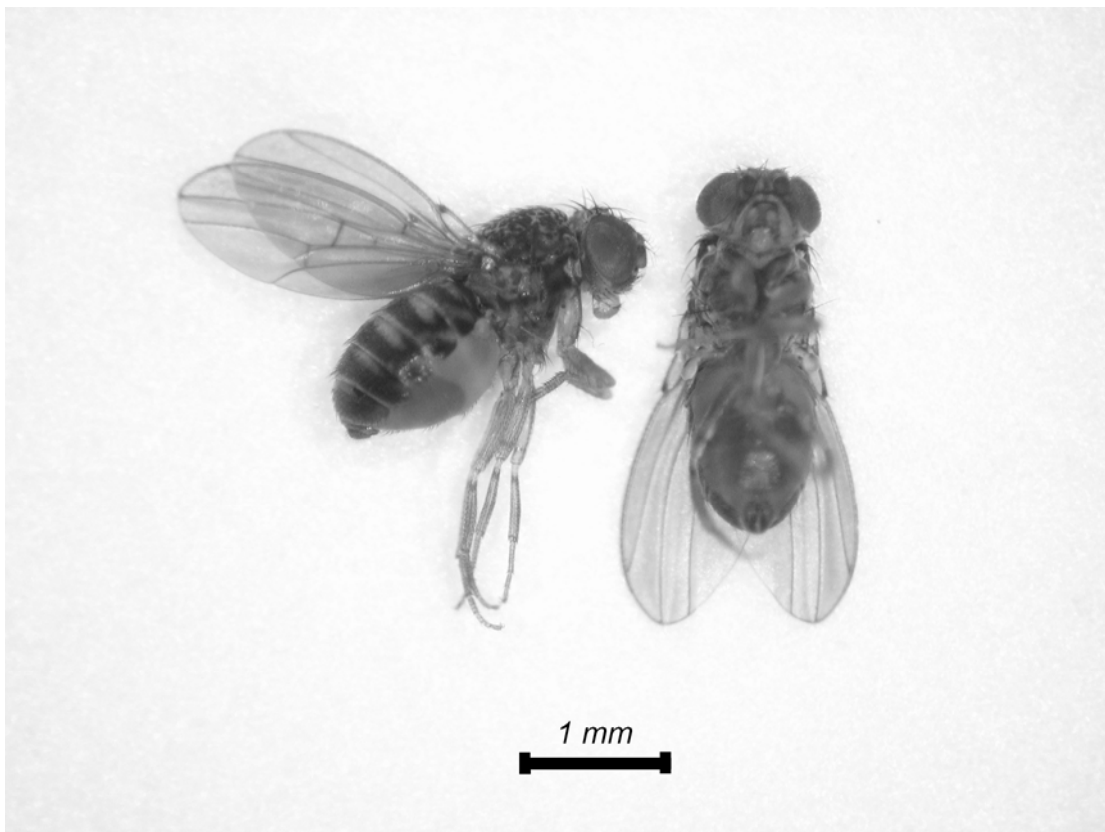


Figura 1.4: Machos de *D. buzzatii* como ejemplos del aspecto externo de las especies del cluster *D. buzzatii*.

La morfología alar

El único par de alas de los dípteros se encuentra adosado al segmento mesotorácico. Además de permitir la obvia función de vuelo, participa del cortejo ya que con ellas los machos producen vibraciones que funcionan a modo de “canto nupcial” (Etges *et al* 2007). En algunas especies las alas presentan coloraciones específicas y, si bien el patrón de venación se encuentra relativamente conservado, algunos taxa como el grupo de especies *planitibia* de drosófilas hawaianas presentan venas cruzadas extras al patrón general.

Tradicionalmente, los patrones de venación y el tamaño del ala no fueron considerados caracteres con valor diagnóstico en el cluster *buzzatii*. Recién en el año

2004, se exploró la posibilidad de utilizar la morfología del ala como criterio sistemático, estudiando la divergencia en la morfología del órgano entre las 7 especies del cluster (Moraes et al., 2004). Estos autores encontraron que la morfología alar permitía discriminar entre especies y que las posiciones de la vena marginal y anterior cruzada eran especialmente informativas (ver Figura 3.1, Capítulo III). Si bien se desconocen los patrones y fuentes ambientales o ecológicas de variación en la conformación alar sí se cuenta con un mayor caudal de información sobre la variación en tamaño y aspecto general del ala en las especies argentinas del cluster: *D. buzzatti* y *D. koepferae* (Carreira et al. 2006)

La morfología genital masculina

La genitalia masculina tanto interna como externa provee a los taxónomos de caracteres útiles para identificar a las especies. El tergito 9, que en los machos también se denomina epandrium (Figura 1.5), puede poseer un número característico de lóbulos (a veces denominados paralóbulos). En disposición posterior al epandrium se encuentran el par de placas anales. La genitalia comprende, además, otra estructura que se denomina hypandrium (Figura 1.5). El aedeago o phallus se posiciona centralmente respecto al hypandrium. Está dividido en 2 partes, el basiphallus y el distiphallus, la porción intromitente del aedeago. Esta última parte puede presentar quetas, espinas y distintos grados de esclerotización. La conformación y tamaño del distiphallus es altamente variable entre las especies y esto también se observa en el cluster *buzzatii*.

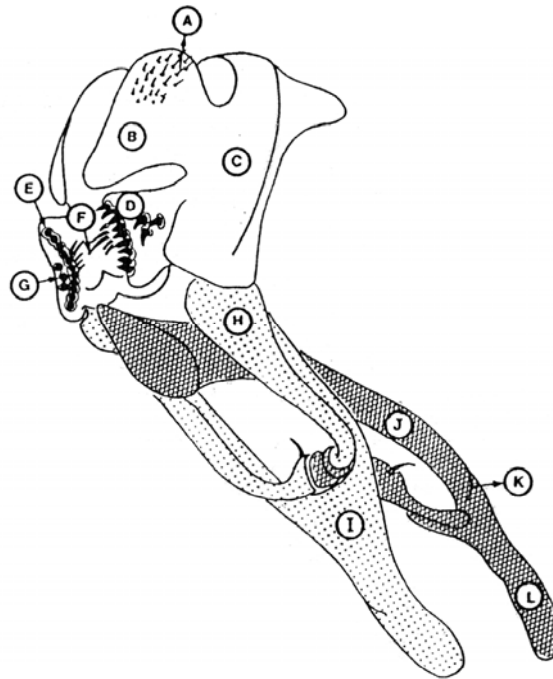


Figura 1.5: Diagrama en vista lateroblicua de la genitalia masculina. A: micropubescencia; B: cercus; C: epandrium; D: surstylus; E: dientes primarios; F: quetas marginales; G: dientes secundarios; H: concha del hypandrium; I: hypandrium; J: aedeago; K: sutura; L: apodema aedeagal. (Modificado de Vilela 1983)



Figura 1.6: Vista lateral derecha del abdomen de un macho de *D. koepferae* donde se aprecia la porción intromitente del aedeago (aumento 25x).

La morfología externa de la genitalia (epandrium, placa genital) de todas las especies del cluster es muy similar lo que dificulta su identificación. Tradicionalmente, ésta se ha basado, en el aspecto del distiphallus que difiere en forma y tamaño entre las especies (Vilela & Sene 1977; Figura 1.6). En la Figura 1.7 podemos observar el aspecto del aedeago de las distintas especies y el grado de diferenciación que presentan

entre sí. Silva y Sene (1991) describieron 5 morfotipos distintos de aedeago en *D. serido*, sólo distinguibles por diferencias cuantitativas (A-E, ver Figura 1.2). Con el fin de caracterizar los diferentes morfotipos el órgano fue dividido en cuatro regiones principales descriptas como “arcos” (Silva & Sene 1991) cuyas longitudes se utilizaron como variables en un análisis morfométrico. Los morfotipos pudieron diferenciarse entre sí en base al largo relativo. Más específicamente, la porción distal superior resultó ser la más informativa a la hora de discriminar entre morfotipos. Posteriormente, varios de estos morfotipos fueron reconocidos como especies diferentes, lo cual muestra que en ausencia de evidencia genética el aedeagus es lo único que permite diagnosticar con certeza las especies del cluster. En este sentido, conocer los patrones y procesos que rigen la divergencia interespecífica en su morfología aportaría información muy valiosa sobre la historia evolutiva de estas especies y los patrones de diferenciación.

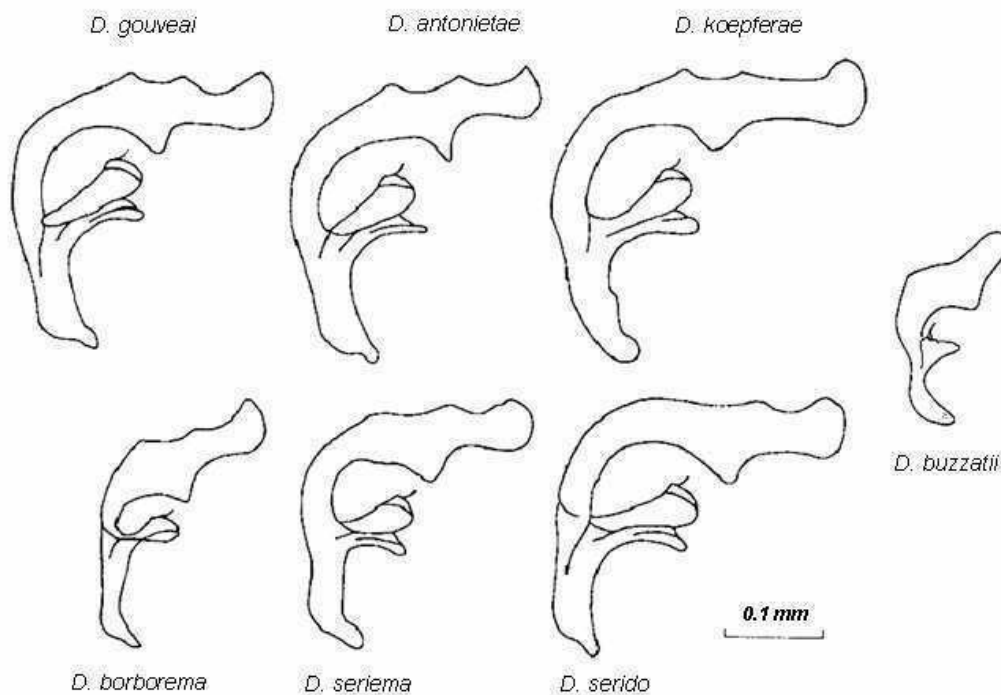


Figura 1.7: Vista lateral izquierda del aspecto del aedeago de las 7 especies del cluster *D. buzzatii*.

Evidencias de hibridación pasada y presente

Siendo un grupo en activa cladogénesis, los tiempos de divergencia entre especies varían entre pares de especies, desde algunos eventos muy recientes de un par

de decenas de miles de años como en el caso de *D. serido*/*D. antonietae*, hasta los 4 a 5 millones de años como el del par *D. buzzatii*/*D. koepferae*. Además, recientes trabajos genético-poblacionales han sugerido la posibilidad de eventos de introgresión en el grupo tanto entre *D. buzzatii* y *D. koepferae* (Gómez & Hasson 2003, Piccinali *et al.* 2004) como entre *D. antonietae* y *D. serido* (Manfrin *et al.*, 2001) y entre *D. antonietae* y *D. gouveai* (DeBrito *et al.* 2002).

Gomez y Hasson (2003) y Piccinali *et al.* (2004) estudiaron en *D. buzzatii* y *D. koepferae* la variación nucleotídica de los genes que codifican para las enzimas esterasa A y xantin deshidrogenasa respectivamente. Ambos genes se encuentran incluidos en segmentos cromosómicos involucrados en las inversiones que son polimórficas en ambas especies. En ambos trabajos los autores observaron que las variantes que segregan en ciertos sitios nucleotídicos eran compartidas por ambas especies. Si bien la observación de polimorfismos transpecíficos admite varias explicaciones alternativas, los autores concluyeron que la hipótesis más plausible parecía ser el flujo génico y/o el flujo génico seguido de selección equilibradora actuando sobre variantes de reemplazo que podría disminuir la probabilidad de pérdida aleatoria de variantes moleculares.

Por su parte, *D. antonietae* y *D. gouveai* han divergido más recientemente que el par antes mencionado (Manfrin *et al.* 2001, De Brito *et al.* 2002). En este caso particular, en una región geográfica donde coinciden las áreas de distribución de ambas especies¹, se han encontrado haplotipos mitocondriales de *D. antonietae* en individuos caracterizados morfológicamente como *D. gouveai* sugiriendo que estos individuos pertenecen a linajes introgresantes y que la región geográfica podría ser considerada una zona de contacto secundario (De Brito *et al.* 2002). De esta manera queda perfilado un escenario cladogenético algo mas complejo que el de un modelo de especiación simple con aislamiento geográfico completo.

De este breve repaso de las características principales del cluster *buzzatii* se desprende que contamos con especies que pueden ser modelos propicios para abordar el estudio de las bases genéticas y ecológicas de la divergencia morfológica, y, por qué no, para ahondar en los mecanismos de lo que Darwin llamó el misterio de los misterios que

¹ Y donde coexisten sus respectivos hospedadores naturales, *C. hildmaniannus* y *P. machrisii* (Manfrin y Sene 2006).

es el origen de nueva biodiversidad. Las especies del cluster *D. buzzatii* pertenecen al género modelo por antonomasia de la biología evolutiva y sin embargo, a diferencia de otras especies de *Drosophila*, son especies para las que se cuenta con un historial frondoso de investigación de su ecología en condiciones naturales. Además, son especies nativas de nuestro subcontinente y su distribución a lo largo de regiones áridas en relación con los cactus hospedadores las hace objeto de interés biogeográfico, filogeográfico, ecológico y evolutivo. La vida en el desierto las expone a condiciones extremas de humedad y temperatura, factores que, posiblemente, imponen muy fuertes presiones de selección. Además, poseen una morfología general muy similar, pero una divergencia interespecífica en su morfología alar y genital cuyos patrones restan por ser dilucidados. El camino a hollar estudiando la evolución de este grupo es vasto y se ofrece fructífero. En los capítulos siguientes avanzaremos en varios de los aspectos que empezamos a detallar en este.

Capítulo II: Viabilidad y tiempo de desarrollo asociado al cactus hospedador

Caso de estudio: Primera evaluación de caracteres de historia de vida asociados al
hospedador en *D. antonietae* y *D. gouveai*

Resumen

Drosophila gouveai utiliza, como sustrato de cría, los tejidos en putrefacción de cactáceas del género *Pilosocereus* mientras que *D. antonietae* está asociada, principalmente, a *Cereus hildmaniannus*. En este capítulo investigamos qué efecto tiene la crianza en hospedadores alternativos sobre la viabilidad y el tiempo de desarrollo de estas dos especies. Con este objetivo procedimos a criar ambas especies en medios semi-naturales preparados, alternativamente, con tejidos fermentados de *P. machrisis* o *C. hildmannianus*.

El diseño experimental de isolíneas permitió identificar las fuentes principales de variación fenotípica. La supervivencia larvaria en *C. hildmaniannus* difirió entre las especies. Por un lado *D. antonietae* tuvo una mayor viabilidad (aunque menor que en el otro hospedador) que *D. gouveai* que apenas sobrevivió en este cactus que no es su hospedador natural.

Se realizaron cruzamientos interespecíficos para investigar las posibles bases genéticas de las diferencias observadas entre especies a nivel de los caracteres evaluados en las especies parentales. Los resultados se discuten considerando la evidencia biogeográfica, morfológica y proveniente de estudios moleculares disponibles. Se destaca la necesidad de una caracterización más completa del nicho ecológico ocupado por cada especie y de extender las presentes líneas experimentales a las otras especies del cluster con el fin de abarcar la evaluación de la importancia de la adaptación a los hospedadores naturales en los procesos de diversificación.

"En Tralfamadore, según dice Billy Pilgrim, a nadie le interesa Jesucristo. La figura terrestre que más compenetra con la mentalidad tralfamadoreana es Charles Darwin, quien enseñó que los que mueren están hechos para morir, y que cada cadáver es un progreso."

Matadero Cinco- Kurt Vonnegut

Las moscas de la fruta del género *Drosophila* se crían en tejidos vegetales necróticos y se alimentan de los microorganismos asociados al proceso de putrefacción. Sin embargo, son pocos los grupos de especies en los cuales es posible incorporar la utilización de plantas hospedadoras en el marco de estudios evolutivos. El grupo *Drosophila repleta* es uno de los más estudiados en el Nuevo Mundo, que es donde se produjo su radiación original utilizando a las cactáceas como plantas hospedadoras. Este aspecto particular de su ecología las llevó a invadir y diversificarse a lo largo de las regiones áridas de América, áreas típicamente inhóspitas para otras especies de *Drosophila* (Wasserman 1982, Throckmorton 1982).

El sistema cactus-levadura-*Drosophila* constituye un modelo largamente utilizado para investigar el rol evolutivo del uso de plantas hospedadoras (Barker y Starmer 1982, Heed y Mangan, 1986, Barker *et al.* 1990). Uno de los mejores ejemplos son los trabajos realizados en el conjunto de especies endémicas del desierto de Sonora (revisado por Heed y Mangan 1986, Fogleman y Abril 1990). Los estudios de Heed y colaboradores han llevado a dos conclusiones principales: 1) cada especie desarrolló su propio conjunto de adaptaciones al desierto y, 2) uno de los factores más importantes que determinan la especificidad de hospedador es la química del cactus (Fogleman, 1982; Fogleman y Abril, 1990).

En el Neotrópico encontramos al cluster *D. buzzatii*, un ensamble de al menos 7 especies en diferentes estadios de divergencia (Manfrin & Sene 2006) que habitan las zonas áridas de Brasil, Paraguay, Bolivia, Uruguay y Argentina (Figura 1.3). Como adelantamos en el capítulo anterior las relaciones filogenéticas del cluster no se encuentran enteramente resueltas, aunque varios estudios moleculares coinciden en señalar a *D. buzzatii* y su especie hermana *D. koepferae* como los taxa más basales. Este par de especies compartió su último ancestro común hace unos 4,5 millones de años (Gómez & Hasson 2003) y en ellas se concentra prácticamente todo el conocimiento que se tiene sobre el uso de plantas hospedadoras en el cluster (Hasson *et al.* 1992, Fanara *et al.* 1999, 2004, 2006).

D. gouveai y *D. antonietae* iniciaron su divergencia hace aproximadamente 3,3 millones de años.¹ *D. gouveai* habita desde el medio oeste brasilero hasta el límite sur del dominio del Cerrado (Tidon Sklorz & Sene 2001). Mientras que en las regiones norte y noreste de su distribución vive en áreas donde crecen varias especies de cactus columnares de los géneros *Pilosocereus* y *Cereus*, en la porción sur la especie sospechada de ser su hospedador principal es *P. machrisii* (Manfrin & Sene 2006). *D. antonietae* puede ser hallada en el sur y sureste brasileño así como en el borde oriental del Chaco de Argentina donde está asociada al columnar *C. hildmaniannus* y a la tuna *Opuntia monacantha* (Tidon Sklorz & Sene 2001, Manfrin & Sene 2006).

La información más actualizada indica que sus áreas de distribución se solapan en el límite sur del área ocupada por *D. gouveai* que a su vez constituye el límite norte de *D. antonietae* (Figura 1.3). En esta región, *D. gouveai* tiene haplotipos mitocondriales característicos de *D. antonietae* lo que sugiere que podría tratarse de un área de contacto secundario e hibridación introgresiva (De Brito *et al.* 2002). Además, en esta región las especies *C. hildmaniannus* y *P. machrisii* crecen juntas a lo largo de un corredor de unos 200 kilómetros (Manfrin & Sene 2006).

En este capítulo avanzamos hacia una caracterización más completa de los patrones de utilización de plantas hospedadoras en el cluster *D. buzzatii*. Presentamos los resultados de una investigación del desempeño (medida por la viabilidad larvaria y el tiempo de desarrollo y su asociación con el tamaño de ala) de *D. gouveai* y *D. antonietae* y de híbridos interespecíficos criados en *P. machrisii* y *C. hildmaniannus*, sus respectivos hospedadores naturales potenciales. Esto permite la primer comparación de un segundo par de especies del cluster con el ya conocido caso de *D. buzzatii*- *D. koepferae*.

Materiales y métodos

Se analizaron 5 isolíneas de *D. gouveai* y 4 de *D. antonietae*. Las mismas representaban las existencias del laboratorio de Genética Evolutiva del Departamento de Biología (Facultad de Filosofía, Ciencias y Letras, Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Brasil). Las isolíneas fueron originalmente fundadas con hembras

¹ Según estimaciones propias basadas en secuencias de ADN mitocondrial reportadas en Manfrin *et al.*

inseminadas recogidas en las localidades de Analandia (Estado de Sao Paulo), Cristalina (Goiás) y Furnas (Minas Gerais) en el caso de *D. gouveai* (detalles de los sitios de colecta en Manfrin *et al.* 2001) y en Serrana (Sao Paulo), Altinópolis (Sao Paulo) y Arroyo Texeira (Rio Grande do Sul) en el caso de *D. antonietae* (detalles en Ruiz *et al.* 2000). Los stocks fueron mantenidos en las mismas condiciones de laboratorio por tres generaciones, en botellas de 30 ml. con medio estándar de cría². En todo ese tiempo nunca estuvieron expuestas a los medios preparados con cactus en descomposición que se utilizaron en los experimentos posteriores.

En las localidades de muestreo, junto con las moscas, también fueron colectados trozos de cactus fresco y necrosis naturales de *C. hildmaniannus* y *P. machrisii*. Las piezas verdes se almacenaron a -20°C y los jugos fermentados de las necrosis se mantuvieron a temperatura ambiente adicionándole 10 gramos de cactus fresco cada 15 días hasta el comienzo de los experimentos. Durante los experimentos la temperatura se mantuvo a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y el fotoperíodo en 12:12 horas de luz-oscuridad.

Cien parejas de moscas adultas de cada línea fueron liberadas en cámaras de puesta. Dentro de estas cámaras se colocaron cajas de Petri con un medio que estimula la oviposición³. Transcurridas 12 horas se removieron las placas y se incubaron por 24 horas a 25°C hasta la eclosión de los huevos. Grupos de 30 larvas de primer estadio se sembraron en tubos de vidrio conteniendo 6 ml. de medio “semi-natural” preparado con partir de trozos de cactus fresco y fermento. Este medio se preparó licuando cactus verde y colocándolo en tubos de vidrio estériles para luego ser inoculados con 0,1 ml. del fermento de *P. machrisii* o *C. hildmaniannus* según correspondiera. Antes de ser utilizados los tubos se incubaron con el inóculo durante 24 horas a 25°C . Las larvas de primer estadio de cada línea se sembraron en ambas especies de hospedador. De cada combinación línea x especie x cactus se realizaron 4 réplicas.

Medición de los caracteres y análisis de datos.

Cada tubo proporcionó un valor de viabilidad que se estimó como la proporción de larvas sembradas (30) que alcanzaron el estadio adulto. Al ser una proporción, el

² A base de harina de maíz, agar y levadura muerta.

³ Agar al 2% +5 ml. de una solución 3:1 de etanol y ácido acético al 60%.

valor del carácter sólo puede variar entre 0 y 1. Por lo tanto, antes de ser utilizado como variable dependiente en los análisis estadísticos, se aplicó una transformación angular⁴. A partir de la observación de pupas, los tubos eran chequeados cada 4 horas durante las 12 horas de luz del ciclo y los adultos emergidos recogidos con un aspirador y su sexo determinado bajo lupa y anestesia con CO₂. A cada individuo adulto se le asignó un valor de tiempo de desarrollo calculado como el tiempo transcurrido (en horas) desde el momento en que se inició el sembrado de ese tubo y la hora media del intervalo en el que el individuo fue recolectado.

Las diferencias en viabilidad fueron puestas a prueba mediante un análisis de varianza (ANOVA) con los factores principales fijos Especie y Cactus y el factor Línea, aleatorio y anidado en Especie. Debido a que la viabilidad representa una proporción y, por lo tanto, solo puede presentar valores de 0 a 1, previo al ANOVA, procedimos a una transformación angular⁵ de los datos.

Para el análisis del tiempo de desarrollo se utilizó una transformación logarítmica de la variable en un ANOVA con Especie, Sexo y Cactus como factores principales fijos y con los factores aleatorios Línea (anidado en Especie) y Réplica (anidado en la interacción Línea por Cactus).

Correlación entre el tiempo de desarrollo y el tamaño de ala.

Adicionalmente investigamos la correlación entre el tiempo de desarrollo y el tamaño de ala, estudio estuvo motivado por trabajos previos que habían demostrado que ambos caracteres forman parte de un compromiso con base genética en *D. buzzatii* (Cortese *et al.* 2002). Se disectaron alas de machos adultos que se montaron en portaobjetos. La razón para elegir sólo un sexo se basa en la observación de que las normas de reacción de la morfología alar son similares en ambos sexos en varias especies de *Drosophila* (e.g. David *et al.* 1994). Las alas fueron posteriormente fotografiadas con una cámara digital montada en una lupa. Sobre las imágenes se digitalizaron 10 puntos de referencia anatómicos (ver Figura 3.1 y Anexo B1) en intersecciones entre venas o puntos de encuentro entre venas y el margen del ala. Se midió un total de 328 alas derechas (118 de *D. gouveai* y 210 de *D. antonietae*). El

⁴ La transformación angular consiste calcular el arco seno de la raíz cuadrada del valor en cuestión. A partir de esto, en la mayoría de los casos la variable pasa a tener una distribución normal y, por lo tanto, cumple con uno de los supuestos de la estadística paramétrica.

⁵ Consiste en reemplazar el valor por el arcoseno de su raíz cuadrada (Sokal y Rohlf 1995)

tamaño atribuido a cada ala fue el tamaño de centroide de la configuración de los puntos anatómicos que se define como la raíz cuadrada de la suma de las distancias de cada punto de referencia anatómico al centroide (centro de gravedad o punto medio) de la configuración (Dryden & Mardia, 1998; ver Anexo B1). La relación entre el tamaño alar y el tiempo de desarrollo se puso a prueba mediante el cálculo de correlaciones de Pearson.

Viabilidad y tiempo de desarrollo de híbridos interespecíficos

Se eligieron al azar dos isolíneas de cada especie para generar híbridos interespecíficos. Se intentaron todas las combinaciones posibles de cruzamientos en ambas direcciones disponiendo en cajas de puesta 25 hembras vírgenes maduras de una línea y especie con 50 machos maduros de una línea de la otra especie. Las cajas de Petri con medio de oviposición fueron removidas cada 12 horas y examinadas para comprobar la presencia de huevos fecundados⁶. El diseño para la determinación de la viabilidad y el tiempo de desarrollo fue el mismo que el previamente descrito para las especies parentales y se hizo de manera simultánea.

Tanto la viabilidad como el tiempo de desarrollo fueron analizados mediante ANOVAs con Genotipo (con 3 niveles ambas especies parentales e híbridos) y Cactus como factores principales (fijos). En el ANOVA para el tiempo de desarrollo, en el que la unidad experimental eran los individuos emergidos, el sexo también fue incluido como factor. Con la intención de evitar un diseño no equilibrado, el factor Réplica no fue incluido en el análisis considerándose entonces las medias de los machos y hembras emergidos en cada tubo. Esta decisión conlleva a la utilización de un ANOVA más conservativo dado que las diferencias entre réplicas incrementan el factor de error.

Resultados

En la Tabla 2.1 se dan los valores medios de la viabilidad y el tiempo de desarrollo de *D. gouveai* y *D. antonietae* crecidas en ambos hospedadores.

⁶ Detectados por el grado de opacidad que presentan.

Tabla 2.1 Valores medios (y error estándar) de la viabilidad (expresada como %) y tiempo de desarrollo (en horas) de *Drosophila antonietae* y *D. gouveai* criados en *Pilosocereus machrisii* y *Cereus hildmaniannus*. N = tamaños muestrales: número de réplicas (viabilidad) o número de individuos (tiempo de desarrollo) analizados.

Carácter	Especie	Sexo	Cactus hospedador			
			<i>Pilosocereus machrisii</i>		<i>Cereus hildmaniannus</i>	
				N		N
Viabilidad	<i>D. antonietae</i>		0,84 (0,02)	16	0,48 (0,06)	16
	<i>D. gouveai</i>		0,84 (0,03)	20	0,18 (0,04)	20
Tiempo de desarrollo	<i>D. antonietae</i>	♂	260,2 (1,1)	233	278,5 (1,7)	63
		♀	257,4 (1,0)	261	273,8 (1,2)	79
	<i>D. gouveai</i>	♂	278,6 (0,7)	244	283,4 (1,6)	56
		♀	277,9 (0,7)	275	284,6 (1,7)	52

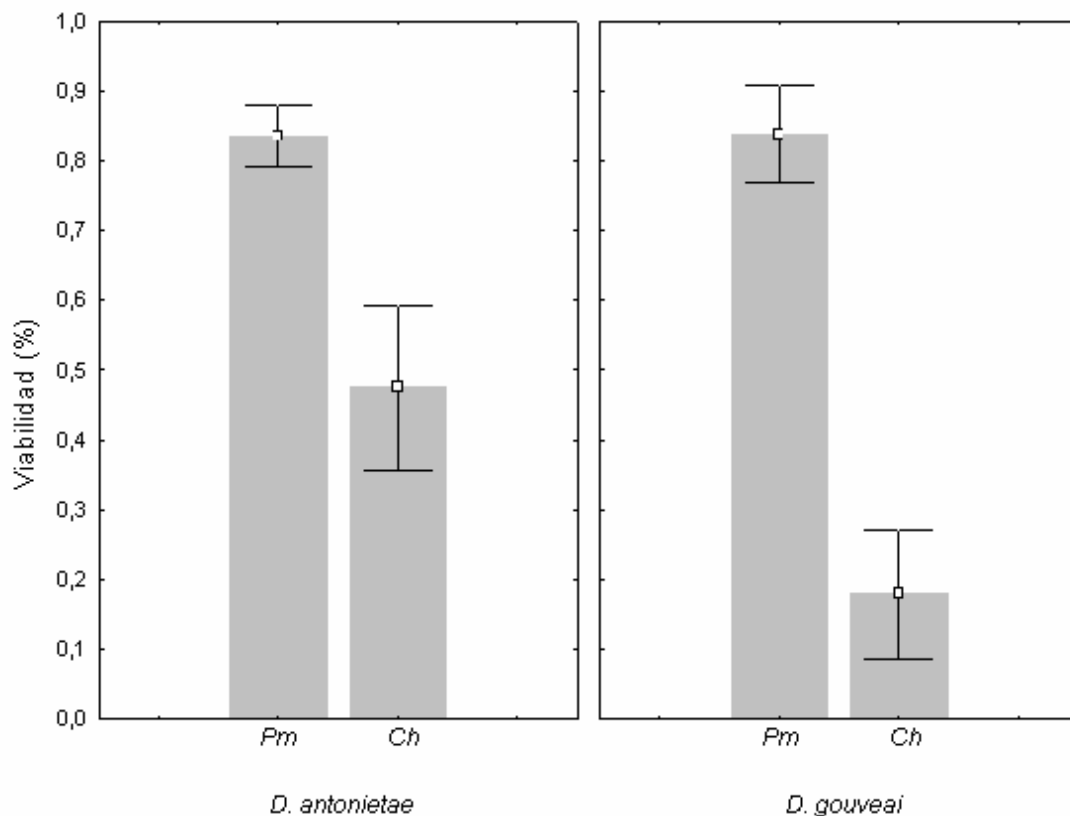


Figura 2.1 Viabilidad media (expresada como la proporción del total de larvas sembradas que emergieron como adultos) e intervalos de confianza para *Drosophila antonietae* y *Drosophila gouveai* criadas en *Pilosocereus machrisii* (Pm) y *Cereus hildmaniannus* (Ch).

Viabilidad

Los dos cactus hospedadores analizados tuvieron un fuerte efecto en la viabilidad de ambas especies (Tabla 2.2). Las diferencias de viabilidad entre especies variaron en magnitud entre cactus según lo indica la interacción significativa (Figura 2.1, Tabla 2.2). Contrastes a posteriori⁷ mostraron que las diferencias de viabilidad entre especies fueron significativas solamente en *C. hildmannianus* donde la proporción de larvas viables de *D. antonietae* (48 %) fue mayor que en *D. gouveai* (18 %) ($p < 0,001$, Figura 2.1). Además, la crianza en *C. hildmannianus* exacerbó las diferencias entre los genotipos representados por las distintas líneas de ambas especies. La interacción Línea por Cactus significativa (Tabla 2.2) indica que las diferencias de viabilidad entre las isolíneas de la misma especie variaron entre hospedadores. La inspección detallada de los datos de viabilidad mostró que la variación fue mayor en *C. hildmannianus* que en *P. machrisis* (Figura 2.2).

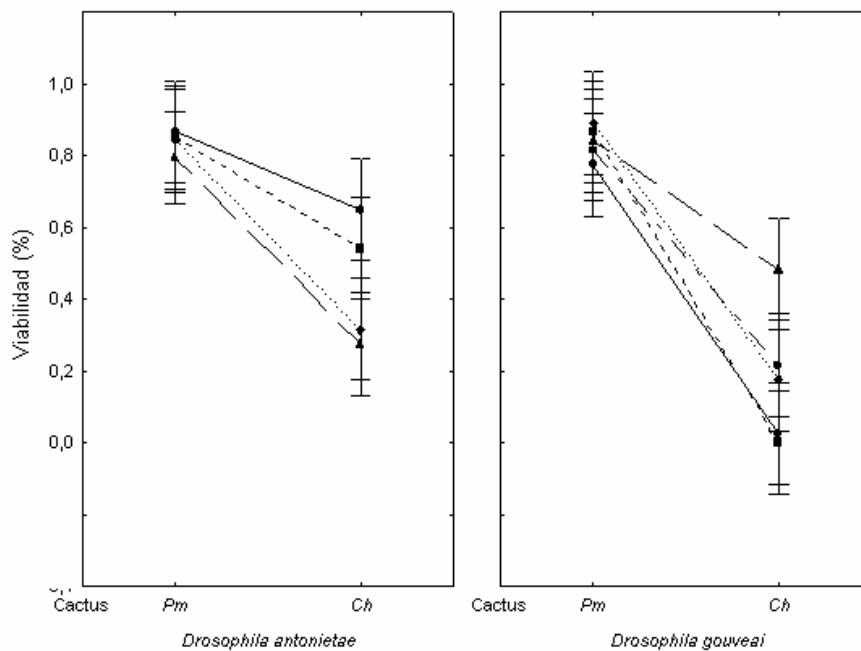


Figura 2.2 Patrones de variación en la viabilidad (expresada como la proporción del total de larvas sembradas que emergieron como adultos) entre isolíneas de *Drosophila antonietae* y *Drosophila gouveai* criadas en *Pilosocereus machrisii* (Pm) y *Cereus hildmannianus* (Ch).

⁷ Contrastes de Tukey para muestras con tamaños muestrales distintos

Tabla 2.2 ANOVAs de la viabilidad y el tiempo de desarrollo. SP: Especies; gl: grados de libertad; CM: cuadrados medios

Carácter	Fuentes de variación	gl	CM	F
<i>Viabilidad</i>	SP	1	0.51	3.89
	Cactus	1	7.43	56.47**
	SP x Cactus	1	0.92	6.97*
	Línea (SP)	7	0.13	1.00
	Línea (SP) x Cactus	7	0.13	3.25*
	Error	54	0.04	
<i>Tiempo de desarrollo</i>	SP	1	24464	5.5*
	Cactus	1	13720	117.7**
	Sexo	1	269	4.97*
	SP x Cactus	1	538	4.61
	SP x Sexo	1	500	9.49**
	Cactus x Sexo	1	3	0.03
	SP x Cactus x Sexo	1	184	2.54
	Línea (SP)	8	8431	70.42*
	Línea (SP) x Sexo	8	33	0.52
	Línea (SP) x Cactus	6	128	0.55
	Línea (SP) x Sexo x Cactus	5	70	0.74
	Réplica (Línea (SP) x Cactus)	52	435	4.42**
	Réplica (Línea (SP) x Cactus) x Sexo	48	99	1.12
	Error	1127	89	

* $p < 0.005$; ** $p < 0.001$.

Tiempo de desarrollo

En promedio, *D. antonietae* se desarrolló más rápidamente que *D. gouveai*, las hembras fueron más rápidas que los machos y el desarrollo en *P. machrisis* fue más rápido que en *C. hildmaniannus* (Figura 2.3, Tabla 2.2). También resultaron significativos los factores aleatorios Línea (anidado en Especie) y Réplica, los cuales indican que hay variabilidad genética para el carácter en las dos especies⁸ y una varianza ambiental importante (que fue incluida en las réplicas). Asimismo, la interacción Especie (SP) por Sexo significativa indica que la magnitud del dimorfismo sexual para este carácter fue distinta en cada especie (Tabla 2.2).

⁸ Interpretación del factor línea significativo siguiendo a David *et al.* 2005

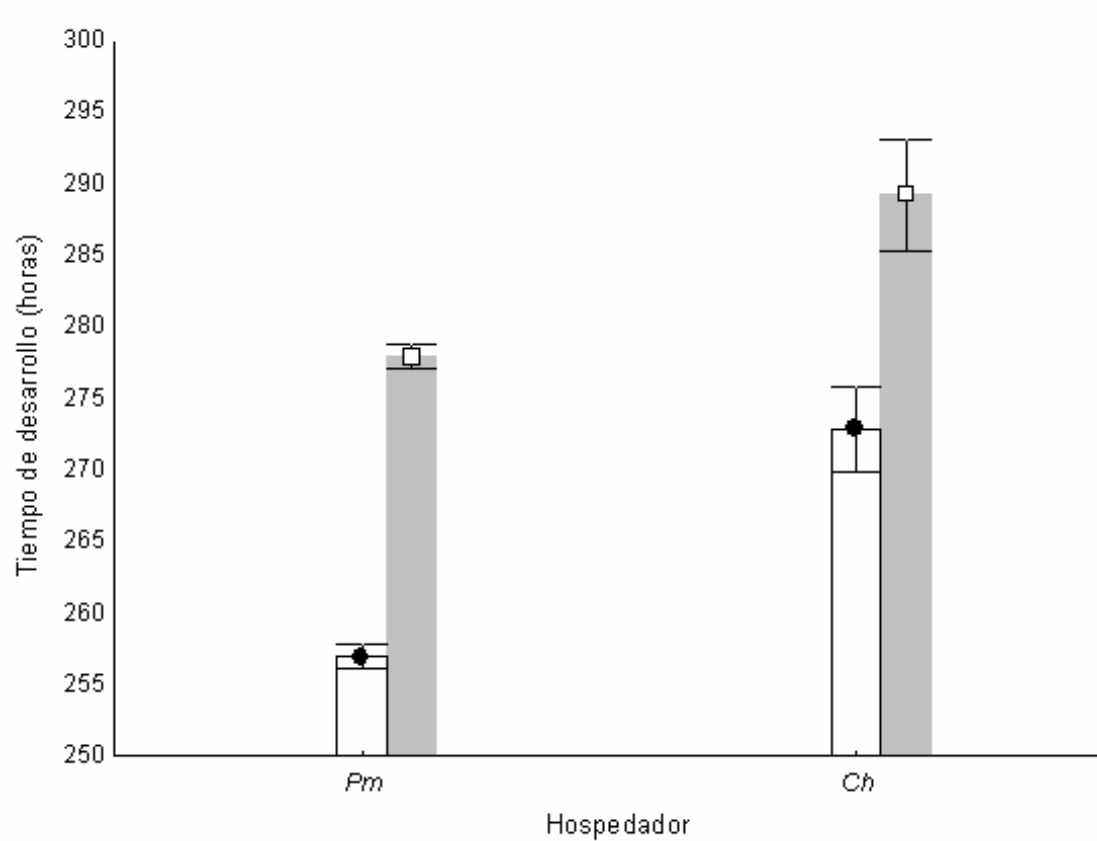


Figura 2.3 Tiempo de desarrollo medio (sexos promediados) de *Drosophila antonietae* (barras blancas) y *Drosophila gouveai* (barras grises) criadas en *Pilosocereus machrisii* (Pm) y *Cereus hildmaniannus* (Ch).

Correlación entre el tiempo de desarrollo y el tamaño de ala.

El tiempo de desarrollo y el tamaño de ala estuvieron correlacionados únicamente en *D. antonietae*. La correlación fue significativa y con signo negativo ($r = -0,39$; $p = 0,021$). Sin embargo éste no fue el caso de *D. gouveai* en la que si bien el coeficiente de correlación fue negativo no fue significativo ($r = -0,18$; $p = 0,29$). Sin embargo, incluso en el caso de *D. antonietae*, se observó una relación lineal poco clara entre ambos caracteres tal como lo refleja la dispersión de los puntos y los bajos valores de R^2 para el modelo (Figura 2.4).

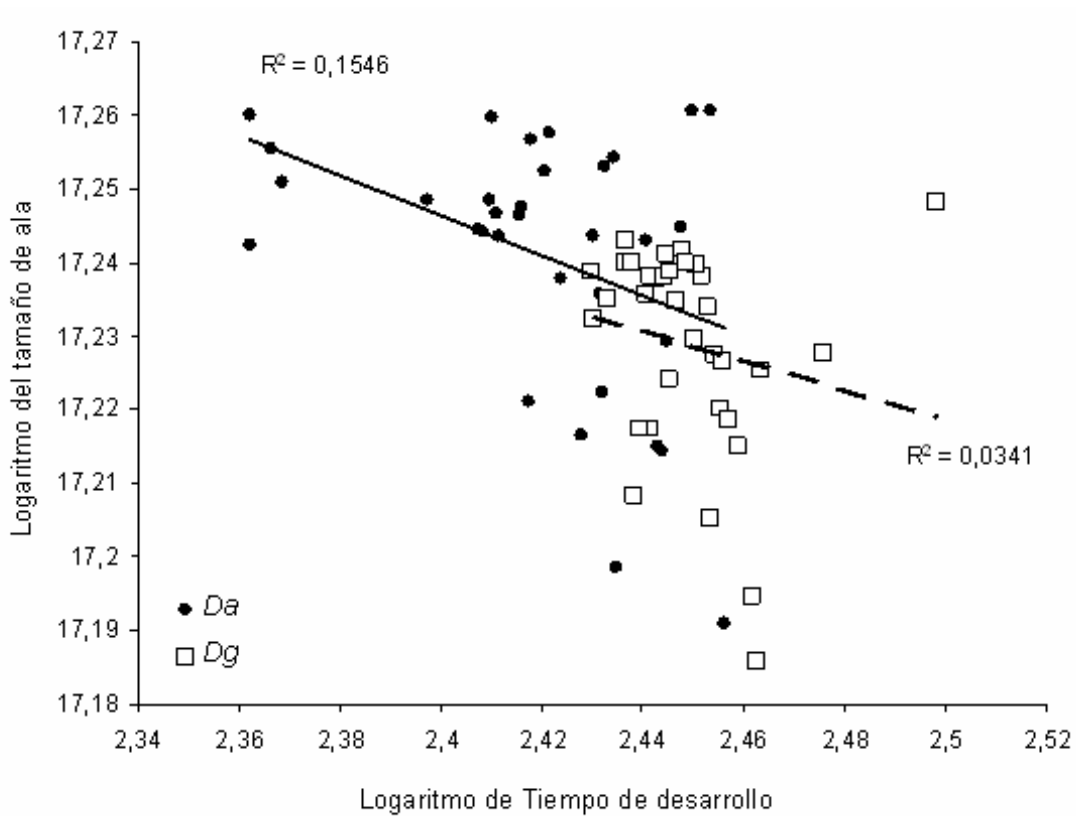


Figura 2.4 Tamaño de ala y tiempo de desarrollo medio de machos de los tubos replicados de *D. antonietae* (*Da*) y *D. gouveai* (*Dg*) (ambos hospedadores considerados). La tendencia lineal se muestra como una línea continua para *D. antonietae* e interrumpida para *D. gouveai*.

Viabilidad y tiempo de desarrollo de híbridos interespecíficos

Solamente uno de los cuatro cruzamientos interespecíficos que se intentaron resultó exitoso lo que reafirma las observaciones previas que sugieren un fuerte aislamiento precigótico entre *D. antonietae* y *D. gouveai*. El único cruzamiento que produjo una cantidad suficiente de progenie como para investigar el desempeño de los híbridos en ambos hospedadores fue ♀ *D. gouveai* x ♂ *D. antonietae*. Seiscientas larvas de primer estadio, descendientes de este cruzamiento, se sembraron en veinte tubos (diez por cada tipo de cactus).

El porcentaje de larvas híbridas viables rondó el 60 %. Los datos de viabilidad se analizaron mediante un ANOVA que mostró un efecto significativo del factor cactus ($F_{1, 31} = 36,35$; $p < 0,0001$). Las comparaciones *a posteriori* mostraron que la viabilidad de los híbridos (0,83) no difirió de la de las especies parentales (0,84 para ambas, $p > 0,05$ en todos los casos; tests de Tukey) en *P. machrisii*. Por el contrario, las

viabilidades de *D. antonietae* (0,46) y de los híbridos F1 (0,39) en *C. hildmaniannus* fueron significativamente mayores⁹ que la de *D. gouveai* (3 %; $p < 0,001$ en ambas comparaciones, Figura 2.5a).

El análisis del tiempo de desarrollo mostró diferencias significativas entre genotipos ($F_{2, 569} = 267$; $p < 0,0001$) y entre moscas emergidas de distintos cactus hospedadores ($F_{1, 569} = 27$; $p < 0,0001$). Todas las comparaciones de a pares entre genotipos fueron significativas. En promedio, los híbridos se desarrollaron más lentamente que ambas especies parentales en ambos cactus (300,7 horas promedio para los híbridos, 267 y 287,5 horas para *D. antonietae* y *D. gouveai*, respectivamente) y, en general, las moscas se desarrollaron más rápidamente en *P. machrisis* que en *C. hildmaniannus* (Figura 2.5b)

Los machos híbridos maduros se colocaron en frascos con alimento con hembras vírgenes de una u otra especie parental. No obstante los múltiples cortejos y cópulas observados, al cabo de una semana no se verificó la presencia de descendientes, dando cuenta de la esterilidad de los machos como previamente se ha informado para los híbridos F1 de sexo masculino entre la mayoría de las especies del cluster (Marín *et al.* 1993)

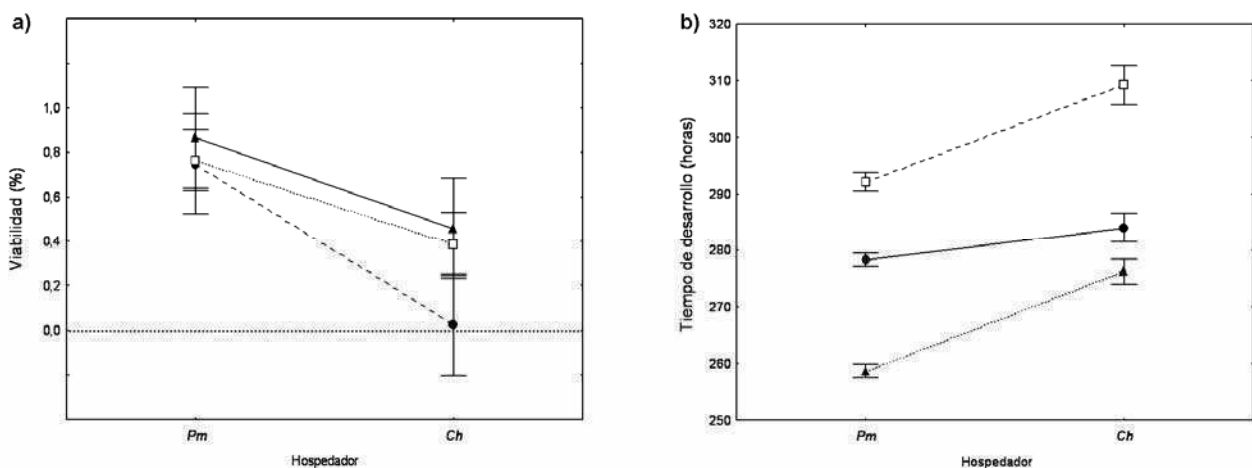


Figura 2.5 Viabilidad larvaria (a) y tiempo de desarrollo (b) medio (e intervalos de confianza) de los genotipos involucrados en cruzamientos interespecíficos. *Drosophila antonietae* (▲), *Drosophila gouveai* (●) e híbridos interespecíficos (□) criados en *Pilosocereus machrisii* (Pm) y *Cereus hildmaniannus* (Ch).

⁹ No distintas entre sí.

Discusión

En la actualidad se desconoce la importancia del grado de especialización en el uso de plantas hospedadoras como factor causal de la diversificación en el grupo de especies que forman el cluster *D. buzzatii*. La principal causa es la falta de información ecológica relevante en la mayoría de los taxa (Manfrin & Sene 2006). Este estudio revela la fuerte influencia de la naturaleza del hospedador en caracteres de historia de vida tan importantes como la viabilidad y el tiempo de desarrollo en un par de especies en el que como *D. antonietae* y *D. gouveai* existe evidencia que sugiere eventos de hibridación introgresiva pasada y/o presente. El fuerte efecto del hospedador observado en el desempeño de *D. antonietae* y *D. gouveai* se condice con estudios previos realizados en el par *D. buzzatii* y *D. koepferae* en el que la evidencia sugiere un ajuste entre los caracteres de historia de vida del insecto y las características de sus hospedadores asociados (e.g. la predictibilidad espacial y temporal, Fanara *et al.* 1999 y referencias).

Por otro lado, la baja viabilidad de *D. antonietae* en su hospedador natural, *C. hildmannianus*, es inconsistente con el supuesto de que las especies, invariablemente, están adaptadas a sus hospedadores específicos. *D. antonietae* se encuentra asociada casi exclusivamente a *C. hildmaniannus* y en unas pocas localidades¹⁰ de su área de distribución se la puede encontrar asociada a *Opuntia monacantha* (Manfrin & Sene 2006). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que *C. hildmaniannus* podría representar un ambiente relativamente estresante para las moscas, no sólo por la baja viabilidad que mostraron ambas especies en este recurso, sino también por el incremento de la variación entre líneas, la expresión de mayor variabilidad (dentro de cada especie).

Una posible explicación para la asociación entre *D. antonietae* y su estresante hospedador es que estamos ante el resultado de un proceso histórico. Esta hipótesis implica que *D. antonietae* habría invadido, recientemente la zona de distribución de *C. hildmaniannus*. Un estudio de la estructuración poblacional en esta especie avala esta idea ya que los patrones de variación a nivel de las secuencias del gen que codifica para la subunidad 1 del citocromo oxidasa del ADN mitocondrial muestran huellas de lo que

¹⁰ En ellas *Cereus hildmaniannus* y *Opuntia monacantha* son simpátricas.

podría interpretarse como una expansión reciente del rango de distribución (De Brito *et al.* 2002). Una explicación alternativa es que *D. antonietae* desarrolló un comportamiento de preferencia hacia *C. hildmannianus* aunque constituya un recurso subóptimo en términos de viabilidad. En este caso, futuras investigaciones deberían indagar la existencia de aspectos del aprovechamiento de este recurso que le ofrecen, a *D. antonietae*, una ventaja frente a otras especies.

El tiempo del desarrollo y el tamaño corporal son dos caracteres fenotípicamente plásticos en relación al hospedador en moscas cactófilas (Fanara *et al.* 1999). Varios trabajos han sugerido que estos dos caracteres están involucrados en un compromiso (*trade-off*) que podría resultar en una correlación genética negativa entre sus efectos a nivel del *fitness* pre-adulto y adulto (Partridge & Fowler 1993, Zwaan *et al.* 1995, Betrán *et al.* 1998, Fernández Iriarte & Hasson 2000). Cortese y colaboradores (2002) demostraron la existencia de esta correlación genética mediante un experimento de selección artificial en *D. buzzatii* manipulando el tiempo de desarrollo y el tamaño de ala¹¹. En el caso de *D. antonietae* y *D. gouveai* pudimos observar que, por lo menos en lo que respecta al fenotipo, la correlación entre ambos caracteres no es en el sentido esperado. En términos generales, los individuos más lentos en desarrollarse también fueron los más pequeños. Sin embargo, la teoría indica que pueden ocurrir cambios en las correlaciones genéticas entre caracteres a diferentes niveles, por ejemplo cuando se consideran especies, poblaciones, estadios ontogenéticos o aún cuando se estudian distintos ambientes dentro de una población (Stearns *et al.* 1991). Incluso en el estudio de Cortese *et al.* (2002) la correlación negativa entre el tiempo de desarrollo larval y el tamaño corporal adulto sólo pudo observarse de manera conspicua cuando las moscas eran criadas en condiciones de alta densidad larvaria mientras que a baja densidad la correlación desaparecía o hasta cambiaba de signo. En el presente estudio las moscas se desarrollaron a densidad baja de modo que la ubicuidad de la correlación entre el tamaño y el tiempo de desarrollo en otras especies dentro del cluster permanece como una cuestión abierta.

En cuanto al desempeño de los híbridos interespecíficos se desarrollará una discusión más general en el Capítulo V cuando estos datos se analicen en forma comparativa con los de experimentos similares de hibridación entre *D. buzzatii* y *D. koepferae*. Podemos adelantar que no se obtuvieron evidencias que sugieran que la

¹¹ Carácter utilizado como predictor del tamaño corporal.

hibridación haya causado desajustes o perturbaciones fisiológicas u ontogenéticas marcadas, por lo menos en la viabilidad. Los híbridos fueron en promedio tan viables como las especies parentales, e incluso superaron a alguna de ellas en el sustrato donde los valores de viabilidad fueron más bajos. Si bien se discute todavía cuál es la relación entre tiempo de desarrollo y la aptitud en insectos fitófagos (Sgro & Hoffmann 2004, Mody *et al.* 2007), en líneas generales se considera que, en las especies cactófilas, el pasar un tiempo prolongado como larva en el sustrato aumenta las probabilidades de predación, muerte por desecación o intoxicación (Fanara *et al.* 2004). Por este motivo, los tiempos de desarrollo más prolongados en los individuos híbridos podría considerarse un valor fenotípico de menor aptitud. Sería interesante estudiar las alteraciones fisiológicas que llevan a las larvas híbridas a pasar más tiempo alimentándose antes de la pupación.

Para finalizar, unas consideraciones sobre el rol de la utilización de los recursos en el caso particular de *D. antonietae* y *D. gouveai*. La diversidad más alta en las especies del cluster se da en el noreste de Brasil (Manfrin & Sene 2006) donde, sugestivamente, la diversidad de cactus es también la más alta (Zappi 1994). Sin embargo, confirmar la sospecha de que los patrones de especialización en la utilización de plantas hospedadoras pueden estar causalmente relacionados con la diversificación requiere no solo de registros y caracterizaciones más completas que abarquen la vasta área de distribución del grupo en el continente, sino de la manipulación experimental de las condiciones ecológicas que conlleve a un conocimiento más claro del comportamiento de las normas de reacción de los caracteres relevantes.

Según la integración de datos morfológicos con marcadores moleculares tanto de origen nuclear como mitocondrial la introgresión de genomas de *D. gouveai* y *D. antonietae* ha sido unidireccional (DeBrito *et al.* 2002), es decir que las hembras híbridas se habrían cruzado preferentemente con machos *D. gouveai*. Esta dirección del flujo génico parece ser coincidente con las consecuencias que esperaríamos a partir de nuestros resultados de viabilidad: *D. antonietae* puede explotar los brazos putrefactos de *P. machrisii* (hospedador natural de *D. gouveai*) mientras que las posibilidades de que ocurra lo contrario son mucho más limitadas ya que los distintos genotipos de *D. gouveai* apenas sobrevivieron en *C. hildmannianus*.

En resumen, la distribución de los hospedadores y (probablemente) la composición química de las necrosis pueden ser invocados como posibles factores de importancia a la hora de determinar la potencial magnitud y dirección del flujo génico

en este par de especies a medida que más evidencia se acumule a favor de la hibridación en condiciones naturales.

Capítulo III: Morfología alar asociada al hospedador

Fuentes de variación fenotípica, normas de reacción y covariación entre partes

Resumen

El estudio de patrones de variación morfológica de una especie puede servir como herramienta para entender cambios genéticos que subyacen a la plasticidad y a la interacción genotipo-ambiente y que, posiblemente, hayan sido determinantes de su rol ecológico actual y su dinámica poblacional. Las alas de los insectos están causalmente relacionadas con su espectacular radiación y, además, constituyen un excelente sistema para estudiar la divergencia morfológica dado el conocimiento que se tiene de su ontogenia y de las fuerzas que gobiernan la variación en poblaciones naturales.

En este capítulo se presenta el estudio comparativo de las alas de dos pares de especies de *Drosophila* pertenecientes al cluster *buzzatii*. Se evalúan las diferencias interespecíficas en el tamaño y los patrones de venación del órgano. Asimismo, se estima la magnitud de la plasticidad fenotípica en relación con el hospedador de cría, así como el grado de compartimentalización de la respuesta plástica, esto último únicamente en las especies que viven en territorio argentino.

Las 4 especies presentaron diferencias interespecíficas en la morfología alar que también resultó ser un órgano sumamente plástico con los patrones de variación muy diferentes entre especies. El estudio de modularidad, el grado de independencia entre compartimentos del ala, mostraron una respuesta plástica concertada para el tamaño y la conformación tanto en *D. buzzatii* como en *D. koepferae*.

Finalmente, en relación a la hipótesis que el hospedador secundario de una especie puede representar un ambiente de mayor stress para los individuos obligados a desarrollarse allí, observamos un incremento en los niveles de asimetría fluctuante en los hospedadores secundarios (la especie de cactus hospedador no preferida) lo cual se interpretó como una posible evidencia de mayor inestabilidad durante el desarrollo.

*Con el alma en las manos
tratando de descubrir
¿que será de nuestro cuerpo alado?*

Será – Las Pelotas

La variación morfológica observada en los organismos en la naturaleza y el cambio del tamaño y la forma de los órganos son temas fundamentales cuya discusión incluso precedió a la fundación de la biología evolutiva moderna (Darwin 1859). En un contexto moderno, las investigaciones sobre la variación morfológica idealmente deben tener enfoques que consideren simultáneamente el análisis de las bases genéticas y de los factores ambientales que determinan tanto la variación intraespecífica como la divergencia interespecífica (Mackay 2004).

Considerando la variación entre individuos de una misma especie y más precisamente, cuando el valor fenotípico de los genotipos es dependiente del ambiente surge el concepto de plasticidad fenotípica. La plasticidad fenotípica es la propiedad de un genotipo de producir diferencias fenotípicas en respuesta al cambio ambiental y es un fenómeno muy bien documentado (e.g., Via *et al.* 1995, Schlichting & Pigliucci 1998, Conner & Hartl 2004). A pesar de su relevancia ecológica y evolutiva (e.g., Via *et al.* 1995, Schlichting & Pigliucci 1998, Debat *et al.* 2003), el estudio empírico de las bases genéticas de la plasticidad fenotípica ha sido muy difícil, en parte debido a la naturaleza poligénica de la mayoría de los caracteres estudiados y también por la relativa ignorancia de los mecanismos de expresión dependientes del ambiente (Ungerer *et al.* 2003).

Además, distintos genotipos de una misma especie pueden diferir en su respuesta frente a un mismo cambio ambiental por lo que las normas de reacción de un carácter pueden adoptar diversas formas (Gomulkiewicz & Kirkpatrick 1992, Gavrilets & Scheiner 1993). Tal variación en la sensibilidad ambiental puede evidenciarse como una interacción Genotipo-Ambiente (GxA; Falconer 1990, Lynch & Walsh 1998). Esto plantea un escenario con consecuencias evolutivas interesantes: si ningún genotipo presenta la aptitud máxima en todos los ambientes que los individuos enfrentan, la selección puede favorecer genotipos alternativos en distintos compartimientos (parches) ambientales (Thomas & Barker 1993, Ungerer *et al.* 2003). Bajo estas condiciones, la interacción GxA puede conducir al mantenimiento de la plasticidad fenotípica y de la variación genética subyacente con consecuencias en las posibilidades de evolución de

caracteres relacionados con la adecuación darwiniana (Fernández Iriarte & Hasson 2000, Ungerer *et al.* 2003).

El estudio de los patrones de variación de caracteres morfológicos puede permitir entender los cambios genéticos subyacentes a la plasticidad y a la interacción con el ambiente que han determinado el destino ecológico y la dinámica poblacional de una especie (Joshi & Thompson 1995, 1997, van Tienderen 1997). Existe amplia evidencia que la variación de caracteres relacionados con el tamaño y la forma corporal son heredables (e.g. Guerra *et al.* 1997, Pezzoli *et al.* 1997) y, que además, correlacionan con varios componentes de la adecuación darwiniana (e.g., Partridge *et al.* 1987, Fernández Iriarte & Hasson 2000, Cortese *et al.* 2002). Sin embargo, la relación entre el tamaño corporal, el *fitness*, la fisiología y otros caracteres morfológicos es muy compleja (e. g. Schmidt-Nielsen 1984). Es más, algunos caracteres están involucrados en distintos compromisos por lo que su estudio debe necesariamente comprender al comportamiento de los caracteres asociados y cómo ésto limita la evolución (Fernández Iriarte & Hasson 2000, Cortese *et al.* 2002).

Los insectos fitófagos constituyen interesantes modelos para estudiar las bases genéticas y ecológicas de la adaptación y la divergencia morfológica. Las plantas hospedadoras constituyen para ellos el factor ambiental más inmediato, y que ejerce su efecto, la mayoría de las veces, desde los primeros estadios del ciclo de vida (Lindroth & Peterson 1988, Baylis & Pierce 1991, Awmack & Leather 2002).

Para los individuos (genotipos), fenómenos como el salto a nuevos hospedadores pueden implicar una serie entera de nuevos desafíos: la explotación de un nuevo tipo de comida, la exposición a ambientes químicamente diversos¹, nuevos ambientes de apareamiento, parasitoides, bacterias, etc (Kircher 1982, Flogeman & Abril 1990, Via 1990). Por este motivo, el escenario impuesto por un cambio de hospedador puede conllevar nuevas presiones selectivas que conducen a la aceleración de la divergencia en caracteres asociados al desempeño en el nuevo ambiente como por ejemplo el tiempo de desarrollo, la estrategia de oviposición y la viabilidad o supervivencia del (de los) estadio(s) asociado(s) al nuevo huésped (Mitler & Futuyma 1983, Jaenike 1991, 1990, Etges 1993, Fanara & Hasson 2001, Jauregui & Etges 2007) o en los sistemas sensoriales asociados al olfato y al gusto (Dambroski *et al.* 2005, McBride 2007). Con

¹ a veces incluso a componentes potencialmente tóxicos como alcaloides

frecuencia, se han descrito, también, cambios morfológicos asociados a los saltos de hospedador (Jones 1998, 2004, Hawthorne & Via 2001, Dambroski *et al.* 2005). Los procesos adaptativos citados pueden así mismo tener consecuencias más profundas ya que de manera directa o como un subproducto (indirectamente), pueden conducir al aislamiento reproductivo entre grupos acentuando el importante rol que parecen tener los cambios de planta hospedadora en la cladogénesis de los insectos fitófagos (e.g. Etges *et al.* 2006; ver también la revisión en Coyne & Orr 2004).

Frente a la variedad y complejidad de formas del aspecto general de los insectos, una buena estrategia es estudiar un carácter u órgano “testigo”. Las alas de los insectos están causalmente relacionadas con su espectacular radiación y constituyen un sistema ideal para realizar estudios comparativos (Carroll *et al.* 1995, Gibson 1999). En el género *Drosophila*, las alas son un excelente modelo para estudiar la evolución morfológica por varias razones complementarias:

- La homología es fácilmente reconocible para un gran número de características anatómicas. El patrón de venación relativamente conservado, permite la comparación simultánea de una gran variedad de especies (Debat *et al.* 2003).
- El desarrollo general del ala está relativamente bien comprendido en lo que respecta al los genes involucrados y su interacción (revisado en De Celis 2003)
- El tamaño del ala es un carácter altamente plástico y se han descrito las normas de reacción de especies expuestas a diferentes fuentes ambientales de variación (David *et al.* 1994, Moreteau *et al.* 1998, Morin *et al.* 1999).
- Tanto el tamaño como la forma del ala responden a la variación ambiental de manera compleja sugiriendo que las normas de reacción forman parte de respuestas adaptativas al ambiente (e.g., Weber 1990, Thomas & Barker 1993, Bitner-Mathé & Klaczko 1999b)
- Hay considerable evidencia que indica que diferentes aspectos del ala (tanto tamaño como forma) son blancos de la selección natural. La existencia de clinas latitudinales paralelas en especies simpátricas así como la evolución de clinas coincidentes en distintos continentes con diferentes historias de colonización son evidencia de la naturaleza adaptativa de la variación morfológica del ala (Powell 1997). Por poner un caso, *D. subobscura*, una especie ampliamente distribuida, reveló sutilezas inesperadas en la respuesta de la morfología alar a la

variación ambiental. Esta especie es nativa del Viejo Mundo y sólo recientemente colonizó las Américas. Unos pocos años después de su primera detección en el continente americano se observó el establecimiento independiente de clinas latitudinales recíprocas para el largo de ala en las costas occidentales de América del Sur y América del Norte (Gilchrist *et al.* 2004). Si bien los patrones de variación clinal en ambos subcontinentes mostraban una relación positiva entre el tamaño del ala y la latitud, la variación involucraba distintas porciones del ala en cada subcontinente revelando la posibilidad de respuestas alternativas a la selección (Gilchrist *et al.* 2004).

En el complejo *Drosophila buzzatii* tenemos este modelo en el contexto de pares de especies que se encuentran en diferentes etapas de la divergencia (Manfrin & Sene 2006). El propósito del presente capítulo es determinar si existen diferencias en la morfología alar entre las especies y analizar los efectos de los cambios de hospedador inducidos experimentalmente sobre la morfología del ala en 2 pares de especies del cluster: *D. buzzatii/D. koepferae* y *D. gouveai/D. antonietae*.

Específicamente se evalúan las siguientes preguntas básicas en las 4 especies:

- ¿Existen diferencias interespecíficas en los patrones de venación o en el tamaño del ala?
- ¿La crianza en diferentes hospedadores afecta el aspecto del ala (ya sea en conformación o tamaño)?
- ¿El cambio de hospedador afecta de manera homogénea a diferentes genotipos dentro de cada especie?

Además, en las especies que se distribuyen en territorio argentino podemos llevar los estudios a cuestiones un tanto más profundas: ¿El ala se ve afectada y cambia su aspecto de manera general o, por el contrario, presenta una respuesta modular con diferentes compartimentos exhibiendo comportamientos distintos ?

Finalmente, examinamos la hipótesis de que el hospedador secundario representa un ambiente de mayor stress, lo cual se traduce en una mayor inestabilidad del desarrollo del ala. La estabilidad del desarrollo es una pista importante para entender cómo se

regula el desarrollo de los caracteres para alcanzar el valor fenotípico ideal². Con este fin medimos las diferencias (en tamaño y forma) entre las alas izquierda y derecha, y estimamos lo que se conoce como asimetría fluctuante (AF). Al ser éste un estimador de la inestabilidad del desarrollo de organismos bilaterales (Zakharov 1992), esperamos observar un incremento de la inestabilidad (i.e. más asimetría) en individuos forzados a crecer en el cactus no preferido bajo el supuesto de que los genotipos tendrán menores capacidades de amortiguación de los efectos perturbadores del ambiente (Polack 2003).

Diseño experimental: ‘stocks’ estudiados y obtención de los individuos experimentales

Las isolíneas de *D. buzzatii* y *D. koepferae* utilizadas fueron fundadas a partir de moscas recolectadas durante el verano de 2003 en la localidad de Suyuque, Provincia de San Luis, Argentina donde ambas especies coexisten en simpatria. En este sitio, las especies se crían en los tejidos en putrefacción de la tuna *Opuntia sulphurea* y el cardón *Trichocereus candicans*. Las poblaciones de origen de las líneas de *D. gouveai* y *D. antonietae* estudiadas en este trabajo son las comentadas en la sección Materiales y Métodos del Capítulo II y sus hospedadores naturales son los cactus columnares *Cereus hildmaniannus* y *Pilosocereus machrisii*.

Se dispuso de 10 líneas de *D. buzzatii* y *D. koepferae* mientras que en los casos de *D. gouveai* y *D. antonietae* tan sólo pudimos contar con 5 líneas de cada especie. La cría, la obtención de los adultos y el montaje de las alas de *D. gouveai* y *D. antonietae* se realizó en el Laboratorio de Genética Evolutiva (FFCLRP-USP, Universidad de São Paulo, Brasil) mientras que la obtención de las alas de las líneas de *D. buzzatii* y *D. koepferae* así como el análisis morfométrico de las 4 especies se realizó en el Laboratorio de Evolución (FCEyN-UBA). Se buscó que en ambos casos el protocolo de cría y las condiciones experimentales fueran las mismas.

Se sembraron grupos de 30 larvas de primer estadio en tubos conteniendo medio de cría preparado con una u otra planta hospedadora. *D. buzzatii* y *D. koepferae* fueron sembradas en medios preparados con *Opuntia sulphurea* y *Trichocereus candicans*

² Ver también con mayor profundidad este tema en el Capítulo V donde se discuten los efectos de la hibridación interespecífica sobre la morfología

fermentado, mientras que las larvas de *D. gouveai* y *D. antonietae* se criaron en tubos que contenían medios preparados con *C. hildmaniannus* y *P. machrisii*. En todos los casos se hicieron 4 réplicas por cada combinación especie/línea/planta hospedadora. Las larvas se desarrollaron bajo un fotoperíodo de 12:12 horas luz/oscuridad y a 25 ± 1 °C.

Una vez emergidos de la pupa, se permitió a los adultos desplegar sus alas y endurecer la quitina. De cada tubo se seleccionaron al azar 5 machos (haciendo un total de 20 individuos por línea), a los que se les removieron ambas alas y se montaron en portaobjetos. Posteriormente se fotografiaron ambas alas utilizando una cámara digital adosada a una lupa (Aumento 25 x) conectada a una computadora. En las fotos de cada ala se tomaron las posiciones de 10 referencias anatómicas (Figura 3.1; ver Anexo B1 para una descripción detallada de la metodología). Excepto en el análisis de asimetría, y con la intención de evitar la pseudoreplicación, sólo se consideró el ala derecha de cada individuo.

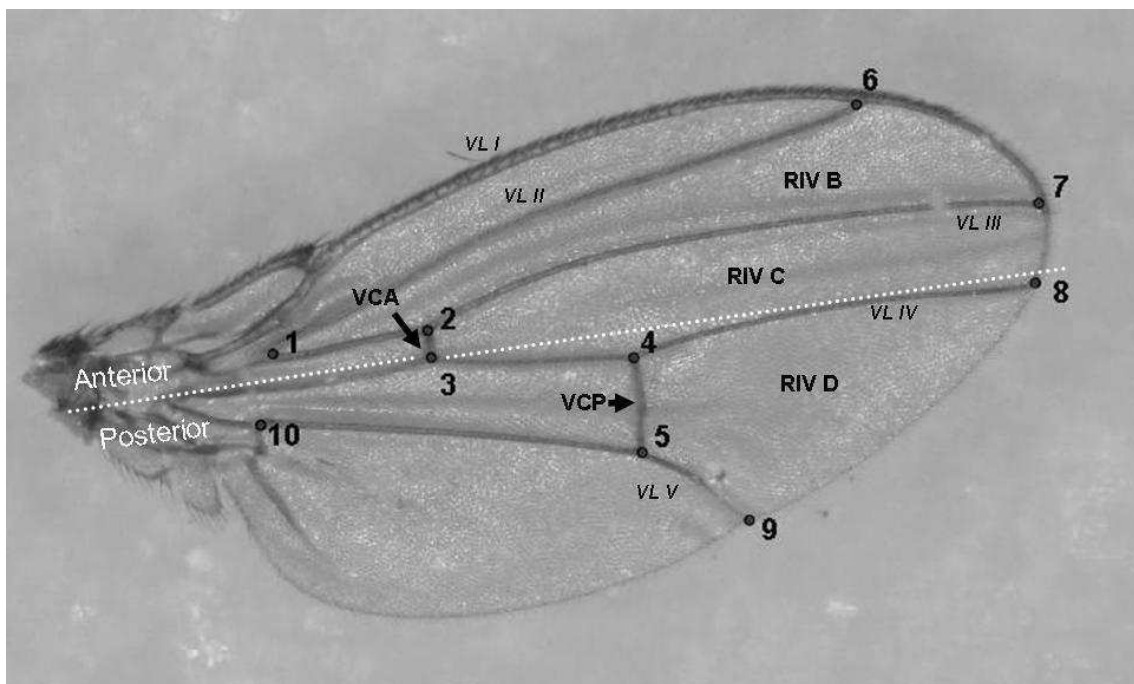


Figura 3.1 Vista dorsal del ala derecha y posicionamiento de las referencias anatómicas ('landmarks'). VL: vena longitudinal; VCA: vena cruzada anterior; VCP: vena cruzada posterior; VIR: regiones intervenosas. La línea punteada delimita los compartimentos anterior y posterior de acuerdo a Debat *et al.* (2003).

El tamaño del ala

El estimador del ala utilizado fue el tamaño del centroide determinado por la distancia entre referencias anatómicas (Anexo B1, Dryden & Mardia 1998).

Las fuentes de variación interespecíficas para el tamaño del ala fueron puestas a prueba mediante sendos ANOVAs, uno para la comparación entre *D. gouveai* y *D. antonietae* y otro para *D. buzzatii* y *D. koepferae*. Los efectos considerados en ambos ANOVAs fueron Especies (E) y Cactus (C) como factores principales fijos y Línea (L) (anidado en Especies) como factor aleatorio:

$$y = \mu + E + C + L(E) + E \times C + L(E) \times C + \varepsilon$$

donde μ es la media de la muestra y ε es el factor de error.

En la Tabla 3.1 se pueden observar las medias de tamaño de ala de las distintas especies al criarse en diferentes hospedadores. A su vez en la Tabla 3.2 presentamos los ANOVAs realizados para analizar la variación en el tamaño del ala entre especies y hospedadores.

Tabla 3.1 Tamaño medio del ala (logaritmo del tamaño de centroide) y error estándar asociados para cada una de las especies criadas en los correspondientes cactus hospedadores (ver el texto para mayores detalles).

Especie	Hospedador				
		<i>Opuntia</i>	<i>N</i>	<i>Trichocereus</i>	<i>N</i>
<i>D. buzzatii</i>	39,56 (0,02)	141	39,57 (0,02)	120	
<i>D. koepferae</i>	39,73 (0,01)	114	39,72 (0,01)	94	
		<i>Cereus</i>		<i>Pilosocereus</i>	
<i>D. gouveai</i>	39,63 (0,01)	42	39,69 (0,01)	142	
<i>D. antonietae</i>	39,66 (0,01)	53	39,72 (0,01)	160	

De acuerdo a los ANOVAs, las especies difirieron en tamaño y este carácter respondió plásticamente al sustrato de cría (Factores principales del ANOVA significativos, Tabla 3.2a). También se detectaron diferencias entre líneas dentro de cada especie así como una interacción línea por cactus lo que sugiere variabilidad entre líneas en la norma de reacción.

Los cactus tuvieron un efecto sobre tamaño que fue independiente de si constituían el recurso primario o secundario (preferido o no preferido en la naturaleza) de la especie de *Drosophila* considerada. Los individuos de *D. koepferae* emergidos en los tubos conteniendo medio preparado con *Opuntia* fueron los que presentaron el mayor tamaño de ala mientras que *D. buzzatii* criada en *Trichocereus* tuvo el menor tamaño medio (Figura 3.2a). Por otro lado, en el par *D. gouveai*/*D. antonietae* se observó que las moscas que se desarrollaron en *Pilosocereus* presentaron alas más grandes que las crecidas en *Cereus* (Figura 3.2b).

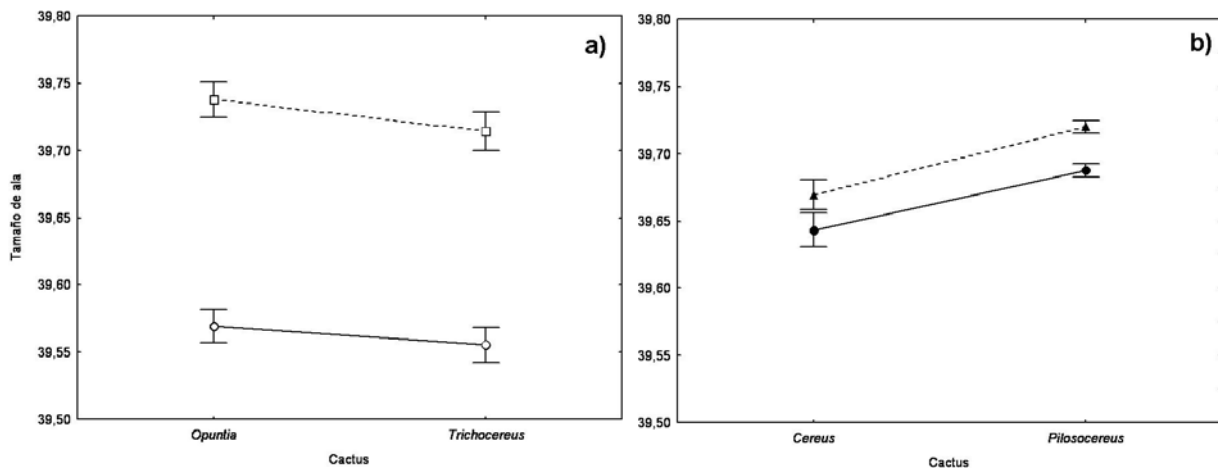


Figura 3.2 Tamaño medio del ala (expresada como el logaritmo del tamaño de centroide; en pixeles) e intervalos de confianza para a) *Drosophila buzzatii* (círculos blancos), *D. koepferae* (cuadrados blancos) y b) *D. gouveai* (círculos negros) y *D. antonietae* (triángulos negros) criados en distintos cactus hospederos (ver el texto para más detalles)

Bajo nuestro diseño experimental una interacción Línea por Cactus significativa implica que las diferencias entre líneas (familias o genotipos) presentaron una dependencia del sustrato en el que se criaron las moscas y, por lo tanto, puede ser interpretada como una estimación de la interacción Genotipo-Ambiente (GxA; Robertson 1959). Esta interacción se detectó en los ANOVAs intraespecíficos de todas las especies excepto *D. buzzatii* (Tabla 3.2b) donde si bien se observó que parte de la variación tenía base genética³, esta fue independiente del cactus hospedador. De

³ Interpretación del Factor Línea significativo siguiendo a David *et al.* (2005)

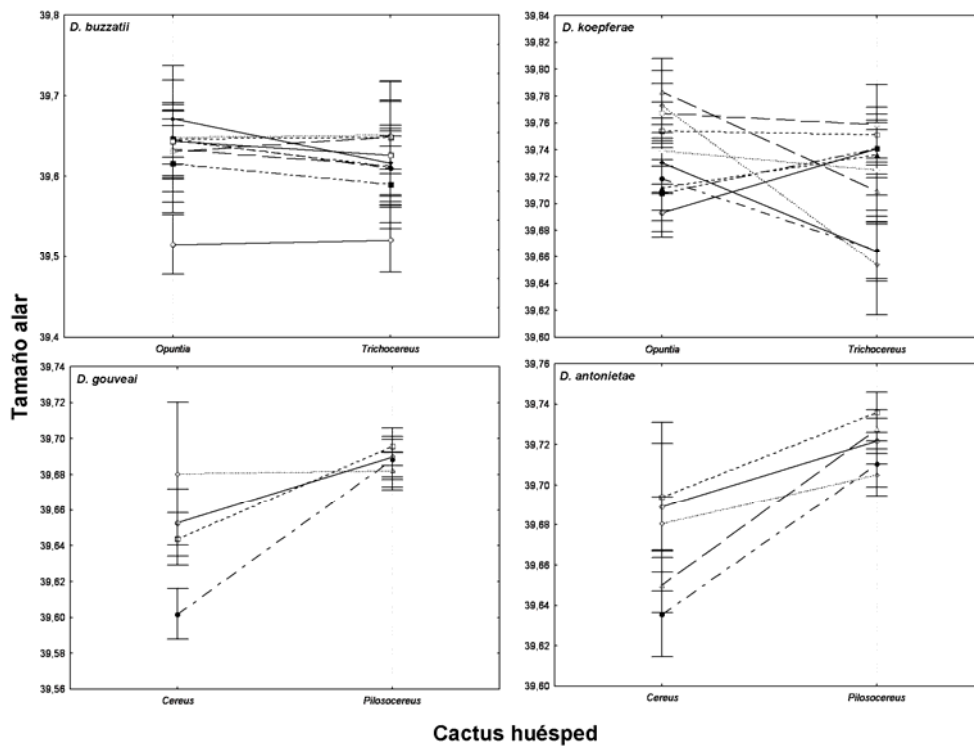
Tabla 3.2 ANOVAs interespecíficos (a) e intraespecíficos (b) del tamaño alar. En los dos pares de especies: *D. gouveai*/*D. antonietae* (*Dg-Da*) y *D. koepferae*/*D. buzzatii* (*Dk-Db*). *gl*: Grados de libertad; *CM* cuadrados medios.

		Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>			Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>
a)											
Interespecíficos	<i>Dg-Da</i>	Especie	1	105,63	42,73**	<i>Dk-Db</i>	Especie	1	5610,35	10,65**	
		Cactus	1	260,32	105,30**		Cactus	1	94,41	4,41*	
		Especie x Cactus	1	1,64	0,7		Especie x Cactus	1	8,57	0,4	
		Línea (Especie)	8	13,67	5,53**		Línea (Especie)	19	626,02	26,05**	
		Cactus x Línea (Especie)	7	15,061	6,09**		Cactus x Línea (Especie)	19	24,1	3,13**	
		Error	378	2,47			Error	425	7,69		
		b)									
Intraespecíficos											
<i>D. gouveai</i>	Línea	4	12,96	0,66	<i>D. buzzatii</i>	Línea	1	19,69	2,21		
	Cactus	1	97,54	8,84*		Cactus	10	1155,48	142,29**		
	Línea x Cactus	3	15,04	6,62**		Línea x Cactus	10	8,12	0,78		
	Error	175	2,26			Error	237	10,41			
<i>D. antonietae</i>	Línea	4	13,3	0,63	<i>D. koepferae</i>	Línea	1	73,91	1,99		
	Cactus	1	254,53	15,64*		Cactus	9	33,82	0,81		
	Línea x Cactus	3	18,17	6,83**		Línea x Cactus	9	41,75	9,61**		
	Error	201	2,65			Error	188	4,34			

* $p < 0,005$; ** $p < 0,001$

acuerdo con Robertson (1959) la interacción GxA puede darse por diferencias de varianza entre líneas en los distintos ambientes, fenómeno denominado cambio de escala, o por desvíos de la unidad de la correlación genética¹ entre genotipos y ambientes, o dicho de otra manera, un cambio en el ordenamiento relativo de las líneas. Un cambio de escala es lo que sucede marcadamente en el caso de *D. gouveai* donde se observa que las diferencias entre líneas son mayores en *Cereus* que en *Pilosocereus* mientras que en *D. antonietae* también se observa un cambio de ordenamiento de las líneas al comparar entre sustratos. Sin embargo, este último efecto es más claro en *D. buzzatii* y sobre todo *D. koepferae* (Figura 3.3).

Figura 3.3 Normas de reacción del tamaño del ala (expresado como el logaritmo del tamaño de centroide de isolíneas criadas en distintos cactus hospederos.



La conformación alar

El análisis de los cambios en la conformación del ala se efectuó usando la técnica de Procrustes (Anexo B1) mediante la cual las alas son superimpuestas para examinar las diferencias de posición de las referencias anatómicas. Como se detalla en

¹ $r_{G \times E} < 1$

el anexo metodológico, los valores de las Deformaciones Relativas (DR) se usaron como las variables morfológicas dependientes en análisis multivariados de varianza (MANOVAs) con Especies, Cactus y Línea (anidado en Especie) como principales fuentes de variación.

Según las comparaciones interespecíficas las especies difirieron en su patrón de venación (conformación) pero en el caso de *D. buzzatii* y *D. koepferae* estas diferencias fueron independientes del sustrato de cría (Tabla 3.3a).

Los análisis intraespecíficos permitieron una mayor discriminación de las fuentes de variación fenotípica en la conformación de las alas (Tabla 3.3b). Los cuatro MANOVAs mostraron diferencias significativas entre líneas lo que es indicativo de variabilidad genética para el carácter (David *et al.* 2005). Además, en concierto con los MANOVAs interespecíficos se detectó un efecto consistente del cactus hospedador en el par *D. gouveai/D. antonietae*, a diferencia de lo que se pudo observar en el par *D. koepferae-D. buzzatii*. Lo notable es que independientemente si la cría en distintos cactus hospedadores afectó la conformación alar de una especie de cada par, todas mostraron una interacción Línea por Cactus significativa (que es una estimación de la interacción Genotipo- Ambiente, ver sección anterior) indicando que existe variación entre líneas en cuanto a las normas de reacción de la conformación del ala en respuesta al sustrato de cría.

En la Figura 3.4 se ilustran como vectores de desplazamiento las variaciones asociadas a los dos primeros ejes de DR en cada par de especies o sea los tipos de cambios considerados a lo largo de los dos ejes principales. En el caso de *D. koepferae* y *D. buzzatii* (Figura 3.4a), estos ejes dan cuenta del 49 % de la variación total. Las especies claramente se separan a lo largo de ambos ejes. Considerando el eje 1 (DR1), se puede observar que *D. koepferae* tiende presentar el punto de referencia ('landmark') 5 en una posición más proximal en relación a la referencia anatómica 4 (es decir la orientación de la vena cruzada posterior) y una mayor distancia entre los puntos 8 y 9 (y por lo tanto un margen distal del ala más amplio) que su especie hermana. A lo largo del eje Y (DR2), *D. buzzatii* muestra una región intervenosa D más ancha (delimitada por los puntos 4, 5, 8 y 9, Figura 3.4a) y una región proximal relativamente más grande que *D. koepferae* (mayores distancias ente los puntos 1, 2, 3 y 10).

En el caso de *D. gouveai* y *D. antonietae* los dos ejes principales explican el 46 % de la variación y las especies se separan a lo largo del primero. *D. antonietae* tiene

Tabla 3.3 MANOVAs para la conformación alar, a) interespecíficos e b) intraespecíficos. *gl*: Grados de libertad. *Da*: *D. antonietae*, *Db*: *D. buzzatii*, *Dg*: *D. gouveai*, *Dk*: *D. koepferae*.

		Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>gl error</i>	λ <i>Wilks</i>	<i>F</i>			Fuentes de variación	<i>gl</i>	<i>gl error</i>	λ <i>Wilks</i>	<i>F</i>
a) Interespecíficos	<i>Db-Dk</i>	Especie	16	448	0,37	48,37*	<i>Dg-Da</i>	Especie	16	376	0,45	28,95*	
		Cactus	16	448	0,97	0,97		Cactus	16	376	0,75	7,64*	
		Especie x Cactus	16	448	0,95	1,44		Especie x Cactus	16	376	0,89	2,97*	
b) Intraespecíficos													
	<i>D. buzzatii</i>	Línea	160	1744,18	0,02	6,25**	<i>D. gouveai</i>	Línea	64	530,78	0,05	10,02**	
		Cactus	16	202,00	0,94	0,81		Cactus	16	135	0,7	3,61**	
		Línea x Cactus	160	1744,18	0,36	1,39**		Línea x Cactus	48	402,32	0,57	1,77**	
		Replica (Línea x Cactus)	320	2581,33	0,21	1,06		Replica (Línea x Cactus)	400	1882,25	0,04	1,25**	
	<i>D. koepferae</i>	Línea	144	1232,87	0,01	7,37**	<i>D. antonietae</i>	Línea	64	636,48	0,02	17,65*	
		Cactus	16	154,00	0,90	1,12		Cactus	16	162	0,77	2,98*	
		Línea x Cactus	144	1232,87	0,33	1,31*		Línea x Cactus	48	482,62	0,63	1,68*	
		Replica (Línea x Cactus)	304	1937,99	0,11	1,26**		Replica (Línea x Cactus)	400	2247,14	0,09	1,09	

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

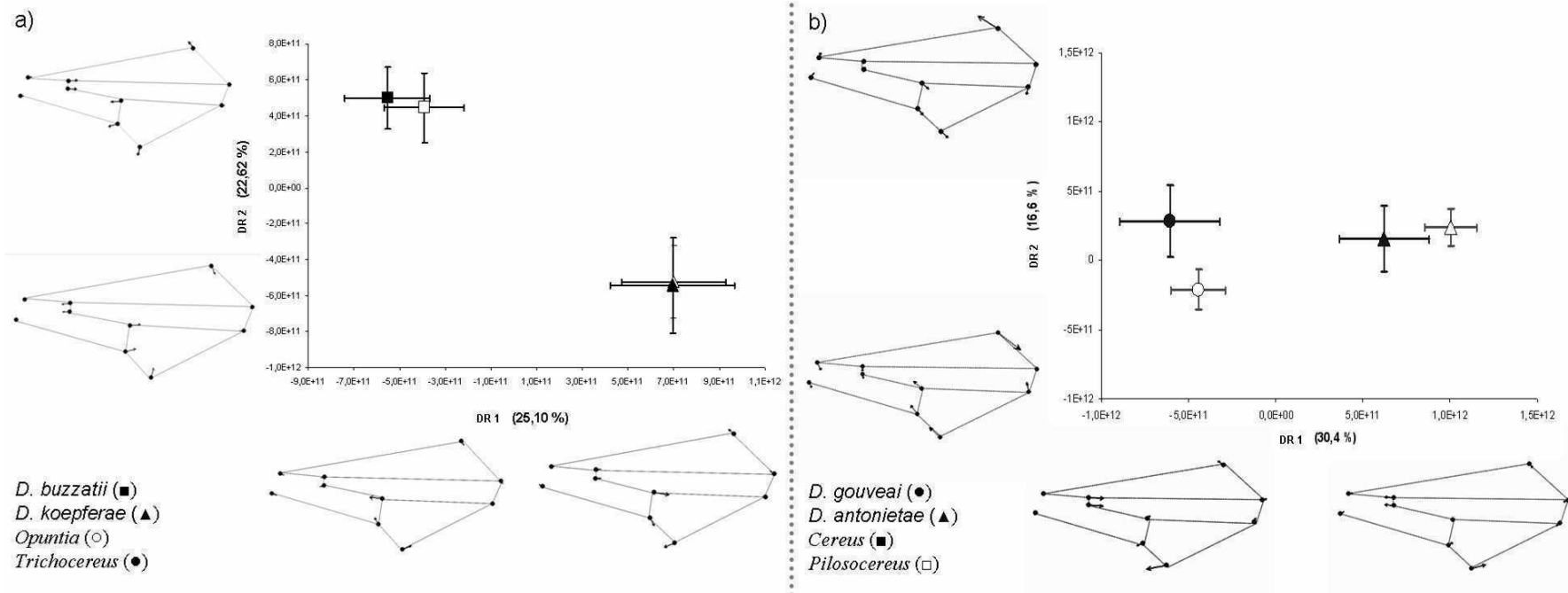


Figura 3.4 Valores medios y desvíos estándar de las dos primeras deformaciones parciales (“relative warps”, DR) y porcentaje explicado de la variación en conformación para las especies de *Drosophila* (*D. buzzatii* y *D. koepferae* (a); y *D. gouveai* y *D. antonietae* (b)) criadas en los correspondientes cactus hospedadores. Las diferencias de conformación se muestran como vectores que indican el desplazamiento de los hitos de referencia morfológica con respecto a la forma media. Los módulos de estos vectores están exagerados 10 veces con fines ilustrativos.

una región intervenosa D (IVD) más ancha que *D. gouveai*. En este caso, la Figura 3.4b ilustra la interacción entre las especies y los cactus hospedadores. Considerando el eje DR2, los individuos de *D. antonietae* emergidos de distintos cactus presentaron valores similares mientras que, por el contrario, fueron muy distintas las conformaciones que presentó *D. gouveai* criada en los diferentes hospedadores.

Análisis de los patrones alométricos

En todos los organismos, el tamaño de cada parte del cuerpo típicamente escala con el tamaño corporal total. Esta relación de escala entre el tamaño (o forma) de caracteres individuales y el tamaño corporal total se denomina alometría (revisado en Shingleton *et al* 2007). A pesar del enorme interés que existe entre los biólogos en conocer las relaciones entre el cambio en el tamaño y la conformación, los mecanismos genéticos y fisiológicos que regulan o controlan las alometrías y el crecimiento proporcional de las partes permanecen elusivos.

La forma de la función alométrica se modela tradicionalmente usando la ecuación:

$$y = a x^b$$

Donde x e y representan los valores de dos caracteres dados. La transformación logarítmica de la función produce la ecuación lineal

$$\text{Log}(y) = \text{Log}(a) + b \text{Log}(x)$$

Si se grafican los 2 caracteres en una escala logarítmica, se obtienen relaciones lineales entre los mismos con una pendiente que toma el valor de b . De esta manera, es posible realizar una clasificación de las alometrías dependiendo del valor de la pendiente. Si el valor de b es igual a 1 nos encontramos frente al caso de la isometría, si $b < 1$ hablamos de hipometría y si $b > 1$ de hipermetría. Esta clasificación sólo puede ser aplicada a caracteres que se comportan según este modelo (de manera lineal en escala logarítmica).

Las alometrías también pueden clasificarse de acuerdo al nivel en que se estudian. En este caso se habla de tres tipos de alometrías: ontogenéticas, evolutivas y

estáticas (Cheverud 1982, Schlichting & Pigliucci 1998). Las alometrías ontogenéticas son trayectorias de crecimiento y describen el desarrollo de un órgano en relación al desarrollo de otro o al crecimiento general del cuerpo en un individuo en particular. Las alometrías evolutivas describen el tamaño relativo de diferentes órganos de individuos de diferentes especies en el mismo estadio. Finalmente, las alometrías estáticas se refieren al tamaño relativo de diferentes órganos en distintos organismos de la misma especie en el mismo estadio de desarrollo. Dado que la variación en el tamaño de un órgano y en el del cuerpo en general es consecuencia de la variación en el crecimiento hasta esa etapa del desarrollo, se deduce que tanto la alometría estática como la evolutiva son consecuencias de cambios en las alometrías ontogenéticas (Figura 3.5, Shingleton *et al.* 2007).

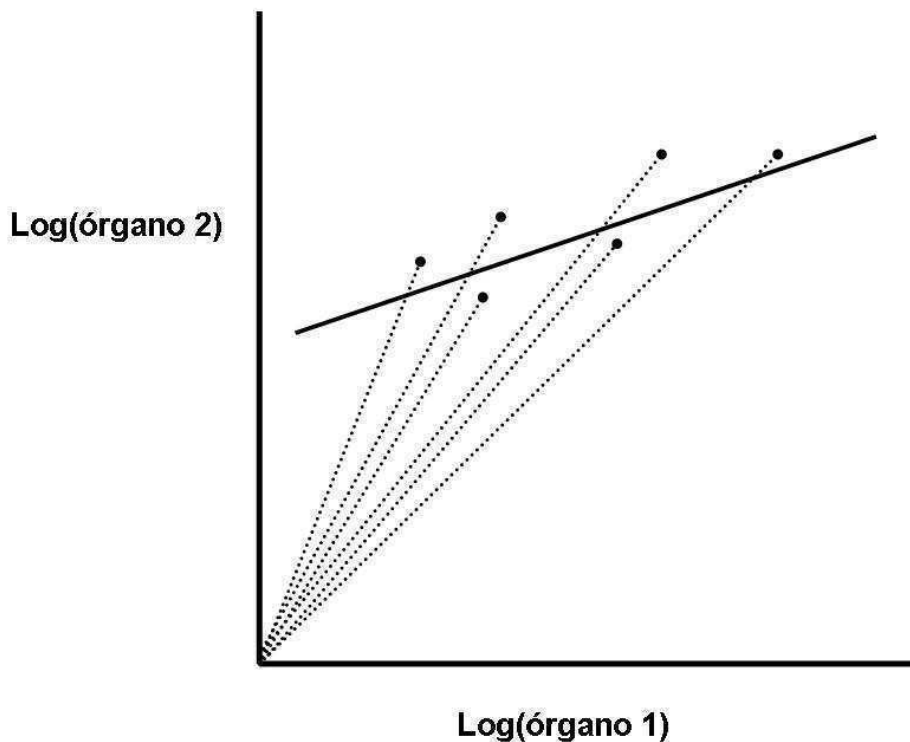


Figura 3.5 La relación entre alometrías estáticas, ontogenéticas y evolutivas. Si cada punto representa los tamaños de órganos de diferentes especies en el mismo estadio de desarrollo entonces la línea es una alometría evolutiva. Si cada punto representa el tamaño de dos órganos medidos en distintos individuos de una misma especie en el mismo estadio de desarrollo entonces la línea representa una alometría estática. En ambos casos, la alometría es producto de las trayectorias relativas de crecimiento (u ontogenéticas) de los dos órganos (líneas punteadas). Modificado de Shingleton y colaboradores (2007)

Si bien en nuestro caso particular la conformación y el tamaño son dos caracteres separados metodológicamente, no podemos (y de hecho hasta es deseable no hacerlo) deshacernos de la relación biológica que puede existir entre los cambios de

tamaño y de conformación. Si hay un desfase en el crecimiento de distintas partes del ala al incrementarse el tamaño (el crecimiento no es isométrico), entonces nos encontraremos con que una parte del cambio conformacional es explicado por las diferencias de tamaño entre los individuos. En este caso la relación alométrica estática no es entre el tamaño de 2 órganos sino entre la conformación y el tamaño dentro de una misma estructura.

En este contexto, consideramos interesante indagar qué fracción de las diferencias en conformación son en realidad alométricas tanto dentro como entre especies. Información ésta que, indirectamente y si encontramos diferencias, nos habla acerca de la variación y la divergencia de las trayectorias ontogenéticas y de los patrones de desarrollo.

Relación entre conformación y tamaño de ala: La variación alométrica y no alométrica del patrón de venación

La regresión multivariada de las variables morfológicas sobre el tamaño de ala (centroide) reveló que en todas las especies existe un componente alométrico en la variación total de la conformación ($p < 0,001$ en todos los casos). Sin embargo la proporción de cambio alométrico respecto del total fue muy heterogénea entre las especies. En el caso de *D. antonietae* y *D. gouveai* el componente alométrico dio cuenta del 27.5 % y 26.5% de la variación total. En cambio en el par *D. koepferae/D. buzzatii* el componente alométrico explicó una proporción muy baja de la variación total, 4,6 % en la primera y sólo 1,9% en la segunda. Es decir que en estas dos últimas sólo una mínima fracción de los cambios en la venación está correlacionada con cambios en el tamaño del ala.

En el caso de *D. buzzatii* y *D. koepferae*, no pudimos poner a prueba la hipótesis de que las diferencias de conformación entre especies se mantienen cuando se corrige por tamaño por medio de un MANCOVA porque la relación alométrica entre tamaño y conformación presentó pendientes distintas entre especies (Tests de paralelismo, Especie x Tamaño de centroide: lambda de Wilks = 0,81; $F_{16, 448} = 6, 41$; $p < 0,001$). Esto obligó al análisis de cada especie por separado. El efecto Línea fue significativo en ambos casos, en tanto que la interacción Línea por Cactus fue significativa solamente en *D. buzzatii* (Tabla 3.4b). En esta última no se observó que la conformación del ala haya

sido afectada de manera consistente por el sustrato de cría pero hubo una interacción Genotipo-Ambiente en el patrón de venación que fue independiente del tamaño del órgano. En cambio, en *D. koepferae*, una vez removida la variación alométrica de la conformación se observaron diferencias entre individuos criados en los distintos sustratos para la porción no alométrica de la conformación.

En el caso del par *D. gouveai* y *D. antonietae*, el MANCOVA interespecífico sí pudo realizarse y mostró que las diferencias de venación entre especies, entre individuos criados en diferentes cactus y la interacción entre estos factores se mantuvieron luego de la corrección por diferencias de tamaño (Tabla 3.4a). Los análisis intraespecíficos detectaron variación entre líneas así como una interacción línea por sustrato significativa en ambas especies (Tabla 3.4b). Esto hace pensar que, además de estar genéticamente determinada, la conformación del ala también es una característica que presenta plasticidad fenotípica, aunque los genotipos son diferentes en cuanto a sus capacidades plásticas. Por otro lado, los patrones no alométricos de variación de la conformación difirieron fuertemente entre especies. Por un lado, todas las fuentes de variación estudiadas siguieron siendo significativas luego de corregir por tamaño en *D. gouveai*, mientras que, por el contrario, en *D. antonietae*, los efectos del cactus y la interacción Línea por Cactus desaparecieron luego de la corrección por tamaño (Tabla 3.4b). Estos resultados sugieren que las diferencias en los patrones de venación entre individuos de *D. antonietae* emergidas en diferentes cactus pueden explicarse simplemente por las diferencias de tamaño entre las mismas, no siendo éste el caso de su especie hermana.

Las diferencias conformacionales específicas

En consonancia con lo que se ha observado en otras especies de *Drosophila*, nuestros resultados apuntan a señalar al ala como un órgano que expresa un alto grado de plasticidad fenotípica. Sin embargo, la generalización llega hasta aquí ya que también observamos un desacople entre el tamaño y la conformación y, como si esto fuera poco, diferencias interespecíficas en los patrones de variación. Hasta aquí ya podemos contestar una de las primeras preguntas formuladas en el inicio de este capítulo. Las especies difieren cuantitativamente en la ubicación de las distintas referencias anatómicas, un punto que retomaremos exhaustivamente en el Capítulo VII.

Tabla 3.4: Análisis de covarianza multivariados (MANCOVAs) interespecíficos (a) e intraespecíficos (b) de la conformación alar corregida por el tamaño de centroide. *gl*: Grados de libertad. Da: *D. antonietae*, Db: *D. buzzatii*, Dg: *D. gouveai*, Dk: *D. koepferae*.

		Fuentes de variación				Fuentes de variación						
		<i>gl</i>	<i>gl error</i>	λ Wilks	<i>F</i>		<i>gl</i>	<i>gl error</i>	λ Wilks	<i>F</i>		
a) Interespecíficos	<i>Db-Dk</i>	No cumple con los supuestos				<i>Dg-Da</i>	Tamaño	16	375	0,85	4,06*	
						Especie	16	375	0,46	27,99*		
						Cactus	16	375	0,87	3,46*		
						Especie x Cactus	16	375	0,88	2,96*		
b) Intraespecíficos												
	<i>D. buzzatii</i>	Tamaño	16	201,00	0,88	1,73*	<i>D. gouveai</i>	Tamaño	16	134	0,87	1,29
		Línea	160	1735,64	0,03	5,60**		Línea	64	526,86	0,04	10,01*
		Cactus	16	201,00	0,94	0,77		Cactus	16	134	0,76	2,66*
		Línea x Cactus	160	1735,64	0,35	1,41**		Línea x Cactus	48	399,34	0,58	1,64*
		Replica (Línea x Cactus)	320	2568,79	0,21	1,06		Replica (Línea x Cactus)	400	1868,73	0,04	1,23*
	<i>D. koepferae</i>	Tamaño	16	153,00	0,71	3,91**	<i>D. antonietae</i>	Tamaño	16	161	0,8	2,53*
		Línea	144	1224,97	0,01	6,96**		Línea	64	632,56	0,02	17,85*
		Cactus	16	153,00	0,86	1,58**		Cactus	16	161	0,93	0,75
		Línea x Cactus	144	1224,97	0,31	1,36		Línea x Cactus	48	479,65	0,68	1,38
		Replica (Línea x Cactus)	304	1925,71	0,10	1,28**		Replica (Línea x Cactus)	400	2233,62	0,09	1,07

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

Si bien los cambios en la conformación del ala que acompañan cambios en el tamaño están bien documentados en insectos (ver por ejemplo Stern & Emlen 1999), la relación entre la variación en el tamaño y en la conformación y la posibilidad de que estos dos elementos constituyentes de la morfología alar sean independientes ha sido discutida por años (Bitner-Mathé & Klaczko 1999 a, b, Weber 1990, 1992, Weber *et al.* 2001, Hoffmann & Shirrifs 2002, Debat *et al.* 2003, Carreira *et al.* 2006).

D. buzzatii-D koepferae

En nuestro caso, en el par *D. buzzatii- D. koepferae* pudimos observar que sólo el tamaño, y no la conformación, presentó una respuesta plástica confirmando estudios previos usando metodologías clásicas de análisis morfométrico (Carreira *et al.* 2006). Una posible explicación de esta diferencia en los patrones de variación que mostraron el tamaño y la conformación del ala podría deberse a que el grado de constreñimiento o canalización de estos aspectos del ala durante la ontogenia fueran diferentes. En línea con estos resultados, se observó que los cambios conformacionales alométricos representan una pequeña fracción de la variación total en ambas especies o, lo que es lo mismo, que la mayor parte del cambio en el patrón de venación es independiente del tamaño. A pesar de esto, hay un aspecto que es común a ambos caracteres: la interacción genotipo-ambiente fue significativa en ambos casos. Esto reivindica la importancia de la heterogeneidad ambiental (representada en este caso por los diferentes sustratos de cría en los que se desarrollaron ambas especies) en el mantenimiento de la variabilidad genética intraespecífica y, eventualmente, de la diversidad de especies. No olvidemos que estas especies en su rango de distribución utilizan varias especies de cactus y que en las zonas de simpatria existen cactus hospederos que pertenecen a más de un género de cactáceas.

En líneas generales, estos resultados también aportan evidencias para considerar a *Opuntia* y *Trichocereus* como dos nichos de explotación de recursos de cría efectivamente distintos para estas especies. En este caso, las tunas y los cardones como sitios de cría para las especies locales difieren en múltiples variables biológicas relevantes como la composición química (Kircher, 1982; Fogleman & Abril, 1990), la diversidad de la microflora (levaduras y bacterias) asociada a la putrefacción (Starmer *et al.*, 1990), el tamaño de las necrosis, la densidad larvaria y la duración del período en el

que las necrosis mantienen las condiciones adecuadas para que las moscas se desarrollen con éxito (Hasson *et al.* 1992). En general, los cactus columnares poseen una química más compleja y son menos nutritivos para las moscas que las opuntias y, por lo tanto demandan una explotación mas especializada, menos plástica por parte de sus huéspedes. En este trabajo hemos visto que las moscas criadas en *O. sulphurea* tenían alas de mayor tamaño que las emergidas en *T. terschekii*. Si aceptamos que esto tiene un correlato con el tamaño corporal de los adultos, un carácter positivamente relacionado con la aptitud, entonces nuestros resultados apuntan en la dirección de las predicciones basadas en las diferencias en la complejidad química entre cactus.

D. gouveai-D antonietae

En ambas especies detectamos plasticidad fenotípica, en particular para el tamaño del ala y, aunque de manera menos marcada, en la conformación. A pesar de que el número de líneas estudiadas por especie no fue grande, sí fue suficiente para encontrar una interacción Genotipo x Ambiente (Línea por Cactus) significativa tanto para el tamaño como para la conformación del ala de ambas especies, lo que sugiere que la variación en las respuestas plásticas tiene base genética.

En lo concerniente a la conformación las diferencias entre los individuos criados en distintos cactus desaparecieron al remover el efecto del tamaño en *D. antonietae*, lo cual parece indicar que el hospedador sólo afecta la conformación de las venas de manera alométrica. Por otro lado, la plasticidad fenotípica de la conformación del ala en *D. gouveai* tuvo dos componentes, el alométrico y el no alométrico. Esta diferencia entre las especies es muy interesante, más si consideramos que concuerda con lo que se esperaría al mover una especie (*D. antonietae*), de su ambiente particular (aunque estresante) a un sustrato más nutritivo, un efecto que sólo es detectable en el tamaño (y, por lo tanto la parte alométrica de la conformación) y que no ejerce perturbaciones mayores en el desarrollo. En cambio, cuando *D. gouveai* fue llevada de su hospedador natural a un sustrato de cría, aparentemente, más estresante, el efecto no se verificó únicamente en la variación del tamaño (área del ala y el componente alométrico de la conformación) sino también cambiando las relaciones entre partes que no responden al crecimiento en tamaño (conformación no alométrica).

Es interesante destacar que estas diferencias en el patrón de respuesta plástica han evolucionado desde que estas especies compartieron su último ancestro común hace aproximadamente 3,3 millones de años¹. Así mismo, la plasticidad fenotípica observada en este par de especies para la conformación alar constituye una novedad respecto a las respuestas observadas en el par de especies hermanas estudiadas en esta tesis que son miembros del mismo cluster: *D. buzzatii* y *D. koepferae*.

Un último comentario acerca de *D. gouveai* y *D. antonietae*. Una alta proporción de la variación morfológica fue explicada por diferencias entre líneas y por la interacción de este factor con el cactus. Estos resultados subrayan nuevamente, en conjunto con lo observado para la viabilidad larvaria y el tiempo de desarrollo (Capítulo II), el destacado rol que ejerce la heterogeneidad ambiental (en este caso representada por distintos hospedadores) en el mantenimiento de la variación genética de la morfología del ala en particular y en caracteres con incidencia en la aptitud en general. Esta propiedad de la heterogeneidad ambiental parece estar muy extendida en el cluster *buzzatii* (Fanara et al. 2006) obligando a prestar especial atención al papel de los cactus y los saltos de hospedador en la historia evolutiva de este grupo.

Covariación de distintas porciones del ala

A pesar de ser consideradas especies hermanas (indistinguibles morfológicamente), nuestro estudio muestra que *D. buzzatii* y *D. koepferae* se diferencian cuantitativamente tanto en el tamaño como en la conformación del ala. El enfoque geométrico empleado nos ha permitido inferir que distintos compartimientos del ala habrían evolucionado a tasas diferentes desde el inicio de la divergencia tanto entre *D. koepferae* y *D. buzzatii* como entre *D. gouveai* y *D. antonietae*. En efecto, este es el caso de la región RIV D que fue la que mostró las mayores diferencias interespecíficas en los dos pares de especies analizados. En este sentido nuestros resultados son coherentes con estudios previos que habían sugerido que esta región del ala es filogenéticamente informativa en el cluster *D. buzzatii* (Moraes et al., 2004).

Nuestro siguiente paso fue investigar el grado de integración entre diferentes porciones del ala definidas “a priori” en *D. buzzatii* y *D. koepferae*. Algunos autores han sugerido que las regiones intervenosas (“intervein region”; RIV, Figura 3.1) del ala

¹ Estimado a partir de secuencias de ADN mitocondrial. Ver Capítulo VII

de *Drosophila* podrían considerarse como unidades genéticamente independientes (Guerra *et al.* 1997, Birdsall *et al.* 2000, Zimmerman *et al.* 2000). Las alas de las moscas pueden dividirse en un compartimiento anterior y uno posterior (Figura 3.1), los cuales corresponden a linajes celulares y dominios de expresión génica distintos (García-Bellido *et al.* 1973, Lawrence & Morata 1976, Lawrence 1992) que consecuentemente han sido considerados módulos ontogenéticamente separados. Las regiones intervenosas consideradas en este experimento se encuentran localizadas en compartimentos distintos.

Se calculó el tamaño de centroide y las deformaciones parciales de la región RIV-B definida por las venas longitudinales 2 y 3 y la región RIV-D definida por las venas longitudinales 4 y 5 (RIV-D) siguiendo la nomenclatura de Debat y colaboradores (2003) (Figura 3.1). La elección de regiones intervenosas que no comparten referencias anatómicas en común evita correlaciones espúreas entre módulos. La covariación en el tamaño se analizó a través de una regresión del tamaño de cada región respecto del tamaño general del ala. Los residuos² de estas regresiones, desprovistos del efecto de covariación con el tamaño general, se utilizaron en un análisis de correlación.

Simultáneamente, la existencia de variación concertada en la conformación de los módulos fue puesta a prueba con un análisis de covariación de conformaciones basado en una técnica de cuadrados mínimos parciales³ (McIntosh *et al.* 1996) utilizando el programa tpsPLS 1.14 (Rohlf 2005). La significación de la correlación se evaluó mediante técnicas de remuestreo aleatorizado incluidas en el mismo programa. Se corrieron 10.000 permutaciones y los cálculos de cuadrados mínimos fueron repetidos y comparados con la correspondencia original.

Por cuestiones de tamaño muestral, número de líneas involucradas, optimización del tiempo y conocimiento acumulado, tanto este análisis como la siguiente evaluación de la asimetría fluctuante involucraron solamente a *D. koepferae* y *D. buzzatii*.

Las regresiones del tamaño de las RIVs B y D sobre el tamaño total del ala mostraron relaciones positivas y significativas en ambas especies (R^2 mayores a 0.98 y $p < 0.001$ en ambos casos). Los ANOVAs diseñados para evaluar la variación de tamaño en las regiones RIV-B y RIV-D mostraron resultados similares al ANOVA para

² Despojados por construcción de todo cambio alométrico debido al incremento general del tamaño del órgano.

³ En el Anexo B1 se desarrolla la teoría y detalles técnicos de este tipo de análisis.

tamaño total. Los factores Especie y Línea y la interacción Línea por Cactus fueron significativas (Tabla 3.5).

Tabla 3.5 Análisis de varianza interespecíficos de las diferencias de tamaño de las regiones intervenosas (RIV) del ala de *D. buzzatii* y *D. koepferae*. gl: grados de libertad; CM: cuadrados medios

Fuentes de variación	gl	Tamaño RIV B				Tamaño RIV D			
		gl error	CM	CM error	F	gl error	CM	CM error	F
Especies	1	19,15	250,41	23,68	10,57**	19,17	56,37	6,96	8,10**
Cactus	1	22,98	4,04	1,06	3,82	24,53	0,97	0,26	3,75
Especies x Cactus	1	22,97	0,35	1,06	0,33	24,51	0,13	0,26	0,52
Línea (Especies)	19	19	31,28	1,27	24,57**	19	9,19	0,30	30,57**
Cactus x Línea Especies)	19	425	1,27	0,39	3,26**	425	0,30	0,13	2,39**
Error	425		0,39				0,13		

* $p < 0.05$ ** $p < 0.001$

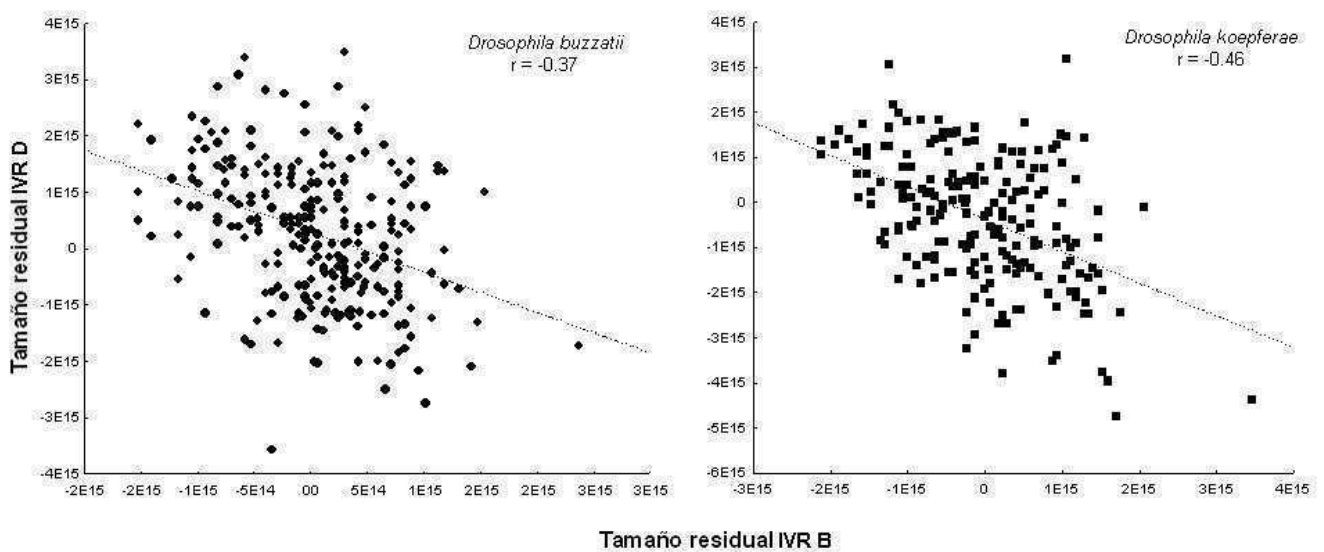


Figura 3.6 Correlación entre los valores residuales de tamaño de las regiones intervenosas RIV-B y RIV-D en *D. buzzatii* y *D. koepferae*. Los tamaños residuales se calcularon como la fracción del tamaño de la región intervenosa que no es explicada por la regresión respecto al tamaño total del ala. $p < 0,05$ para ambas correlaciones.

Los tamaños residuales de las RIVs estuvieron correlacionadas en ambas especies (correlación de Pearson, $r = -0,37$, $N = 259$ y $r = -0,46$, $N = 208$ para *D. buzzatii* y *D. koepferae*, respectivamente, $p < 0,05$ en ambos casos; Figura 3.6). Estos resultados

implican que, independientemente del incremento general del ala, las regiones covarían negativamente, esto es que el crecimiento relativo de una parte involucra el decrecimiento relativo de la otra.

Las fuentes de variación significativas para la conformación de las regiones intervenosas no incluyeron al sustrato de cría como factor principal. Sin embargo, en el caso de *D. koepferae*, la región intervenosa B estuvo involucrada en una interacción Genotipo x Ambiente. Las líneas difirieron entre sí en ambas especies tanto para la RIV-B como RIV-D (Tabla 3.6). Congruentemente con la variación en tamaño, el análisis de cuadrados mínimos parciales reveló cierto grado de variación concertada de la forma de las regiones intervenosas. En ambas especies quedaron conformados 4 ejes de variación morfológica para cada región. Los resultados de las pruebas de permutación mostraron que, en *D. buzzatii*, 3 de estos cuatro ejes y los 4 en *D. koepferae* estuvieron significativamente correlacionados ($p < 0,04$ en ambos casos). Los dos primeros ejes explicaron el 99 y 98 por ciento de la covariación entre RIVs en *D. buzzatii* y *D. koepferae*, respectivamente. Los coeficientes de correlación entre los ejes variaron entre 0,03 y 0,52 en *D. buzzatii* y entre 0,17 y 0,56 en *D. koepferae*.

Tabla 3.6: MANOVAs de las deformaciones relativas describiendo la conformación de las regiones intervenosas B y D (ver Figura 3.1) en *D. buzzatii* y *D. koepferae*. gl.: grados de libertad.

Especie	Fuentes de variación	Conformación RIV B				Conformación RIV D			
		gl. Efecto	gl. error	λ Wilks	F	gl. efecto	gl. error	λ Wilks	F
<i>D. buzzatii</i>									
	Cactus	4	234	0,99	0,41	4	234	0,99	0,71
	Línea	40	889	0,37	6,61**	40	889	0,38	6,49**
	Cactus x Línea	40	889	0,81	1,24	40	889	0,82	1,22
<i>D. koepferae</i>									
	Cactus	4	185	0,97	1,24	4	185	0,97	1,57
	Línea	36	695	0,17	11,52**	36	695	0,27	8,20**
	Cactus x Línea	36	695	0,71	1,82**	36	695	0,80	1,16

** $p < 0,001$

Tradicionalmente hubo dos concepciones sobre el patrón de desarrollo del ala de *Drosophila*: la integrativa y la modular. Hoy en día no se debate la validez de estas posiciones extremas y hay un consenso general de que en realidad se trata de una cuestión de estimar el grado de integración entre partes (Klingenberg & Zaklan 2000).

En términos generales, se espera que todas las regiones del ala participen de un incremento general del tamaño del órgano. Sin embargo, la variación en forma independiente del tamaño⁴ no necesariamente tiene que estar estrictamente coordinada entre regiones, en especial si no hay adyacencia y regiones intermedias pueden funcionar como “tampón” que compense las pequeñas disparidades. En nuestro estudio, las RIVs B y D, dos regiones que no comparten referencias anatómicas, presentaron variación correlacionada significativa tanto en tamaño (aunque la correlación no fué alta) como en forma, brindando evidencia a favor de que no existe una completa independencia entre regiones del ala y que el crecimiento celular de una parte puede ser compensado por (y coordinada con) otras regiones del ala.

Patrones de asimetría fluctuante

La homeostasis o estabilidad del desarrollo es una propiedad de los organismos de expresar un programa ontogenético sin verse afectado por fluctuaciones en las condiciones ambientales (Cannon 1932, Lerner 1954). Su contraparte es la inestabilidad del desarrollo que es la incapacidad de los mecanismos regulatorios para estabilizar el desarrollo frente a las perturbaciones externas (Van Valen, 1962; Palmer & Strobeck, 1986, 1992). La medida más utilizada como estimador de la inestabilidad del desarrollo es la asimetría fluctuante (AF), que consiste en pequeñas diferencias aleatorias entre los lados derecho e izquierdo de estructuras bilaterales en organismos simétricos (Van Valen, 1962; Palmer, 1994). Además, se supone que la AF no solamente está correlacionada negativamente con la estabilidad del desarrollo sino también con el fitness (Palmer, 1994; Møller & Swaddle, 1997). Es decir que los individuos más asimétricos se espera tengan menos éxito reproductivo que los más simétricos.

Potencialmente, un fenómeno como la hibridación interespecífica que implica la reunión de dos genomas divergentes que podrían no ser totalmente compatibles debería traer aparejada una mayor AF en el organismo. Hay varios estudios que han demostrado un incremento de la AF en híbridos respecto de las especies parentales y estas observaciones fueron explicadas como el resultado de la disrupción de complejos de

⁴ El componente no alométrico del cambio morfológico

genes coadaptados (Ferguson 1986, Lamb & Avise 1987; Ross & Robertson 1990, Graham, 1992, Alibert & Auffray 2003).

Otro alejamiento de la simetría bilateral perfecta es la asimetría direccional (AD) que ocurre cuando un lado de un carácter bilateral es consistentemente mayor o distinto que el otro (Van Valen 1962). Aunque se la asocie menos con la inestabilidad del desarrollo (Palmer 1994), se han encontrado diferencias en AD entre especies parentales y su progenie híbrida (Auffray *et al.* 1996, Klingenberg *et al.* 1998) y también transiciones entre AF y AD que fueron interpretadas como indicadores de situaciones de stress (McKenzie & Clarke 1988, Graham *et al.* 1993, Leamy *et al.* 1999).

Ya explicamos que el éxito evolutivo de las especies del grupo *D. repleta* está relacionado con su capacidad para utilizar a las cactáceas como sustrato de cría y alimentación lo que habría permitido su expansión en las regiones desérticas del Nuevo Mundo (Wasserman 1982). Como en la mayoría de los grupos de insectos, nuevas plantas hospedadoras representan un desafío a la capacidad adaptativa de las drosófilas cactófilas que deben ajustar su esquema de desarrollo a nuevos químicos u organismos presentes en la microflora asociada. Con el fin de estimar hasta qué punto crecer en sustratos alternativos puede afectar la estabilidad del desarrollo se investigó el grado de AF en *D. buzzatii* y *D. koepferae* criadas en sus hospedadores primarios y en cactus alternativos (preferido vs no preferido).

Con este objetivo, 10 a 20 moscas de 4 aisladas de *D. buzzatii* y *D. koepferae* se eligieron al azar del total de emergidos. El proceso de digitalización de las referencias anatómicas en este caso se hizo para ambas alas y por duplicado en 2 conjuntos distintos de fotografías⁵. De esta forma se consigue una estimación del error de medición necesario para ese tipo de análisis (Palmer 1994). Previamente a la aplicación del método de Procrustes, todas las imágenes de un lado del cuerpo fueron convertidas en su imagen especular (Klingenberg & McIntyre 1998) para permitir la superposición de todas las configuraciones (eliminación de la quiralidad).

En este punto debemos comentar una tercera forma de asimetría que podría sesgar la interpretación de los resultados: la antisimetría (AS). Es el caso en el que el programa de desarrollo conduce a que siempre los lados del cuerpo (el izquierdo o el

⁵ Tomadas en días distintos. La finalidad de esto es evitar sesgos metodológicos

derecho) sean sistemáticamente diferentes⁶. Para descartar la AS en la muestra experimental se evaluó la distribución de los datos, buscando discrepancias respecto de la normal distribución de las diferencias entre lados esperada bajo la hipótesis de AF. Para esto se calcularon los estadísticos de sesgo y kurtosis para cada especie en cada cactus por separado.

La asimetría bilateral del tamaño de ala fue investigada partiendo la variación fenotípica en intra-individual, entre individuos y el componente de error mediante el siguiente diseño de ANOVA (Leamy, 1984; Palmer & Strobeck, 1986; Palmer 1994).

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

En este diseño, “Individuo” es un factor aleatorio que considera la variación inter individual, “Lado” es un factor fijo que funciona como estimador de la asimetría direccional y la interacción Individuo por Lado es el estimador de asimetría fluctuante. La estimación del error de medición está dada por el componente de varianza residual entre mediciones replicadas del mismo individuo.

Una vez confirmada la existencia de asimetría fluctuante para el tamaño se procedió a evaluar las diferencias entre muestras. Para esto se siguieron las propuestas de Palmer y Strobeck (1992) poniendo a prueba las diferencias de AF usando los valores absolutos de las diferencias de tamaño entre alas izquierda y derecha (D-I). Como estos valores pueden estar sesgados por la presencia de asimetría direccional o simplemente por diferencias en el tamaño de ala entre muestras, después de corregir por AD^7 se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA) con Especie y Cactus como factores fijos y el valor medio (promedio de ambas alas) del tamaño de cada individuo como covariable.

El análisis de varianza de la asimetría tiene una adaptación para el análisis de la forma denominada ANOVA de Procrustes (Klingenberg & McIntyre, 1998). Estos ANOVAS se calculan añadiendo las sumas de cuadrados de todos los caracteres (en este caso las coordenadas de las 10 referencias) y los grados de libertad se obtienen

⁶ Un ejemplo es el caso del macho del cangrejo violinista que tiene siempre una pinza más grande que la otra, ya sea la izquierda o la derecha. evitando así sistemáticamente la simetría.

⁷ Mediante la resta del valor medio de la diferencia (con signo) D-I de la muestra a cada valor individual de R-L de la muestra.

multiplicando los grados de libertad de cada factor por el número total de dimensiones de la forma (16 nuestro caso). El programa ASI (Dujardin & Slice 2007) provisto personalmente por el Dr JP Dujardin, permitió el cálculo de los ANOVAS de Procrustes.

Para descartar la presencia de antisimetría en la forma se realizaron gráficos de las diferencias entre izquierda y derecha de las coordenadas para cada referencia anatómica previo a la superimposición de Procrustes y se inspeccionaron visualmente en busca de agrupamientos de valores (Klingenberg & McIntyre 1998, Debat *et al.* 2000).

Las diferencias de AF en la forma del ala se probaron entre especies criadas en el mismo hospedador y entre individuos de la misma especie criados en distintos hospedadores. Para esto se utilizaron, en pruebas de F, los cuadrados medios de la interacción Individuo por Lado y sus correspondientes grados de libertad obtenidos a partir de los ANOVAS de Procrustes. De esta manera se evita la presencia de AD (incluida en la varianza explicada por el factor Lado)

La Tabla 3.7 muestra una serie de descriptores estadísticos de la asimetría para el tamaño de ala. En el análisis de las diferencias con signo entre el tamaño del ala derecha e izquierda se observó un valor medio positivo en ambas especies y hospedadores y los valores absolutos de las diferencias fueron en promedio mayores en *D. koepferae* que en *D. buzzatii*. Asimismo, es interesante destacar que las diferencias con signo que presentaron los individuos de *D. koepferae* criados en cardón (*Trichocereus*) fueron tres veces mayores respecto de *D. buzzatii* en el mismo cactus sino también respecto de los individuos de la misma especie criados en *Opuntia* (Tabla 3.7).

No se observó evidencia de antisimetría ni para tamaño ni para forma del ala en ningún grupo. Los valores de sesgo y kurtosis no permitieron rechazar la hipótesis nula de una distribución normal de los datos y en el caso de las variables para la forma no se observó ningún agrupamiento lo que sugiere ausencia de antisimetría para el caso multivariado. Considerando los ANOVAS para asimetría en el tamaño, sólo se observó asimetría direccional (factor Lado significativo) cuando *D. koepferae* fue criada en *Trichocereus*. En todos los casos se detectó la existencia de asimetría fluctuante (Tabla 3.8).

Los niveles de asimetría fluctuante detectados difirieron entre especies y no fueron independientes del sustrato (interacción Especie por Cactus significativa ($F_{1,425}=10,83$, $p=0,001$) tal como se ilustra en la Figura 3.7. Los individuos de *D. koepferae* criados en tuna fueron más asimétricos para el tamaño de ala que los que se desarrollaron en cardón, su hospedador natural ($p=0,024$, comparación *a posteriori* usando el método de Tukey). Para el caso de *D. buzzatii*, si bien en cardón se observa una mayor asimetría que en *Opuntia* (Figura 3.7), estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,56$, en comparación de Tukey *a posteriori*).

Las pruebas de asimetría para la forma del ala detectaron asimetría direccional en *D. koepferae* criada en *Opuntia* y asimetría fluctuante en todos los casos (Tabla 3.8). Cuando se compararon los grados de asimetría entre muestras únicamente se detectaron diferencias significativas en *D. buzzatii*. Los individuos criados en *Opuntia* fueron más asimétricos que sus congéneres criados en *Trichocereus* ($F_{992,736}=1.18$; $p<0.01$). Cabe destacar que este efecto del hospedador en la forma se encuentra de alguna manera en contradicción con el MANOVA de las fuentes de variación de la forma del ala en donde no se detectó ningún efecto del cactus sobre el carácter (Tabla 3.3b).

Es importante señalar que la metodología estadística utilizada puede sobreestimar los valores de AF (y por lo tanto la inestabilidad de desarrollo) en presencia de AD (Graham *et al.*, 1998). De hecho, caracteres direccionalmente asimétricos (y/o antisimétricos) no podrían ser utilizados como estimadores de la inestabilidad del desarrollo ya que existe una proporción desconocida de varianza para la asimetría que tiene una base genética y refleja un desarrollo normal del carácter (Palmer & Strobeck, 1992). Frente a este problema Graham *et al.* (1998) propusieron varias metodologías para estimar correctamente la AF. Siguiendo a estos autores establecimos la norma de la relación de crecimiento entre las alas derecha e izquierda y observamos la presencia de isometría⁸. Posteriormente confirmamos que los residuos de la regresión del ala derecha versus la izquierda eran homocedásticos y por lo tanto se podía aplicar un modelo de error aditivo⁹. Dado que se cumplieron estas dos condiciones, podemos asegurar que nuestra metodología, tal como recomienda Palmer (1994), es adecuada en el presente caso y, por lo tanto, los resultados obtenidos son confiables.

⁸ La pendiente de crecimiento es igual a 1 y por lo tanto las dos alas crecen a la misma tasa.

⁹ Ver regresión de eje mayor en Graham y colaboradores 1998

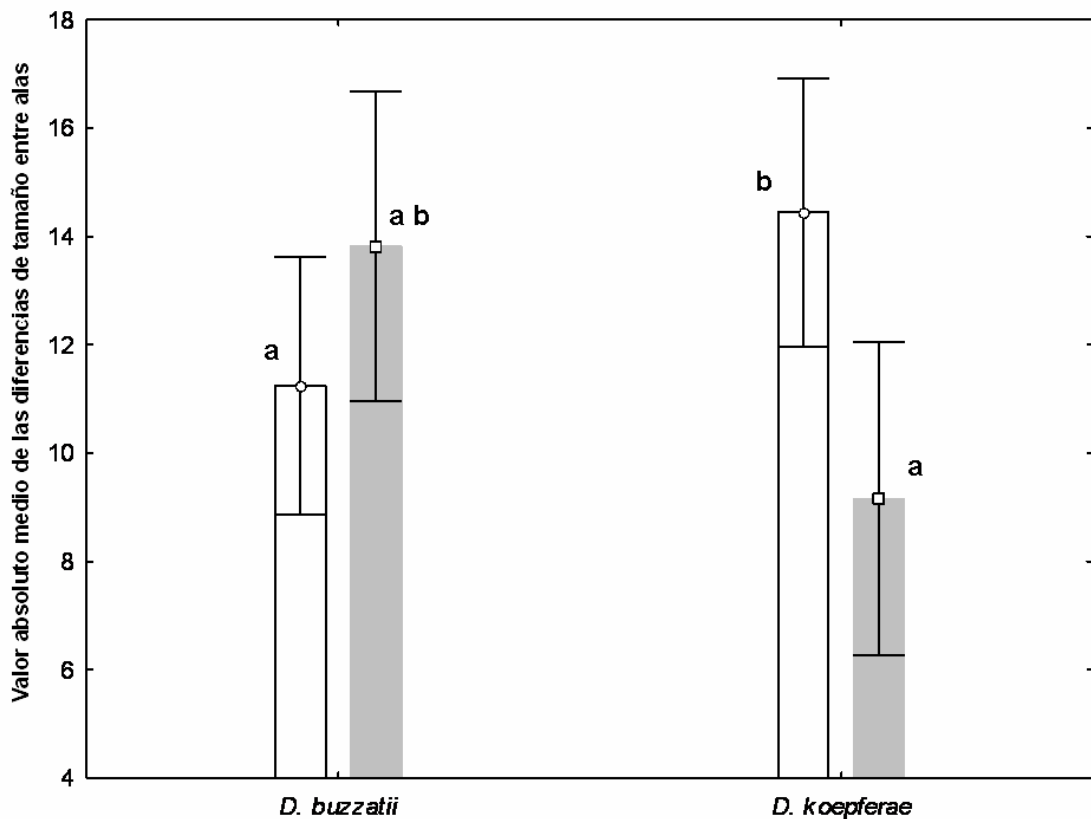


Figura 3.7. Valor absoluto medio (y error estándar) de las diferencias de tamaño entre alas derechas e izquierdas de machos de *D. koepferae* y *D. buzzatii* criados en *Opuntia* (barras blancas) y *Trichocereus* (barras grises). Los valores están corregidos por tamaño total y asimetría direccional. Las letras indican grupos homogéneos según comparaciones a posteriori (Tukey con α global = 0,05)

Nuestra expectativa “a priori” era encontrar valores de asimetría fluctuante más elevados en los cactus hospederos secundarios: *Trichocereus* para el caso de *D. buzzatii* y *Opuntia* en el caso de *D. koepferae*. Esta idea estaba basada en observaciones previas que indicaban que el desempeño de las especies depende de los hospedadores en los que se produjo su desarrollo larvario (Fanara *et al*, 1999). Nuestros resultados confirmaron, de manera general, esta predicción. Los individuos de *D. koepferae* fueron significativamente más asimétricos cuando se desarrollaron en *Opuntia*. Para *D. buzzatii* en cambio, si bien se observó la tendencia esperada, las magnitudes de asimetría no fueron lo suficientemente grandes como para ser detectadas por los estadísticos.

Tabla 3.7 Estadísticos descriptivos (errores estándar en paréntesis) de la asimetría en el tamaño de ala. (D: Ala derecha, I: Ala izquierda)

Especies	Cactus	N° Individuos	Media tamaño alar	Media de la diferencia D- I	Prueba Normalidad Shapiro Wilk	Sesgo	Kurtosis	Media de los valores absolutos de D-I
<i>D. buzzatii</i>	<i>Opuntia</i>	63	1631,82 (9,63)	1,95 (1,37)	W= 0,99, p= 0,26	0,25 (0,22)	-0,09 (0,43)	12,38 (0,83)
	<i>Trichocereus</i>	47	1604,58 (6,10)	1,71 (1,88)	W= 0,99, p= 0,46	-0,18 (0,25)	0,25 (0,49)	14,43 (1,16)
<i>D. koepferae</i>	<i>Opuntia</i>	58	1793,90 (7,72)	1,67 (2,08)	W= 0,98, p= 0,10	-0,17 (0,22)	0,27 (0,45)	16,95 (1,36)
	<i>Trichocereus</i>	47	1821,51 (7,07)	6,22 (2,07)	W= 0,99 p= 0,54	0,04 (0,25)	-0,09 (0,49)	16,51(1,33)

Tabla 3.8 ANOVAs y ANOVAs de Procrustes poniendo a prueba las diferencias en asimetría del tamaño del ala y conformación respectivamente. *gl*: grados de libertad; *CM*: cuadrados medios

Carácter	<i>D. buzzatii</i>						<i>D. koepferae</i>					
	<i>Opuntia</i>			<i>Trichocereus</i>			<i>Opuntia</i>			<i>Trichocereus</i>		
	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>
<i>Tamaño</i>												
Individuo	62	3786,03	160,70**	46	1414,34	37,89**	57	2791,30	56,17**	46	1896,47	47,42**
Lado	1	23,99	1,02	1	13,74	0,37	1	16,17	0,33	1	181,90	4,55*
Lado x Individuo	62	23,56	5,18**	46	37,33	10,50**	57	49,69	5,87**	46	39,99	5,19**
Error	126	4,55		94	3,56		116	8,46		94	7,70	
<i>Conformación</i>												
Individuo	992	6,50E-05	9,29**	736	6,00E-05	10,00**	912	8,20E-05	8,2**	736	8,60E-05	8,6**
Lado	16	8,00E-06	1,14	16	3,00E-06	0,50	16	3,60E-05	3,60**	16	1,10E-05	1,10
Lado x Individuo	992	7,00E-06	8,49**	736	6,00E-06	11,06**	912	1,00E-05	14,18**	736	1,00E-05	18,30**
Error	2016	1,00E-06		1504	1,00E-06		1856	1,00E-06		1504	1,00E-06	

* $p < 0,05$ ** $p < 0,001$

Nuestro estudio ilustra un efecto adicional del sustrato de cría sobre el fenotipo, en particular en lo referido a la asimetría direccional. Esto fue evidente en el caso de *D. koepferae*, en la cual se verificó un incremento de casi tres veces en la diferencia entre ala derecha y la izquierda de los individuos criados en cardón respecto a los crecidos en tuna que no fue acompañado por un incremento de la asimetría fluctuante. En consonancia con nuestros resultados, Graham *et al.* (1993) mostraron un incremento de la AD, pero no de AF, al exponer a *D. melanogaster* a concentraciones crecientes de benceno durante el desarrollo. Los autores explicaron sus resultados como una transición de AF a AD. Si seguimos esta línea de razonamiento, el incremento de AD en *D. koepferae* criada en cardón sugiere una perturbación del desarrollo inducida por el cactus hospedador, que se expresa como AD y no como AF (Graham *et al.* 1993a, b)¹.

Para que la AF constituya un buen biomonitor, debe estar correlacionada no tanto con el stress sino con el fitness (Floate y Fox 2000). En nuestro caso, es interesante destacar que los patrones de AF tienen un correlato en estudios previos que evidenciaron que, por ejemplo, las moscas *D. buzzatii* desarrolladas en *Opuntia* tienen un mayor tamaño corporal, se desarrollan más rápido y gozan de una mayor viabilidad (todos caracteres directamente relacionados con el fitness) que cuando crecen en cardón (Fanara *et al.* 1999). Por otro lado, el patrón detectado en *D. koepferae* concuerda con estimaciones de su performance que mostraron que es una especie, en general, menos plástica (Fanara *et al.* 1999; Carreira *et al.* 2006, ver Capítulo IV) y especializada en el uso de un hospedero que, como ya hemos discutido, es relativamente estresante para otras especies de *Drosophila* debido a su alto contenido de alcaloides y compuestos potencialmente tóxicos, características químicas que son compartidas por muchas especies de cactáceas columnares (Kircher 1982, Fogleman & Abril 1990).

En resumen: existen diferencias entre las especies en los patrones de venación, tamaño y forma del ala y, además, estos caracteres se ven afectados por la naturaleza del hospedador en donde los individuos pasan su desarrollo larvario. Adicionalmente, pudimos observar que la variación en tamaño y conformación del ala de *D. buzzatii* y *D. koepferae* es un fenómeno en donde distintas regiones participan de manera concertada generando la respuesta general de manera integrada. Y además, aprovechando el hecho de ser un carácter bilateral, los patrones de asimetría fluctuante, calculados a partir de las diferencias de tamaño y forma entre el ala derecha e izquierda de distintos

¹ Sin embargo ver Palmer y Strobeck 1992 para una opinión contraria.

individuos, apuntan a perturbaciones en el desarrollo por parte del hospedador cuando éste no es la especie utilizada preferencialmente por las moscas.

Capítulo IV: Variación morfológica de la genitalia masculina en el cluster *buzzatii*

Fuentes de variación fenotípica, normas de reacción y covariación entre partes

Resumen

Muchos eventos especiogénicos han estado acompañados por una rápida evolución de la morfología genital. Sin embargo, en la mayoría de los casos, los patrones subyacentes y los procesos causales no han sido establecidos. En este capítulo se investigan los patrones de variación en la morfología genital masculina en 4 especies (los pares de especies hermanas: *D. koepferae*/*D. buzzatii* y *D. antonietae*/*D. gouveai*) evaluadas en distintos cactus hospedadores.

Se encontró una base genética en la variación morfológica intraespecífica para todas las especies, aunque los patrones generales observados fueron especie-específicos y con diferencias contrastantes. Excepto *D. koepferae*, las otras especies mostraron un comportamiento plástico de la morfología del órgano copulador (aedeago) ya que el aspecto de la genitalia varió entre moscas criadas en diferentes cactus hospedadores. Este trabajo es la primer evidencia de plasticidad fenotípica para la morfología de la genitalia del macho en respuesta al sustrato de cría en *Drosophila*.

El aedeago (aedeagus), órgano genital masculino de *Drosophila*, es, prácticamente, un órgano plano compuesto de dos hemipiezas fusionadas a lo largo de una porción de su margen medio dorsal (Figura 4.1). Dentro del género hay una variedad tan grande en la morfología del órgano copulador que se lo considera un carácter diagnóstico que permite identificar con claridad a las especies. Esto es especialmente relevante en el grupo *D. repleta* (Vilela 1983) en el que se ha descrito muchos pares de especies indiferenciables por su aspecto general. Sin embargo, es esta misma característica ventajosa de la genitalia la que plantea un problema. Si bien un órgano especialmente diverso en formas y ornamentos facilita la identificación de distintos grupos, su complejidad morfológica se vuelve un reto metodológico si se quieren encarar estudios cuantitativos del carácter. Recién el desarrollo de técnicas modernas de morfometría geométrica permitió sortear este escollo (ver Anexo B2).

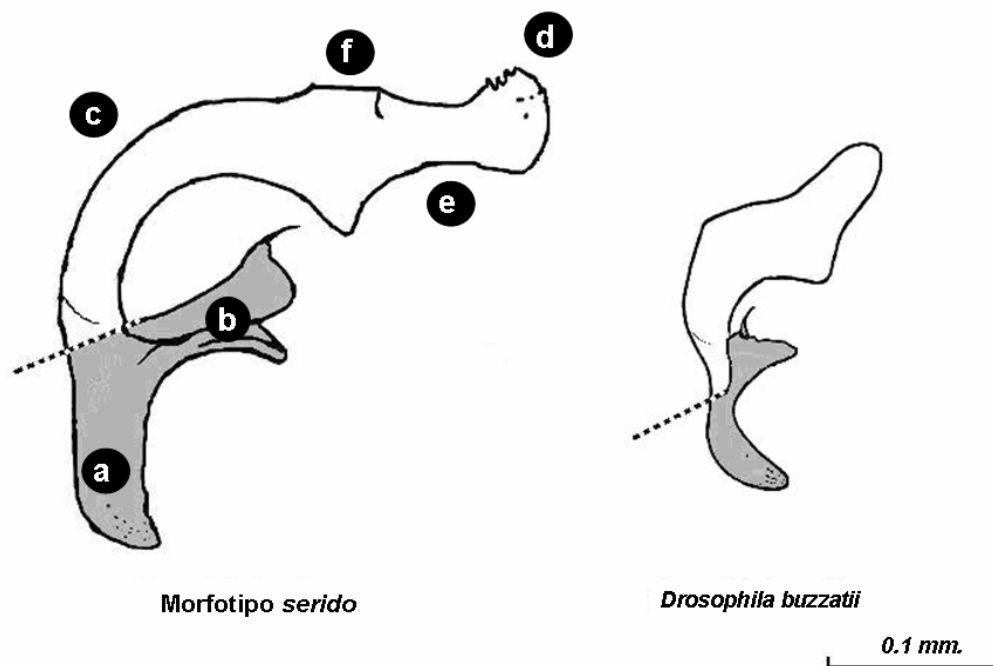


Figura 4.1 Vista lateral izquierda de un aedeago representativo del set de especies “tipo serido” y sus partes (a-f) junto a un aedeago de *D. buzzatii*. En gris se representa la porción del órgano excluida de la cuantificación morfológica. a) apodema b) gonopodio, c) margen dorsal, d) punta, e) margen ventral, f) región de unión de las hemipiezas.

La divergencia genital entre especies

Las altas tasas de evolución genital no son exclusivas de *Drosophila* sino que han sido observadas en muchos taxa de artrópodos¹ y vertebrados con fertilización interna (Eberhard 1993, 1998, Arnqvist 1997a, 1998, Arnqvist & Thornhill 1998, House & Simmons 2003). A pesar de la generalidad del fenómeno, se ignoran los procesos evolutivos que gobiernan la divergencia de la genitalia animal (Coyne 1983, Eberhard 1985, Arnqvist 1997, Hosken & Stockley 2004). Además, es notable la escasez de estudios intraespecíficos que evalúen las causas y consecuencias de la variación morfológica.

Las explicaciones actuales difieren en cuanto a las fuerzas evolutivas invocadas así como en la identificación del blanco de dichas fuerzas. Existen tres hipótesis principales que buscan explicar la evolución genital: la teoría de “llave y cerradura”, la pleiotrópica y la hipótesis de selección sexual.

La hipótesis llave y cerradura (Dufour 1844, Arnqvist 1997) afirma que la genitalia masculina evoluciona como un carácter especie-específico por la presión de encajar correctamente en la genitalia de la hembra. Como cualquier desvío morfológico repercute negativamente en la capacidad reproductiva del macho, los caracteres genitales se encontrarían sujetos a una fuerte selección normalizadora (stabilizing selection). Esta teoría predice un desarrollo canalizado del órgano y bajos niveles de variación tanto fenotípica como genotípica (Shapiro & Porter 1989, Arnqvist 1997, 1998).

La hipótesis pleiotrópica (Mayr 1963 Eberhard 1985, 1990) supone que la variación genital es principalmente neutra. Sin embargo, dado que en el marco de esta teoría la morfología genital se encuentra de manera implícita, genéticamente correlacionada con la morfología general del organismo, cambios en las frecuencias de loci que afectan pleiotrópicamente la morfología general y la genital pueden conducir a una divergencia arbitraria y rápida de esta última (Mayr 1963, Eberhard 1985, 1990).

En la hipótesis de selección sexual (Eberhard 1993, Arnqvist 1997), la variación en la morfología de la genitalia masculina se traduce en variación en el éxito en la fertilización, de manera que la divergencia morfológica es consecuencia de la presión de la selección sexual ya sea por competencia intrasexual como intersexual (Arnqvist

¹ Donde también se utiliza la genitalia como carácter diagnóstico (revisado en Hosken & Stockley 2004).

1997). Hoy por hoy, las dos hipótesis que no incluyen la selección sexual son las que carecen de mayor confirmación empírica (Hosken & Stockley 2004).

Para dificultar un poco más el estudio de la evolución morfológica de la genitalia, además de la influencia de la selección natural y sexual, el valor fenotípico final observado puede estar influenciado por factores ambientales, es decir que las características genitales puede ser fenotípicamente plásticas (Andrade *et al.* 2005), como ocurre con tantos otros caracteres morfológicos. Por este motivo, el estudio conjunto de la variación intraespecífica y la divergencia interespecífica puede ser un enfoque útil para intentar comprender cuál es la estructura genética subyacente a los caracteres genitales y cuáles son los procesos involucrados en su evolución (Arnqvist & Thornhill 1998, Preziosi & Roff 1998, House & Simmons 2003).

Se sabe bastante poco acerca de las bases genéticas de la variación en la morfología genital. En este contexto, dos autores muy influyentes en la temática de la especiación han sugerido, en su reciente libro, que las arquitectura genética subyacente a las diferencias entre especies cercanamente emparentadas en la morfología de la genitalia deberían ser mayoritariamente de naturaleza poligénica (Coyne & Orr 2004). Sin embargo, hasta el momento, esta afirmación se basa en un único estudio comparativo del lóbulo posterior de la genitalia masculina entre dos especies de *Drosophila*, los híbridos F1 y retrocruzantes (Zeng *et al.* 2000). Por lo tanto es evidente la necesidad de más estudios para confirmar la generalidad de esta observación y para determinar si diferencias genéticas simples pueden explicar el patrón de evolución de una estructura compleja como la genitalia de los insectos (Sasabe *et al.* 2007).

Como ya hemos explicado, en el grupo *Drosophila repleta* los caracteres guía a la hora de identificar especies son las inversiones cromosómicas y la morfología del aedeago (Vilela 1983, Ruiz *et al.* 2000). Sobre la base de la comparación de la genitalia masculina es posible dividir las 7 especies del cluster *D. buzzatii* en 2 grupos. Por un lado está *D. buzzatii* que muestra diferencias cualitativas respecto del resto y por otro, las especies del “set” *Drosophila serido*. Los miembros de este conjunto muestran diferencias cuantitativas entre sí (Tidon-Sklorz & Sene 2001). De hecho, cinco de estas especies (*D. serido*, *D. koepferae*, *D. seriema*, *D. antonietae* y *D. gouveai*), tienen aedeagos tan parecidos que originalmente se las consideró como pertenecientes a la misma especie: *D. serido*. (Vilela & Sene 1977). Sin embargo, en tiempos más recientes, las afinidades morfológicas empezaron a mostrarse en conflicto con las

relaciones evolutivas inferidas a partir de estudios filogenético-moleculares (Manfrin *et al.* 2001).

La importancia de las características de la planta hospedadora como factor ecológico clave para la adecuación de los insectos fitófagos se ve expresada por sus efectos en caracteres fisiológicos del comensal y también, morfológicos y comportamentales (Hawthorne & Via, 2001, Via 2001, Etges 1990, Dambroski *et al.* 2005, McBride 2007). Los efectos del cactus hospedador sobre el fenotipo adulto de las moscas cactófilas están bien documentados para el largo de tórax (Fanara *et al.* 1999, 2004), el patrón de venación y el tamaño de ala (Carreira *et al.* 2006, Capítulo III), el tiempo de desarrollo (Fanara *et al.* 1999, Capítulo II), la viabilidad larvaria (Fanara *et al.* 1999, Fanara & Hasson, 2001, Capítulo II) e incluso la estabilidad del desarrollo medida en función de la magnitud de la asimetría fluctuante (ver Capítulo III). Sin embargo, hasta el presente, no se han explorado los efectos que pueden tener los cactus hospedadores sobre los aspectos morfológicos de la genitalia.

En el presente capítulo investigaremos las fuentes de variación fenotípica, genética y ambiental, examinando la conformación y tamaño de la genitalia de *D. koepferae*, *D. buzzatii*, *D. gouveai* y *D. antonietae* criadas en hospedadores alternativos. Los individuos estudiados corresponden a isolíneas de los stocks ya mencionados así como los medios de cría (ver detalles en los Capítulos II y III). En ambos casos las condiciones de temperatura, fotoperíodo y densidad larvaria fueron controladas como se detalló en los capítulos anteriores.

Diseño experimental

Cuantificación morfológica

La captura cuantitativa de la geometría del aedeago se realizó mediante la implementación de un análisis de Fourier de descriptores elípticos del contorno del órgano (ver Anexo B2 para mayor detalle de la técnica utilizada). En el estudio sólo se consideró la porción distal del órgano (distiphallus) que es la parte efectivamente involucrada en la penetración de la hembra. Esto excluye las porciones denominadas apodema y gonopodios (Figura 4.1). El área de las siluetas (medida en píxeles) se utilizó como un estimador del tamaño órgano.

Las matrices de varianza-covarianza de los coeficientes de Fourier² se calcularon por separado para cada par de especies: *D. buzzatii*-*D. koepferae* y *D. gouveai*-*D. antonietae*. Posteriormente se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con cada una de las matrices. El PCA reduce la dimensionalidad de la matriz (Rohlf y Archie 1984) a un número menor de componentes principales (CPs) que pasan a funcionar como caracteres morfológicos reorganizados, cada uno de ellos abarcando una parte de la variación morfológica total (Iwata & Ukai 2002).

Variación en tamaño y conformación

Las diferencias tanto intra como interespecíficas en tamaño fueron evaluadas mediante ANOVAs con los factores Especie (2 niveles, fijo), Cactus (2 niveles, fijo) y Línea (anidado en Especies, aleatorio) como fuentes de variación. Los individuos de las diferentes réplicas fueron agrupados bajo el factor Línea para asegurar un tamaño muestral mínimo en aquellos tubos en los cuales la cantidad de emergidos fue escasa.³ La variación en conformación fue evaluada mediante MANOVAs con los valores de los CPs como variables dependientes y los factores Especie, Cactus y Línea.

Relaciones alométricas

En presencia de alometría interna al órgano, una fracción de los cambios en la conformación puede ser explicada a partir de cambios en el tamaño del aedeago. La magnitud del cambio morfológico alométrico se evaluó de manera comparativa entre parejas de especies. Con este propósito se calcularon, para cada especie, las matrices de correlación entre el tamaño del órgano y cada uno de los ejes de variación morfológica (CPs).

En el par *D. buzzatii*-*D. koepferae*, adicionalmente, tuvimos la oportunidad de evaluar la relación alométrica entre el tamaño del aedeago y el largo del ala, un estimador del tamaño corporal y que, a su vez se sabe que está afectado por el sustrato de cría. Previo a los análisis, todos los datos de tamaño fueron convertidos a logaritmo.

² Cada una de ellas con 120 coeficientes estimados, 4 por armónico considerado en el polinomio descriptivo (ver Anexo B2).

³ La casilla Línea (en Especie) x Cactus. En este tipo de análisis morfométricos, debido al alto número de variables dependientes estimadas, es deseable tener tamaños muestrales mayores que el número de variables morfológicas

En total, para este análisis se disectaron, montaron, fotografiaron y describieron geoméricamente 729 aedeagos: 252 de *D. buzzatii*, 294 *D. koepferae*, 90 *D. gouveai* y 93 de *D. antonietae*

Resultados

Variación en tamaño y conformación

A- *Drosophila buzzatii*-*D. koepferae*

Debido a las marcadas diferencias morfológicas existentes entre estas especies, se procedió, primero, a calcular una matriz de coeficientes y los consiguientes Componentes Principales (CPs) para cada especie por separado. Las variables morfológicas derivadas son las que fueron utilizadas para los análisis de fuentes de variación intraespecífica evitando, de esta manera, que contengan en mayor medida la variación dada por las diferencias de especies. Por el contrario, los análisis interespecíficos se realizaron como se explicó, previamente, con los CPs derivados de una matriz que contenía a ambas especies.

Los primeros 5 CPs de los Descriptores Elípticos contribuyeron a explicar, de manera conjunta, cerca del 84 % de toda la variación morfológica en *D. buzzatii* y *D. koepferae*. El tipo de variación morfológica explicada por cada componente se presenta gráficamente mediante contornos del órgano en la Figura 4.2

AI-Tamaño genital

Como era de esperar, el ANOVA detectó diferencias significativas en el tamaño de la genitalia entre las especies y, notablemente, también entre individuos de la misma especie criados en distintos hospedadores (Tabla 4.1a). Sin embargo, en un diseño de ANOVA anidado como el utilizado, los factores aleatorios Línea y Línea por Cactus funcionan como términos de error para los factores fijos (Especie, Cactus y su interacción) y, por lo tanto, si la proporción de la varianza explicada por aquellos es elevada pueden ocasionar resultados poco confiables en la puesta a prueba de los factores fijos. Por esta razón, se realizaron contrastes “a posteriori” con el fin de evaluar

Tabla 4.1: Fuentes de variación de la genitalia masculina en *Drosophila buzzatii* y *D. koepferae*. Se reportan los valores de *F* de los ANOVAs (para tamaño) y MANOVAs (para forma) en análisis interspecíficos (a) e intraespecíficos (b). *gl*: grados de libertad.

Fuentes de variación	<i>gl</i>	Tamaño	Forma			
			<i>gl</i> Efecto	<i>gl</i> Error	Valor de Wilks	<i>F</i>
a)						
Especie (Sp)	1	1812,95**	10	475	0,06	788,32**
Cactus	1	6,56**	10	475	0,98	1,02
Especie x Cactus	1	0,77	10	475	0,96	2,01*
Línea(Sp)	28	2,05*	280	4512,13	0,14	3,73**
Línea(Sp)*Cactus	28	1,99*	280	4512,13	0,43	1,52**
Error	487					
b)						
<i>Drosophila buzzatii</i>						
Línea	14	1,39	140	1765,07	0,16	3,13**
Cactus	1	3,31	10	213,00	0,95	1,18
Línea x Cactus	14	2,47*	140	1765,07	0,44	1,32**
Error	224					
<i>Drosophila koepferae</i>						
Línea	14	4,71*	140	2093,31	0,16	3,75**
Cactus	1	4,02	10	253,00	0,94	1,59
Línea x Cactus	14	1,12	140	2093,31	0,44	1,56**
Error	264					

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

la interacción Especie por Cactus (ilustrada en la Figura 4.3) y confirmar los resultados generales. Estos contrastes mostraron que los machos de *D. buzzatii* criados en *Opuntia* tuvieron una genitalia más grande que los que se desarrollaron en *Trichocereus* (contraste de Tukey, $p = 0,028$). Sin embargo, en *D. koepferae* las diferencias de tamaño entre moscas criadas en los distintos cactus no resultaron significativas (contraste de Tukey, $p = 0,69$).

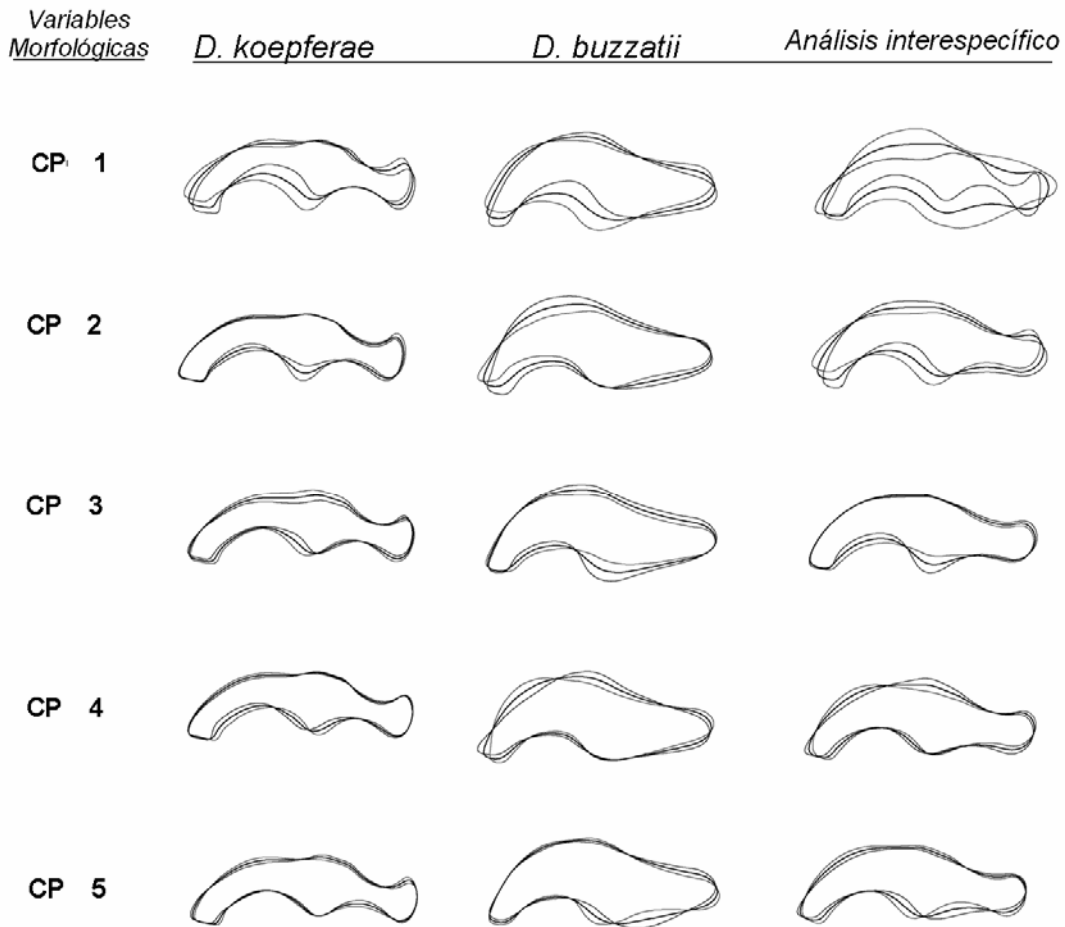


Figura 4.2 Los contornos representan la variación en conformación atribuible a los primeros 5 componentes principales. Las líneas de cada figura representan la conformación media y la conformación \pm dos desvíos estándar. El contorno atribuido a cada componente fue reconstruido a partir de los coeficientes estimados utilizando su valor medio (o el valor de \pm dos desvíos estándar) y llevando los valores de los otros componentes a cero.

Los ANOVAs intraespecíficos también revelaron importantes diferencias (Tabla 4.1b). En *D. buzzatii* la interacción Línea por Cactus dio cuenta de un porcentaje importante de la varianza en el tamaño (12,1 %). Contrariamente, en *D. koepferae* sólo

el factor Línea resultó significativo y no se observó ningún efecto que involucrara a los cactus.

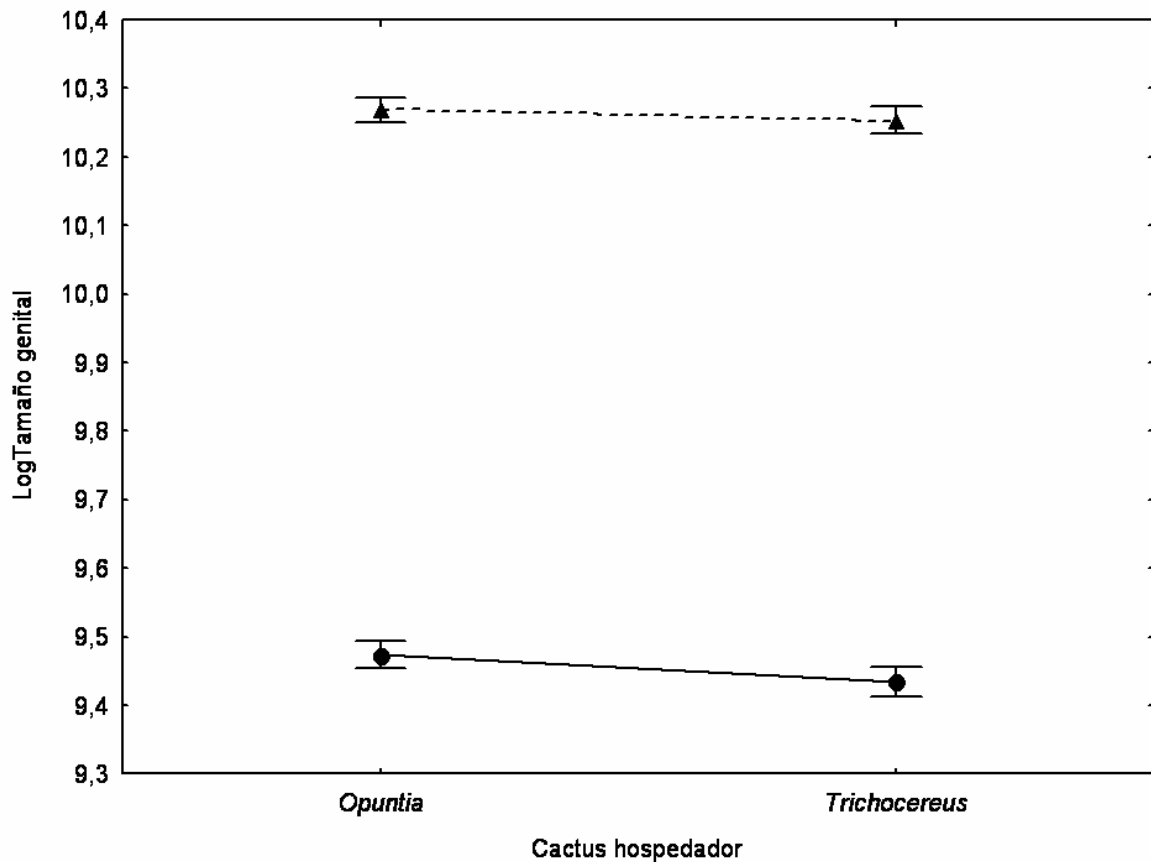


Figura 4.3 Tamaños de aedeagos de individuos pertenecientes a *Drosophila koepferae* (▲) y *D. buzzatii* (●) criados durante su desarrollo larvario en *Opuntia sulphurea* o *Trichocereus candicans*.

A2- Conformación genital

Con respecto a las diferencias de conformación entre *D. buzzatii* y *D. koepferae*, el MANOVA reflejó lo esperado por la evidente divergencia observable. Además, una porción importante de la varianza en la forma puede explicarse por las diferencias entre las líneas y, también, por la interacción con el sustrato de cría (Tabla 4.1a). Las diferencias entre líneas fueron significativas en ambas especies (Tabla 4.1b). La proporción de la variación total en la forma explicada por la interacción Línea por Cactus fue distinta entre las especies. En *D. koepferae*, el CP 3, que se relaciona con la variación en el grosor de las porciones medias tanto ventrales como dorsales del aedeago (Figura 4.2), fue la variable de forma para la cual dicha interacción fue significativa y que explica un 9 % de la varianza total. A su vez, en *D. buzzatii*, CP 1

fue la variable morfológica que exhibió una interacción G x A significativa. Esta variable describe cambios en el proceso del margen ventral (Figura 4.2) y explica el 30 % de la variación original. En la Figura 4.4 se pueden observar claramente los patrones de variación morfológica de ambas especies frente al cambio en el sustrato de cría.

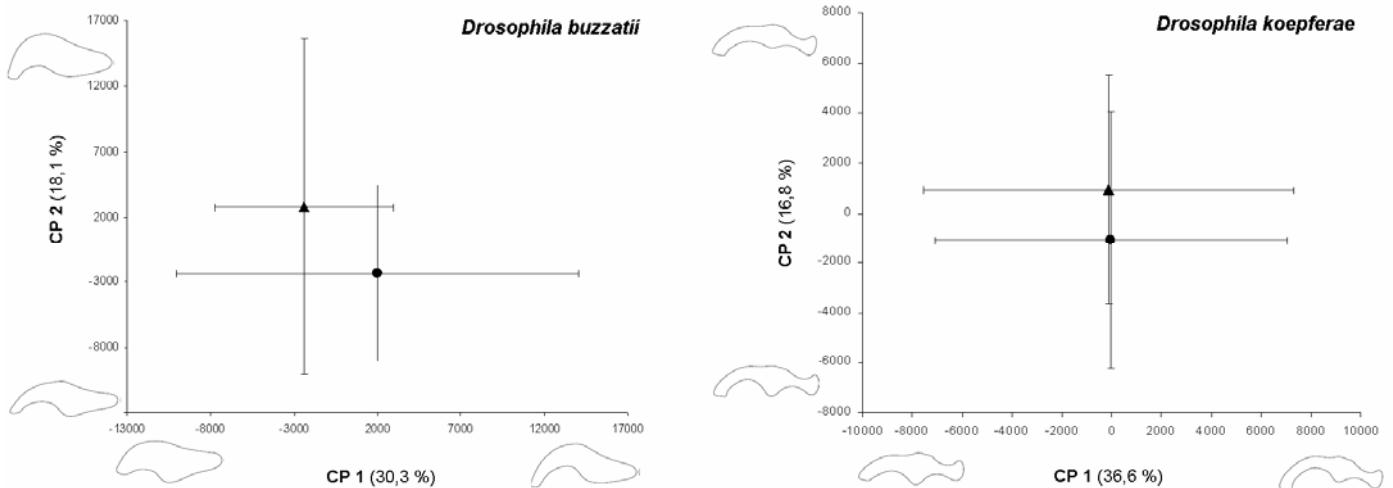


Figura 4. 4: Plasticidad fenotípica de la forma genital. Se grafica la conformación media e intervalos de confianza de los dos primeros componentes del contorno de los aedeagos de *D. buzzatii* y *D. koepferae* en ambos hospedadores (círculos para *Opuntia* y triángulo para *Trichocereus*). Entre paréntesis se indica la proporción de varianza explicada por cada componente principal. En cada eje se representa el tipo de cambio acaecido a lo largo del componente graficándose las formas correspondientes a los valores extremos (± 2 desvíos estándar).

B- *Drosophila gouveai* - *D. antonietae*

BI- Tamaño genital

Para el caso de *Drosophila gouveai* y *D. antonietae* los CPs significativos fueron 15 y explicaron, en conjunto, el 91.6 % de la variación total de la matriz de varianza/covarianza original. En la Figura 4.5 se ilustran los primeros 8 CPs de los descriptores elípticos (82.8 % de la varianza de forma total).

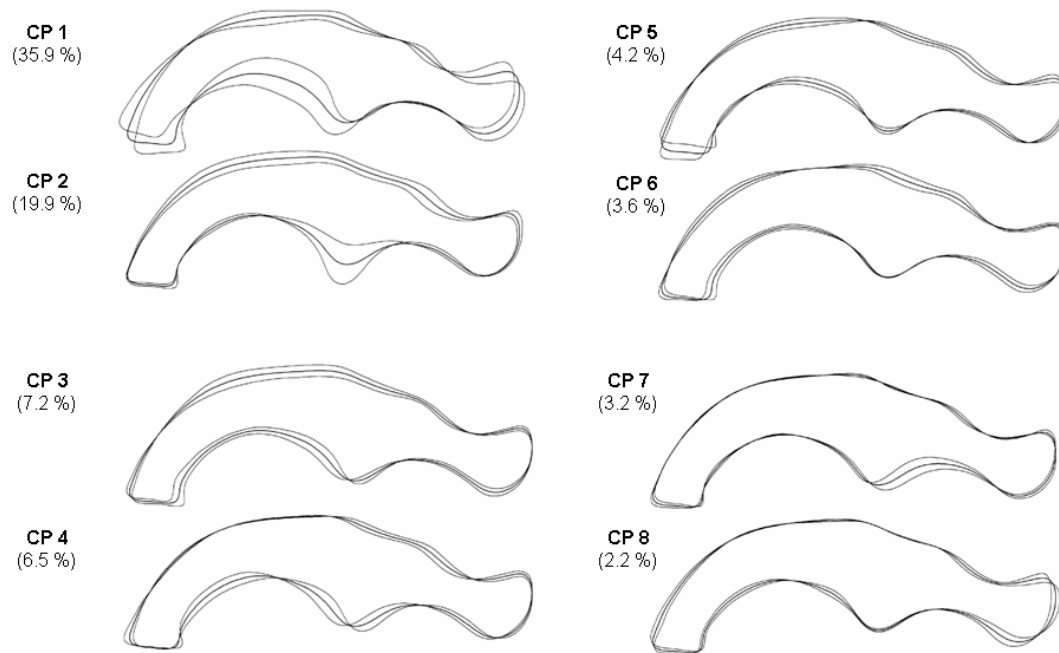


Figura 4.5 Los contornos representan la variación en forma atribuible a los primeros 8 componentes principales del análisis interespecífico de *D. gouveai* y *D. antonietae*. Las líneas de cada figura representan a la conformación media ± 2 desvíos estándar. El contorno atribuido a cada componente fue reconstruido a partir de los coeficientes estimados utilizando su valor medio (o el valor de \pm dos desvíos) y llevando los valores del resto de los componentes a cero. Entre paréntesis se indica el porcentaje de la variación total explicado por cada componente.

Los resultados del ANOVA para el tamaño genital se presentan en la Tabla 4.2. Se observó un efecto consistente del cactus hospedador ya que los machos de ambas especies crecidos en *Pilosocereus* presentaron, en promedio, una genitalia de mayor tamaño que aquellos crecidos en *Cereus*. Si bien las comparaciones *a posteriori* no detectaron diferencias significativas entre especies en ninguno de los cactus ($p = 0,379$ en *Cereus* y $p = 0,365$ en *Pilosocereus*, la interacción Especie por Cactus sugiere que las normas de reacción de las especies con respecto al cactus hospedador no fueron paralelas (Tabla 4.2a, Figura 4.6).

Finalmente en los ANOVAs intraespecíficos no se detectaron diferencias significativas entre líneas (dentro de las especies) en el tamaño de la genitalia, ni tampoco la interacción Línea por Cactus.

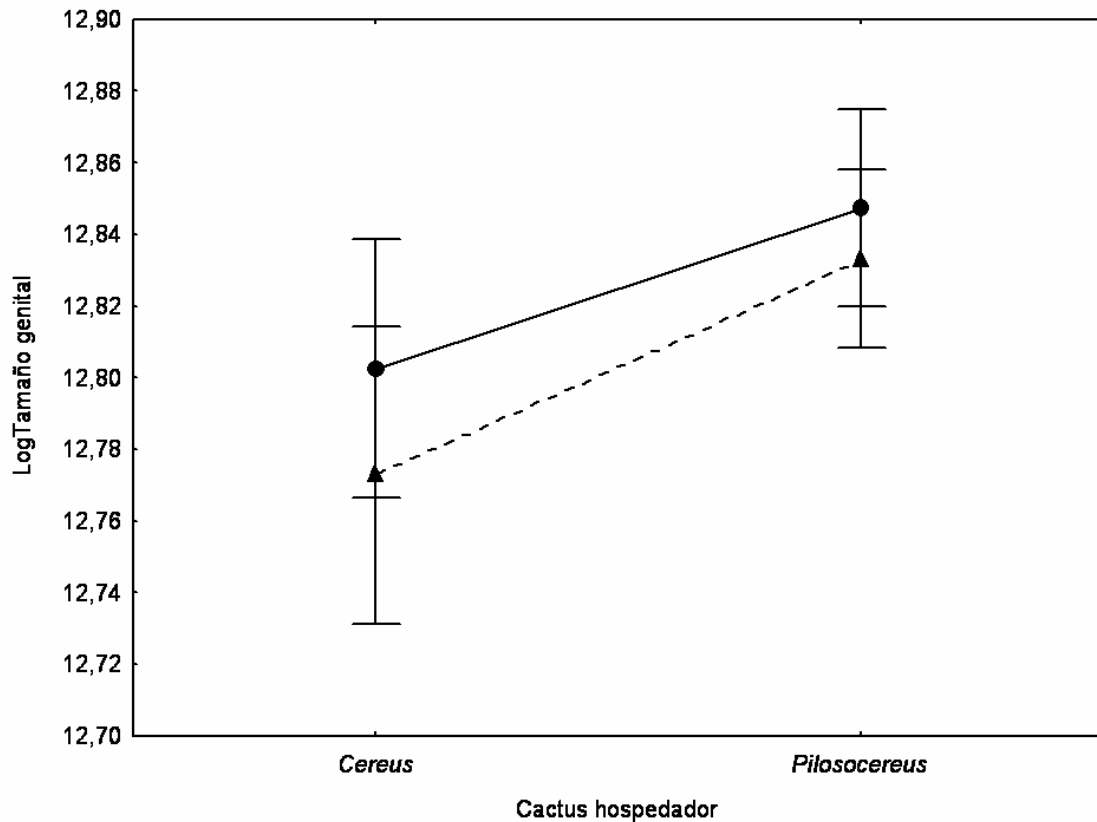


Figura 4.6 Tamaño medio del aedeago en *Drosophila antonietae* (▲) y *D. gouveai* (●) criadas en *Cereus hildmaniannus* y *Pilosocereus machrisii*.

B2- Conformación genital

El análisis de la conformación genital se realizó mediante un MANOVA que detectó diferencias significativas tanto entre especies como entre individuos de la misma especie criados en hospedadores alternativos. En este caso las especies no mostraron diferencias en relación a la norma de cambio plástico a través de los cactus ya que la interacción especie por cactus no fue significativa (Tabla 4.2a) Los cambios conformacionales de la genitalia consistieron en un alargamiento y una mayor curvatura de los aedeagos de los individuos criados en *Pilosocereus* con la punta y el proceso ventral más pronunciados que en aquellos que se desarrollaron en *Cereus*. Tal comportamiento plástico así como las diferencias entre las especies se ilustran en la Figura 4.7.

Los análisis intraespecíficos (Tabla 4.2b) mostraron que, en *D. gouveai* las diferencias entre moscas emergidas en distintos hospedadores y entre líneas fueron significativas pero ninguna de las interacciones. Por el contrario, *D. antonietae* presentó variación significativa entre líneas, pero la misma no fue independiente del hospedador como lo indica la interacción Línea por Cactus

Tabla 4.2: Fuentes de variación de la genitalia masculina en *Drosophila gouveai* y *D. antonietae*. Se reportan los valores de *F* de los ANOVAs (para tamaño) y los MANOVAs (para conformación) de los análisis inter (a) e intraspecificos (b). *gl*: grados de libertad. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Fuentes de variación	Tamaño		Forma			
	<i>gl</i>		<i>gl</i> Efecto	<i>gl</i> Error	Valor de Wilks	<i>F</i>
a)						
Especie (Sp)	1	0,11	15	153	0,47	11,4**
Cactus	1	4,74*	15	153	0,83	2,1*
Especie x Cactus	1	4,83*	15	153	0,89	1,1
Línea(Sp)	6	6,75*	90	867,03	0,23	2,9**
Línea(Sp)*Cactus	6	0,52	90	867,03	0,44	1,5**
Error	167					
b)						
<i>Drosophila gouveai</i>						
Línea	4	1,74	11	70	0,73	2,35*
Cactus	1	0,69	33	206,94	0,22	4,21**
Línea x Cactus	4	1,20	22	140	0,73	1,10
Error	83					
<i>Drosophila antonietae</i>						
Línea	3	0,36	11	74,00	0,91	0,67
Cactus	1	14,68*	33	218,72	0,28	3,64**
Línea x Cactus	3	0,30	22	148,00	0,55	2,33**
Error	85					

Relaciones alométricas

Relación entre el tamaño y la conformación del aedeago.

Los análisis de correlación entre el tamaño y la conformación genital arrojaron nueva información sobre las diferencias morfológicas entre especies.

En el caso de *D. buzzatii* varios componentes conformacionales correlacionaron significativamente con el tamaño, algo más del 16 % de la variación morfológica fue alométrica. En cambio, ninguno de los primeros 5 ejes que describen la variación en la

conformación estuvieron significativamente asociados al cambio en tamaño en la especie hermana (Tabla 4.3).

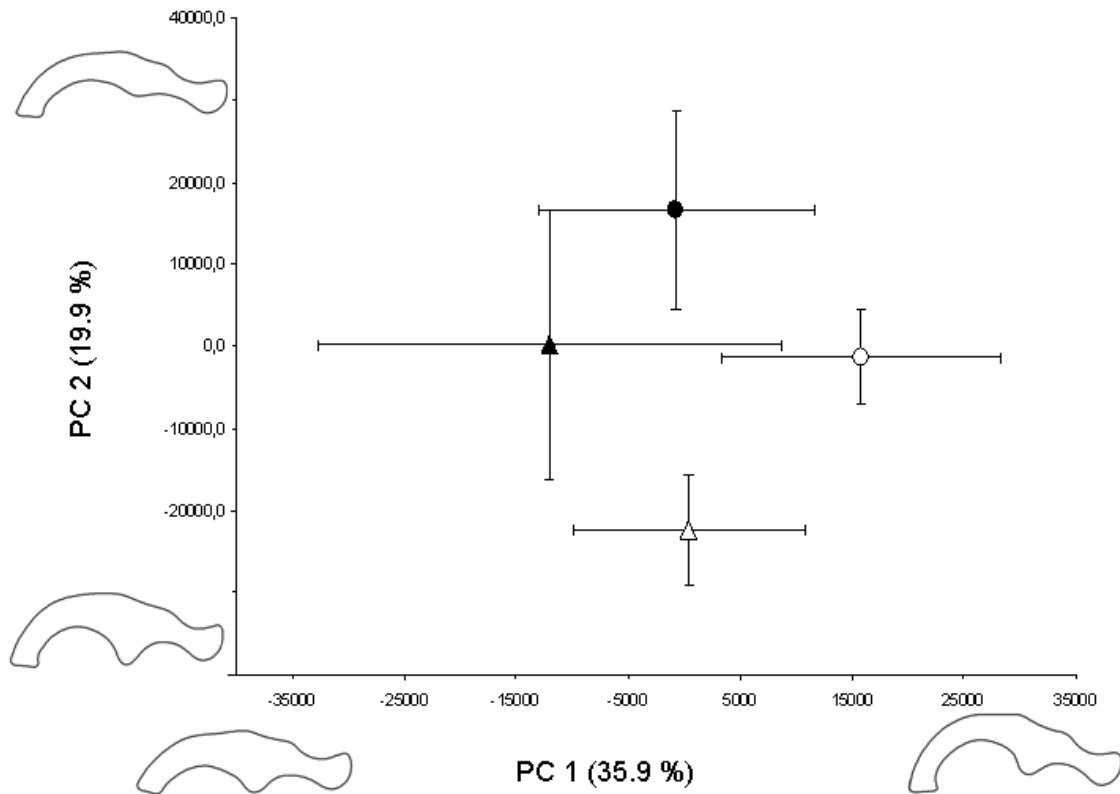


Figura 4.7: Plasticidad fenotípica de la forma genital. Se grafica la forma media e intervalos de confianza de los dos primeros componentes del contorno de los aedeagos de *D. antonietae* (triángulos) y *D. gouveai* (círculos) en ambos hospedadores (símbolos llenos para *Cereus* y vacíos para *Pilosocereus*). Entre paréntesis se indica la proporción de varianza explicada. En cada eje se representa el cambio acaecido a lo largo del componente graficándose las formas correspondientes a los valores extremos.

Curiosamente, a pesar de su similitud genital, *D. gouveai* y *D. antonietae* también presentaron diferencias en sus patrones alométricos. Estas especies no solo difirieron en las variables descriptoras de la conformación que tuvieron una asociación alométrica con el tamaño, sino, que en algunos casos, incluso, difirieron en el signo de esa asociación. Esto se vio confirmado por una prueba de paralelismo que mostró que las pendientes de las regresiones de las variables morfológicas (conformacionales) sobre el tamaño del aedeago eran distintas (regresión multivariada, factor Especie x logTamaño; valor de Wilks = 0,85, $F_{15, 156} = 1,87$, $p = 0,03$). Esto último no permitió la implementación de un análisis multivariado de covarianza (MANCOVA) que hubiera

permitido determinar si las diferencias interespecíficas en la forma del aedeago eran atribuibles a fuentes de variación alométrica, no alométrica o ambas.

Tabla 4.3 Correlaciones entre el tamaño y los 5 primeros componentes principales de variación conformacional del aedeago en las 4 especies estudiadas. Los CPs representan los mismos ejes de variación morfológica dentro de cada par *D. buzzatii*- *D. koepferae* y *D. gouveai* - *D. antonietae*. El asterisco indica las correlaciones significativas ($p < 0,05$). Entre paréntesis se da el número de individuos analizados en cada especie.

Variables de conformación*	Tamaño genital			
	<i>D. koepferae</i> (252)	<i>D. buzzatii</i> (294)	<i>D. antonietae</i> (91)	<i>D. gouveai</i> (87)
CP1	-0,08	-0,17*	0,26*	-0,10
CP2	-0,07	0,45*	-0,19	-0,46*
CP3	-0,03	0,24*	-0,36*	-0,27*
CP4	0,02	0,16*	-0,17	0,15
CP5	0,03	0,01	-0,38*	-0,16

Alometrías entre la genitalia y el tamaño general del cuerpo

Cuando estudiamos la relación entre el tamaño de la genitalia y el tamaño del cuerpo (estimado a partir del tamaño alar), observamos que existen importantes diferencias entre especies. En *D. koepferae* la correlación no fue significativa ($r = 0,13$, $p = 0,07$) mientras que en *D. buzzatii*, el tamaño genital y el largo del ala estuvieron correlacionados de manera positiva y significativa ($r = 0,32$, $p < 0,001$). Al estudiar el tipo de relación alométrica observamos que corresponde a un caso de isometría ya que el valor que tomó la pendiente (coeficiente de alometría) no difirió significativamente de 1 (valor de la pendiente de la regresión lineal = 0,82; intervalos de confianza del 95%: 0,42 - 1,23).

Discusión

Hemos desarrollado a lo largo de este capítulo dos estudios independientes pero análogos sobre la divergencia morfológica en pares de especies de *Drosophila* incluyendo en nuestro estudio un factor biótico de suma importancia para su biología como es el cactus hospedador durante el desarrollo larvario.

La principal conclusión de estos estudios es que tanto el tamaño como la forma del aedeago varían de manera sustancial en las 4 especies estudiadas y que una importante parte de esta variación se detecta como diferencias entre genotipos (líneas). A pesar de ser un concepto superado en la bibliografía, la idea de un fenotipo genital “fijo” para una especie, tal como postula el modelo llave-cerradura constituye una figura preconceptual fuerte y los resultados que presentamos resaltan en este contexto.

Considerar en el diseño experimental de medios de cría preparados con tejido de cactus fermentado permitió la caracterización morfológica en términos de plasticidad fenotípica. No existen antecedentes en la literatura de efectos de sustratos de cría sobre la morfología genital para ninguna especie de díptero pero nuestros resultados coinciden con un estudio reciente que demuestra una respuesta plástica de la morfología del aedeago de *D. mediopunctata* a la temperatura de cría (Andrade *et al.* 2005). En nuestro trabajo la única especie, que no exhibió una respuesta plástica, ni en el tamaño ni la conformación genital asociada al medio de cría fue *D. koepferae*. Tal ausencia de plasticidad podría ser interpretada en términos de un desarrollo genital más canalizado. *D. buzzatii* mostró una evidente plasticidad tanto en el tamaño como en la forma del aedeago. Además, encontramos que existe una importante interacción entre los genotipos y su ambiente de cría. Dicho de otra manera los genotipos representados por las distintas isolíneas no respondieron de la misma manera a la exposición a los cactus alternativos sugiriendo variabilidad genética para las normas de reacción (Conner & Hartl 2004).

La inclusión de *D. gouveai* y *D. antonietae* aporta interesantes perspectivas a las posibles conclusiones de este capítulo. Como hemos visto, estas dos especies presentan una morfología genital del tipo “serido”, similar a la de *D. koepferae* y sin embargo, a diferencia de ésta, exhibieron un comportamiento plástico con respecto al hospedador sugiriendo que el nivel de canalización no es un atributo del “tipo” de aedeago sino más bien de cada especie en particular. Además, hemos observado patrones de variación muy distintos entre *D. gouveai* y *D. antonietae*. Si bien el tamaño y el aspecto genital fueron similares, ambas especies difirieron en sus patrones de respuestas plásticas al cambiar de cactus hospedador. En términos generales, los machos de ambas especies que habían pasado su desarrollo larval en *Pilosocereus* presentaron aedeagos de tamaño mayor a los criados en *Cereus* aunque los patrones de variación del tamaño entre cactus hospedadores difirieron entre especies (algo similar a lo observado con el tamaño del ala en el Capítulo III). Sugestivamente, tanto para el ala como para la genitalia se observó una mayor dispersión de los valores fenotípicos en *Cereus*. Este fenómeno, al

ser observado en dos órganos tan distintos (y derivados de distintos discos imaginales¹) parece indicar un efecto generalizado de este hospedador sobre la morfología.

Como en *D. buzzatii*, la planta hospedadora también afectó la forma del aedeago en el par *D. gouveai*-*D. antonietae*. Los cambios genitales asociados a la crianza en *Pilosocereus* fueron una mayor elongación, un curvado más acentuado y un proceso ventral y punta más conspicuos.

Las relaciones alométricas

Como pudimos observar en el capítulo anterior para el caso de las alas, las relaciones alométricas intra-órgano entre los cambios de tamaño y forma no se mantienen entre especies. Por ejemplo, no podemos pensar a la genitalia de *D. buzzatii* como una versión más pequeña de los otros tipos de aedeago porque, al estar regida por una alometría ontogenética distinta, de alcanzar tamaños equivalentes a los morfotipos *serido* observaríamos una genitalia de una forma muy diferente a la de *D. gouveai* o *D. koepferae*. Esto suponiendo que las funciones alométricas mantienen la linealidad para todo el rango de tamaños en discusión.

En el caso de *D. koepferae*, los bajos o nulos niveles de alometría intra e inter órganos sugieren que tanto la forma y el tamaño genital así como éste y la longitud del ala son, en términos generales, caracteres cuyo desarrollo se encontraría desacoplado. Es decir que, la variación inter-individual en el tamaño corporal no necesariamente se ve traducida en diferencias en la genitalia y por lo tanto un órgano no funciona de predictor del otro.

D. gouveai y *D. antonietae* comparten con *D. koepferae* el mismo aspecto general pero nuestros resultados sugieren que tales similitudes sólo serían superficiales. Ambas especies en oposición a *D. koepferae* mostraron un componente alométrico en la forma genital pero difirieron entre sí en las variables descriptoras de la morfología que estaban asociadas a la variación en el tamaño. Sólo 1 de las 8 variables principales de la forma (CP3) estuvo correlacionada simultáneamente con el tamaño en ambas especies. Los otros aspectos de la morfología estuvieron correlacionados (si lo estaban) en una u otra especie pero no en ambas. En términos generales el 47,3 % de la variación de la

¹ Disco imaginal: En insectos holometábolos se llama así al tejido embrionario que permanece indiferenciado hasta dar origen a las distintas estructuras del imago (adulto) (Maggenti y Gardner 2005)

forma en *D. antonietae* fue alométrica mientras que en *D. gouveai*, esta proporción cae al 27,1 %. Esto sugiere que a pesar de compartir un aedeago de dimensiones y aspecto similar y una historia evolutiva común relativamente reciente, los cambios alométricos, las trayectorias ontogenéticas de las especies se han diferenciado desde el momento de la divergencia.

Por el contrario, *D. buzzatii* posee un aedeago cuyas diferencias de forma entre individuos se explican en parte por las diferencias genitales de tamaño. Además, en esta especie sí existe una relación entre el tamaño corporal de la mosca y el tamaño de la genitalia. Estudios en *Drosophila* en general y en *D. buzzatii*, en particular, han mostrado que los caracteres relacionados con el tamaño corporal (tamaño de tórax, tamaño de ala, largo de tarso) se encuentran bajo selección natural (Robertson 1957, Roff 1977, Hasson *et al.* 1993) y además son afectados por el tipo de sustrato de cría (Fanara *et al.* 1999, 2004, 2006, Carreira *et al.* 2006). Además, existe, en los machos de *D. buzzatii*, una correlación positiva entre el tamaño corporal y el éxito reproductivo (Santos *et al.* 1988, 1992, Hasson *et al.* 1993, Norry *et al.* 1995). Planteado este escenario, podemos conjeturar que si la correlación fenotípica que hemos observado entre el tamaño del aedeago y la longitud del ala tiene una base genética, presiones selectivas direccionales que afectaran el tamaño corporal (o el tamaño del ala) podrían afectar indirectamente la evolución de la genitalia masculina. Esto abre la posibilidad de interesantes experimentos tanto de selección artificial como de búsqueda de genes con efectos pleiotrópicos sobre ambos caracteres.

Continuando con las posibilidades que se abren a partir de los resultados que se presentan en este capítulo, se han encontrado que varias características del sistema de apareamiento de *D. buzzatii* como la frecuencia de re-apareamiento de las hembras, el tiempo antes de la primera cópula, la duración de la cópula y el intervalo entre cópulas sucesivas tienen una base genética (Bundgaard & Barker 2000). Resta explorar no solo la variación interespecífica de estos aspectos reproductivos en el cluster sino además su posible relación con la morfología genital.

Cabe preguntarse entonces si las diferencias morfológicas relacionadas con el hospedador, tienen consecuencias en el desempeño sexual de los machos en alguna de las especies o es una respuesta plástica sin mayores consecuencias adaptativas en ese sentido. Las reales implicancias de los resultados en lo concerniente a la evolución genital y el proceso especiogénico dependerán, obviamente, del tipo de relación que exista entre la morfología genital, su efecto en la hembra y el éxito reproductivo del

macho, algo que ya ha sido descrito en otros insectos pertenecientes a órdenes como Heteroptera (Bertin & Fairbairn 2005) y Coleoptera (House & Simmons 2003).

Las hipótesis de evolución genital

Hasta aquí hemos caracterizado de manera básica los patrones de variación de la morfología del aedeago en 4 de las 7 especies reconocidas del cluster *buzzatii*. Sería interesante examinar si podemos aventurar una evaluación crítica (aunque preliminar) de la plausibilidad de las distintas hipótesis para explicar la evolución genital en nuestro modelo.

Aunque no podemos afirmar que los resultados son concluyentes en este sentido, la extendida variación tanto fenotípica como genética en la morfología constituye una fuerte evidencia en contra de la hipótesis de “llave-cerradura” ya que esta predice muy bajos niveles de variación (genética y fenotípica) en estructuras genitales. Esto es aplicable a todas las especies estudiadas. Por otro lado, la correlación entre forma y tamaño genital y tamaño general del cuerpo, sumada a cierta dependencia de la condición² por parte de la expresión establece condiciones compatibles con predicciones de la hipótesis de pleiotropía, sobre todo en *D. buzzatii*. En este sentido, el argumento se podría extender a *D. gouveai* y *D. antonietae*. Sin embargo, el desconocimiento de la relación entre el tamaño genital y el corporal impide avanzar más en esta generalización de los patrones. Con respecto a la tercer hipótesis, la que involucra a la selección sexual (en cualquiera de sus variantes) deberíamos esperar futuros experimentos poniendo a prueba la relación entre morfología y éxito reproductivo.

En otros taxa de insectos ya se ha documentado una variación en estructuras genitales que son dependientes del ambiente. El mosquito chironómido *Procladius choreus* tiene genitales cuya morfología cambia siguiendo la estacionalidad (Kobayashi 1998). En el mosquito *Anopheles albimanus* la dependencia es con la temperatura en que se desarrolla la larva (Hribar 1996). Cuando Arnqvist y Thornhill (1998) estudiaron a la chinche acuática *Gerris incognitus* encontraron que ciertos caracteres morfológicos de la genitalia de este insecto no sólo eran plásticos sino que eran sensibles a

² Plasticidad fenotípica en relación al hospedador. En la literatura en realidad se entiende por condición al estado nutricional más o menos óptimo durante el desarrollo (Arnqvist 1997) pero dadas las marcadas diferencias químicas que, en general, existen entre hospedadores y su efecto sobre el tamaño corporal y el fitness de adulto en las moscas (Hasson et al 1992, Fanara et al 1999) no es arriesgado argumentar que en cierta medida con la crianza en distintos cactus uno está manipulando la condición de los individuos.

condiciones de stress alimenticio. Esta y otras observaciones, llevaron a los autores a rechazar la hipótesis de “llave-cerradura”. Como se mencionó anteriormente en *Drosophila*, Andrade y colaboradores (2005) han informado una respuesta plástica en la morfología del aedeago de *D. mediopunctata* asociada a la temperatura de cría. En este caso, también, la plasticidad fenotípica observada llevó a los autores a rechazar la hipótesis de llave-cerradura.

¿En qué consisten las diferencias interespecíficas del aedeago?

En un trabajo previo sobre *D. antonietae* y *D. gouveai*, Silva y Sene (1991) encontraron que los arcos II y III (que representan el margen dorsal posterior desde la porción fusionada de las hemipiezas hasta la punta del aedeago) eran los más informativos a la hora de discriminar las especies. A pesar de las diferencias metodológicas, este trabajo confirma esa afirmación ya que observamos que las especies se diferenciaron en las variables morfológicas que involucran cambios en esas porciones del aedeago (Figura 4.7). De todas maneras, y curiosamente, son las mismas partes que estuvieron involucradas en la respuesta plástica con respecto al hospedador (por ejemplo por elongación de la porción distal) lo que habla de una variabilidad general alta y multifactorial de algunas partes del órgano copulador.

Tidon-Sklorz y Sene (2001) conjeturaron que el parecido morfológico observado entre las especies del grupo *D. serido* puede atribuirse a su reciente pasado en común sumado a una ausencia aparente de presiones para la diferenciación morfológica por compartir características ambientales y ecológicas comunes. En este contexto es importante preguntarse ¿cómo pueden diferenciarse la ausencia de presiones selectivas divergentes (ya sea de índole sexual o natural) de una restricción filogenética? Por ejemplo, como miembros del *D. serido* “sibling set”, *D. koepferae*, *D. gouveai* y *D. antonietae* presentan un morfotipo muy similar. Una posible interpretación de esta observación es que este parecido es consecuencia del bagaje genético común que no ha divergido significativamente y, por lo tanto, hoy en día la morfología genital permanece filogenéticamente restringida. Sin embargo, esta similitud podría ser solo aparente. *D. gouveai* y *D. antonietae*, a diferencia de *D. koepferae*, mostraron plasticidad fenotípica. Esto sugiere que el grado de canalización del desarrollo genital varía entre las especies del cluster *buzzatii*. Por otro lado, el porcentaje y el tipo de variación alométrica de la conformación genital (intra-órgano) fueron distintos en todas las especies lo que habla

de distintas “reglas de crecimiento” de la conformación al aumentar el tamaño del aedeago.

En resumen, el aedeago en el cluster *buzzatii* presenta variabilidad genética, plasticidad morfológica dependiente del sustrato en 3 de las 4 de las especies evaluadas. Estas evidencias van en contra de las predicciones de la hipótesis de evolución genital de “llave y cerradura” de manera que éste no sería el marco teórico correcto para modelar la evolución genital en este grupo de especies. Por otro lado, varios aspectos de la variación genital estarían sugiriendo que a pesar de la divergencia reciente, patrones de desarrollo diferenciales ya podrían haberse esbozado en cada una de las especies luego de los eventos de especiación. En el Capítulo VII presentaremos un análisis alternativo para el estudio de las fuerzas implicadas en la divergencia genital entre las especies.

Capítulo V: Efectos fenotípicos de la hibridación interespecífica

Un caso de estudio: El tiempo de desarrollo, la morfología y la viabilidad en *D. buzzatii* y *D. koepferae* e híbridos interespecíficos.

Resumen

En el género *Drosophila*, la hibridación interespecífica en condiciones naturales ha sido considerada un fenómeno poco frecuente. Sin embargo, la aplicación de técnicas moleculares en estudios poblacionales ha suministrado evidencias que sugieren un cierto grado de introgresión entre pares de especies cercanas. Este es también el caso de *Drosophila buzzatii* y *D. koepferae*. En este capítulo analizamos caracteres de historia de vida y morfológicos en la descendencia de cruzamientos entre machos de *D. buzzatii* y hembras de *D. koepferae* criados en distintos cactus hospedadores.

Los híbridos no difirieron significativamente en sus caracteres de historia de vida respecto de las especies parentales y en algunos casos, incluso, mostraron cierta ventaja al presentar tiempos de desarrollo más cortos.

La morfología del ala de los híbridos fue plástica respecto al sustrato de cría y difirió de ambos parentales. Además la conformación y el tamaño del ala (los dos componentes de la forma) mostraron comportamientos heterogéneos sugiriendo cierta complejidad en la arquitectura genética subyacente. En cambio, el grado de asimetría fluctuante de las alas no se vio afectado por la hibridación.

La genitalia de los híbridos presentó una morfología variable y su grado de similitud a una u otra de las especies parentales varió en cada cruzamiento. En general nuestros resultados parecen indicar una arquitectura genética compleja en la que existirían factores con efectos fenotípicos mayores.

Los resultados se discuten e interpretan como indicadores del grado de inestabilidad ontogenética resultantes del balance entre los niveles de heterocigosidad y la disrupción de complejos génicos coadaptados, ambos, fenómenos resultantes de la combinación de genomas divergentes en un mismo organismo.

Frecuentemente se ha observado que los cruzamientos entre especies divergentes producen descendencia con viabilidad y/o fertilidad reducidas (Burke & Arnold, 2001, Coyne & Orr 2004). Esto llevó, históricamente, a considerar a la hibridación en condiciones naturales un evento raro y evolutivamente poco importante (ver una revisión del tema en Burke & Arnold, 2001). La postura alternativa y menos común es considerar que la hibridación es un fenómeno más frecuente y con potencialidad creativa, ya que, vía introgresión de porciones de genoma de una especie en otra, podría ser fuente de nueva variación con consecuencias adaptativas.

Para estudiar el posible papel de la hibridación interespecífica es necesario contar con especies que tengan capacidad de hibridar aunque sea en condiciones artificiales. La posibilidad de generar híbridos interespecíficos entre pares de especies con diferente grado de divergencia, brinda la oportunidad de observar el comportamiento de dos genomas que interactúan dentro de un mismo individuo. Esta interacción de genomas parentales, bajo el modelo de Dobzhansky-Müller¹, podría repercutir en una desestabilización del desarrollo normal. De esta manera, si utilizamos pares de especies cercanamente emparentadas, que aún conservan la capacidad de hibridar, contamos con una herramienta poderosa para estudiar las bases genéticas de la divergencia fenotípica (Otte & Endler, 1989; Alibert & Auffray, 2003).

El verdadero rol de la hibridación en la evolución de las poblaciones en condiciones naturales dependerá de manera crítica de la aptitud de los híbridos y es esta cuestión la que ha sido extensamente debatida en los últimos tiempos (Burke & Arnold 2001, Coyne & Orr 2004). En general se acepta que los híbridos tienden a tener un *fitness* menor al de las especies parentales (Burke & Arnold 2001, Coyne & Orr 2004, Godoy-Herrera *et al.* 2005) y esto puede deberse a distintas causas: irregularidades meióticas, anormalidades fisiológicas u ontogenéticas y/o incluso efectos ambientales específicos (Coyne & Orr 2004). Barton (2001) separó a estos factores en dos grupos: los de selección endógena y aquellos que constituyen factores de selección exógena. En este sentido, la mayor cantidad de información proviene de trabajos que han estudiado los efectos de la hibridación sobre la fertilidad (un factor de selección endógena). En cambio, poco se sabe aún sobre los efectos del ambiente de cría sobre la aptitud darwiniana de los híbridos (selección exógena), aunque la evidencia disponible indica

¹El modelo de Dobzhansky-Müller propone como base de las incompatibilidades híbridas a interacciones entre los genes que han evolucionado por separado en cada una de las especies que se han entrecruzado y cuya presencia simultánea en un híbrido evita que éste sobreviva o reproduzca adecuadamente.

que, en algunos casos, los híbridos pueden tener un *fitness* equivalente e incluso superior al de las especies progenitoras en los hábitats “parentales” (Arnold 1997, Barton 2001).

La hibridación interespecífica en la naturaleza se considera un fenómeno extremadamente raro en *Drosophila* (Coyne & Orr 2004). Sin embargo, las especies del género difieren en su habilidad para aparearse con individuos de especies cercanamente emparentadas (e. g. Marín *et al.* 1993), y varias de ellas pueden cruzarse con éxito en condiciones de laboratorio, como es el caso de las especies que forman el cluster *buzzatii* (ver por ejemplo Marín *et al.* 1993, Machado *et al.* 2006). Más aún, recientes estudios genético-poblacionales han provisto evidencia de flujo génico entre especies que podría considerarse como una fuente de variación intraespecífica adicional. Por ejemplo, la hibridación parece haber jugado (y en algunos casos podría estar jugándolo) un importante papel en la evolución de varios pares de especies como *D. buzzatii*-*D. koepferae* o *D. serido*-*D. antonietae* (Gómez & Hasson 2003; Piccinali *et al.* 2004, Manfrin & Sene 2006). En este sentido las especies que forman el cluster *D. buzzatii* constituyen una oportunidad única para investigar las bases genéticas de la diferenciación morfológica o a nivel de caracteres de historia de vida entre especies de divergencia temprana y tardía. Además, por ser uno de los sistema modelo “cactus-levadura-*Drosophila*”, el complejo *D. buzzatii* agrega la oportunidad de estudiar la influencia de factores ecológicos en la hibridación (Barker & Starmer, 1983).

En este capítulo se presenta el primer estudio general de caracteres morfológicos y de historia de vida en híbridos entre *D. buzzatii* y *D. koepferae*. El cruzamiento de estas especies es posible en condiciones controladas de laboratorio donde los machos de *D. buzzatii* son capaces de fertilizar hembras de *D. koepferae* (Marin *et al.* 1993, Marin & Fontdevila 1998). Si bien los machos F1 son estériles, las hembras son fértiles y pueden ser retrocruzadas con machos *D. buzzatii* (Naveira & Fontdevila 1986, Marin & Fontdevila 1998). La hibridación entre estas especies que puede forzarse en el laboratorio podría ser una fuente adicional de variación en la naturaleza de confirmarse las sospechas de eventos de introgresión recientes en poblaciones de estas especies (Gómez & Hasson 2003, Piccinali *et al.* 2004).

En este capítulo los híbridos se estudiarán en forma comparativa con las especies parentales evaluando: 1) caracteres relacionados con el *fitness* y la explotación de los hospedadores (Viabilidad larvaria y tiempo de desarrollo), 2) la morfología alar, y por último 3) la morfología genital.

Antes hemos planteado que en los híbridos se combinan dos genomas, que dependiendo del caso, acumularon diferencias genéticas que pueden conllevar desde disrupciones moderadas de la homeostasis del desarrollo en los casos en que la divergencia entre las poblaciones parentales es pequeña, hasta perturbaciones extremas que se traducen en un incremento de la AF, valores fenotípicos aberrantes, esterilidad e incluso inviabilidad (Endler 1977, Hedrick *et al.* 1978). En este contexto hemos decidido investigar la hipótesis de que en los híbridos el desarrollo es más inestable que en las especies parentales a través del análisis de los patrones de asimetría entre las alas derecha e izquierda.

Además de las preguntas particulares de cada parte, la cuestión general será, siempre, si los híbridos presentan valores fenotípicos intermedios a las especies parentales (lo predicho por un modelo exclusivamente aditivo de los efectos génicos) y cuáles son los patrones de expresión cuando comparamos distintos cruzamientos o, dicho en otras palabras, si existe una dependencia entre los genotipos parentales de partida y el resultado fenotípico final observado en el híbrido.

Obtención de los híbridos

Seleccionamos al azar 5 líneas de cada especie que se dispusieron para efectuar todas las combinaciones posibles de cruzamientos interespecíficos. Para cada cruzamiento se tomaron 150 machos maduros de *D. buzzatii* y 50 hembras vírgenes de *D. koepferae* y se colocaron en cajas de acrílico en donde previamente se había ubicado una caja de Petri que contenía un medio de oviposición preparado con agar y levadura. Cada 24 horas, durante 3 días seguidos, las cajas de Petri fueron removidas e inspeccionadas en busca de huevos. En los casos positivos se incubaron las cajas por 36 horas a 25° C. Luego se recogieron las larvas eclosionadas y se sembraron en tubos de vidrio con medio de cultivo preparado con cactus fermentado (*O. sulphurea* o *T. terschekii*)² a una densidad de 30 larvas por tubo (4 réplicas por cactus). Paralelamente se montaron cajas de puesta con las líneas parentales y se sembraron larvas a la misma densidad en los mismos medios.

Un subconjunto de las larvas de tercer estadio de cada cruzamiento exitoso fue utilizado para corroborar la condición híbrida de la progenie mediante el análisis de los

² La preparación se realizó como se describe en el Capítulo II

cromosomas politénicos de las glándulas salivares ya que los híbridos entre *D. koepferae* y *D. buzzatii* muestran el típico patrón de asinapsis³.

La nomenclatura para identificar los cruzamientos consistió de un número de 4 dígitos en los que los dos primeros representaban el número de referencia de la línea materna (*D. koepferae*) y los dos últimos de la paterna (*D. buzzatii*). Por ejemplo, el cruzamiento 8832 corresponde a los híbridos producidos a partir de las hembras de la línea 88 de *D. koepferae* cruzadas con machos de *D. buzzatii* de la línea 32.

Caracteres de historia de vida: La viabilidad y el tiempo de desarrollo larvario de los híbridos

Los caracteres de historia de vida estudiados para tipificar la explotación de los sustratos de cría en las especies parentales y los híbridos fueron la viabilidad larvaria y el tiempo de desarrollo. Estos dos caracteres son los más importantes para evaluar la aptitud de los genotipos durante la fase larvaria y se estimaron como se describió en el Capítulo II.

Para el tiempo de desarrollo los análisis estadísticos consistieron en sendos ANOVAs para cada uno de los cruzamientos que produjeron un número suficiente de descendencia híbrida con Genotipo, Sexo y Cactus como factores principales fijos y Réplica como factor aleatorio anidado en la interacción Genotipo x Cactus. En este caso los individuos emergidos fueron las unidades experimentales.

Sólo 6 de los 25 cruzamientos intentados resultaron exitosos y la eclosionabilidad⁴ fue extremadamente heterogénea entre ellos. El porcentaje de cruzamientos exitosos concuerda con lo informado en estudios previos de hibridación entre estas especies (Marín *et al.* 1993). Sólo 3 cruzamientos produjeron un número suficiente de larvas como para obtener estimadores confiables de los caracteres que nos interesaba evaluar en esta parte del trabajo. En la Tabla 5.1 se informan los valores medios de viabilidad y tiempo de desarrollo de cada especie parental y en la Tabla 5.2 se presentan los mismos valores para cada cruzamiento discriminados por genotipo.

Por otro lado, y con el fin de evaluar la fertilidad de los machos híbridos, a estos se les permitió madurar durante una semana y luego fueron puestos en contacto con varias hembras vírgenes maduras de ambas especies (cada especie parental por

³ Apareamiento incompleto entre cromosomas homólogos que marca las regiones introgresadas.

⁴ La proporción de huevos fecundados que eclosionan y producen una larva viable de primer estadio.

separado) por un período de 5 días en tubos con medio de cultivo. Los machos híbridos cortejaron y montaron a las hembras pero en ningún caso, luego de completado este período, se observó que las hembras hayan sido fecundadas ya que no depositaron ningún huevo fértil en las semanas subsiguientes. Estos resultados confirman que los machos híbridos son completamente estériles.

Tabla 5.1: Medias y errores estándar de la viabilidad larvaria (VL, proporción de larvas sembradas que emergieron como adultos) y tiempo de desarrollo (en horas) de las especies parentales.

	<i>Drosophila buzzatii</i>			<i>Drosophila koepferae</i>		
	VL	TD		VL	TD	
		♀	♂		♀	♂
<i>Opuntia</i>	0,75 (0,02)	286,6 (1,37)	289,8 (1,45)	0,67 (0,02)	292,1 (1,34)	300,5 (1,25)
	n = 52	n = 617	n = 551	n = 52	n = 530	n = 521
<i>Trichocereus</i>	0,66 (0,02)	317,1 (2,34)	323,2 (2,2)	0,59 (0,02)	296,8 (1,55)	298,5 (1,43)
	n = 52	n = 526	n = 507	n = 52	n = 443	n = 485

n, tamaño muestral (VL: número de réplicas, TD: número de individuos).

La Tabla 5.3 muestra los resultados de los ANOVAs para viabilidad larvaria. Un hecho destacable de estos primeros resultados es que la viabilidad de los híbridos no fue menor que en las especies parentales (Figura 5.1a). Los distintos genotipos del cruzamiento 3512 no presentaron diferencias. En el caso del cruzamiento 4855 (Figura 5.1) los contrastes “a posteriori” mostraron que, todos los genotipos difirieron entre sí y que los híbridos tuvieron una viabilidad intermedia, un patrón común a ambos cactus. En cambio, se detectó una interacción significativa genotipo por cactus en el cruzamiento 8812, en el que como puede verse la línea parental con mayor viabilidad no fue la misma en ambos cactus. Además, los híbridos, curiosamente, mostraron, en ambos sustratos, valores de viabilidad comparables con el parental de más alta supervivencia (Contrastes de Tukey a posteriori, $p > 0,05$ en ambos casos).

Tabla 5.2: Medias y errores estándar de la viabilidad larvaria (VL, proporción de larvas sembradas que emergieron como adultos) y tiempo de desarrollo (en horas) de los distintos genotipos en cada cruzamiento. n, tamaño muestral (VL: número de réplicas, TD: número de individuos).

	Cruzamiento 3512			Cruzamiento 4855			Cruzamiento 8812		
	TD			TD			TD		
	VL	♀	♂	VL	♀	♂	VL	♀	♂
<i>D. buzzatii</i>									
<i>Opuntia</i>	0,650 (0,104)	299,4 (32,5)	310,7 (38,2)	0,908 (0,034)	305,1 (2,7)	309,4 (3,7)	0,775 (0,120)	297,5 (28,1)	290,2 (23,2)
	n = 4	n = 42	n = 36	n = 4	n = 58	n = 35	n = 4	n = 60	n = 49
<i>Trichocereus</i>	0,483 (0,191)	296,5 (28,2)	307,4 (30,5)	0,850 (0,014)	417,6 (9,1)	428,6 (7,0)	0,400 (0,088)	291,7 (29,5)	296,7 (33,9)
	n = 4	n = 27	n = 31	n = 4	n = 20	n = 28	n = 4	n = 56	n = 46
<i>D. koepferae</i>									
<i>Opuntia</i>	0,758 (0,208)	344,1 (31)	358,4 (29,6)	0,567 (0,048)	335,4 (3,3)	332,6 (2,4)	0,642 (0,152)	288 (34,2)	285,5 (26,3)
	n = 4	n = 48	n = 47	n = 4	n = 34	n = 43	n = 4	n = 40	n = 35
<i>Trichocereus</i>	0,767 (0,109)	314,8 (23,7)	311,4 (27,1)	0,442 (0,080)	371,3 (2,7)	383,5 (3,1)	0,542 (0,083)	286,2 (35,8)	294,1 (36,8)
	n = 4	n = 51	n = 41	n = 4	n = 33	n = 32	n = 4	n = 28	n = 36
Híbridos F1									
<i>Opuntia</i>	0,533 (0,231)	307,5 (54,5)	319,9 (53,5)	0,817 (0,023)	281,4 (3,7)	287,8 (3,1)	0,788 (0,096)	287,1 (32,7)	280,1 (28,6)
	n = 3	n = 27	n = 21	n = 3	n = 29	n = 32	n = 4	n = 61	n = 54
<i>Trichocereus</i>	0,644 (0,168)	273,5 (56,8)	269,4 (42,9)	0,658 (0,080)	324,3 (15,9)	327,5 (11,9)	0,556 (0,137)	271,9 (35,5)	264 (15,2)
	n = 3	n = 25	n = 33	n = 3	n = 24	n = 26	n = 4	n = 41	n = 40

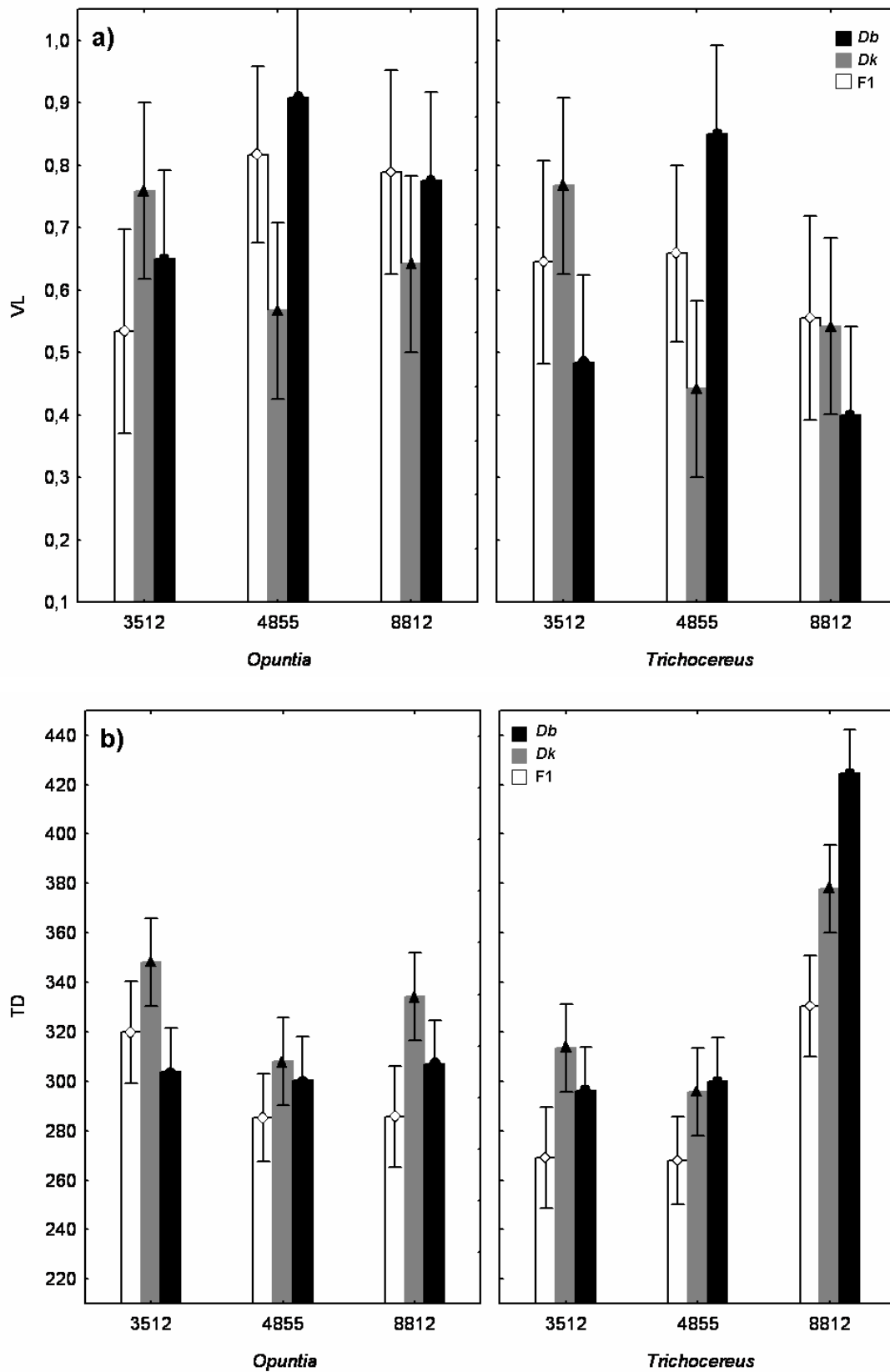


Figura 5.1: Valores medios e intervalos de confianza de la viabilidad larvaria, VL (a) y el tiempo de desarrollo, TD (b) de las líneas parentales de *D. buzzatii* (*Db*) y *D. koepferae* (*Dk*) y los híbridos (F1) en cada cruzamiento en ambos cactus hospedadores. La viabilidad está expresada como la proporción de larvas que alcanzaron el estadio adulto respecto del total sembrado y el tiempo de desarrollo en horas (los sexos agrupados).

En cuanto al tiempo de desarrollo los híbridos invariablemente difirieron de las respectivas líneas parentales en todos los cruzamientos (Tabla 5.4, Figura 5.1b). Los contrastes “a posteriori” comprobaron que los híbridos se desarrollaron más rápidamente que los parentales en los cruzamientos 5512 y 4855 (Test de Tukey: $p < 0,005$ en ambos casos). Cabe destacar que en este último cruzamiento la interacción Genotipo por Cactus fue significativa.

Tabla 5.3: Análisis de varianza de la viabilidad larvaria en los distintos cruzamientos interespecíficos. *gl.*: grados de libertad; *CM*: cuadrados medios. G: Genotipos (*D. buzzatii*, *D. koepferae*, Híbridos F1); C: Cactus (*Opuntia*, *Trichocereus*).
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Fuentes de variación	Cruzamientos								
	3512			4855			8812		
	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>
G	2	0,149	2,86	2	0,432	17,66**	2	0,016	1,46
C	1	0,008	0,16	1	0,141	5,76*	1	0,337	30,12**
G x C	2	0,037	0,72	2	0,002	0,10	2	0,043	3,84*
Error	16	0,052		18	0,024		16	0,011	

Los resultados muestran que la viabilidad larvaria y el tiempo de desarrollo en *D. buzzatii* y *D. koepferae* dependen del hospedador y que una importante proporción de la varianza de ambos caracteres tiene base genética, en consonancia con lo observado en estudios previos (ver Fanara *et al.* 2006 y referencias).

El aporte novedoso de nuestro estudio es la posibilidad de comparar entre las especies parentales y los respectivos híbridos para estos caracteres largamente caracterizados. Sorprendentemente, no encontramos evidencia de una reducción en viabilidad o de un desarrollo extendido en los híbridos con respecto a las líneas parentales, como cabría esperar si existiera alguna interacción negativa entre los dos genomas que perturbara su desarrollo (Alibert & Auffray 2003). De hecho, en algunos cruzamientos la supervivencia de los híbridos fue más alta o el desarrollo más rápido que en los parentales.

La respuesta plástica dependiente del sustrato de cría observada para el tiempo de desarrollo no fue homogénea entre las líneas (genotipos) denotando la presencia de variación genética. Esto evidencia que las moscas de ambas especies perciben a *O. sulphurea* y *T. candicans* como parches distintos de un ambiente heterogéneo. La relevancia evolutiva de esta observación es clara ya que sugiere que la heterogeneidad ambiental ejerce un papel muy importante en el mantenimiento de la diversidad de

especies y su variación genética (Via & Lande 1987, Gurganus *et al.* 1998, Hedrick, 2000, Anholt *et al.* 2003, Ungerer *et al.* 2003, Byers 2004, Harbison *et al.* 2004).

La viabilidad larvaria es un componente primario de la adecuación de los insectos holometábolos a su ambiente. A su vez, la ventaja adaptativa de un tiempo de desarrollo corto residiría en: a) la reducción del tiempo generacional (Sevenster & Van Alphen, 1993) lo que conlleva a la optimización del uso de un recurso efímero como los tejidos de tuna que rápidamente se descomponen o secan en condiciones naturales (Fanara *et al.* 1999); y b) la reducción de la mortalidad larvaria al evitar la exposición a largos períodos de competencia entre individuos (Pimm *et al.* 1985, Krebs & Barker 1991, Pascual *et al.* 1998, Morris 1999). En el marco de un escenario adaptativo podríamos esperar una correlación entre el desempeño y la preferencia de hospedador en particular por parte del insecto (Rausher 1982, Barker *et al.* 1990). Es decir que las especies deberían mostrar una viabilidad mayor y un tiempo de desarrollo reducido en su recurso preferido y la respuesta opuesta cuando se las cambia a su hospedador secundario. En este sentido, nuestros resultados en *D. buzzatii* estarían de acuerdo con la predicción dado que tanto la viabilidad larvaria como el desarrollo rápido se vieron maximizados es uno de sus hospedadores naturales preferidos (*Opuntia*) en comparación con un hospedador secundario.

En cambio la situación en *D. koepferae* fue diferente. Sólo la viabilidad larvaria estuvo maximizada en *Trichocereus* ya que el tiempo de desarrollo fue mayor, en relación a *O. sulphurea*. Esto podría estar relacionado con la respuesta de la morfología del ala (ver Capítulo III). En efecto, *D. koepferae* presentó los mayores tamaños de ala en *T. candicans*, su hospedador primario, en comparación con el tamaño alcanzado en el hospedador secundario, *O. sulphurea* (ver Efectos del cactus hospedador en la morfología del ala más abajo). A su vez, se sabe que el tamaño del ala está positivamente correlacionado con el tamaño corporal y que ambos correlacionan con la capacidad dispersiva (Stalker 1980). Particularmente, se ha propuesto que el desarrollo de alas más grandes podría considerarse una respuesta adaptativa en las moscas cactófilas, ya que confieren una ventaja para la explotación de recursos de baja predecibilidad espacial (Fanara *et al.* 1999). Si esto es así, la correlación negativa entre el tiempo de desarrollo y el tamaño de ala (Cortese *et al.* 2002) podría ser la razón de la

ausencia de un patrón clásico¹ de las moscas de *D. koepferae* criadas en su hospedador preferido.

La decisión de incluir híbridos en el estudio de los componentes de variación del tiempo de desarrollo y la viabilidad se fundamenta en observaciones que sugieren que el flujo génico interespecífico podría haber jugado algún papel en la evolución de las especies cactófilas del cluster *D. buzzatii*. Es más, existen evidencias que el flujo génico entre especies cercanamente emparentadas puede llegar a ser un fenómeno más extendido de lo que solía conjeturarse previo a la aplicación de técnicas de biología molecular a la investigación evolutiva (revisado por Schilthuizen 2000, Coyne & Orr 2004, Noor & Feder 2006). Por ejemplo, estudios de la variación a nivel de la secuencia de nucleótidos del ADN mitocondrial revelaron patrones de haplotipos compartidos entre *D. gouveai* y *D. antonietae* y entre *D. antonietae* y *D. serido*, que probablemente constituyan una consecuencia de eventos de flujo génico unidireccional en ambos casos (Manfrin & Sene 2006). De manera similar, se observó que *D. buzzatii* y *D. koepferae* compartían variantes de polimorfismos nucleotídicos para algunos loci nucleares (Gómez & Hasson 2003, Piccinali *et al.* 2004) mientras que para otros, ambas especies aparentaban ser estrictamente monofiléticas (Piccinali *et al.* 2007). Esto podría indicar que algunas regiones genómicas podrían ser más propensas a la introgresión interespecífica que otras.

En otro sentido, podemos considerar a la introgresión como una inesperada fuente de variabilidad para el cluster aunque para ser estrictos, este rol “creativo” de la hibridación en condiciones naturales dependerá de manera crítica de la aptitud de los híbridos. De las distintas barreras reproductivas que restringen el flujo génico entre *D. buzzatii* y *D. koepferae* el aislamiento sexual (durante el cortejo) es la primaria (Marín *et al.* 1993) mientras que el aislamiento de hábitat o de nicho parece constituir una barrera secundaria (Fanara *et al.* 1999). En condiciones de laboratorio estas barreras pueden superarse para producir progenie híbrida, que suele ser relativamente escasa y los pocos cigotos que llegan a eclosionar representan una fracción muy pequeña del total de huevos fecundados que son depositados por las hembras lo que indica que, tal cual pudimos comprobar, la viabilidad de huevo (o eclosionabilidad) es extremadamente baja en los híbridos. Además, el caso cumple con la regla de Haldane ya que los machos son estériles (Naveira & Fontdevila 1986) y por lo tanto la mitad de

¹ Donde todos los caracteres se encuentran en valores óptimos

Tabla 5.4: Análisis de varianza del tiempo de desarrollo en los distintos cruzamientos interespecíficos. *g.l.*: grados de libertad; CM: cuadrados medios. G: Genotipos (*D. buzzatii*, *D. koepferae*, Híbridos F1); C: Cactus (*Opuntia*, *Trichocereus*); S: Sexo; R: Réplicas anidadas en la interacción G x C
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Fuentes de variación	Cruzamientos								
	3512			4855			8812		
	<i>gl</i>	CM	<i>F</i>	<i>gl</i>	CM	<i>F</i>	<i>gl</i>	CM	<i>F</i>
G	2	50661,79	8,731**	2	88035,5	14,513**	2	18262,93	3,925*
C	1	78012,64	13,584**	1	422320,9	70,920**	1	4566,44	1,006
S	1	2092,59	2,347	1	117,6	0,087	1	4,95	0,008
G x C	2	11449,75	1,973	2	44843,3	7,372**	2	4934,07	1,061
G x S	2	611,21	0,688	2	1102,8	0,801	2	1277,31	2,06
C x S	1	1579,44	1,772	1	178,9	0,131	1	1795,24	2,885
G x C x S	2	553,58	0,623	2	3008	2,182	2	517,84	0,835
R(G x C)	16	6462,44	7,575**	17	7170,9	4,778**	20	5172,16	8,344**
S x R(G x C)	16	853,16	0,751	17	1500,8	1,920**	19	614,85	0,825
Error	385	1136,68		351	781,7		495	745,48	

la descendencia viable es estéril. No cabe duda entonces que estamos hablando de dos especies totalmente constituidas.

Si consideramos la fracción de híbridos que sí eclosionó y analizamos los valores de viabilidad y tiempo de desarrollo, predictores ambos de su aptitud general (o por lo menos de los componentes tempranos de ésta), entonces los híbridos parecen tener un nivel de adecuación equivalente a los parentales: presentaron una viabilidad que por lo menos fue equivalente a la de la especie con peor desempeño y se desarrollaron a una tasa que nunca fue inferior a la especie más lenta.

Hasta aquí hemos bosquejado una aproximación a los componentes tempranos de la historia de vida. Ahora continuaremos con la caracterización de la morfología de los híbridos a través del estudio de las alas y la genitalia masculina.

La variación en la morfología del ala de los híbridos interespecíficos

En esta sección evaluamos el efecto de factores ecológicos (los sustratos de cría) y genéticos (la asimetría de híbridos F1 obtenidos en cruzamientos diferentes) en la morfología alar de los híbridos. Nos preguntamos:

- a) ¿Los valores fenotípicos de los híbridos son intermedios a los presentados por las líneas parentales?
- b) ¿Cuáles son las contribuciones relativas de la plasticidad fenotípica y la variabilidad genética en la morfología y asimetría alar de los híbridos?
- c) ¿Se observa un incremento de la asimetría fluctuante (AF) y/o direccional (AD) en los híbridos?

Evaluar la inestabilidad del desarrollo por medio de la cuantificación de la asimetría del ala es un aspecto interesante en un contexto de hibridación interespecífica. Como comentamos más extensamente cuando discutimos los patrones de variación morfológica del ala en distintas especies (Capítulo III), varios estudios han demostrado una asimetría incrementada en híbridos F1 respecto de las especies parentales. En estos trabajos se argumentó que la causa de esta observación podría ser la disrupción de complejos de genes coadaptados (Ferguson 1986, Lamb & Avise 1987, Ross & Robertson 1990, Graham 1992, Alibert & Auffray 2003). Cuando la divergencia genética entre las poblaciones (o especies) parentales es pequeña uno puede esperar solo

disrupciones sutiles en la homeostasis del desarrollo del híbrido. Sin embargo, a medida que la divergencia es mayor y las diferencias se acumulan, se espera que las disrupciones en el desarrollo de los híbridos sean más extremas ocasionando incrementos en la AF, fenotipos extremos, esterilidad e inviabilidad (Endler 1977, Hedrick *et al.* 1978). Aunque la asimetría direccional está menos asociada a la estabilidad ontogenética (Palmer 1994), hay evidencia que sugiere que la hibridación puede conllevar incrementos en la AD (Auffray *et al.* 1996, Klingenberg *et al.* 1998). Más aún, se ha sugerido que podrían existir transiciones entre la AF y la AD y que ambas podrían considerarse indicadores de stress en las poblaciones (McKenzie & Clarke 1988, Graham *et al.* 1993, Leamy *et al.* 1999; ver también Capítulo III).

No obstante, cabe la posibilidad de que la homeostasis ontogenética pueda no verse alterada. En efecto, si la selección ha producido coadaptaciones similares en las poblaciones que hibridan, o mejor, si estas coadaptaciones tienen bases genéticas similares, entonces la estabilidad y el fitness de algunos híbridos puede incluso aumentar debido al “vigor híbrido” resultante de la heterocigosidad en múltiples loci. Por lo tanto, la homeostasis ontogenética puede actuar como una muy fuerte barrera reproductiva post-cigótica o, por el contrario, en ausencia de aislamiento precigótico, puede llegar a promover el flujo génico entre híbridos y consolidar la perduración de zonas híbridas.

Las alas de insectos y sobre todo de *Drosophila* son modelos de estudio en investigaciones de los factores que promueven discrepancias respecto de la simetría bilateral (Markow & Ricker, 1992; Markow & Sawka, 1992; Klingenberg *et al.*, 1998; Norry *et al.*, 1998; Santos, 2001, 2002). A pesar de esto, al momento de la redacción de este trabajo sólo dos estudios han evaluado el efecto de la hibridación interespecífica en la variación de la morfología alar y la AF en *Drosophila* (Markow & Ricker 1991, Rego *et al.* 2006). En el primer estudio se examinó el largo de ala en cruzamientos entre *D. melanogaster* y *D. simulans*, mientras que en el segundo se analizó de manera simultánea el tamaño y la conformación alar en híbridos de *D. subobscura* y *D. madeirensis*, dos especies de divergencia muy reciente.

Los resultados que se presentan en esta sección involucran algunos cruzamientos que no pudieron ser incluidos en el estudio del tiempo de desarrollo y la viabilidad debido al bajo número de individuos emergidos. En la Tabla 5.5 se resumen los resultados de los ANOVAs comparando diferencias en tamaño y conformación entre genotipos y entre moscas criadas en los distintos cactus hospedadores. Las

diferencias de tamaño entre genotipos fueron significativas tanto en machos como en hembras de todos los cruzamientos con la única excepción del caso de las hembras del cruzamiento 3512. La interacción Genotipo por Cactus fue en todos los casos significativa mostrando la marcada dependencia ambiental de las diferencias genotípicas. Los contrastes *a posteriori* mostraron que: a) en el caso de las hembras de los cruzamientos 3512 y 8855 y en el de los machos del cruzamiento 8812 los híbridos se diferenciaron solamente de *D. buzzatii*; b) los híbridos se diferenciaron solamente de *D. koepferae* en el caso de las hembras del cruzamiento 8832 y en ambos sexos del cruzamiento 4855 en *Opuntia*; c) los híbridos presentaron valores intermedios a los parentales en los cruzamientos 8832, 4853 y 8855 en *Opuntia* y 4855 en *Trichocereus*; d) los híbridos fueron más chicos que ambos parentales en el caso de los machos del cruzamiento 3512 y e) los especímenes híbridos fueron más grandes que ambas especies parentales en el caso de las hembras del cruzamiento 4855 criadas en *Trichocereus*. En resumen, el tamaño de ala de las moscas híbridas difirió de *D. buzzatii* y/o *D. koepferae* pero tanto la magnitud como la dirección de las diferencias dependieron del cruzamiento, el sexo y el cactus de cría (Figura 5.2).

Para la conformación alar se encontraron diferencias entre genotipos en ambos sexos en todos los cruzamientos (Tabla 5.5). En aquellos cruzamientos en los que pudo evaluarse el efecto de ambos sustratos sobre la conformación se detectaron diferencias significativas, con la única excepción de las hembras del cruzamiento 3512. Por su parte la interacción genotipo por cactus fue significativa sólo en algunos casos (Tabla 5.5). En otras palabras, la conformación del ala de los híbridos difirió en términos generales del aspecto de *D. buzzatii* y/o *D. koepferae* pero tanto la magnitud como la dirección de las diferencias dependieron del cruzamiento considerado o sea, de los genotipos involucrados en cada cruzamiento, del sexo y del hospedador (Figura 5.3). Para evaluar este patrón se calcularon las distancias fenéticas¹ de cada individuo a la media conformacional de cada una de las líneas parentales utilizadas. Este estudio clarificó el patrón que se resume en la Tabla 5.6. Allí se resume el parecido morfológico como una diferencia entre la distancia fenética al parental *D. koepferae* menos la distancia al parental *D. buzzatii*. Cuando el intervalo de confianza del 95% de este índice incluía al cero se consideró que los híbridos presentaban un aspecto exactamente intermedio entre ambos parentales.

¹ Se calcularon las distancias euclidianas a partir de los valores de las variables conformacionales (RWs) de cada individuo (Anexo B1)

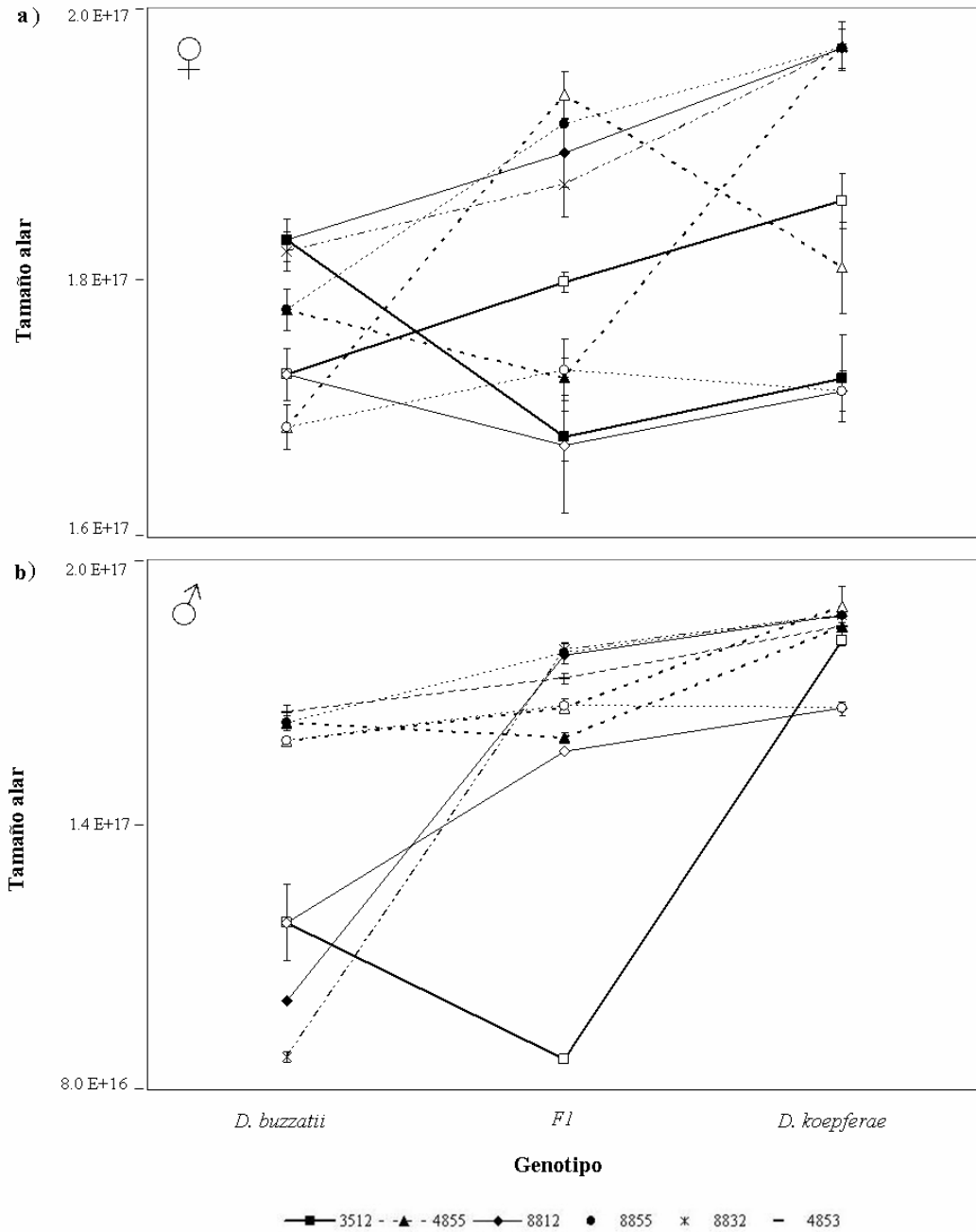


Figura 5.2: Tamaño medio de ala (en unidades arbitrarias de tamaño de centroide) y desvío estándar de los genotipos involucrados en 6 cruzamientos interespecíficos. Las partes a) y b) muestran los valores para hembras y machos respectivamente. Los símbolos llenos corresponden a los individuos criados en *Opuntia* y los vacíos a los criados en *Trichocereus*.

Si bien, en general, los híbridos tendieron a parecerse al parental *D. buzzatii*, la descendencia del cruzamiento 8832 y los machos híbridos criados en *Opuntia* descendientes del cruzamiento 8855 tuvieron un aspecto más cercano a *D. koepferae*. La conformación alar tuvo valores intermedios en las hembras del cruzamiento 8812 emergidas en *Opuntia*, en todas las hembras del cruzamiento 8855 y en los machos

criados en *Trichocereus* descendientes de este mismo cruzamiento (Tabla 5.6, Figura 5.3).

Tabla 5.5: Fuentes de variación de la morfología alar. Se reportan los valores de *F* de los ANOVAs (para tamaño) y los MANOVAs (para conformación) probando diferencias entre genotipos (G; *D. buzzatii*, *D. koepferae* e híbridos) y entre cactus (C; *Opuntia* y *Trichocereus*).

	Cruzamientos					
	3512	8812	8832	8855	4855	4853
Hembras						
<i>Tamaño</i>						
G	2,3	4,8*	25,7***	19,4***	58,7***	ND
C	6,9*	100,6***	ND	76,0***	0,6	ND
G x C	21,5***	7,2**	ND	10,1***	7,7***	ND
<i>Conformación</i>						
G	7,2***	8,0***	8,4***‡	9,6***	10,6***†	ND
C	1,9	8,6***	NA	7,6***	1,8*	ND
G x C	2,0**†	2,4***§a,†b	NA	2,5***§	1,2	ND
Machos						
<i>Tamaño</i>						
G	46,5***	52,0***	798,3***	34,0***	95,9***	23,9***
C	ND	1,5	ND	43,4***	2,6	ND
G x C	ND	5,4**	ND	7,8***	6,8**	ND
<i>Conformación</i>						
G	7,9***†	5,3***†	3,2*‡	8,1***‡a,§b	5,4***†	8,2***†
C	ND	3,5***	ND	3,4***	1,9*	ND
G x C	ND	1,9**	ND	1,2	1,8*	ND

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

ND = No Disponible. Tamaño muestral insuficiente. Los símbolos indican los resultados principales derivados del análisis de distancias morfológicas de los híbridos a las líneas parentales (ver texto).

§ = Conformación alar intermedia a las especies † = Conformación alar similar a *D. buzzatii*

‡ = Conformación alar similar a *D. koepferae*. a: en *Opuntia*; b: en *Trichocereus*

Discusión

En esta sección hemos extendido los estudios reseñados en el Capítulo III de variación intra e interespecífica de la morfología alar en *D. buzzatii* y *D. koepferae* a sus híbridos interespecíficos. Es así como pudimos observar en la morfología de las alas de los híbridos, ya sea considerando sus aspectos de tamaño como de forma y en línea con los patrones parentales, un alto grado de plasticidad fenotípica. Si bien ambos aspectos de la morfología fueron distintos a las especies parentales, tanto la dirección como la magnitud de estas diferencias dependieron del sexo y del sustrato de cría. Otro hecho destacable es la heterogeneidad de los patrones en los distintos cruzamientos marcando

un fuerte efecto de la línea (genotipo) parental particular. Todo apunta a pensar que los factores involucrados en la determinación de la morfología alar en las especies no interactúan entre sí de manera aditiva en los híbridos. En este sentido nuestros resultados son coincidentes con recientes estudios morfológicos en híbridos entre *D. melanogaster* y *D. simulans* (David *et al*, 2002) que han postulado que la arquitectura genética de la conformación alar involucra factores genéticos con efectos dominantes y epistáticos.

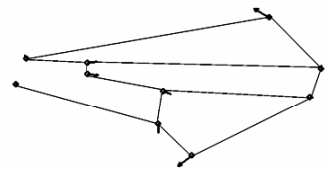
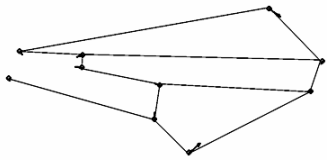
Tabla 5.6: Índice de similitud medio de los híbridos interespecíficos expresado como la diferencia entre las distancias fenéticas a las medias conformacionales parentales (Distancia a *D. buzzatii* menos la distancia a *D. koepferae*). Entre paréntesis se indica si los híbridos son cuantitativamente más similares a alguna de las líneas parentales en particular (*D. buzzatii* – Db- o *D. koepferae* – Dk) o si, por el contrario presentan una conformación intermedia (=)

Cruzamiento	Hospedador							
	<i>Opuntia</i>				<i>Trichocereus</i>			
	♀	N	♂	N	♀	N	♂	N
3512	13,76 (Db)	4	sd		9,08 (Db)	11	15,13 (Db)	10
4855	17,24 (Db)	10	13,79 (Db)	24	9,85 (Db)	6	5,87 (Db)	11
8812	3,61 (=)	11	10,73 (Db)	24	20,27 (Db)	7	22,78 (Db)	10
8855	-1,67 (=)	10	-4,41 (Dk)	16	5,14 (=)	3	1,88 (=)	5
8832	-8,31 (Dk)	7	-7,69 (Dk)	12	Sd		sd	

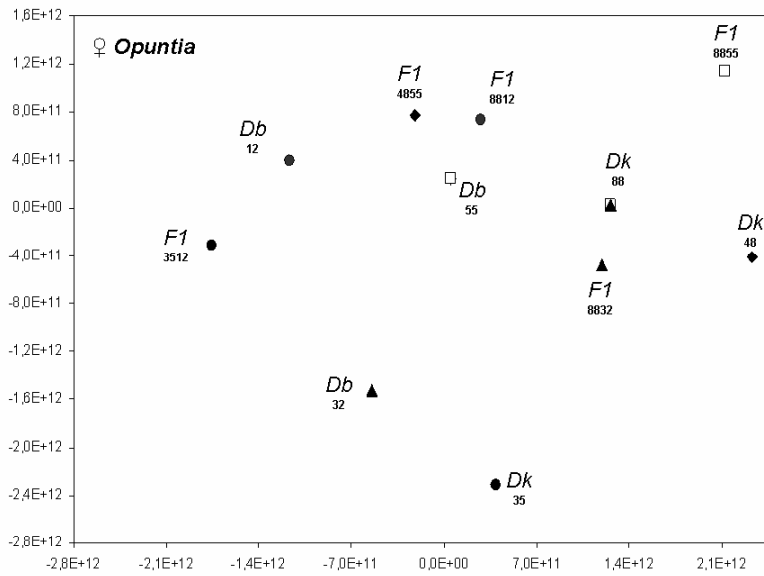
Discutamos, brevemente y por separado, cada uno de los aspectos de la morfología alar: tamaño y conformación. La importancia de efectos no lineales (epistasia, dominancia) sobre caracteres de tamaño, como el peso corporal, es bien conocida desde hace varias décadas en *Drosophila* (Gilchrist & Partridge 1999, Gockel *et al.* 2002). En particular, estas interacciones fueron más pronunciadas en la progenie de cruzamientos donde se combinaban cromosomas de cepas de *D. melanogaster* muy lejanamente emparentadas (e.g. Robertson 1954). En nuestro caso, estos efectos aparecen claramente cuando se analizan los cruzamientos que compartieron la misma línea de *D. koepferae* como progenitor materno (líneas 48 y 88). En los cruzamientos en los que las madres procedían de la línea 88 pudimos comprobar que no solo existe una interacción entre los genomas parentales que afecta el tamaño, sino también que este

efecto es dependiente del sexo: los machos F1 fueron más parecidos en tamaño a los machos de la línea de *D. koepferae* correspondiente, mientras que el tamaño de las hembras híbridas dependió de la línea particular de *D. buzzatii* utilizada como progenitor paterno. En tanto que en los dos cruzamientos en los que las madres eran de la línea 48, el análisis de los machos híbridos de los cruzamientos 4855 y 4853, mostró que eran más similares en tamaño a los machos de la línea de *D. buzzatii* paternal (55 o 53 según corresponda). Esta búsqueda de patrones se complica aún más al considerar el sustrato de cría, ya que las diferencias entre cruzamientos fueron extremadamente dependientes del cactus hospedador.

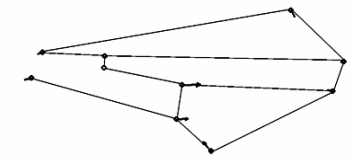
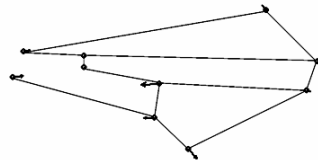
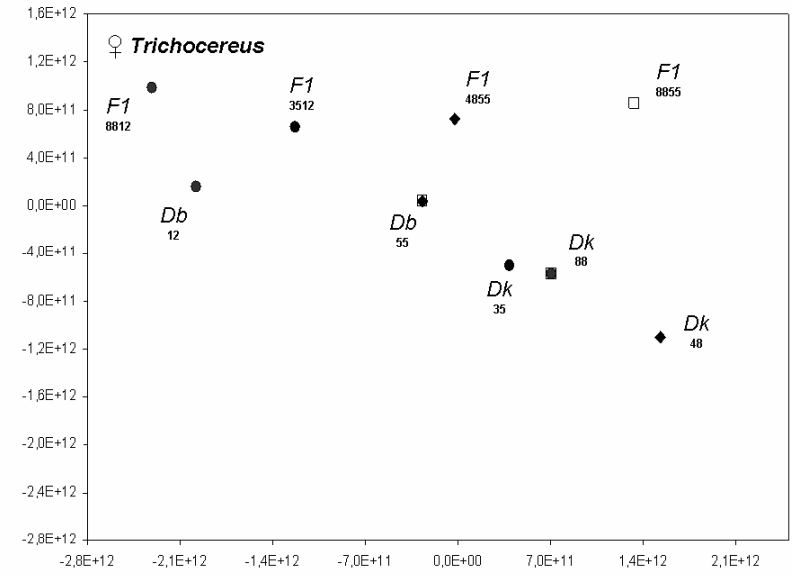
En el caso de los patrones de venación o conformación del ala, pudimos comprobar un escenario similar. Si bien se acepta que la forma del ala está sujeta a limitaciones ontogenéticas más marcadas que el tamaño (Weber 1990, Gilchrist & Partridge 2001), nuestros híbridos se diferenciaron significativamente de ambos parentales. A pesar de que el parecido conformacional de los híbridos respecto de las especies dependió del sustrato de cría utilizado (al igual que para el tamaño), los resultados mostraron muchos más casos en los que las moscas F1 presentaron un aspecto del ala más cercano a *D. buzzatii* que a *D. koepferae*. Una vez más, cuando estudiamos de manera comparativa los cruzamientos que compartieron la misma línea materna de *D. koepferae* observamos que los machos híbridos presentaron una tendencia a parecerse a *D. koepferae* mientras que en el caso de las hembras la similitud en la conformación alar dependió de la línea paterna de *D. buzzatii* utilizada en el cruzamiento. A su vez, en los cruzamientos en los que las madres eran de la misma línea 48 de *D. koepferae*, los híbridos se parecieron más a *D. buzzatii*, independientemente de la línea paterna. Dos cruzamientos compartieron la misma línea como progenitor paterno, la línea 12 de *D. buzzatii*. En este caso vimos que ambos sexos en la F1 se parecieron más a *D. buzzatii* independientemente de la línea utilizada como materna. Sin embargo, en los cruzamientos que compartieron la misma línea paterna 55 los patrones observados fueron diferentes: en el caso del cruzamiento con la línea 48 observamos una dominancia del fenotipo *D. buzzatii* en ambos sexos y hospedadores, pero la misma línea interactuando con la 88 de *D. koepferae* presentó un comportamiento aditivo excepto en un caso (machos híbridos criados en *Opuntia*). En conclusión, nuestros resultados apuntan a una arquitectura genética compleja con relaciones epistáticas y de dominancia entre factores genéticos tanto para la conformación como para el tamaño de ala.



RW 2 (21, 8 %)



RW 1 (29, 6 %)



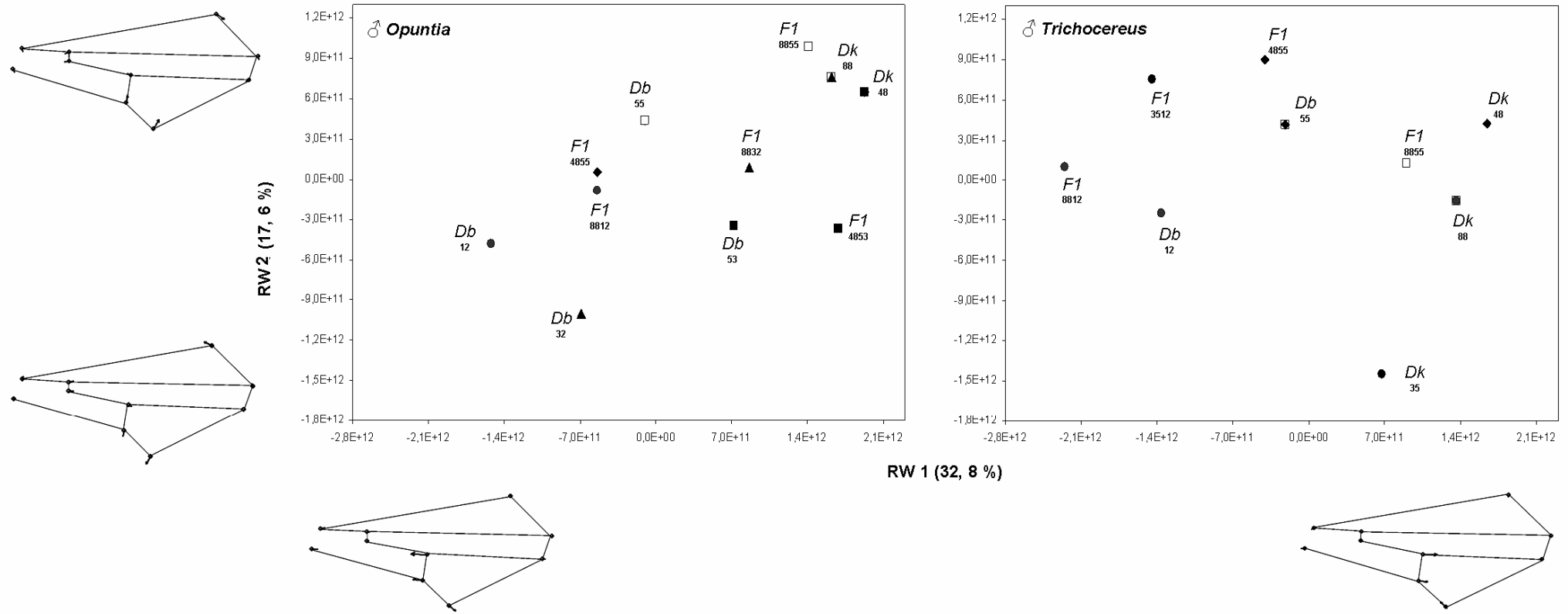


Figura 5.3: Valores medios de las dos primeras variables (RW) de la conformación del ala de cada genotipo discriminado por sexo y cactus de cría. Entre paréntesis se indica el porcentaje de variación explicado. *Dk*: *Drosophila koepferae*; *Db*: *Drosophila buzzatii*, *F1*: híbridos. Los números indican la línea de cada genotipo o los parentales en el caso de los híbridos.

Tabla 5.7: ANOVAs y MANOVAs poniendo a prueba las diferencias en tamaño (a) y conformación (b) respectivamente en los distintos cruzamientos interespecíficos. *gl.*: grados de libertad; *CM*: cuadrados medios.

<i>Fuentes de variación</i>	<i>Cruzamientos</i>											
	<i>3512</i>			<i>4855</i>			<i>8832</i>			<i>4853</i>		
<i>a) Tamaño</i>												
	<i>gl</i>	<i>F</i>		<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>gl</i>	<i>F</i>		<i>gl</i>	<i>F</i>		
Genotipo	2	359,96**		2	204,17**	2	609,06**		2	176,73**		
Cactus	1	0,33		1	0,41		-			-		
Genotipo x Cactus	2	0,14		2	4,49*		-			-		
Error	38			69		56			34			
<i>b) Conformación</i>												
	<i>gl</i>	<i>gl error</i>	λ	<i>gl</i>	<i>gl error</i>	λ	<i>gl</i>	<i>gl error</i>	λ	<i>gl</i>	<i>gl error</i>	λ
Genotipo	20	58	0,015**	20	120	0,095**	20	94	0,015**	20	50	0,014**
Cactus	10	29	0,865	10	60	0,914			-			-
Genotipo x Cactus	20	58	0,635	20	120	0,672			-			-

La morfología genital masculina de los híbridos interespecíficos

De los híbridos descendientes de los cruzamientos 4855, 4853, 8832 y 3512 se pudieron obtener suficientes aedeagos como para realizar el análisis de la morfología genital. Sin embargo, el efecto del sustrato de cría sobre la morfología no pudo analizarse en los cruzamientos 4853 y 8832 ya que solo en los tubos con medio de *Opuntia* emergió un número suficiente de moscas.

El tamaño de la genitalia en los híbridos

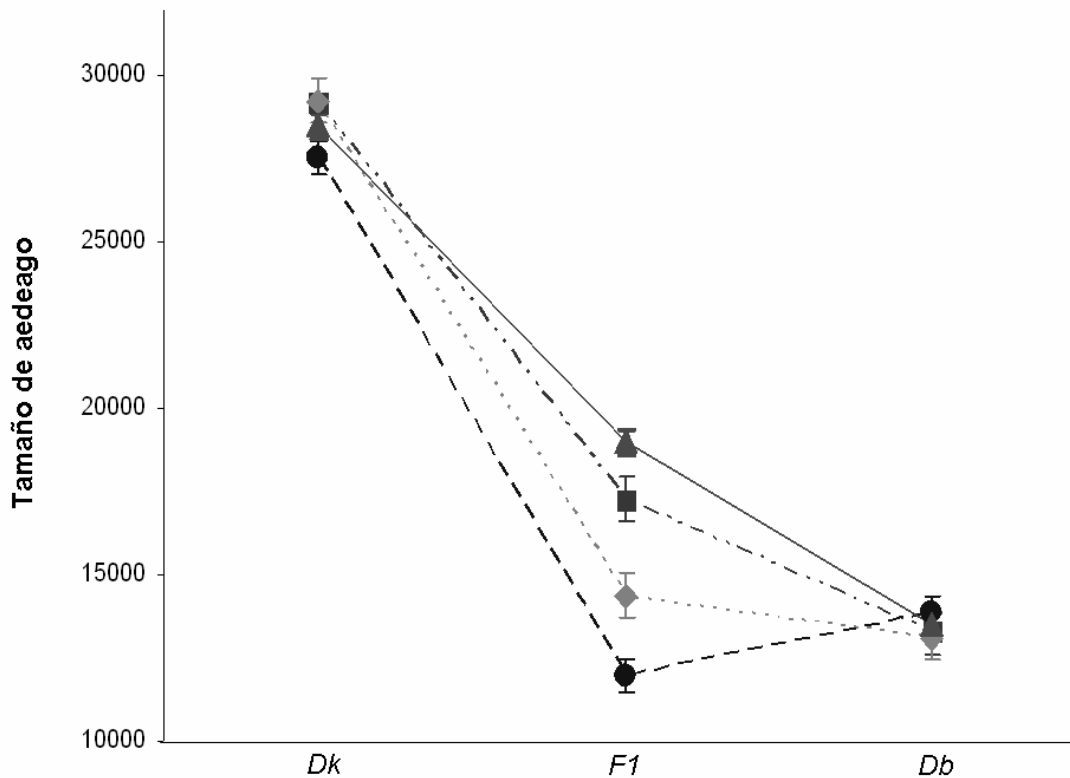


Figura 5.4: Tamaño medio de aedeago (en píxeles) de individuos criados en *Opuntia*. Las líneas unen medias del mismo cruzamiento. Dk: *Drosophila koepferae*; Db: *Drosophila buzzatii*; F1: híbridos. Cruzamientos 3512 (●); 4853 (■); 4855 (◆); 8832 (▲)

En todos los cruzamientos se detectaron diferencias significativas en el tamaño de la genitalia entre genotipos (Tabla 5.7). En la Figura 5.4 podemos observar estas diferencias en los individuos criados en *Opuntia*. Los machos híbridos de los cruzamientos 4853 y 8832 presentaron valores intermedios y fueron significativamente diferentes de los parentales ($p < 0.05$ en ambos casos, comparaciones de Tukey a

posteriori). En dos cruzamientos se obtuvieron suficientes híbridos en ambos hospedadores. En uno de ellos (4855) se detectó una interacción Genotipo por Cactus ($F_{2, 69} = 4,49$, $p < 0,01$), los híbridos presentaron aedeagos más grandes que *D. buzzatii* en *Opuntia*, en tanto que en *Trichocereus* las moscas mostraron aedeagos de tamaño similar a *D. buzzatii*. En todos los casos, *D. koepferae* presentó la genitalia de mayor tamaño. En el cruzamiento 3512 se observó que el tamaño medio de la genitalia de los híbridos fue menor incluso que la media de *D. buzzatii* ($p = 0,025$; Test de Tukey).

La conformación de la genitalia en los híbridos

En la Figura 5.5 presentamos las variables conformacionales resultantes del análisis de Componentes Principales de los Descriptores Elípticos y el tipo de cambio incluido por cada una de las variables. Los ANOVAs permitieron detectar diferencias de conformación entre genotipos en todos los cruzamientos (Tabla 5.7). Los contrastes “a posteriori” mostraron que, en todos los casos, los genotipos difirieron, al menos, en los valores de la variable conformacional más importante en términos de varianza explicada (PC1; $p < 0,001$ en todos los casos). En los cruzamientos 4855 y 3512, ni el factor Cactus ni la interacción Genotipo por Cactus fueron significativas (Tabla 5.7).

En la Figura 5.6 se ilustra la distribución en el espacio morfológico determinado por los dos primeros PCs de los valores medios de los distintos genotipos para cada cruzamiento. Puede verse que las especies parentales aparecen claramente diferenciadas entre sí y que los híbridos ocupan posiciones intermedias respecto de las líneas parentales a lo largo del primer eje principal (PC 1). Sin embargo, no se observó un patrón semejante para el segundo eje principal. Por ejemplo, los híbridos del cruzamiento 8832 presentaron valores de PC 1 y PC 2 que los ubica más cerca de *D. koepferae* (línea 88) que de *D. buzzatii*. Por el contrario, en el cruzamiento 3512 la conformación híbrida aparece como más similar a *D. buzzatii* conforme a los valores de PC 1 (línea 12), pero los valores de PC 2 fueron más extremos que los de cualquiera de las líneas parentales. Con el fin de evaluar el parecido de la conformación híbrida respecto de cada una de las líneas parentales de manera cuantitativa, se calcularon las distancias fenéticas¹ al centroide morfológico de cada línea parental. Si la conformación híbrida del aedeago es efectivamente intermedia la distancia a ambas especies

¹ Como se explicó para la conformación alar mas arriba (Nota al pie 6)

parentales será la misma. En cambio si existe algún tipo de dominancia en la expresión de un genoma respecto del otro, el fenotipo del híbrido será más parecido a esa línea parental que a la otra. Esto se puso a prueba mediante un ANOVA en el que la variable dependiente fue la distancia euclidiana del híbrido al centroide (conformación media) de cada parental y los factores independientes (fijos) fueron Cruzamiento y especie parental. El ANOVA reveló diferencias significativas entre cruzamientos y, además, que la semejanza de los híbridos a las líneas parentales varió entre cruzamientos ($F_{3,110}=17,59$; $p < 0,0001$; Figura 5.7). Es decir que en algunos cruzamientos el genoma de *D. buzzatii* fue dominante y en otros lo fue el de *D. koepferae*.

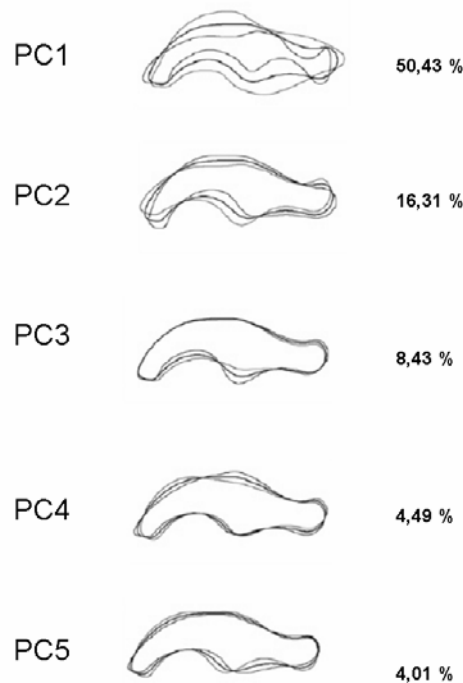


Figura 5.5: Contornos representando la variación en conformación de los aedeagos de *D. koepferae*, *D. buzzatii* e híbridos F1 para las 5 variables conformacionales mas importantes. Cada contorno fue reconstruido a partir de los coeficientes elípticos estimados a partir del valor medio del PC correspondiente y de los valores de PC medio \pm 2 desvíos estándar.

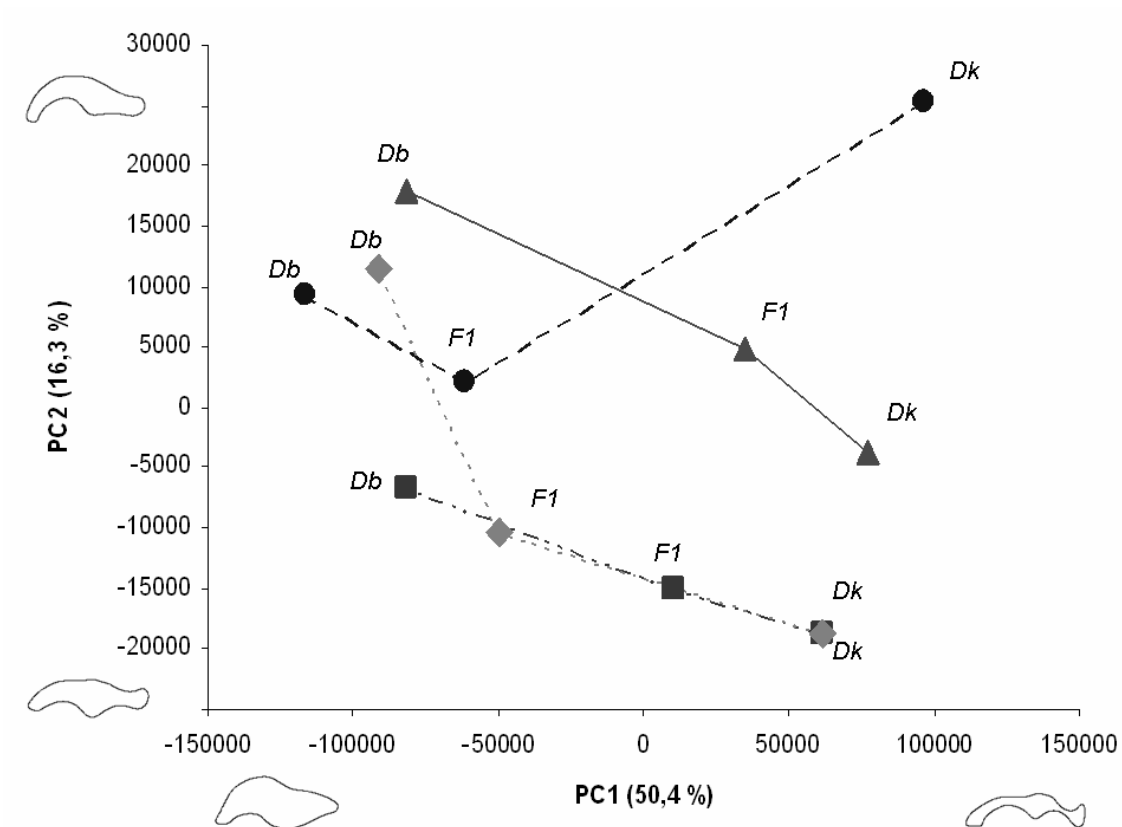


Figura 5.6: Valores medios de las dos primeras variables conformacionales de cada genotipo. Entre paréntesis se indica el porcentaje de variación explicado. Las líneas conectan los genotipos involucrados en el mismo cruzamiento. Los contornos ilustran los fenotipos extremos del tipo de variación morfológica incluida en cada dimensión. *Dk*: *Drosophila koepferae*; *Db*: *Drosophila buzzatii*, *F1*: híbridos. Cruzamientos: 3512 (●); 4853 (■); 4855 (◆); 8832 (▲).

Discusión

¿Qué es lo que nos dice el estudio de la morfología genital respecto de las bases genéticas de las diferencias genitales entre *D. buzzatii* y *D. koepferae*? En primer lugar, nuestros resultados no son concordantes con lo observado en el único estudio que compara la morfología genital de híbridos F1 entre *D. mauritiana* y *D. simulans* y ambas especies parentales² (Liu *et al.* 1996, Zeng *et al.* 2001). En nuestro caso ni la conformación ni el tamaño genital de los machos híbridos mostraron valores intermedios y, además, el patrón de semejanzas y diferencias de los híbridos respecto de los fenotipos parentales varió entre cruzamientos. En ninguno de los 4 cruzamientos la morfología híbrida fue intermedia (Figura 5.7). Los híbridos de los cruzamientos 4853 y 8832 tendieron a asemejarse a su parental *D koepferae* mientras que aquellos fruto de los cruzamientos 3512 y 4855 exhibieron genitales más parecidos a los machos de *D.*

² En ese caso se trataba de *D. melanogaster* y *D. simulans*

buzzatii de las líneas empleadas. Estos resultados son de alguna manera incompatibles con la generalización de Coyne y Orr (2004), quienes se basaron únicamente en el estudio de los híbridos entre *D. simulans* y *D. mauritiana*. Los autores afirmaron, temerariamente, que las bases genéticas de las diferencias morfológicas genitales entre especies consisten de muchos genes con pequeños efectos aditivos. Sin embargo, hay que destacar que los autores del trabajo original (Liu *et al.* 1996) admiten detectar cierto grado de dominancia y epistasis en la expresión fenotípica de la morfología. Siguiendo esa línea de evidencia, nuestros resultados sugieren la existencia de cierto grado de dominancia y la participación de factores de efecto mayor.

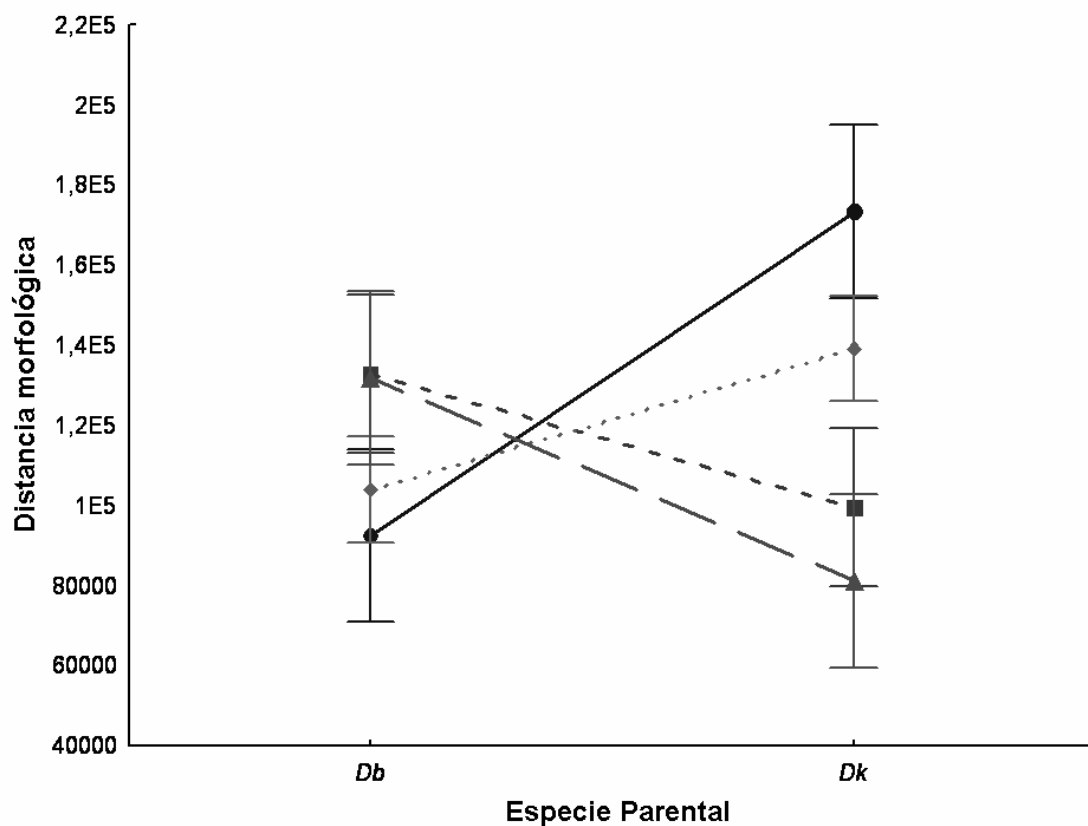


Figura 5.7: Distancias morfológicas (Euclidianas) medias (e intervalos de confianza asociados) entre la conformación genital de los híbridos y el aspecto de las líneas parentales que los produjeron. Las líneas unen los valores de distancia a los distintos parentales de los híbridos de un mismo cruzamiento. *Dk*: *Drosophila koepferae*; *Db*: *Drosophila buzzatii*. Cruzamientos: 3512 (●); 4853 (■); 4855 (◆); 8832 (▲)

Sin embargo, nuestro trabajo y el de Liu *et al* (1996) tienen algunas diferencias que vale la pena resaltar. La primera se relaciona con la parte de la genitalia examinada en cada caso. En nuestro trabajo estudiamos la porción intromitente del phallus y en el

de Liu *et al.* el lóbulo posterior³. Estos órganos desarrollan funciones radicalmente diferentes durante la cópula (Jagadeeshan y Singh 2006) y por lo tanto, muy probablemente su evolución se encuentre dirigida y limitada por procesos distintos. La segunda diferencia es metodológica y hace a las metodologías utilizadas para evaluar las diferencias morfológicas. Afortunadamente, esto último, pudimos resolverlo aplicando nuestra metodología a parte de los datos del trabajo de Liu *et al.* Con este fin capturamos los contornos disponibles en la versión digital del trabajo y pusimos a prueba las diferencias entre los híbridos F1 y las especies parentales y la distancia fenética entre estos grupos. Este análisis confirmó que los híbridos entre *D. simulans* y *D. mauritiana* tienen una morfología intermedia ya que las distancias morfológicas entre los híbridos y cada uno de los fenotipos parentales no fueron distintas ($F_{1, 18} = 0,08, p = 0,93$).

Otro punto para nada trivial que debemos tener en cuenta en la discusión es la diferencia que existe entre los tiempos de divergencia entre cada par de especies. Esto es importante porque el desarrollo de los híbridos se verá afectado por un balance entre los efectos del grado de heterocigosidad y el grado de coadaptación genómica (los que se espera que se incrementen y decrezcan respectivamente en función del tiempo de divergencia) así como los efectos de las presiones selectivas que sufrieron las especies estudiadas a lo largo de su historia evolutiva (Alibert & Auffray 1993). *D. simulans* y *D. mauritiana* son especies relativamente jóvenes, de divergencia reciente. Su último ancestro común se estima que existió entre 0,6 y 0,9 millones de años atrás (Hey & Kliman 1993) mientras que *D. koepferae* y *D. buzzatii* son especies más antiguas con un tiempo de divergencia de 4 a 5 millones de años (Gómez & Hasson 2003).

Otra diferencia importante es que, *D. simulans* y *D. mauritiana*, a diferencia del par *D. koepferae-D. buzzatii*, son homosecuenciales lo que significa que no tienen diferencias cromosómicas fijadas, lo que hace que los cromosomas politénicos de ambas especies presenten un patrón de bandas idénticas (Lemeunier & Ashburner 1976). En cambio, desde su separación se han fijado dos inversiones diferentes en los linajes que llevan a *D. buzzatii* (la inversión *g* en el cromosoma 5) y a *D. koepferae* (la inversión *j*⁹ en el cromosoma 2), y, además, en ambas especies han evolucionado, de manera independiente, ricos polimorfismos de inversiones, en particular en el cromosoma 2 (Fontdevila *et al.* 1988, Ruiz & Wasserman 1993).

³ Una estructura particular que es característica solamente del grupo *D. melanogaster* (Jagadeeshan y Singh 2006) al que pertenecen las especies que Liu *et al* investigaron

Sobre los polimorfismos de inversión y sus efectos poseemos un conocimiento detallado en *D. buzzatii*. En esta especie se cuenta con evidencia que los rearrreglos afectan de manera diferencial caracteres morfológicos y fisiológicos que tienen consecuencias en el fitness (Fernández Iriarte & Hasson 2000 y referencias). Si bien no tenemos evidencia que relacione a las inversiones de manera directa con la morfología genital, es probable que las inversiones ejerzan su efecto de manera indirecta mediado por la influencia que tienen sobre el tamaño corporal general (recordemos que existe una relación alométrica entre morfología genital y tamaño corporal en *D. buzzatii*). Esta idea, la de una asociación entre la variación en la morfología de un órgano que tiene una potencial participación en el reconocimiento específico y un polimorfismo de inversiones, es consistente con los planteos de recientes teorías que han reformulado el papel de los rearrreglos en la especiación y su relación con el aislamiento reproductivo (Noor *et al.* 2001, Rieseberg 2001), abriendo una nueva línea de investigación que seguramente habrá que transitar.

Conclusiones generales

Los estudios reseñados en este capítulo nos permiten abordar cuestiones evolutivas interesantes. Primero, la habilidad o posibilidad de combinar genomas divergentes (es decir de producir fenotipos viables y con características morfológicas estables) procedentes de diferentes especies parece ser un carácter variable en *D. koepferae* y *D. buzzatii*. Dicho de otra manera, los genomas de ambas especies difieren entre sí en su capacidad de generar híbridos interespecíficos con aptitud darwiniana similar a las especies parentales. Esto también parecería aplicarse a *D. gouveai* y *D. antonietae* (Capítulo II), aunque, en este caso no pudimos contar con un número de cruzamientos viables suficientes como para generar una afirmación más categórica. Por otro lado, en el raro evento de hibridación entre *D. buzzatii* y *D. koepferae*, en el cual se producen algunos cigotos viables, las hembras híbridas⁴ podrían constituirse en un puente potencial para la introgresión, dadas la buena viabilidad larvaria y la tasa de desarrollo similar a los valores de los parentales.

Las poblaciones ahora conocidas como *D. buzzatii* y *D. koepferae* compartieron su último ancestro común hace 4-5 millones de años (Gómez & Hasson 2003). Por lo

⁴ Recordemos que los machos son infértiles.

tanto las barreras reproductivas han evolucionado y se han reforzado a partir de ese momento. El hecho que este par de especies compartan variantes moleculares polimórficas puede ser reflejo de antiguos eventos de introgresión, producidos en tiempos en los que las barreras reproductivas no habían alcanzado su desarrollo actual y la compatibilidad reproductiva entre poblaciones era mayor. Nuestros resultados nos permiten ver los resabios de aquella compatibilidad en la forma de híbridos en los que la orquestación entre genomas hace que no difieran, en lo que a caracteres de historia de vida respecta, de las especies puras.

Entonces podemos concluir que la hibridación interespecífica podría haber jugado un papel no despreciable en la historia evolutiva del cluster *buzzatii*, ya que el *fitness* de los híbridos que sortean el estadio de huevo no es inferior a ninguna de las especies parentales, al menos en términos de los caracteres medidos en este trabajo. Sin embargo, para poder definir con mayor precisión cuál ha sido papel evolutivo de la hibridación es necesario realizar más experimentos. En ese sentido, parecería ser que la interacción entre cada par de especies es única porque en el Capítulo II pudimos observar que si bien los híbridos entre *D. gouveai* y *D. antonietae* presentaron viabilidades larvarias comparables a la de las especies parentales, su desempeño considerando el tiempo de desarrollo fue menor.

Finalmente, intentaremos responder las cuestiones planteadas en la introducción. En los aspectos morfológicos y fisiológicos, hemos observado desvíos respecto del modelo aditivo poligénico tanto para el ala de ambos sexos como para la morfología genital de los machos. En otras palabras, los fenotipos híbridos no pueden considerarse intermedios a los valores parentales. Por otro lado, nuestro estudio nos ofrece la posibilidad de comparar el comportamiento de un genoma en particular (una isolínea precisa) en combinación con diferentes líneas de la otra especie. Estos análisis comparativos mostraron que el resultado fenotípico final en los híbridos tiene una fuerte dependencia de los genomas particulares que se combinan y esto es un efecto observable en todos los caracteres considerados. Queda abierta la posibilidad de expandir el número de cruzamientos y montar experimentos que permitan mapear las regiones genómicas los factores genéticos asociados con los distintos caracteres con el fin de alcanzar una mayor precisión en la caracterización de la arquitectura genética de las diferencias interespecíficas en la morfología alar y de la genitalia.

Capítulo VI: Patrones geográficos de la variación en la morfología genital en *Drosophila buzzatii*

Resumen

En el cluster *D. buzzatii*, la asociación insecto-planta hospedadora lleva a la estructuración en parches de las poblaciones con distinto grado de aislamiento. Si bien este fenómeno varía de una especie a otra, en todos los casos la geografía y la ecología local afectan el grado de aislamiento, planteando así, una nueva dimensión al cambio morfológico. Cuando las poblaciones ocupan hábitats distintos, la selección natural divergente puede producir la diferenciación de caracteres ecológicamente relevantes. Pero, al mismo tiempo, el flujo génico actúa como una fuerza homogeneizadora disminuyendo la divergencia interpoblacional de manera general. Este tema ha cobrado un renovado interés en los últimos años ya que se ha observado en varias ocasiones una relación inversa entre el nivel de flujo génico y el grado de diferenciación en distintos caracteres morfológicos.

En este capítulo analizamos la morfología del aedeago de machos recolectados en 12 poblaciones naturales dentro del área de distribución de *D. buzzatii* en territorio argentino. Una vez caracterizado el patrón de variación, se investigaron las correlaciones entre el grado de divergencia morfológica y el aislamiento geográfico y las frecuencias de inversiones cromosómicas polimórficas que segregan en las mismas.

Las distintas poblaciones difirieron tanto en el tamaño como en la conformación genital no alométrica. Las relaciones de similitud fenética tuvieron una fuerte correlación con la matriz de distancias geográficas. Asimismo, se detectaron asociaciones significativas entre las frecuencias de los ordenamientos cromosómicos más frecuentes (*j* y *st*, el orden de genes estándar) y las variables conformacionales del aedeago. Esta asociación refuerza la idea de que la morfología genital del macho ha evolucionado en el cluster *D. buzzatii* conforme al modelo pleiotrópico.

Nuestros resultados se discuten a la luz de estudios de variación morfológica en poblaciones naturales de *D. serido*.

En el capítulo IV hemos estudiado las fuentes de variación fenotípica de la morfología genital dentro de poblaciones de las distintas especies. En el presente capítulo llevaremos el estudio de divergencia morfológica a una escala geográfica mayor.

La fuerte asociación de las especies de *Drosophila* con las plantas hospedadoras lleva a las poblaciones a estructurarse en parches entre los cuales el grado de aislamiento por distancia es variable. Si bien este efecto varía de una especie a otra¹ en todos los casos la geografía y las posibilidades de aislamiento plantean una nueva dimensión de cambio morfológico. En este sentido, el grado de divergencia morfológica es el resultado de la acción, fundamentalmente, de tres mecanismos evolutivos: la selección natural, la deriva génica y el flujo génico (Endler 1977). Estos, actuando individualmente o de manera conjunta afectan el destino de la variación genética y a las variantes génicas de los loci implicados, en este caso particular, en la arquitectura genética de la variación morfológica que se observa en poblaciones naturales.

Cuando las poblaciones ocupan hábitats distintos, la selección natural divergente puede ocasionar la diferenciación de caracteres ecológicamente relevantes (Schluter 2000). Por el contrario, el flujo génico actúa como una fuerza homogeneizadora disminuyendo o retardando la divergencia interpoblacional (Slatkin 1987). Este tema ha cobrado un renovado interés en los últimos años (Crespi 2000, Schluter 2000, Hendry *et al.* 2001, 2002, Lenormand 2002, Saint-Laurent *et al.* 2003) ya que se han reportado en varias ocasiones relaciones inversas entre los niveles de flujo génico entre poblaciones y el grado de diferenciación en distintos caracteres morfológicos o comportamentales con valor adaptativo, en taxa tan diversos como peces (Lu & Bernatchez 1999, Hendry *et al.* 2002), anfibios (Storfer & Sih 1998, Storfer *et al.* 1999), aves (Dhondt *et al.* 1990, Smith *et al.* 1997), reptiles (King & Lawson 1995), insectos (Sandoval 1994a, Ross & Keller 1995) y arácnidos (Riechert 1993, Riechert & Hall 2000, Riechert *et al.* 2001). Si bien los niveles de flujo génico a menudo reflejan el aislamiento geográfico y/o la capacidad dispersiva, también podrían ser indicadores de procesos de especiación incipiente, a través de la evolución de barreras reproductivas entre los grupos, independientemente de la presencia de barreras geográficas. De hecho, causa y consecuencia se revierten si la divergencia del carácter produce aislamiento

¹ Por ejemplo *D. koepferae* posee una estructuración mucho más marcada que *D. buzzatii* (Piccinali *et al.* 2004) a pesar de poseer una distribución geográficamente más restringida.

reproductivo disminuyendo el flujo génico entre taxa o demos (i.e. especiación ecológica; Schluter 1998, Lu & Bernatchez 1999, Coyne & Orr 2004)

En el caso particular de la genitalia hemos observado la existencia de un significativo nivel de variabilidad morfológica intrapoblacional que tiene una consistente base genética dentro de las poblaciones. Esto constituye una condición básica necesaria para que pueda existir divergencia y evolución del carácter. Como desconocemos exactamente el valor adaptativo de la variación en la morfología del aedeago, no podemos adelantar cuál es el proceso que gobierna su evolución. De todas maneras, de existir divergencia interpoblacional, a mayor flujo génico entre demos menor será la divergencia esperada. Potencialmente también existe la posibilidad de divergencia genital por pleiotropía con caracteres de adaptación ecológica, o por selección sexual, si las poblaciones desarrollan independientemente distintos procesos coevolutivos de resolución de los conflictos intra e intersexuales.

En este capítulo estudiamos la diferenciación interpoblacional en la morfología genital en *D. buzzatii* que es la especie que tiene la más amplia distribución en el continente y que fue caracterizada en mayor número de localidades. Una vez caracterizado el patrón geográfico de diferenciación genital se investigaron sus asociaciones con variables ambientales y biológicas de las poblaciones.

Con este fin analizamos la morfología genital de un total de 224 machos salvajes recolectados en su ambiente natural en 12 localidades dentro del área de distribución de *D. buzzatii* en territorio argentino (Tabla 5.1, Figura 5.1). La cuantificación morfológica se realizó de acuerdo a los mismos protocolos del capítulo anterior y que se encuentran detallados en el Anexo B2.



Figura 6.1: Mapa de las localidades donde fueron capturados los machos de *D. buzzatii* analizados.

Tabla 6.1: Poblaciones de *D. buzzatii* analizadas y número de machos descriptos por localidad.

Localidad	Provincia	Lat	Long	Altitud (m)	N°Machos	
Ing. Juarez	JUA	Formosa	23°49 24	61°52 09	177	39
Gral. Guemes	GUE	Salta	24°40 02	65°03 53	769	7
Las Lomitas	LOM	Formosa	24°42 07	60°34 55	133	35
Palo Santo	PAL	Formosa	25°33 37	59°22 02	92	35
Vipos	VIP	Tucumán	26°29 13	65°22 20	1000	35
Montecarlo	MON	Misiones	26°34 52	54°43 38	207	11
Jachal	JAC	San Juan	30°14 25	68°47 09	1317	2
Cruz del Eje	CRZ	Córdoba	30°31 13	64°48 23	390	18
Valle Fértil	VFE	San Juan	30°38 47	67°34 05	1189	16
Diamante	DIA	Entre Ríos	32°02 12	60°35 11	40	11
Lavalle	LAV	Mendoza	32°49 58	68°28 42	612	4
Suyuque	SUY	San Luis	33°07 29	66°16 50	1008	11

Las diferencias de tamaño entre poblaciones se pusieron a prueba mediante un ANOVA utilizando el logaritmo del tamaño del órgano como variable dependiente. En un principio las diferencias de conformación se analizaron a través de un MANOVA

utilizando los componentes principales (CPs) como variables dependientes pero debido a la existencia de marcadas diferencias de tamaño no controladas experimentalmente, y conociendo por resultados anteriores el importante componente alométrico de la conformación genital (ver Capítulo IV), decidimos realizar un MANCOVA con el tamaño como covariable para verificar si las diferencias de conformación entre poblaciones se mantienen independientemente de las diferencias de tamaño.

Patrones interpopulacionales de divergencia genital

El análisis de Componentes Principales de la matriz de Descriptores Elípticos produjo 13 Componentes significativos que incluyen el 93 % de la variación original de conformación. La variación explicada por las primeras 8 variables conformacionales se ilustran en la Figura 6.2

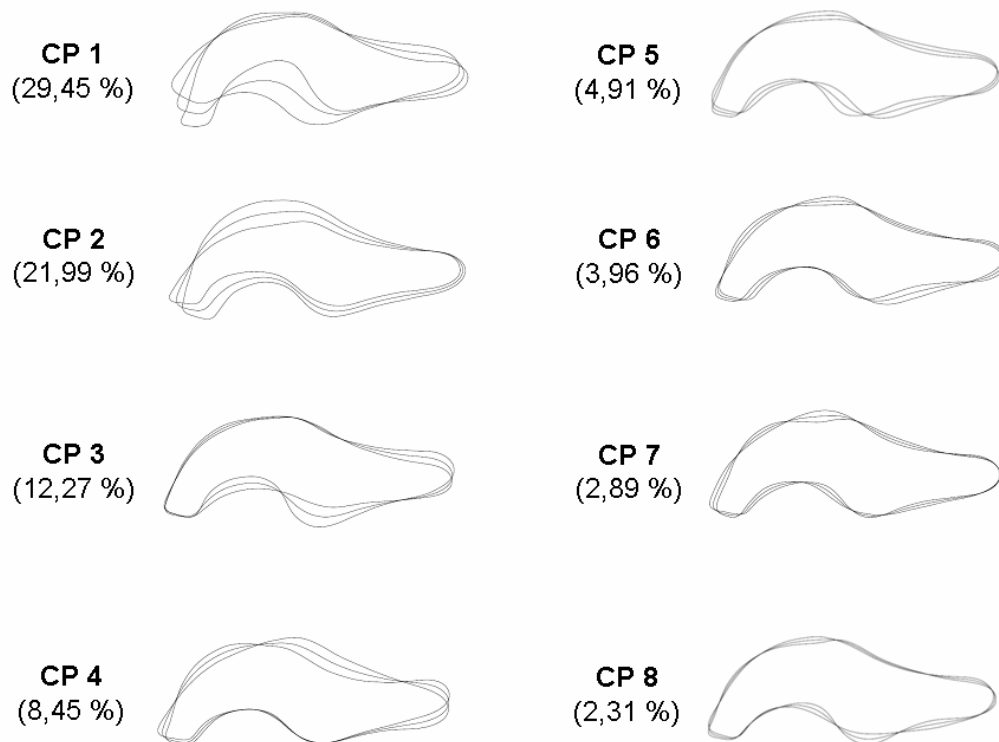


Figura 6.2 Los contornos representan la variación en la forma del aedeago atribuible a los primeros 8 componentes principales del análisis de la variación interpopulacional en *D. buzzatii*. Las líneas de cada figura representan la conformación media y la correspondiente a ± 2 desvíos estándar. El contorno atribuido a cada componente fue reconstruido a partir de los coeficientes estimados utilizando su valor medio (o el valor de \pm dos desvíos) y llevando los valores del resto de los componentes a cero. Entre paréntesis se indicia el porcentaje de la variación total explicado por cada componente.

Tabla 6.2: Fuentes de variación de la morfología genital. Resultados del ANOVA realizado para investigar si existen diferencias de tamaño genital entre poblaciones de *D. buzzatii* (a) y análisis multivariados de las diferencias de conformación total (MANOVA, b) y solo el componente no alométrico (c). *gl*: grados de libertad; *SC*: suma de cuadrados, *CM*: cuadrados medios.

Fuentes de variación				
a) Tamaño				
	<i>gl</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>
Poblacion	12	1,75	0,15	7,4**
Error	223	4,39	0,02	
b) Conformación				
	<i>gl</i> Efecto	<i>gl</i> Error	Valor de Wilks	<i>F</i>
Población	120	1675,60	0,09	5,14**
c)				
Tamaño	10	213,00	0,64	12,03**
Población	120	1667,84	0,10	4,81**

En la Tabla 6.2 se muestran los resultados del ANOVA para tamaño, y del MANOVA y el MANCOVA para conformación. Los machos recolectados en distintas poblaciones difirieron en el tamaño (Tabla 6.2 a) y en la conformación genital (Tabla 6.2 b). Además, se detectaron diferencias significativas entre las poblaciones para caracteres conformacionales que fueron independientes del tamaño (Tabla 6.2 c). En la Figura 6.3 se presentan los valores medios para el tamaño medio del aedeago de cada población (a) y la disposición de cada una de las poblaciones en el espacio morfológico considerando el aspecto promedio de su genitalia (b).

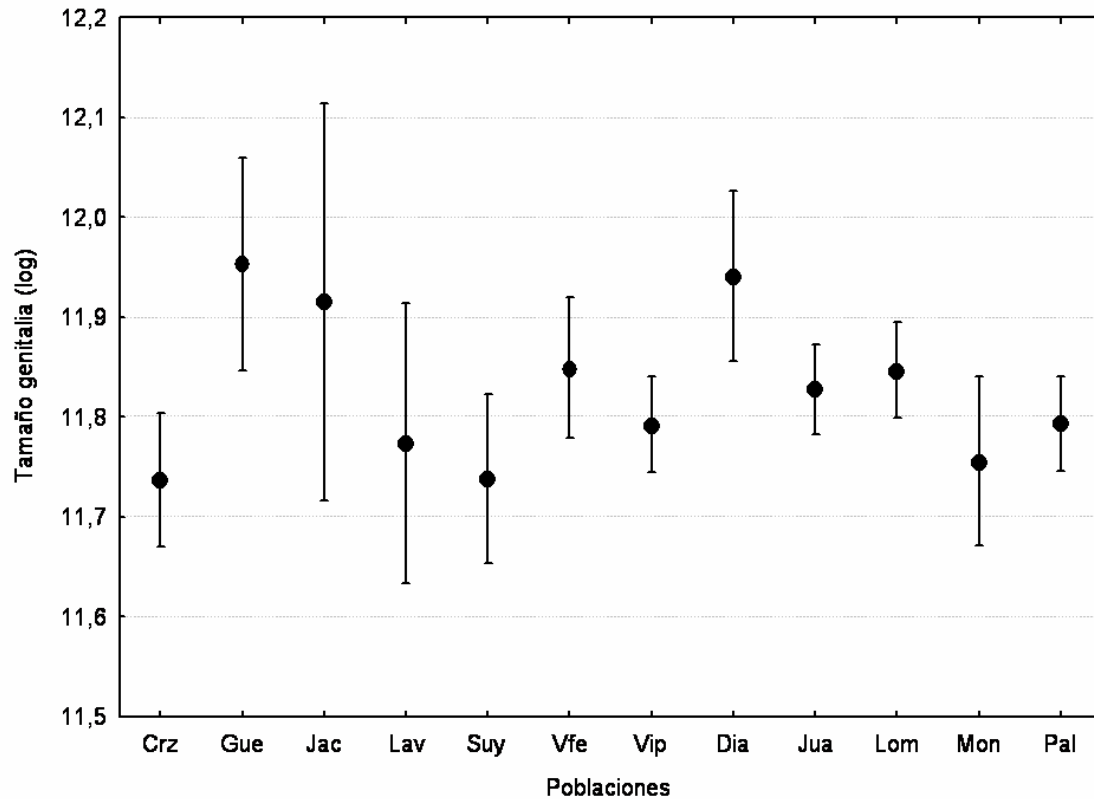


Figura 6.3a: Valor medio del tamaño del aedeago e intervalos de confianza (95%) en cada una de las poblaciones analizadas.

Hasta aquí confirmamos que las distintas poblaciones difieren en su conformación genital, no sólo debido a diferencias en el tamaño medio, sino también a diferencias conformacionales no alométricas.

Una cuestión interesante que surge es si el grado de diferenciación morfológica interpoblacional está correlacionado con la distancia geográfica entre poblaciones. Dicho de otra manera, ¿las poblaciones geográficamente más cercanas tienden a parecerse más entre sí que las más alejadas? Esta pregunta no es trivial, ya que si la diferenciación morfológica no correlaciona con la distancia geográfica, las causas deben buscarse en procesos que no dependan únicamente del flujo génico, como podría ser la selección natural o la selección sexual dentro de cada demo, que pueden estar promoviendo la divergencia entre demos ya sea directa o indirectamente.

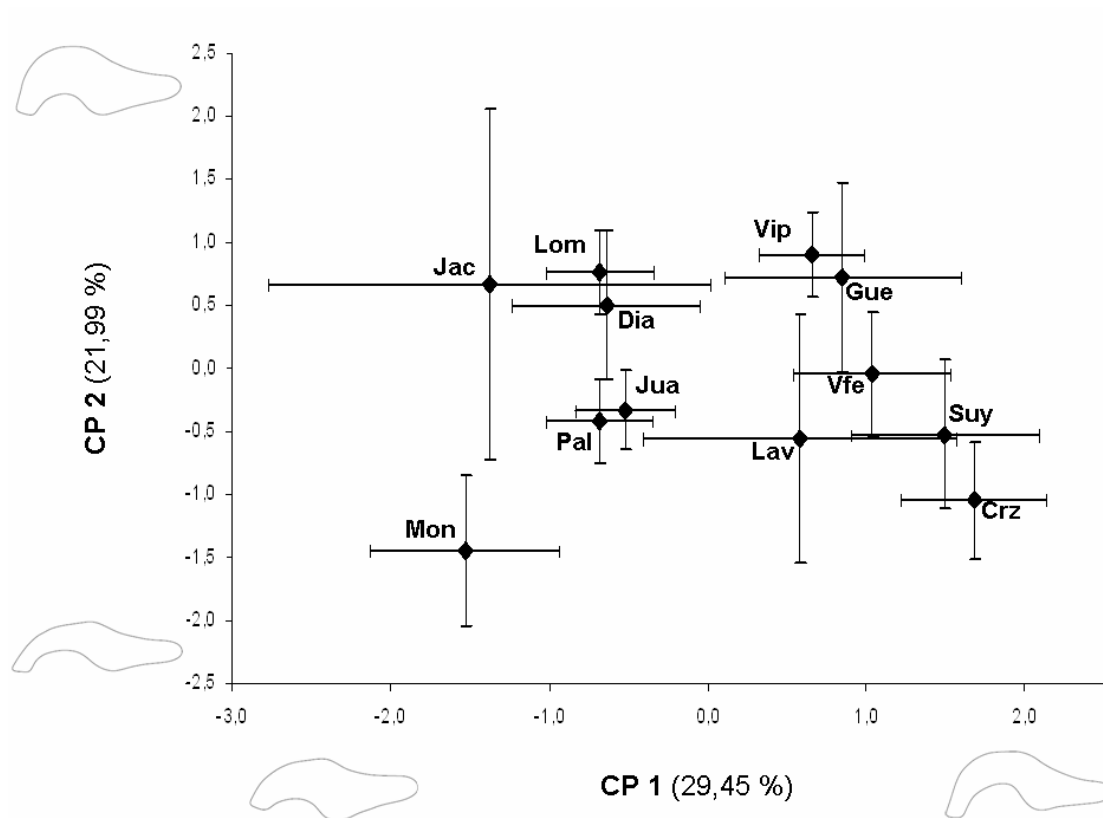


Figura 6.3b: Conformación media e intervalos de confianza de las dos primeros Componentes Principales (CP) conformacionales del contorno de los aedeagos de machos de *D. buzzatii* colectados en poblaciones naturales. Entre paréntesis se indica la proporción de varianza explicada por cada CP. En cada eje se representa el cambio acaecido a lo largo del componente graficándose las conformaciones correspondientes a los valores extremos (± 2 desvíos estándar).

Con el fin de resumir la diferenciación entre localidades, realizamos un análisis de variables canónicas utilizando la matriz de componentes principales. Este análisis produjo 5 variables canónicas significativas que contenían, en conjunto, el 89 % de la información general. En este espacio reordenado, ahora definido por las variables canónicas, las poblaciones se disponen de acuerdo a su similitud morfológica; en otras palabras, cuanto mayor es el parecido entre dos poblaciones, menor será la distancia morfológica entre ellas. Luego se construyeron dos matrices de distancias entre las poblaciones, una de distancias fenéticas (distancias euclidianas entre las medias morfológicas, el centroide, de cada población considerando las variables canónicas) y otra de distancias geográficas (Tabla 6.3). El grado de correlación entre ambas matrices se calculó con una prueba de Mantel² y la probabilidad asociada se estimó mediante 10.000 permutaciones. La asociación entre las matrices altamente significativa ($r =$

² Mantel for Windows (Cavalcanti 2005)

0,976; $p = 0,0001$). Esto sugiere, en una primera aproximación, que el grado de diferenciación genital correlaciona con el aislamiento geográfico entre las poblaciones.

Un fenograma construido a partir de los valores de las variables conformacionales muestra un patrón de agrupamiento en el que se verifica esta estructuración geográfica (Figura 6.4). En el mismo podemos observar que Montecarlo (Misiones) y Diamante (Entre Ríos) son las poblaciones que están más diferenciadas del resto. Las localidades formoseñas (Las Lomitas, Palo Santo e Ingeniero Juárez) forman un agrupamiento, en tanto que por otro lado se agrupan las localidades del oeste y el noroeste argentino. La excepción a este patrón es Güemes que, a pesar de ser una localidad salteña y relativamente cercana a Vipos, se muestra alejada de este grupo y de las formoseñas. Si no hubo algún error en la caracterización morfológica de esta población, esto plantea cuestiones interesantes ya que si bien la distancia geográfica explica en gran parte la diferenciación morfológica entre poblaciones, es posible que haya otros factores responsables del patrón general. Sin embargo, el número escaso número de individuos analizado en esta localidad limita la interpretación de nuestros resultados.

Correlación entre la morfología genital y el polimorfismo de inversión

Muchos trabajos han mostrado que los polimorfismos de inversión en *Drosophila* están frecuentemente asociados a características vinculadas al *fitness* en muchas especies de *Drosophila* (Chippindale *et al* 2001, Ayala & Coluzzi 2005). En este sentido *D. buzzatii* no es una excepción ya que se ha estudiado extensamente la relación de su polimorfismo cromosómico con caracteres morfológicos, el tiempo de desarrollo, la viabilidad, la longevidad y el éxito en el apareamiento (Rodríguez *et al.* 1999, Fernández Iriarte & Hasson 2000).

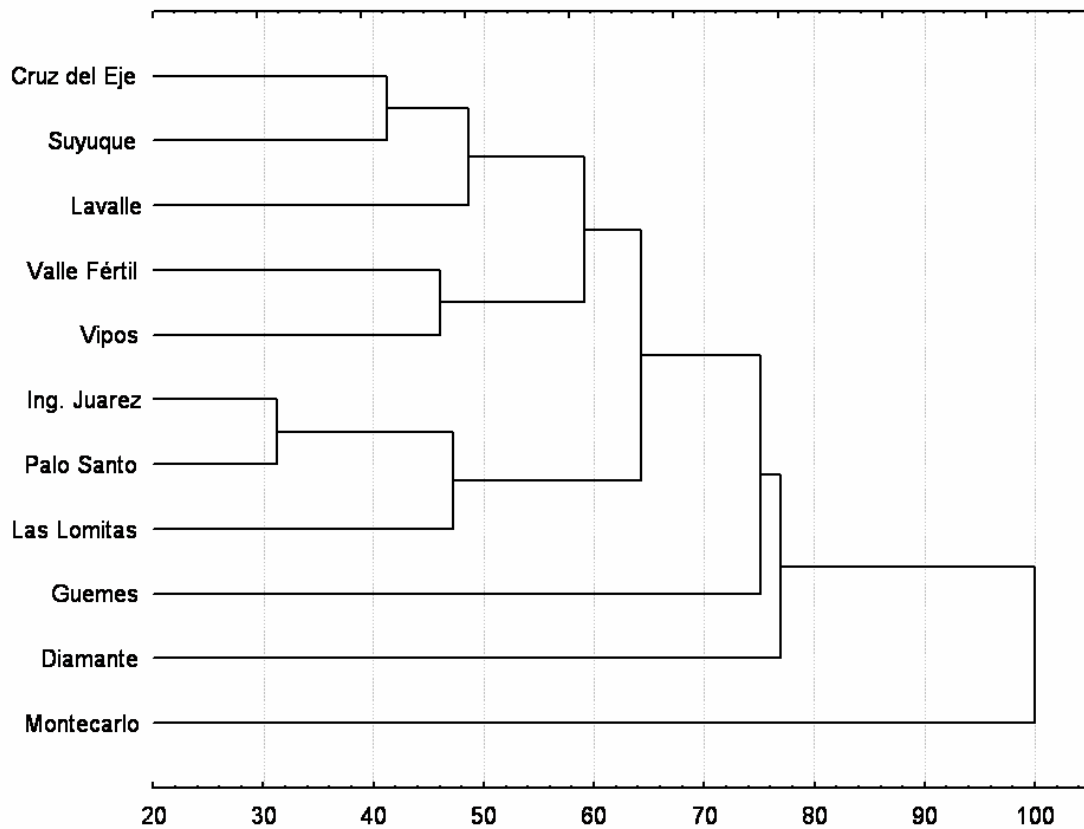


Figura 6.4: Fenograma construido a partir de las distancias euclidianas entre las poblaciones en el espacio definido por las variables canónicas. En el eje de las abscisas se presentan las distancias relativas de unión siendo 100 la distancia de unión mayor. La regla de agrupamiento fue el de Promedio de a pares pesado.

Solamente en el cromosoma 2 se han descrito nada menos que 13 ordenamientos cromosómicos de los cuales: 2st, 2j y 2jq³, tienen una amplia distribución y son los más frecuentes, en tanto que un cuarto (2jq⁷) tiene una frecuencia moderada y una distribución muy restringida (Ruiz *et al.* 1984, Hasson *et al.* 1995). Estudios de laboratorio mostraron cambios en las frecuencias de las tres inversiones más frecuentes entre grupos de moscas cuando eran criadas en distintos recursos (Ruiz & Fontdevila 1985). Asimismo, cuando se estudiaron poblaciones naturales se demostró que las inversiones polimórficas afectaban pleiotrópicamente varios caracteres de historia de vida y que, además, los componentes de *fitness* que afectaban las inversiones podían variar entre poblaciones (Ruiz *et al.* 1986, Hasson *et al.* 1991, Fanara *et al.* 1996). Estos estudios permitieron demostrar un compromiso entre los efectos de las ordenaciones cromosómicas sobre componentes tempranos y tardíos del *fitness*. Por ejemplo, la dosis del rearrreglo 2st que porta un individuo se encuentra negativamente correlacionada con el tiempo de desarrollo larvario y el largo del tórax de adulto, mientras que moscas portadoras de los rearrreglos derivados 2j y 2jq⁷ poseen desarrollos más dilatados y

tienen mayor tamaño corporal (Fernández Iriarte & Hasson 2000). Estos dos caracteres, el tiempo de desarrollo y el tamaño del cuerpo, son de suma importancia ya que son predictores de la adecuación darwiniana temprana y de adulto. Un menor tiempo de desarrollo incrementa el *fitness* temprano por reducción de la exposición a tóxicos del sustrato, a la competencia intra e interespecífica y de la probabilidad de desecación. Un mayor tamaño corporal de adulto correlaciona positivamente con componente de la aptitud como la fecundidad de las hembras y el éxito en el apareamiento del macho (ver referencias en Fernández Iriarte & Hasson 2000). Toda esta evidencia acumulada pone de manifiesto que el compromiso que existe entre los efectos pleiotrópicos de los rearrreglos y que los cactus hospedadores juegan un papel relevante en el mantenimiento del polimorfismo. Así surgió la idea de que el uso de distintos hospedadores en distintos escenarios ecológicos puede aportar una explicación causal de los patrones de estructuración poblacional observados para el polimorfismo de inversiones (Hasson *et al.* 1995, Tabla 6.4).

Frente a los efectos de los rearrreglos cromosómicos sobre el tamaño corporal general (Norry *et al.* 1995, Fernández Iriarte & Hasson 2000) nos preguntamos si los polimorfismos de inversión podrían tener algún efecto sobre la morfología genital. Por lo tanto, a partir de datos tomados de la bibliografía pertinente (Hasson *et al.* 1995) y de estimaciones de las frecuencias de inversiones en nuevas localidades que se presentan en esta tesis por primera vez (Tabla 6.4), investigamos si existe alguna correlación entre la morfología genital y las inversiones polimórficas del cromosoma 2.

En este caso el análisis de los datos consistió en regresiones múltiples de las variables conformacionales (CVs) en función de la frecuencia de cada uno de los rearrreglos más frecuentes en las poblaciones naturales. Debido al limitado número de poblaciones incluidas en el estudio y el hecho de que cada una constituiría solo un punto en la regresión, decidimos considerar sólo los tres primeros ejes de conformación (75 % de la variación total) como medida para conservar potencia estadística descartando los ejes con menos información.

Tabla 6.3: Distancias geográficas (en kilómetros; debajo de la diagonal) y fenéticas (Distancias euclidianas en unidades arbitrarias; sobre la diagonal) entre las localidades de muestreo.

	Cruz del Eje	Güemes	Jachal	Lavalle	Suyuque	Valle Fértil	Vipos	Las Lomitas	Ing. Juarez	Palo Santo	Montecarlo	Diamante
Cruz del Eje	0	69878	104616	42647	34185	49692	64474	99290	57011	78957	90896	65512
Güemes	654,0	0	61258	59653	54926	43122	45469	59869	51449	59292	62087	54973
Jachal	379,34	716,37	0	82559	83772	70482	49932	48470	61142	51664	46254	54267
Lavalle	432,6	965,23	287,03	0	26438	54330	40949	79112	41086	45658	67341	41866
Suyuque	319,3	944,06	392,85	207,03	0	40879	40057	79305	44965	56041	66309	49297
Valle Fértil	259,7	705,12	127,39	258,29	299,91	0	41987	64618	37194	66009	66257	47863
Vipos	450,3	199,47	530,32	763,76	743,51	503,31	0	48019	29700	29659	43926	27359
Las Lomitas	768,51	456,67	1009,37	1183,33	1080,94	942,62	516,55	0	50840	57561	45590	50550
Ing. Juarez	798,32	338,96	980,5	1187,84	1115,74	933,8	458,65	161,17	0	41372	50767	17227
Palo Santo	764,6	580,89	1053,19	1195,72	1068,87	970,21	608	156,1	323,33	0	43408	32784
Montecarlo	1077,9	1062,77	1428,89	1495,21	1320,63	1320,5	1057,03	620,44	780,8	478,12	0	44003
Diamante	425,05	929,95	803,71	748,36	545,28	672,29	769,76	810,13	922	725,18	832,69	0

Tabla 6.4: Distribución de frecuencias del polimorfismo de rearrreglos cromosómicos En las poblacionales analizadas. * Datos tomados de Hasson *et al* 1995; Sd: sin datos

Localidad	Provincia	Rearreglos del cromosoma 2				
		st	j	jz3	jc9	y3
Las Lomitas	Formosa	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Palo Santo	Formosa	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ing. Juarez	Formosa	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diamante	Entre Ríos	0,46	0,52	0,02	0,00	0,00
Cruz del Eje	Córdoba	0,36	0,64	0,00	0,00	0,00
Guemes*	Salta	0,34	0,66	0,00	0,00	0,00
Suyuque	San Luis	0,32	0,52	0,09	0,03	0,04
Valle Fértil	San Juan	0,32	0,54	0,14	0,00	0,00
Vipos*	Tucumán	0,26	0,72	0,01	0,00	0,01
Montecarlo	Misiones	0,14	0,86	0,00	0,00	0,00
Jachal	San Juan			Sd?		
Lavalle	Mendoza			Sd?		

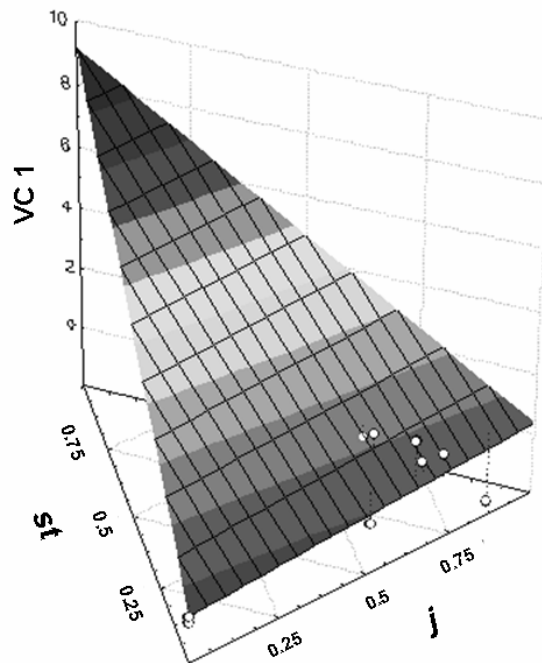
Tabla 6.5: Regresiones lineales múltiples de las tres primeras variables canónicas en función de los tres ordenamientos cromosómicos más frecuentes en las poblaciones analizadas. *gl*: Grados de libertad; *CM*: Cuadrados medios

	<i>gl</i>	<i>st</i>		<i>J</i>		<i>z3</i>	
		<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>
Intercepción	1	3,40	64,72**	0,76	13,35**	0,002	0,93
VC1	1	0,33	6,34*	0,22	3,88	0,006	2,14
VC2	1	0,06	1,10	0,05	0,83	0,0001	0,05
VC3	1	0,51	9,76**	0,47	8,19**	0,001	0,30
Error	6	0,05		0,06		0,003	

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

En la Tabla 6.5 se presentan resumidos los resultados de las regresiones. Se encontraron correlaciones significativas entre los ordenamientos *st* y *j* con al menos una de las variables conformacionales. Por este motivo, podemos considerar que parte de la conformación genital está afectada por los rearrreglos como previamente se observó para otras variables morfométricas como el tamaño del tórax o del ala (Norry *et al.* 1995). La Figura 6.5 ilustra una superficie de regresión lineal de las variables conformacionales afectadas considerando los tres rearrreglos.

a)



b)

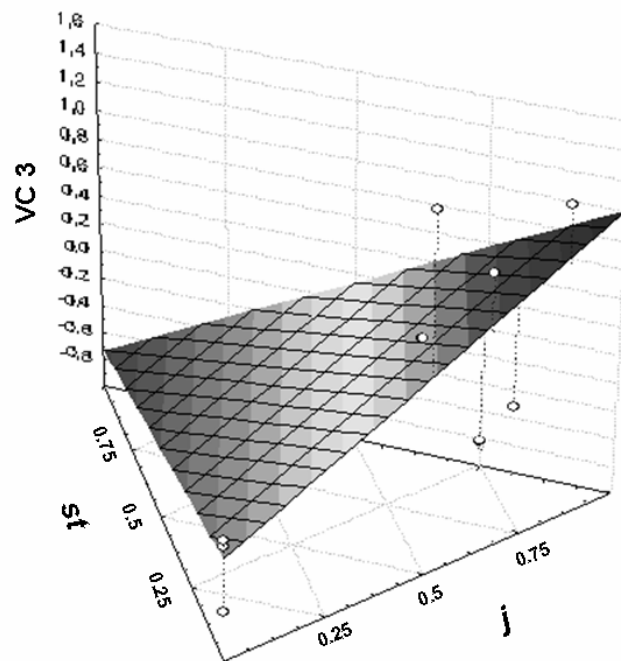


Figura 6.5: Variables conformacionales (a: VC1; b: VC3) que presentaron una regresión significativa con la frecuencia de los rearrreglos cromosómicos en las poblaciones de *D. buzzatii*. La base del diagrama es un gráfico ternario que ubica a las poblaciones según la frecuencia combinada de los tres rearrreglos mayoritarios del cromosoma 2 (st , j y $z3$). La superficie representa la regresión lineal tridimensional, los valores de las variables conformacionales (Eje Z) son unidades arbitrarias sin unidad.

Poblaciones en simpatria con *D. koepferae*.

Como hemos discutido previamente en el Capítulo V, se desconoce la importancia del papel que la hibridación ha jugado en la evolución de *D. buzzatii* y *D. koepferae*, aunque los estudios reseñados en esta Tesis llevan a sospechar que ha tenido de cierta relevancia. Ante los estudios que sugieren la posibilidad de flujo génico entre estas especies como potencial fuente de variación intraespecífica adicional cabe preguntarnos:

¿Qué ocurre con la diferenciación morfológica en los casos en los que *D. buzzatii* coexiste y comparte recursos con *D. koepferae*, su especie hermana? Es decir: ¿La presencia de *D. koepferae* ha tenido algún efecto sobre la evolución de la genitalia de *D. buzzatii*? Si la sospechada hibridación es un proceso relativamente común y recurrente, entonces las poblaciones simpátricas deberían estar morfológicamente menos diferenciadas entre sí que sus conespecíficas de otras áreas donde *D. buzzatii* no coexiste con especies cercanamente emparentadas. Si por el contrario, el contacto entre estas especies ha disparado mecanismos de evasión de la hibridación y el aedeago participa del reconocimiento entre especies como ocurre en otras especies de *Drosophila* (Jagadeeshan & Singh 2006) se podría esperar una aceleración de la tasa de evolución morfológica como consecuencia del desplazamiento de caracteres (Coyne & Orr 2004) que ocasionaría que las poblaciones de *D. buzzatii* simpátricas estén morfológicamente más diferenciadas que las alopátricas.

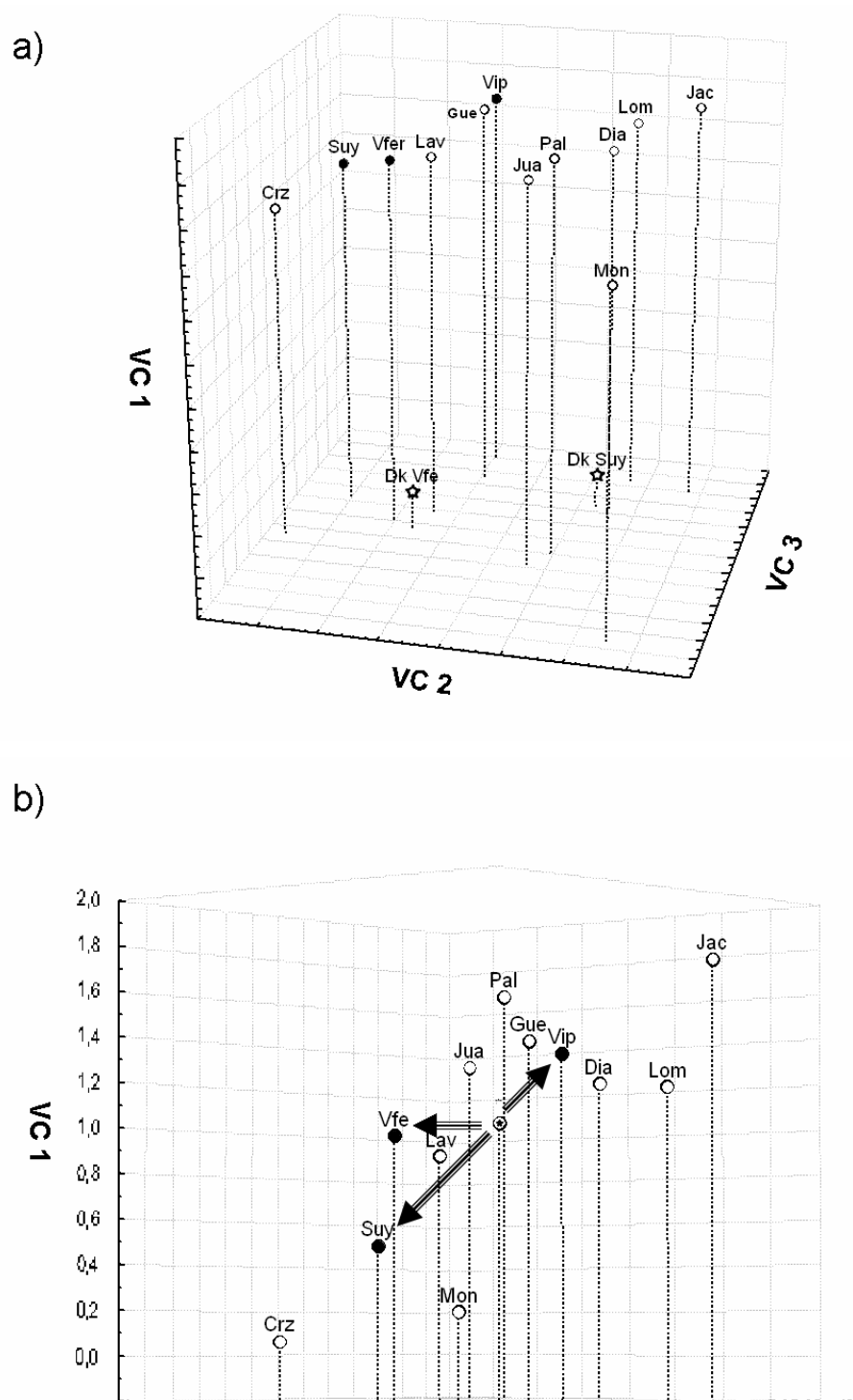


Figura 6.6: Espacio morfológico determinado por las primeras 3 variables canónicas discriminando poblaciones de *D. buzzatii* y *D. koepferae* (a) y vista particular (b) considerando solo las poblaciones de *D. buzzatii*. El eje Z (VC1) discrimina entre especies y puede considerarse un estimador del parecido genital relativo de las distintas poblaciones de *D. buzzatii* respecto a *D. koepferae*. Los puntos blancos representan poblaciones alopátricas a *D. koepferae* y los puntos llenos las simpátricas. Las flechas en b) representan el desplazamiento de las poblaciones simpátricas respecto de la media morfológica total de *D. buzzatii*. **Crz:** Cruz del eje; **Dia:** Diamante; **Gue:** Güemes; **Jac:** Jachal; **Jua:** Ingeniero Juarez; **Lav:** Lavalle; **Lom:** Las Lomitas; **Mon:** Montecarlo; **Pal:** Palo Santo; **Suy:** Suyuque; **Vfe:** Valle Fértil; **Vip:** Vipos.

Explorando esta posibilidad, agregamos a la base de datos los contornos de aedeagos de individuos de *D. koepferae* recolectados en las localidades de Valle Fértil y Suyuque donde ambas especies coexisten¹. Con esta muestra calculamos un nuevo conjunto de Componentes Principales de conformación y de Variables Canónicas. Los resultados de este análisis mostraron que las distancias fenéticas medias a las conformaciones de *D. koepferae* no difirieron entre poblaciones simpátricas y alopátricas ($F_{1, 22} = 0,21, p = 0,65$) como puede observarse en la Figura 6.6. Mediante la exploración visual de esta figura podemos constatar que las 3 poblaciones simpátricas de nuestro estudio tuvieron, en este sentido, comportamientos heterogéneos. Por un lado, las distancias fenéticas que separan a Suyuque y Vipos respecto de *D. koepferae* fueron la menor y la mayor respectivamente, mientras que la distancia entre Valle Fértil y *D. koepferae* fue un valor muy cercano a la media general (Figura 6.6b). Por lo tanto, podemos considerar que nuestros resultados no proveen evidencia que apunte a sospechar un efecto observable de la condición alopatria/simpatria sobre la morfología de la genitalia.

¿Qué procesos evolutivos rigen la divergencia genital entre poblaciones de *D. buzzatii*?

La variación es la fuente del cambio evolutivo y la diferenciación entre poblaciones es el paso previo a la especiación y por este motivo, estudios de variación intra e interespecífica tienen la potencialidad de brindar valiosa información tanto sobre la historia evolutiva de la especie como para identificar cuáles son las unidades evolutivas en la naturaleza.

En nuestro caso pudimos observar una fuerte asociación entre la diferenciación morfológica interpoblacional y el grado de aislamiento geográfico. Esto puede indicar que las poblaciones de *D. buzzatii* están morfológicamente estructuradas siguiendo un modelo de aislamiento por distancia o de “stepping- stone”² en los que el equilibrio entre el flujo génico y la deriva génica promueven una diferenciación gradual, la cual estará relacionada positivamente con las distancias geográficas que separan las poblaciones (Congdon *et al.*, 2000; Telles & Diniz 2005). El modelo de aislamiento por distancia supone que los individuos de una metapoblación están distribuidos de manera

¹ También en Vipos coexisten ambas especies pero no se recolectaron especímenes de *D. koepferae*

² En referencia a la imagen de las piedras que uno utiliza, pasando de una a otra para vadear un río.

uniforme a lo largo del rango geográfico y debido a las bajas tasas migratorias se produce una estructuración a través de este continuo (Wright 1969). En su trabajo, Wright (1969) define al modelo de aislamiento de tipo “stepping-stone” como formado por una distribución fragmentada de poblaciones dentro del espacio geográfico que constituye la distribución de la especie. La asociación de las moscas cactófilas con sus hospedadores, que típicamente se presentan en parches (Wiens 1976, Moraes & Sene 2002, Moraes *et al.* 2005), nos lleva a inclinarnos por este último modelo como el más verosímil.

A pesar de esto, encontramos evidencia indirecta que sugiere que otros procesos podrían estar involucrados en la diferenciación morfológica de la genitalia. Nuestros resultados muestran una significativa correlación de la variación en la conformación de la genitalia con el polimorfismo del cromosoma 2. Abundante evidencia sugiere que estos polimorfismos son el blanco de varios tipos de selección equilibradora, cuya acción conduce al mantenimiento selectivo de dicho polimorfismo. Entre los mecanismos de selección equilibradora, uno de los más interesantes es el efecto pleiotrópico antagónico que los diferentes ordenamientos cromosómicos tienen sobre componentes tempranos y tardíos de la adecuación darwiniana, que ilustran la denominada hipótesis de la pleiotropía antagónica (Ruiz *et al.* 1986, Hasson *et al.* 1991). Sin embargo, en la medida en que desconocemos si existe alguna relación entre la variación fenotípica del aedeago y el *fitness* no podemos arriesgar efectos correlacionados de la acción de la selección natural sobre el polimorfismo cromosómico. Hasta el momento parece claro que la evolución de la genitalia habría tenido lugar siguiendo el modelo pleiotrópico y en este contexto, un mecanismo que incluya a los rearreglos y su relación con el tiempo de desarrollo y el tamaño corporal parece francamente plausible.

Si bien nuestra primera aproximación a las bases genéticas de la morfología genital es en extremo preliminar, nuestros resultados abren interesantes posibilidades. Posibles experimentos que podrían confirmar las bases genéticas de la variación morfológica podría ser la cría de larvas de diferentes localidades bajo condiciones de ambiente común de laboratorio. De mantenerse las diferencias interpopulacionales, es posible comenzar la búsqueda de loci de caracteres cuantitativos (QTLs) mediante el cruzamientos, genotipificación y caracterización morfológica de líneas provenientes de las poblaciones más divergentes pero con los mismos tipos de rearreglos fijados, para evitar el efecto de las inversiones ‘*per se*’. Por otro lado queda por determinar la

contribución relativa de los efectos aditivos y de interacción (dominancia y epistática) a la varianza genética total. Asimismo, sería interesante estimar los efectos medios de los diferentes ordenamientos cromosómicos sobre la genitalia y, además, determinar si la morfología genital de individuos portadores del mismo ordenamiento procedentes de diferentes localidades presentan morfologías más similares entre sí que individuos de una misma localidad pero portadores de diferentes ordenamientos.

Finalmente, y en relación con la evolución del cluster como un todo sería interesante ampliar este estudio al resto de las especies del cluster. En esta dirección ya contamos con resultados preliminares producto de un estudio similar realizado en *D. serido*.

El caso de Drosophila serido

Como comentamos en el Capítulo I, a lo largo de la historia del estudio del cluster *buzzatii*, distintas poblaciones de *Drosophila serido* han sido elevadas al status de especie por acumulación de pruebas de su divergencia con respecto al holotipo original. Tanto *D. gouveai*, *D. antonietae* como *D. borborema* fueron todas originalmente consideradas como variaciones geográficas de *D. serido* (Silva & Sene 1991).

Actualmente, las poblaciones consideradas *D. serido sensu stricto* poseen fijada la inversión $2x^7$ (Ruiz *et al.* 2000) y presentan un aedeago denominado originalmente morfotipo A por Silva y Sene (1991). Sin embargo, la especie es politépica para otra serie de características como el cariotipo metafásico (Baimai *et al.* 1983), los polimorfismos de inversiones cromosómicas (Tosi & Sene, 1989; Ruiz *et al.*, 2000) y haplotipos de ADN mitocondrial (Manfrin *et al.* 2001, Morales *et al.* 2004, Manfrin & Sene 2006). Las poblaciones del Dominio conocido como Caatinga son cromosómicamente homogéneas y tienen el cariomorfo Tipo I (según Baimai *et al.* 1983), pero difieren de las poblaciones de la costa Atlántica (y estas entre sí) ya que estas últimas presentan otros cariomorfos (Tipos III, IV y VI dependiendo de la localidad; Baimai *et al.* 1983, Manfrin & Sene 2006). En lo que respecta a los polimorfismos de inversiones cromosómicas, cuatro rearrreglos están restringidos a las poblaciones del noreste brasileiro ($2a^8$, $2b^8$, $2c^8$ y $2d^8$) mientras que otras dos ($2x^8$ y $2w^8$) se observan en las poblaciones costeras (Tosi & Sene 1989, Ruiz *et al.* 2000).

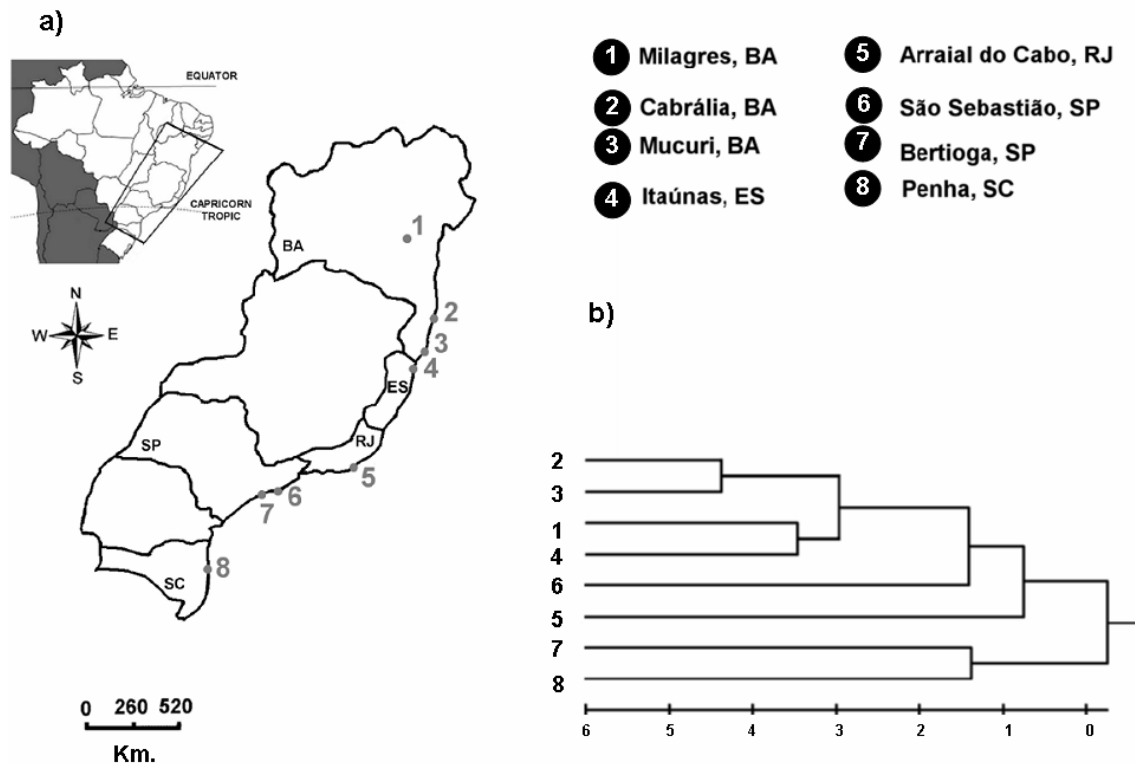


Figura 6.7: a) Sitios de colecta de *D. serido* en Brasil. (1) Milagres; (2) Cabrália; (3) Mucuri; (4) Itaúnas; (5) Arraial do Cabo; (6) São Sebastião; (7) Bertioga; (8) Penha. Estados: **BA**: Bahia; **ES**, Espírito Santo; **RJ**, Rio de Janeiro; **SP**, São Paulo; **SC**, Santa Catarina. b) Dendrograma a partir de un agrupamiento de tipo UPGMA mostrando las relaciones fenéticas entre las poblaciones de *D. serido* a partir de las variables conformacionales del aedeago. La barra muestra unidades de distancia fenética (Mahalanobis) Modificado de Franco *et al.* 2008)

Las inferencias filogeográficas a partir de los datos aportados por el ADN mitocondrial sugieren que *D. serido* colonizó la costa atlántica y el noreste brasileiro por la expansión demográfica de poblaciones ancestrales del centro de la distribución y luego se produjeron retracciones del área de distribución que llevaron a un incremento del aislamiento (Morales *et al.* 2004, Manfrin & Sene, 2006). Estos eventos históricos pudieron traducirse en la diferenciación genética estocástica de las poblaciones de *D. serido* dado que los migrantes son portadores de una fracción de la variabilidad de la población original (Mayr 1963, Hartl & Clark 1997). Los marcadores mitocondriales también detectaron la existencia de tres grupos de poblaciones: el del noroeste, el de la porción norte de la costa Atlántica y el de la porción sur del Atlántico (Morales *et al.* 2004, Manfrin & Sene, 2006). El análisis de la estructura haplotípica de las poblaciones a nivel del ADN mitocondrial también apunta a una diferenciación entre los grupos de poblaciones de la Caatinga respecto de la costa Atlántica. A su vez, estas últimas pueden subdividirse en dos grupos: uno que incluye las poblaciones de las localidades

norteñas del estado de San Pablo y sur de Bahía y otro que abarca las poblaciones del sur de San Pablo y el estado de Santa Catarina (Morales *et al.* 2004, Manfrin & Sene 2006).

A pesar de toda esta información citogenética y molecular, no existía hasta el momento una evaluación de la diferenciación morfológica interpoblacional. En esta sección se presenta un estudio de la variación en la morfología de la genitalia de *D. serido* a partir de la caracterización de machos recogidos en la naturaleza de 8 poblaciones que abarcan desde el noreste hasta el sur del Brasil (Figura 6.7). El análisis fenético del aspecto genital de estas poblaciones mostró dos grupos bien definidos. Uno integrado por las poblaciones norteñas y otro con las poblaciones meridionales además de las poblaciones de Arraial do Cabo y São Sebastião que presentaron una cierta relación, aunque menos definida con el grupo septentrional (Figura 6.7b). Esta primera caracterización fenética de la diferenciación entre poblaciones de *D. serido* arroja resultados comparables a los comentados en *D. buzzatii*. Si bien estos resultados son preliminares son congruentes con la hipótesis de eventos históricos de fragmentación del área de distribución de la especie y posterior diferenciación y están en concordancia con los datos del ADN mitocondrial que sugieren la existencia de agrupamientos similares de poblaciones: noreste, porción norte de la costa atlántica brasilera y porción sur de la costa atlántica brasilera. (Morales *et al.* 2004, Manfrin & Sene 2006).

En resumen, en las dos especies analizadas se ha observado una marcada estructuración poblacional en la conformación del aedeago. Además, el patrón de divergencia interpoblacional observado parecer haber sido resultado de eventos estocásticos y aislamiento por distancia.

En el próximo capítulo subiremos a un nivel superior de organización para intentar inferir qué fuerzas evolutivas podrían haber estado implicadas en la evolución de la genitalia en el cluster *buzzatii* como un todo.

Capítulo VII: La selección versus la deriva génica como mecanismos causales de la divergencia morfológica en drosófilas cactófilas neotropicales

Tiempo y modo de evolución morfológica en el cluster *buzzatii*

Resumen

¿Cuál es la importancia de la selección en comparación con la deriva como fuerzas diversificadoras de la morfología de las especies? En este capítulo investigamos la diversificación en la conformación del ala y la genitalia masculina a través del estudio de 5 de las 7 especies que forman el cluster *D. buzzatii*. Utilizando modelos de la genética cuantitativa derivamos predicciones específicas acerca de la relación entre los patrones morfológicos de variación entre y dentro de las especies y ponemos a prueba la hipótesis de que la deriva génica (como hipótesis nula) es una explicación suficiente para el grado de divergencia observado entre los taxa. El estudio consideró dos niveles, el cluster *D. buzzatii* y el 'set' de especies *D. serido*.

De acuerdo a los resultados, la deriva puede ser descartada como explicación de la diversificación de la morfología del ala (tanto es su aspecto general como en las variaciones de los patrones localizados de venación) en ambos niveles estudiados. Para la morfología genital, en cambio, la deriva es suficiente para explicar la divergencia dentro del grupo *D. serido*, pero, nuestros resultados muestran evidencia suficiente para proponer a la selección natural como fuerza responsable de la divergencia dentro del cluster como un todo, en particular para explicar la divergencia de *D. buzzatii* respecto del resto del enjambre de especies.

A pesar de las generalizaciones, cada órgano estudiado presentó evidencias de estar sujeto a distintas fuerzas evolutivas cuando se consideran distintas dimensiones del cambio de conformación. Esto afirma, tanto para el ala como para el aedeago, su naturaleza compleja.

“Time flies like an arrow. Fruit flies like a banana”
Groucho Marx

La importancia relativa de la selección natural y la deriva génica como fuerzas modeladoras de la diversidad biológica es un viejo debate que no ha perdido contemporaneidad. Dirimir qué papel han jugado los procesos selectivos y la deriva en la evolución de caracteres complejos sigue siendo una cuestión central en biología evolutiva (Fisher 1930, Wright 1931, Marroig *et al.* 2004).

En este último capítulo, nuestra atención se centrará en la perspectiva más general de la evolución morfológica del cluster *D. buzzatii*, con el objetivo de inferir la importancia relativa de los procesos evolutivos involucrados (deriva y selección) a partir del estudio de los patrones de divergencia observados. Existe consenso en considerar tanto a la deriva como a la selección natural como mecanismos responsables del cambio evolutivo, sin embargo, hay disparidad de opiniones respecto de cuál es el proceso que domina estos fenómenos a diferentes niveles de organización biológica (desde el ADN y las moléculas pasando por los caracteres complejos hasta los organismos y poblaciones). Con el fin de evitar un paradigma “planglossiano”¹ de evolución, siempre es saludable considerar la posibilidad de que parte de la diversidad morfológica que observamos puede explicarse en base a modelos neutros, basados en la idea que las variantes observadas no afectan la aptitud (o lo hacen de manera equivalente), de manera que la evolución es el resultado del equilibrio entre la deriva génica, que erosiona la variabilidad y la mutación que introduce, generación tras generación, nuevas variantes en las poblaciones. A nivel morfológico esta idea es, incluso, aplicable para ciertas características de órganos que se sabe responden a presiones adaptativas como puede ser el caso de las alas de *Drosophila* (ver Capítulo III). En estos casos la pregunta será entonces qué aspectos y qué porcentaje de la variación morfológica responde a la evolución por selección natural y cuáles están libres de restricciones selectivas y por lo tanto evolucionan por deriva.

Existen distintos enfoques a la hora de encarar la comprensión de la evolución morfológica, por un lado, las estrategias experimentales y por otro, los estudios comparativos. Los datos con los que contamos permiten un tipo particular de estudios

¹ Por el doctor Pangloss, personaje de “Candido” de Voltaire (1759) para el que todas las cosas responden a un propósito específico. El paradigma Panglossiano, ya dentro de la biología evolutiva, tiende a considerar a todas las estructuras y comportamientos de los organismos como adaptaciones al ambiente y no considera la posibilidad de estructuras neutras o productos secundarios de otros procesos y por lo tanto sin valor adaptativo *per se* (Gould & Lewontin 1979).

que es la comparación, entre taxa, de los patrones de medias, varianzas y covarianzas de caracteres cuantitativos y su cotejo con las expectativas teóricas bajo distintos escenarios. Ya que la variación intraespecífica es el combustible de las fuerzas evolutivas en la diversificación interpoblacional, tanto el patrón como la magnitud de la variación en una población deberían encontrarse correlacionados con la divergencia entre especies.

La genética cuantitativa provee el marco teórico permitiendo comparar los patrones de variación observados con aquellos esperados bajo modelos que contemplan la acción de distintos mecanismos evolutivos (Lande 1979, Roff 1997). El grado de divergencia morfológica entre grupos resultante de la evolución por deriva génica debe ser proporcional a los niveles de variación de esos caracteres en la población ancestral (Clayton & Robertson 1955, Lande 1979). Estos niveles pueden ser estimados de manera más eficiente por la matriz de varianza / covarianza (V/CV) genética aditiva de todos los grupos tomados en conjunto (matriz G; Lande 1979). A esta afirmación subyace una serie de supuestos como la ausencia de selección divergente y un influjo constante de mutaciones con efectos pleiotrópicos y aditivos que mantienen tanto los fenotipos medios como los niveles de varianza y covarianza genéticas (Lande 1979, 1980, Turelli 1988, Barton & Turelli 1989), es decir matrices G relativamente constantes o proporcionales. Lamentablemente, estimar correctamente la matriz G de una población involucraría trabajar con cientos o incluso miles de individuos con relaciones genealógicas conocidas. Es evidente el obstáculo operacional que esto implica y que explica, en parte, la falta de estudios que aborden estos aspectos de la evolución morfológica (Ackermann & Cheverud 2002, pero ver Marroig *et al.* 2003). Afortunadamente, la matriz de varianza/covarianza fenotípica (matriz P) puede ser un buen sustituto de la matriz G, simplificando enormemente los estudios (Cheverud 1988, 1996, Roff 1995, 1997, Koots & Gibson 1996, Reusch & Blackenhorn 1998).²

El modelo así planteado provee una prueba de la hipótesis de evolución neutra mediante la comparación de las matrices de varianza/covarianza fenotípicas entre y dentro de los taxa. Así, si consideramos la hipótesis que la deriva génica ha sido el proceso principal que operó en la divergencia morfológica entre las especies y, por lo tanto los caracteres seguidos fueron selectivamente neutros, es posible modelar su

² Ninguno de estos trabajos involucra el estudio del cluster *D. buzzatii* por lo que la confirmación de esta afirmación en nuestro modelo está pendiente y por lo tanto, en el contexto de nuestro trabajo, enfatizamos su consideración como un supuesto.

comportamiento como un proceso de difusión (Lande 1979, Lofsvold 1988). De acuerdo con estos autores, la dispersión esperada en los fenotipos promedio de las poblaciones a través del accionar de la deriva génica a lo largo de las generaciones será una función dependiente de la matriz \mathbf{G} , el tamaño efectivo de las poblaciones y el tiempo de divergencia:

$$\mathbf{E}(\mathbf{t}) = \mathbf{G}(\mathbf{t}/N_e) \quad (1)$$

Donde $\mathbf{E}(\mathbf{t})$ es la matriz de dispersión o matriz de varianza/covarianza entre poblaciones (o taxa o especies) en la generación \mathbf{t} , \mathbf{G} es la matriz de varianza/covarianza genética aditiva de la población base del grupo de especies y N_e es el tamaño poblacional efectivo.

Como comentamos en los párrafos anteriores, cuando se trabaja con datos de poblaciones contemporáneas, la matriz fenotípica intragrupo, que en nuestros análisis llamaremos \mathbf{D} , es un buen estimador de la matriz \mathbf{G} (Cheverud 1988, Roff, 1995, 1996, Koots & Gibson 1996) y la ecuación (1) puede sustituirse en esos casos por una versión más operativa:

$$\mathbf{E}(\mathbf{t}) \propto \mathbf{D}(\mathbf{t}/N_e) \quad (2)$$

Dado que \mathbf{t} y N_e (la constancia de N_e es, también, una suposición) son constantes, si las poblaciones realmente se diversificaron por procesos estocásticos, se deduce que el patrón de variación fenotípica entre grupos será proporcional a la variación fenotípica dentro del conjunto de taxa ($\mathbf{E} \propto \mathbf{D}$) y en consecuencia, la hipótesis de evolución morfológica neutra puede ser evaluada a partir de pruebas de proporcionalidad de matrices. Si estos patrones resultan no ser proporcionales podemos postular que otros procesos, como la selección natural habrían sido responsables de la divergencia fenotípica.

En síntesis la aproximación descrita no parte de la suposición de que la variación morfológica es adaptativa, su hipótesis nula (H_0) es que la deriva es una explicación suficiente que puede dar cuenta de diferencias morfológicas observadas. No rechazar H_0 nos llevará a sugerir que la diversificación observada no ha sido adaptativa. Dado que tanto el ala como el aedeago son órganos complejos conformados por distintos caracteres interrelacionados, es importante considerar estas cuestiones en un

contexto multivariado de manera de incluir en el análisis los compromisos genéticos entre las partes (Arnold 1992).

Sin embargo, cabe señalar que coeficientes de selección uniformes para todos los caracteres de un órgano pueden terminar generando un patrón de divergencia entre especies que podría imitar el esperado bajo deriva (Ackermann & Cheverud 2002). Es decir que el no rechazo de la hipótesis nula no asegura la ausencia total de selección y conduce a la necesidad de realizar estudios adicionales.

Para nuestro estudio de los mecanismos implicados en la divergencia morfológica contamos con datos de 5 de las 7 especies del cluster: *D. buzzatii*, *D. koepferae*, *D. gouveai*, *D. antonietae* y *D. serido*, las mismas que hemos mencionado en los capítulos anteriores. Las restantes, *D. seriema* y *D. borborema* son especies de muy difícil mantenimiento en el laboratorio, de las cuales la información con que se cuenta es fragmentaria y dado que no disponemos de especímenes, lamentablemente, no pudieron ser incluidas en el estudio.

En el caso de la morfología alar la muestra utilizada consistió de 30 alas derechas de machos adultos de cada especie, de modo que no fue posible incluir la variación debida al dimorfismo sexual y a la asimetría que llevarían a sobreestimar los valores intraespecíficos de variación. Los individuos de *D. buzzatii* y *D. koepferae* provinieron de líneas escogidas al azar (5 de cada especie) entre los stocks con que se contaba en el laboratorio. Las moscas de cada línea fueron criadas a baja densidad en su hospedador natural como precaución por cualquier posible sesgo causado por la plasticidad fenotípica. Los individuos de *D. gouveai* y *D. antonietae* fueron tomados de las líneas analizadas en el Capítulo II tratando de respetar el mismo criterio con respecto al sustrato de cría y el muestreo de cada línea antes comentado. Los individuos de *D. serido* provienen de líneas aportadas por el laboratorio de Genética Evolutiva (Facultad de Filosofía, Ciencias y Letras, Ribeirão Preto) de la Universidad de Sao Paulo, Brasil. Estas líneas se originaron a partir de moscas muestreadas en Milagres (Bahía, Brasil) que es la localidad topotípica de la especie. Las moscas experimentales fueron criadas a baja densidad en un medio de laboratorio preparado en base a harina de maíz y levadura, que es el mismo que se utiliza para su mantenimiento rutinario.

Para el caso de los aedeagos, respetando los criterios antedichos, se buscó maximizar el número total de individuos por el alto grado de error que tiene la metodología de captura de la morfología genital. Por este motivo se analizaron entre 50 y 100 individuos por especie. La morfología alar se capturó mediante la digitalización

de marcos anatómicos tal cual se describió previamente (ver Capítulo III, Anexo B1) y la morfología genital mediante la descripción de su contorno con elipses de Fourier (ver Capítulo IV, Anexo B2).

El papel de la deriva génica en la diversificación morfológica

Como explicamos, al comparar las matrices de varianza/covarianza dentro y entre poblaciones (Ecuaciones 1 y 2) es posible evaluar si el patrón observado puede ser explicado por la deriva. Podemos hacer más sencillo el cálculo si obtenemos matemáticamente formas más simples de las matrices. Una forma de hacer esto es por medio de un análisis de Componentes Principales de cada matriz y, a partir de este, trabajar con los ejes principales de variación y los autovalores asociados. Esto no constituye una novedad ya que a lo largo de esta tesis las variables morfológicas que se utilizaron como descriptores de la morfología alar (DRs) y genital (CPs) son los componentes principales de las matrices de varianza/covarianza fenotípica (ver Anexo B para un detalle de la composición particular de cada una de las matrices referidas). Los componentes principales de las matrices V/CV intragrupo están ordenados por el porcentaje de varianza que explican y son ortogonales entre sí, esto es que, por construcción, no están correlacionados. Entonces, la matriz V/CV intragrupo (**D**) queda así definida como una matriz diagonal sin covarianzas entre los componentes. Para los componentes de la matriz entre grupos **E** equivalentes a esta diagonal de **D** se calcula la varianza entre poblaciones de las medias de cada componente principal.

Si la diversificación tuvo lugar a través de la deriva entonces las varianzas de los valores de componentes principales entre poblaciones deberían ser proporcionales a las varianzas intragrupo (los autovalores del PCA). Esto significa que si llevamos la reformulación de la ecuación (1) a una escala logarítmica queda conformada una regresión lineal:

$$\ln \mathbf{E}_i = \ln (t/N_e) + \beta \ln (\mathbf{D}_i) \quad (3)$$

donde \mathbf{E}_i es la varianza intergrupo y \mathbf{D}_i la varianza intragrupo para el autovector \mathbf{i} y esperamos que la pendiente β de la regresión tenga un valor de 1. Los desvíos de este valor en las pendientes estimadas proveerán, en cada caso, las pruebas estadísticas que permitirán inferir si el patrón observado es compatible, o no, con lo esperado por deriva.

Una pendiente mayor a 1 indicaría que uno o más de los CPs, que explican los mayores porcentajes de variación, son más variables, en relación al resto. Esto puede deberse a selección diversificadora para los CPs más variables y por lo tanto a que la variación entre grupos es mayor que la esperada a partir de los valores intragrupo o, por el contrario, a selección normalizadora a nivel de los CPs menores (los que explican un bajos porcentajes de varianza), que presentan varianzas entre grupos proporcionalmente muy pequeñas en comparación a la varianza intragrupo. En tanto que una pendiente menor a 1 sería una señal de que la divergencia interpoblacional a lo largo de los ejes menores es mayor a la esperada bajo neutralidad. Una posible interpretación de este patrón sería que la acción de la selección diversificadora se centra en CPs menores o que en realidad los CPs mayores se encuentran sujetos a selección normalizadora.

La razón entre el tiempo y el tamaño efectivo (t/N_e) es la constante de la regresión y por lo tanto su valor no altera el valor esperado de 1 para β . O sea, bajo un modelo de evolución estrictamente neutra, al aumentar el tiempo de divergencia se incrementa la dispersión entre los grupos y aumentará el valor de la constante pero β no se ve afectada.

La coselección de variables conformacionales como desvíos de la proporcionalidad.

La matriz de varianza/covarianza interespecífica de las medias de cada especie también puede presentar un desvío de la proporcionalidad si los valores de distintos componentes principales de los grupos divergentes se encuentran correlacionados entre sí. Por definición, los componentes principales intragrupo son ortogonales entre sí y, por lo tanto no están correlacionados. Si la deriva es la causa de la divergencia la expectativa es que los valores medios de los componentes principales de cada especie, al compararlos entre especies, mantengan esa falta de correlación. Sin embargo, la selección en distintas dimensiones (componentes), a nivel de la morfología, puede provocar una correlación entre los valores de los CPs interespecíficos.

La respuesta multivariada a la selección natural se puede expresar de la siguiente manera:

$$\Delta Z = G P^{-1} S$$

Donde ΔZ representa la respuesta a la selección, G es a matriz V/CV genética multiplicada por la inversa de la matriz de covarianza fenotípica (P^{-1}) y el diferencial de

selección (**S**). Este último valor contiene la diferencia entre la media fenotípica después de un evento de selección menos la media fenotípica antes de la selección para cada rasgo (Lynch & Walsh 1998). El diferencial de selección mide la integración de las fuerzas directas e indirectas de la selección sobre un dado carácter, mientras que el gradiente de selección, (β) da una medida de la fuerza directa de la selección sobre el carácter.

Siendo $\beta = P^{-1} S$, la ecuación anterior queda expresada como:

$$\Delta Z = G \beta$$

Entonces, β contiene la información sobre la intensidad de la selección natural (tanto directa como indirecta), necesaria para predecir la respuesta direccional a la selección (Arnold 1983, Lande & Arnold 1983). **S** puede calcularse como la covarianza entre la adecuación biológica relativa y la media fenotípica (Price 1970, Lynch & Walsh 1998). Siguiendo a Lande & Arnold (1983) β es el vector de coeficientes de regresión parciales de la adecuación biológica relativa sobre los caracteres. En otras palabras, la matriz **E** esperada bajo selección direccional diversificadora es:

$$E = GC,$$

donde **G** es la matriz V/CV genética y **C** es la matriz V/CV entre gradientes de selección para los caracteres morfológicos (Jones *et al* 2003), los coeficientes de regresión parcial, (también denominados “gradientes de selección”) que cuantifican la acción directa de la selección sobre un CP en particular y la indirecta sobre otro.

Como explicamos los CPs intragrupo no están correlacionados conformando de esta manera una matriz **G** diagonal. Por lo tanto, de detectarse una correlación en la matriz **E** es evidente que proviene de **C** porque se estaría produciendo lo que Felsenstein (1988) denominó covarianza selectiva, o, en otras palabras, correlaciones entre los gradientes de selección de distintos caracteres. En términos prácticos esto podría interpretarse como particularidades morfológicas que son co-seleccionadas dentro de un clado particular. Una manera de determinar el efecto de la coselección es mediante el cálculo de coeficientes de correlación entre los componentes principales calculados para cada una de las especies mediante pruebas de Pearson corregidas por tests múltiples. En nuestro estudio utilizamos esta metodología para establecer la interdependencia (o no) del comportamiento de los componentes.

El análisis de los patrones de variación, lo haremos a dos niveles. En el más general consideraremos, tal cual adelantamos, 5 especies buscando la representatividad de todo el cluster. Pero también realizaremos los estudios excluyendo a *D. buzzatii* para así conocer los patrones de divergencia dentro del “sibling set” de *D. serido*.

Evolución de la morfología del ala en el cluster *D. buzzatii*

La técnica que utilizamos a lo largo de los capítulos para describir la morfología de las alas de *Drosophila* fue determinar marcos anatómicos que permitieran conservar la geometría del órgano y luego describirla a partir de lo que llamamos Deformaciones Parciales (Anexo B1). Estas Deformaciones Parciales pueden ser sometidas a PCA para obtener las denominadas Deformaciones Relativas (DR). Entonces, estas variables morfológicas están asociadas a autovalores que son los que funcionan como descriptores de la matriz V/CV fenotípica de la muestra (que en este capítulo denominamos **D**) definiendo una matriz diagonal sin covarianzas entre los componentes. Resumiendo, el cálculo de las Deformaciones Relativas de toda la muestra (todos los individuos de las 5 especies) no permite obtener los valores de **D** para la prueba de proporcionalidad del cluster y el cálculo de las DRs de una muestra sin individuos de *D. buzzatii* brinda los mismos valores pero para el grupo *D. serido*. Sin embargo, existe un elemento adicional de evaluación gracias a algunas particularidades de esta técnica de morfometría geométrica, el valor del parámetro α (Anexo B1). Este parámetro es el peso que se le da a las deformaciones parciales según la escala espacial del cambio que describe cada una. En la mayoría de los trabajos se utiliza un valor de 0 para α y esto otorga igual peso a todas las deformaciones. Pero en nuestro caso, nos interesa investigar que pasa con el ala a distintas escalas de cambio morfológico y por esto subdividimos la sección en dos evaluaciones. Por un lado, calculamos las deformaciones relativas con un α de 1, dándole así el mayor énfasis a la variación en la escala más grande del cambio, el aspecto general del ala, o sea los cambios en el patrón de venación que afectaron, simultáneamente, a la mayor cantidad de referencias anatómicas. Luego repetimos los análisis con las deformaciones relativas obtenidas con un valor de α de -1 maximizando el peso de las diferencias entre especies en escalas pequeñas y en porciones limitadas del ala.

Tabla 7.1: Autovalores del análisis de componentes principales (deformaciones parciales, DRs) intragrupo (**D**), porcentaje de la variación total explicada por cada uno y varianza entre medias específicas de cada componente (**E**). Se consideró a las 5 especies del cluster *D. buzzatii* o a las cuatro especies (excluyendo a *D. buzzatii*) del grupo de especies *D. serido*. El análisis de componentes principales se realizó pesando el aspecto general del ala ($\alpha = 1$) y las particularidades localizadas de los patrones de venación ($\alpha = -1$).

Grupo	Aspecto general ($\alpha = 1$)			Aspecto particular ($\alpha = -1$)		
	D	%	E	D	%	E
<i>Cluster D. buzzatii</i>						
DR1	0,102	58,24	3,03E+23	0,418	20,06	7,32E+24
DR2	0,056	17,33	3,52E+22	0,405	18,80	3,33E+24
DR3	0,054	16,61	2,65E+22	0,340	13,23	1,48E+24
DR4	0,026	3,68	4,62E+21	0,332	12,63	1,05E+24
DR5	0,018	1,86	5,76E+21	0,268	8,25	1,17E+24
DR6	0,011	0,65	1,61E+21	0,239	6,54	4,04E+23
DR7	0,010	0,52	9,36E+20	0,206	4,88	1,58E+23
DR8	0,008	0,38	2,38E+20	0,191	4,20	5,71E+22
DR9	0,008	0,33	7,94E+20	0,178	3,64	2,47E+23
DR10	0,005	0,16	1,08E+20	0,155	2,74	8,46E+22
DR11	0,005	0,14	1,97E+20	0,136	2,11	2,64E+23
DR12	0,004	0,08	2,92E+20	0,125	1,80	3,28E+22
DR13	0,002	0,01	4,38E+19	0,076	0,66	5,07E+22
DR14	0,001	0,01	9,86E+18	0,064	0,47	3,03E+23
"sibling set" <i>D. serido</i>						
DR1	0,082	54,10	1,28E+23	0,373	21,96	5,51E+24
DR2	0,051	21,14	5,27E+22	0,322	16,4	5,79E+23
DR3	0,045	16,19	5,19E+21	0,309	15,1	1,74E+24
DR4	0,023	4,21	7,82E+21	0,257	10,43	1,12E+24
DR5	0,016	1,95	5,49E+21	0,241	9,18	3,90E+23
DR6	0,009	0,66	7,98E+20	0,206	6,68	7,60E+23
DR7	0,008	0,56	2,05E+21	0,181	5,16	1,50E+23
DR8	0,007	0,44	1,27E+20	0,163	4,22	1,81E+23
DR9	0,007	0,35	5,76E+20	0,139	3,05	2,68E+23
DR10	0,005	0,17	1,28E+20	0,124	2,45	1,07E+23
DR11	0,004	0,13	1,16E+20	0,120	2,26	7,53E+22
DR12	0,003	0,08	2,06E+20	0,110	1,92	1,52E+23
DR13	0,001	0,01	1,81E+19	0,068	0,73	5,75E+22
DR14	0,001	0,01	1,45E+18	0,054	0,47	3,37E+22

En la Tabla 7.1 se presentan los autovalores de las matrices de varianza/covarianza fenotípica intragrupo (**D**) y los valores de varianza entre las medias específicas de los componentes principales (**E**) para cada valor de α .

En la Tabla 7.2 se pueden observar los resultados de las pruebas de proporcionalidad tanto para el conjunto de las 5 especies del cluster como para el set *D*.

serido, por separado. El aspecto general del ala de las especies analizadas no mostró evidencia de haber evolucionado por deriva en ninguno de los niveles jerárquicos analizados. Tanto para el grupo *D. serido* como para el cluster entero las regresiones presentaron en todos los casos pendientes mayores que 1 (Tabla 7.2). En la figura 7.1 se ilustran los resultados de las regresiones para cada aspecto del ala en cada nivel analizado.

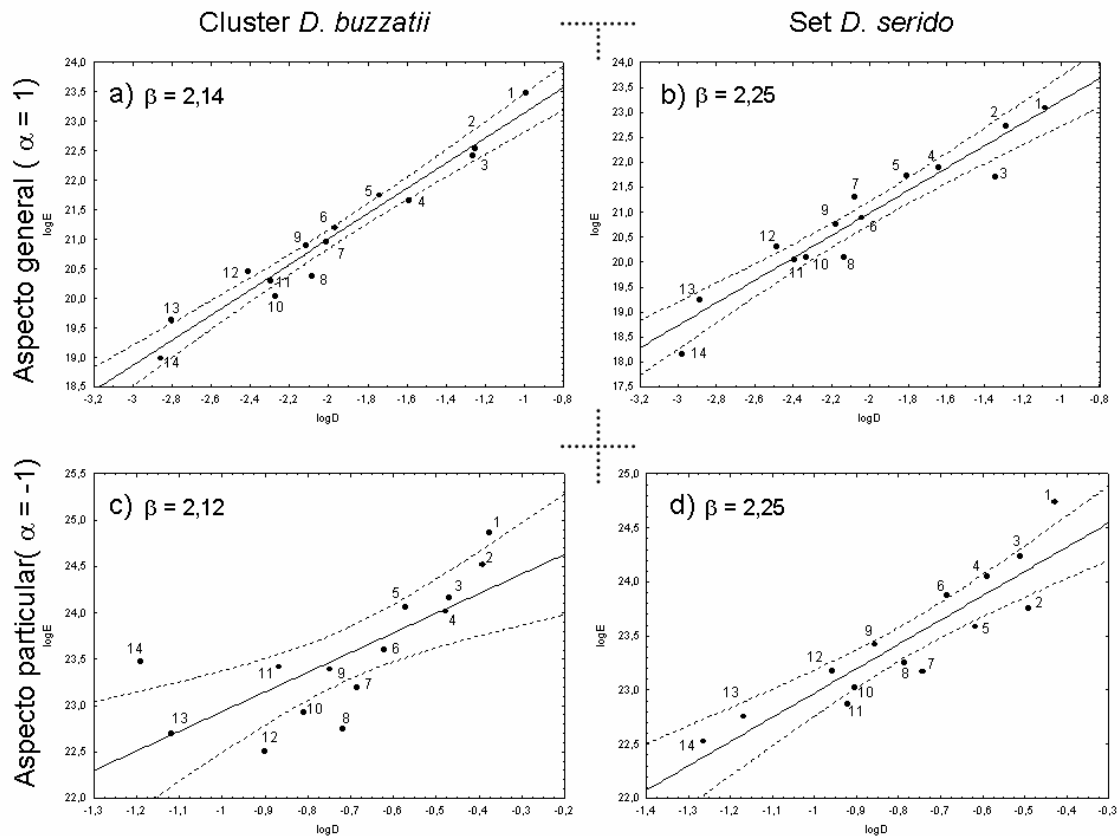


Figura 7.1: Regresiones del logaritmo de los autovalores de las matrices intragrupo de varianza/covarianza fenotípica (**D**) y el logaritmo de los valores de varianza entre las medias específicas de las 14 Deformaciones relativas (**E**) para cada valor de α considerando las 5 especies del cluster o solo las pertenecientes al set *D. serido*. Se informa el valor de la pendiente de la regresión (β) y las bandas de confianza al 95 %.

Cuando analizamos los patrones de cambio alar restringidos a ciertas zonas del órgano encontramos, en principio, que no es posible rechazar la hipótesis de evolución por deriva para todo el cluster. Sin embargo, el bajo valor de R^2 que presentó la regresión ($R^2 = 0,57$) condujo a un examen más minucioso. Este análisis permitió observar que las DRs más extremas, DR 1 y DR 14, presentaron mucha más variación entre especies que la esperada según el modelo cayendo incluso por fuera de las bandas de confianza de la ecuación (Figura 7.1). Además, el análisis de desvíos respecto de la

proporcionalidad por co-selección (ver *La coselección de variables conformacionales como desvío de la proporcionalidad*) indicó que la única correlación significativa entre DRs fue entre estas dos variables ($r = 0,97, p < 0,05$). Dado que esta relación lleva a que las 2 variables se comporten como una sola variable decidimos eliminar a una de ellas optando por DR 14 que explica un porcentaje muy bajo de la variación total (0,47 %). Al recalcular de esta forma la regresión se rechaza la hipótesis nula ($\beta = 2,98$; IC 95 %, 1,93 – 4,02; $R^2 = 0,78$). Sin embargo, incluso con esta nueva función de pendiente mayor, la DR principal sigue ubicándose por arriba de la banda del 95 % de confianza lo que habla de una muy elevada variación entre especies respecto de lo observado dentro de las especies. En la Figura 7.2a se ilustra el cambio morfológico explicado por DR 1 y DR 14, aquella coseleccionada con la segunda. Simultáneamente y presentando un comportamiento inverso, detectamos un par de DRs (DR 7 y DR 8) que siempre presentaron mucha menor variación entre especies que la esperada incluso por el modelo neutro. En la Figura 7.2b se ilustran las zonas del ala que dichas DR involucran (y que no están correlacionadas entre si). En total este par de variables explica el 9,1 % de la variación total y representa un tipo de cambio conformacional que estuvo muy restringido y conservado durante la divergencia del grupo.

Tabla 7.2: Resumen de las pruebas de hipótesis de proporcionalidad entre las matrices **D** y **E** para la conformación del ala y su consistencia con una evolución por deriva. β : valor de la pendiente de la regresión. IC: intervalo de confianza del valor de la pendiente. Cuando el intervalo de confianza no incluyó al 1 se rechazó la hipótesis de deriva. Todas las regresiones fueron significativas ($p < 0,01$ en todos los casos)

Grupo		Consistente con Deriva	β	IC 95%	R^2
Cluster <i>D. buzzatii</i>	Aspecto general ($\alpha = 1$)	NO	2,14	1,84 <> 2,43	0,95
	Particularidades venación ($\alpha = -1$)	SI*	2,12	0,95 <> 3,24	0,57
"sibling set" <i>D. serido</i>	Aspecto general ($\alpha = 1$)	NO	2,25	1,82 <> 2,68	0,92
	Particularidades venación ($\alpha = -1$)	NO	2,25	1,59 <> 2,89	0,83

*Sin embargo ver texto.

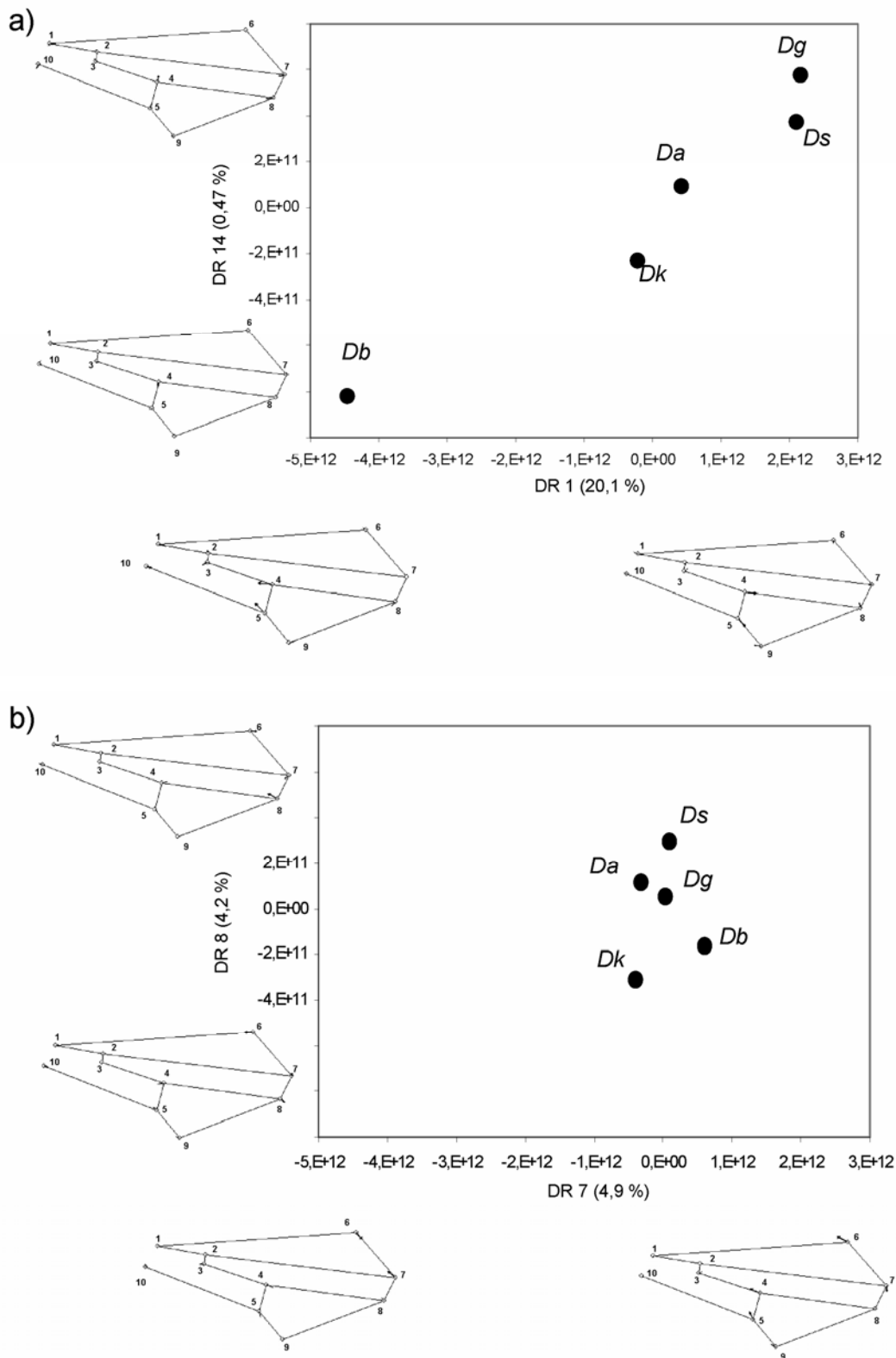
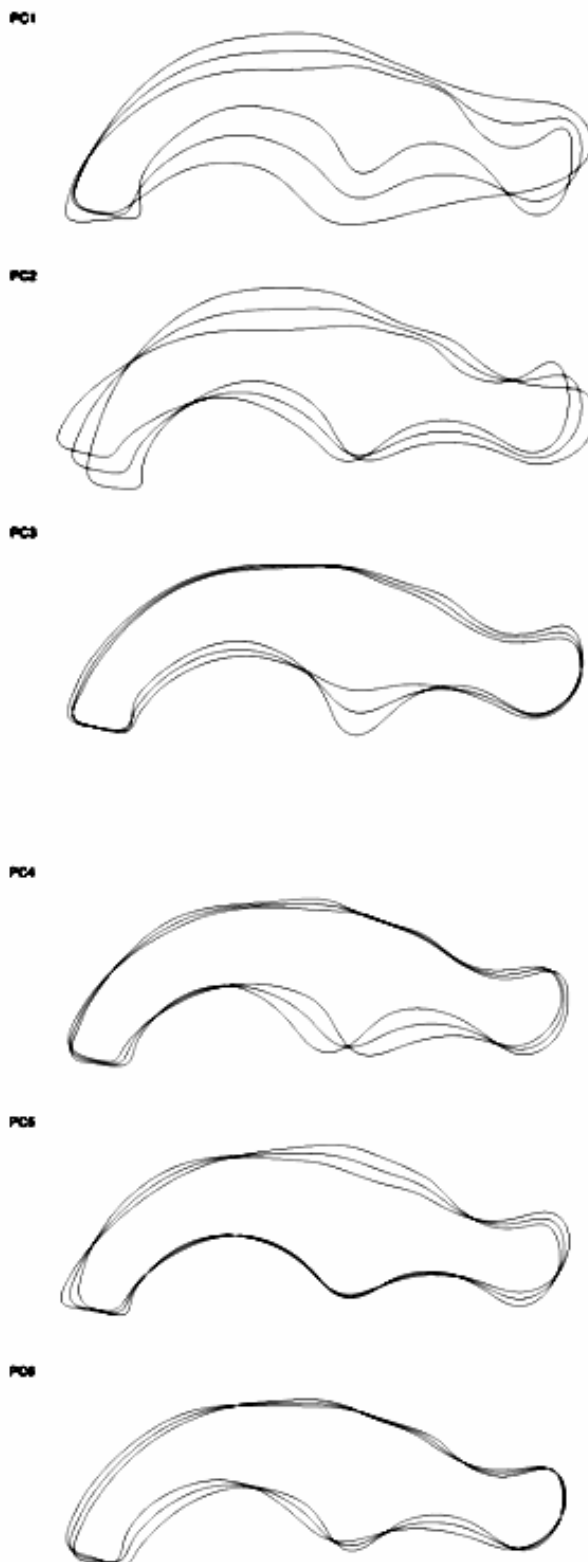


Figura 7.2: Distribución de las especies en los espacios morfológicos determinados por Deformaciones Relativas con signos de estar sujetas a selección diversificadora (a: DR 1 y DR 14) y a selección normalizadora (b: DR 8 y DR 7). Entre paréntesis se indica el porcentaje del total de la variación morfológica explicada por cada DR. Los gráficos ilustran mediante vectores de desplazamiento los marcos anatómicos involucrados en cada dimensión.

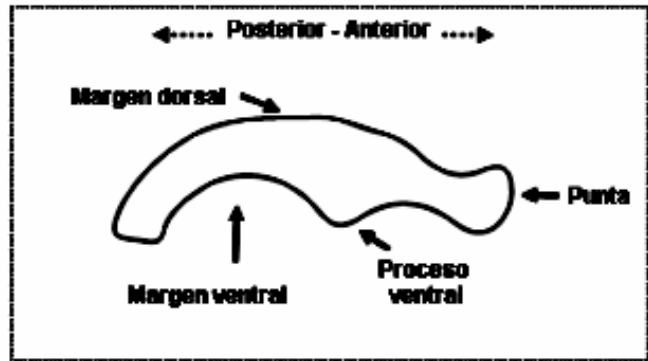
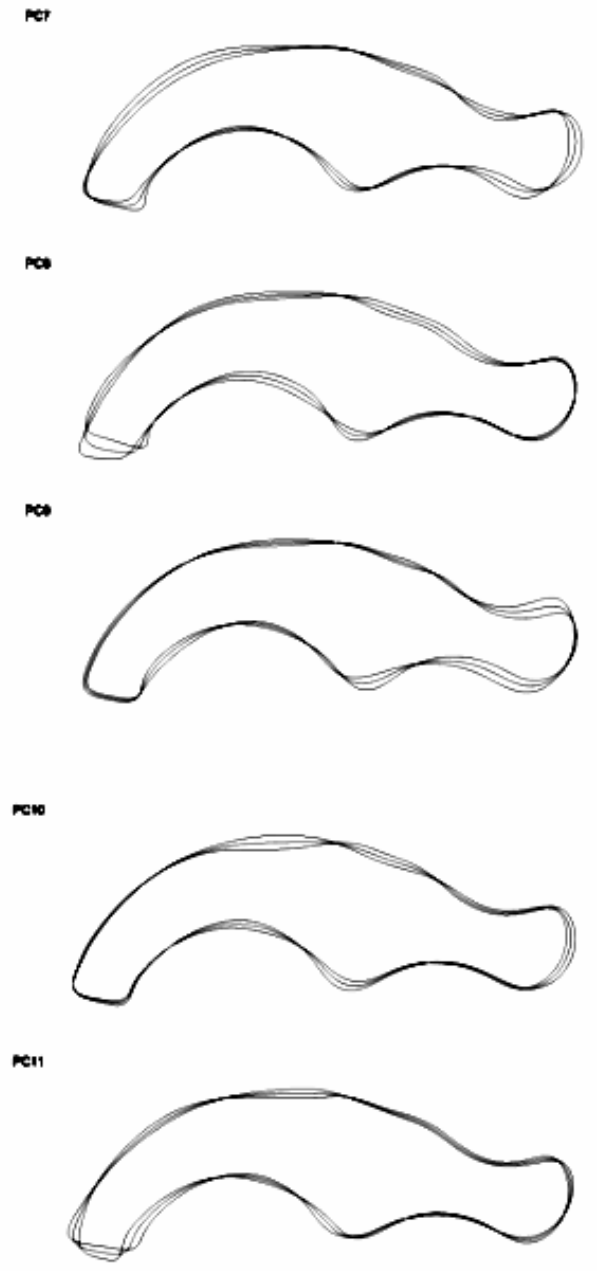
Evolución de la morfología genital en el cluster *D. buzzatii*

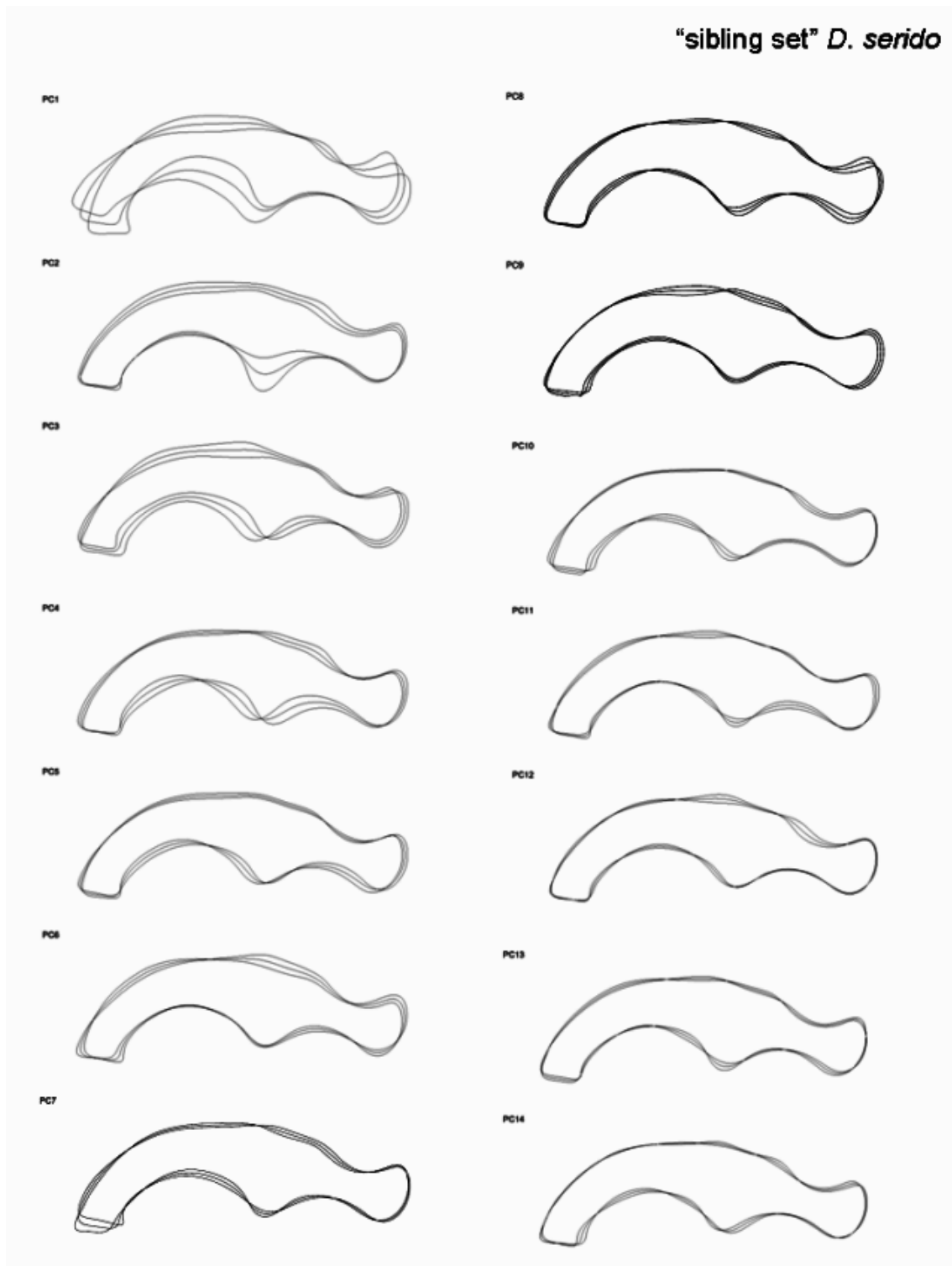
En la Tabla 7.3 se dan los autovalores de las matrices intragrupo de varianza/covarianza fenotípica (**D**) y los valores de varianza entre las medias específicas de los componentes principales (**E**). En la Figura 7.3 podemos observar el tipo de cambio morfológico del que da cuenta cada componente principal, tanto en el análisis general (todo el cluster *D. buzzatii*) como para el set *D. serido*.

Una exploración del espacio morfológico genital muestra que *D. buzzatii* se encuentra notoriamente alejada del resto de las especies, las que presentan una menor dispersión interespecífica de sus medias (Figura 7.4). Según lo indican los resultados de los análisis de regresión, la divergencia en la morfología de la genitalia masculina del cluster *D. buzzatii* no se puede explicar bajo un modelo basado en la evolución por deriva (Tabla 7.4). En el caso de la morfología genital se destaca el comportamiento del CP 7 que presenta un notorio desvío con una varianza entre especies excesivamente mayor a la predicha por la variación dentro de especies. Como se ilustra en la Figura 7.3 este componente incluye modificaciones principalmente en la punta del aedeago y en el grado de curvatura del margen dorsal. Recordemos que por la metodología empleada sólo se consideran las diferencias en la conformación de los contornos, los que se encuentran corregidos para presentar la misma superficie, excluyendo, de esta manera, la variación debida al tamaño del órgano. Las diferencias morfológicas reales son entonces más marcadas que las conformacionales solas ya que el aedeago de *D. buzzatii* representa un tercio del tamaño medio del resto de las especies consideradas (ver Capítulo IV para una comparación con *D. koepferae*).



Cluster *D. buzzatii*





Figuras 7.3: Variación en conformación atribuible a los primeros componentes principales calculados para el total de especies del cluster *D. buzzatii* consideradas y para las pertenecientes al set *D. serido*. Las líneas de cada figura representan la conformación media y la conformación \pm dos desvíos estándar. El contorno atribuido a cada componente fue reconstruido a partir de los coeficientes estimados utilizando su valor medio (o el valor de \pm dos desvíos estándar) y llevando los valores de los otros componentes a cero.

Tabla 7.3: Autovalores del análisis de componentes principales (CP) intragrupo (**D**), porcentaje de la variación explicada por cada uno y varianza entre especies de las medias específicas de cada componente (**E**). El grupo se consideró a las 5 especies del cluster *D. buzzatii* o a las cuatro especies (excluyendo a *D. buzzatii*) del set de especies *D. serido*.

Grupo		D	%	E
Cluster <i>D. buzzatii</i>				
	CP1	4,30E-03	42,04	4,03E+09
	CP2	1,96E-03	19,21	8,08E+08
	CP3	9,60E-04	9,38	1,64E+08
	CP4	5,46E-04	5,34	1,85E+08
	CP5	3,82E-04	3,74	4,38E+07
	CP6	3,38E-04	3,31	3,14E+07
	CP7	2,62E-04	2,57	2,52E+08
	CP8	2,11E-04	2,07	1,46E+07
	CP9	1,59E-04	1,55	2,45E+07
	CP10	1,23E-04	1,20	1,36E+07
	CP11	1,15E-04	1,12	6,22E+06
"sibling set" <i>D. serido</i>				
	CP1	2,33E-03	35,66	1,02E+09
	CP2	1,02E-03	15,59	2,96E+08
	CP3	6,77E-04	10,38	1,36E+08
	CP4	4,92E-04	7,54	2,25E+08
	CP5	3,03E-04	4,65	2,19E+08
	CP6	2,94E-04	4,51	5,63E+07
	CP7	2,09E-04	3,20	1,58E+07
	CP8	1,41E-04	2,17	2,57E+07
	CP9	1,30E-04	2,00	1,60E+07
	CP10	9,57E-05	1,47	6,87E+06
	CP11	9,38E-05	1,44	3,53E+06
	CP12	7,37E-05	1,13	1,43E+07
	CP13	6,49E-05	1,00	9,32E+06
	CP14	6,14E-05	0,94	1,71E+07

Tabla 7.4: Resumen de las pruebas de hipótesis de proporcionalidad entre las matrices **D** y **E** para la conformación del aedeago y su consistencia con una evolución por deriva. β : valor de la pendiente de la regresión. IC: intervalo de confianza del valor de la pendiente. Cuando el intervalo de confianza no incluyó al 1 se rechazó la hipótesis de deriva. Ambas regresiones fueron significativas ($p < 0,01$)

Grupo	Consistente con deriva	β	IC 95%	R^2
Cluster <i>D. buzzatii</i>	NO	1,57	1,08 <> 2,05	0,86
"sibling set" <i>D. serido</i>	SI	1,38	0,99 <> 1,76	0,84

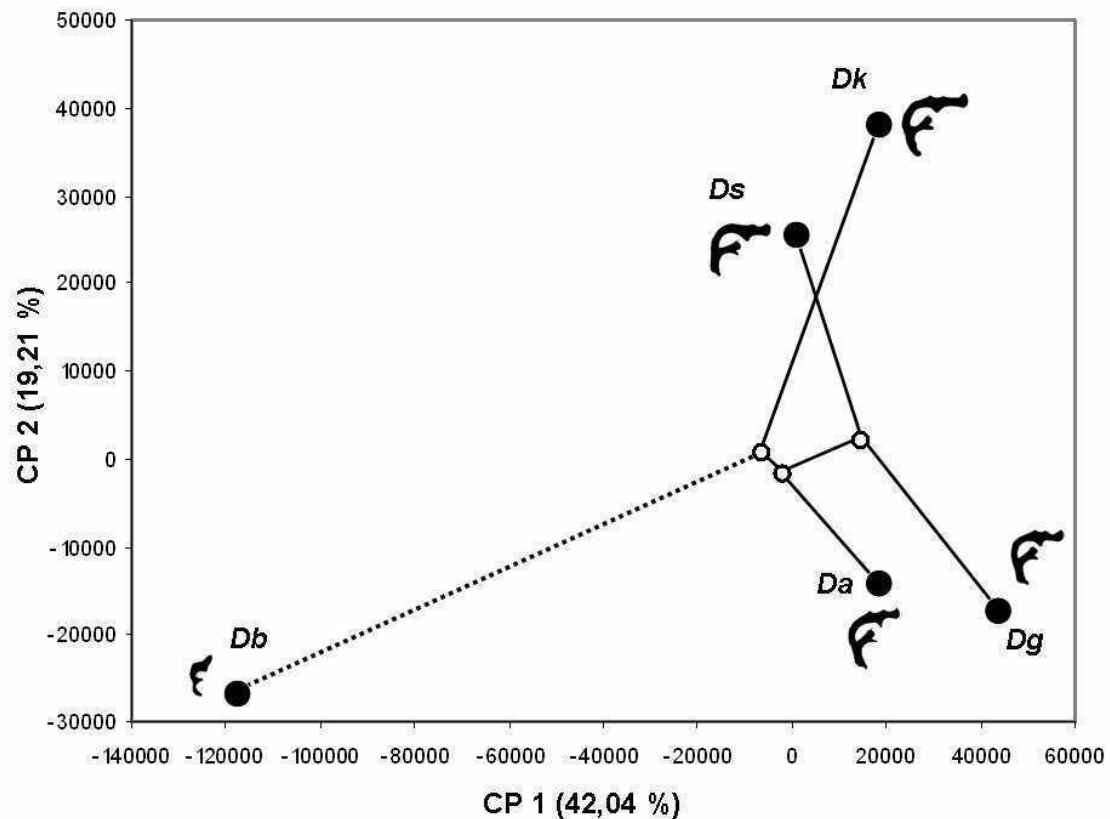


Figura 7.4: Ubicación de las medias específicas en el espacio morfológico determinado por las dos dimensiones principales de cambio conformacional (CP1 y CP2). Entre paréntesis se indica el porcentaje de variación explicado por cada eje. Las especies están unidas según el orden de hipotético de cladogenia según Manfrin *et al* (2001) y los nodos internos se ubican en el promedio de los valores de cada grupo que unen. Las líneas continuas representan divergencia por deriva mientras que la línea punteada representa divergencia por selección según los resultados de la prueba de proporcionalidad (Tabla 7.2). A pesar de las ilustraciones las distancias solo consideran diferencias en la conformación y no diferencias en el tamaño.

Por otro lado, cuando trabajamos exclusivamente con el set *D. serido* no es posible rechazar la hipótesis de evolución neutra, lo que indicaría que la selección habría actuado tempranamente en el grupo, en particular desde la divergencia entre *D. buzzatii* y el resto de las especies y, aparentemente en la línea evolutiva que lleva a ésta. Sin embargo, debemos destacar que las pruebas correspondientes a la genitalia tuvieron valores de R^2 menores que los de la conformación alar (excepto el caso ya comentado del aspecto particular en el cluster *D. buzzatii*). Esto indica una dispersión mayor de los valores de CP respecto al valor predicho por el modelo lineal. Así encontramos que los CP 4, 5 y 14 presentan una varianza mayor entre especies que los hace caer por fuera y por encima del intervalo de confianza del modelo nulo y los CPs 7, 10 y 11 también caen por fuera pero la variación interespecífica es, en este caso, menor que la esperada

conforme a la variación intraespecífica (Figura 7.5b). Sin desestimar el resultado general de evolución genital por deriva, pensamos que de todas maneras sería interesante indagar más sobre este patrón. La prueba de coselección no detectó ninguna correlación significativa entre estos componentes, por lo que su comportamiento puede ser considerado independiente. A la luz de estos resultados y dado que cada componente incluye cambios en distintas partes del contorno del aedeago, más adelante discutiremos las porciones del órgano que muestran discrepancias respecto del tipo de evolución general presentada para el órgano en su conjunto (Ver discusión)

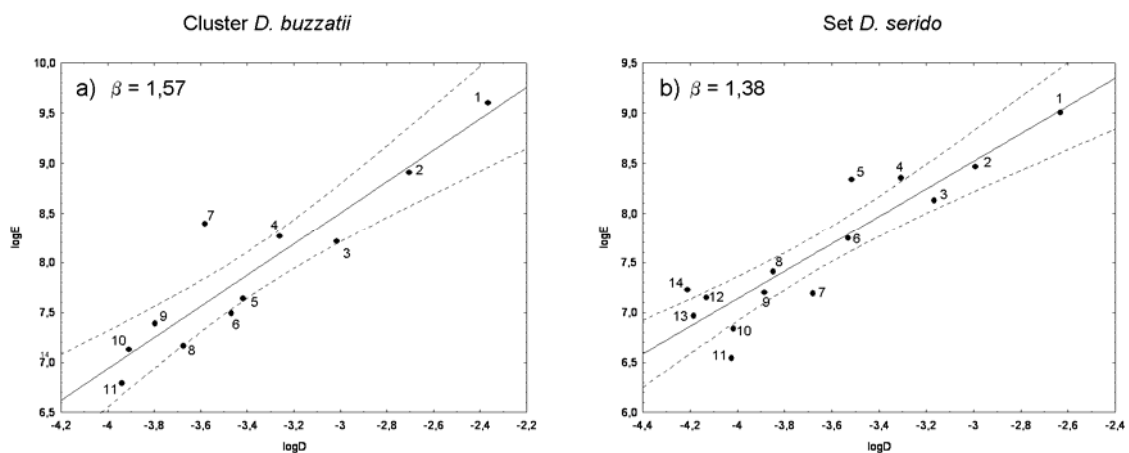


Figura 7.5 Regresiones del logaritmo de los autovalores de las matrices intragrupo de varianza/covarianza fenotípica (**D**) y el logaritmo de los valores de varianza entre las medias específicas de los componentes principales intragrupo (**E**) de la conformación del aedeago de las 5 especies del cluster o las pertenecientes al set *D. serido*. Se informa el valor de la pendiente de la regresión (β) y las bandas de confianza al 95 %.

Patrones de divergencia intraespecífica: D. buzzatii

En el caso de la genitalia contamos con la posibilidad de descender un nivel de organización más y analizar que ocurre con el patrón de divergencia genital entre las poblaciones de *D. buzzatii* estudiadas en el capítulo anterior y que presentaban un patrón de divergencia que estaba relacionado, principalmente, con el aislamiento geográfico.

La prueba de regresión no permite descartar la hipótesis de evolución neutra para el patrón general de divergencia entre las poblaciones de *D. buzzatii* ($\beta = 1,19$; IC 95%, 0,96 – 1,42, $R^2 = 0,92$; Figura 7.6). El análisis de co-selección mostró que las DR 4, 6 y 10 se encuentran correlacionadas con la DR1 (valores del coeficiente de

correlación: $r = 0,68$; $0,69$ y $-0,60$ respectivamente, $p < 0,05$ en todos los casos). Recordemos que tanto DR1 como DR3 fueron las variables que mostraron coeficientes de correlación significativos con las frecuencias de las ordenaciones cromosómicas polimórficas más frecuentes en las poblaciones naturales (Capítulo VI), las cuales se sabe están sujetas a intensas presiones selectivas (Hasson *et al.* 1991, 1995, Rodríguez *et al.* 2000, Gómez & Hasson 2003).

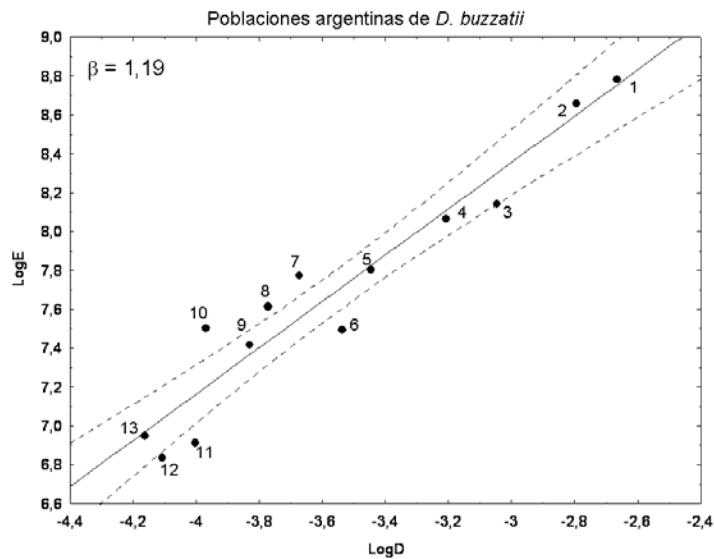


Figura 7.6: Regresiones del logaritmo de los autovalores de las matrices intragrupo de varianza/covarianza fenotípica (**D**) y el logaritmo de los valores de varianza entre las medias específicas de los Componentes Principales (**E**) de las 12 poblaciones argentinas de *D. buzzatii* analizadas en el Capítulo VI. Se informa el valor de la pendiente de la regresión (β) y las bandas de confianza al 95 %.

Discusión

Nuestros resultados muestran que el modelo de evolución neutra (basado en el equilibrio deriva/mutación) es insuficiente para explicar la divergencia en la morfología del ala y de la genitalia masculina en el cluster *D. buzzatii*. En el caso del ala esta afirmación se mantiene tanto en su aspecto más general como en las variaciones de los patrones localizados de venación, incluso cuando se analizan solamente las especies del set *D. serido*. Curiosamente en éste la deriva sí fue suficiente para explicar la divergencia genital. De esta manera, para conformar el escenario general y dado que debemos considerar que para todo el cluster hay evidencia de fuerzas selectivas moldeando la evolución de la morfología genital, es posible proponer que estos procesos habrían actuado en el momento de la divergencia de *D. buzzatii* respecto al

resto del grupo y que la divergencia entre las especies del *D. serido* “sibling set” tuvo lugar de manera estocástica en lo que hace a su patrón general.

Sin embargo, es importante tener en cuenta algunas cuestiones que podrían limitar los alcances de nuestros resultados. En primer lugar no estuvieron incluidas en este estudio *D. seriema* y *D. borborema*. La inspección de sus contornos en la Figura 1.5 (Capítulo I) permite observar que presentan morfologías algo distintas al resto del “sibling set”, especialmente *D. borborema*. Por este motivo y hasta tanto no se efectúe un estudio que incluya a todas las especies la idea de evolución genital neutra dentro del set *D. serido* debe tomarse con la debida precaución. Por otro lado, tanto el ala como el aedeago son caracteres de naturaleza compleja. Complejidad que se traduce, a través de la cuantificación geométrica de la morfología, en el desdoblamiento del cambio de conformación en distintas dimensiones. Aquí tenemos una ventaja ya que esto permite no solo la evaluación de los patrones generales de comportamiento de los órganos sino, además, la posibilidad de detallar porciones del órgano o relaciones entre partes del mismo que presentan distintos tipos de respuestas. Nuestros resultados ejemplifican este caso ya que, a pesar de las generalizaciones, los análisis efectuados para cada órgano mostraron evidencias que sugieren que las distintas dimensiones del cambio conformacional podrían haber estado sujetas a la acción de diferentes fuerzas evolutivas.

Las Figuras 7.7 y 7.8 buscan resumir este comportamiento para los distintos aspectos del cambio de la conformación alar en el cluster *D. buzzatii*. Recordemos que la morfología como un todo presentó evidencias de evolución por selección (muy probablemente natural y no sexual) y esto puede verse más claramente graficando las deformaciones particulares: las principales y que por lo tanto explican la mayor proporción de la variación o las asociadas a la mayor divergencia respecto del patrón general. Si observamos el diagrama del aspecto general del ala (Figura 7.7) vemos que el cambio combinado de marcos anatómicos sujetos a selección diversificadora según la deformación relativa más importante (DR1) es el que lleva a un cambio en la relación entre las partes distal y proximal del ala. Este es el tipo de cambio reportado en *D. subobscura* (Gilchrist *et al.*, 2004) y ya comentado en el Capítulo III. En efecto, las clinas latitudinales positivas en el largo total del ala que se han establecido independientemente en las costas occidentales de América del Sur y América del Norte difieren en las proporciones relativas de las porciones distal y proximal que determinan el aspecto general del órgano.

Es curioso observar que la dimensión de cambio más importante al considerar la divergencia interespecífica involucra desplazamientos de los marcos anatómicos casi exclusivamente a lo largo del eje proximal-distal. También obsérvese que los desplazamientos que han sido minimizados durante la divergencia de las especies y, aparentemente, mantenidos por la selección normalizadora han sido aquellos que consisten en torsiones de distintas porciones del ala, ya sea en su parte proximal (referencias 1 y 10), media (4 y 5) o distales (7 y 8). De efectuarse estos desplazamientos la vena longitudinal III se desplaza respecto de la IV haciendo, por ejemplo, un ala de aspecto más puntiaguda y menos redondeada y se modifica la orientación de la vena cruzada posterior. Este es un tipo de cambio que no parece haber ocurrido durante la evolución del grupo, quizás debido a una limitación ontogenética, ya que parte del desarrollo normal del ala de *Drosophila* pasa por la determinación del eje distal-proximal a través de la expresión concertada y en gradientes de varios genes algunos de altos niveles jerárquicos en la cascada regulatoria (Williams *et al.* 1993, Couso *et al.* 1994, Villano & Katz 1995, Campbell & Tomlinson 1998). De hecho, producir este tipo de cambio implicaría un desacople entre la tasas de crecimiento de líneas celulares que crecen en paralelo, algo que se perfila como altamente improbable.

Cuando consideramos el aspecto general del ala es posible observar los cambios concertados que involucraron a la mayoría, sino a todos los marcos anatómicos dispuestos a lo largo del órgano. Pero por otro lado, al ponderar los desplazamientos más localizados estamos considerando los comportamientos “individuales” de los marcos anatómicos, de ciertas zonas del ala o la disposición de venas particulares. Aquí, más que en el caso anterior, quedan claras, en una misma referencia anatómica, de direcciones de cambio “favorecidas” y otras conservadas, a lo largo de las cuales las especies no han divergido. Son los casos, por ejemplo, de las referencias anatómicas 4, 5 (vena cruzada posterior) y 8 (Figura 7.8). La región intervenosa D, delimitada por los marcos 4, 5, 8 y 9 es la única en la cual la totalidad de sus referencias parece haber sido el blanco de algún tipo de selección divergente entre las especies. Recordemos que esta misma región (IVD) es la que presentó conspicuas diferencias en los estudios comparativos entre *D. buzzatii* y *D. koepferae* y entre *D. gouveai* y *D. antonietae* en los estudios de fuentes de variación (Capítulo III).

Aspecto general ($\alpha = 1$)

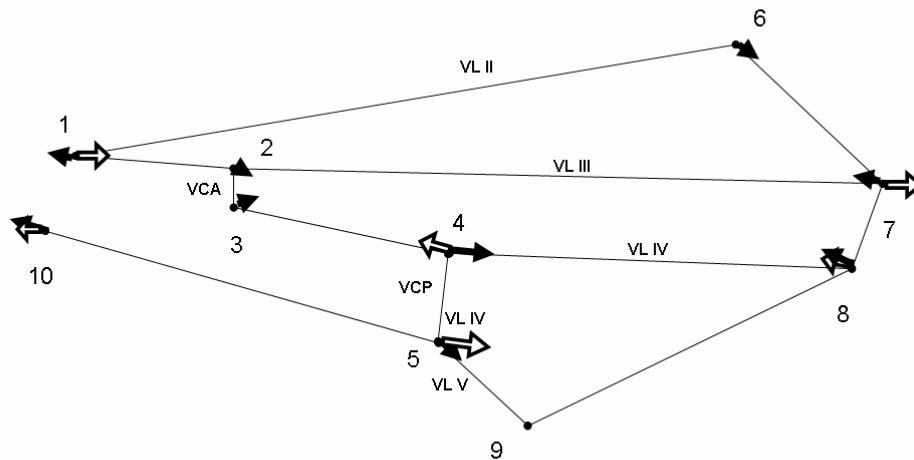


Figura 7.7: Fuerzas selectivas en el aspecto general del ala del cluster *D. buzzatii*. Las flechas negras ilustran una dirección del cambio morfológico explicado por la deformación relativa 1, variable con signos de selección diversificadora durante la divergencia de las especies del cluster. Las flechas blancas señalan los desplazamientos explicados por la deformación relativa 8. Variable con evidencias de encontrarse bajo fuerzas selectivas normalizadoras. VL: vena longitudinal; VCA: vena cruzada anterior; VCP: vena cruzada posterior

La evolución de la morfología genital en el cluster muestra evidencias de una historia que parece desacoplada de la del ala. En primer lugar podemos descartar a la deriva como explicación principal del patrón de evolución de la genitalia en el cluster *buzzatii*. En cambio, nuestros resultados indican que las sutiles diferencias morfológicas entre las especies que forman parte del set *D. serido* habrían divergido por simple deriva. De hecho, nuestro análisis provee una evidencia complementaria a las discutidas en el Capítulo IV acerca de las hipótesis de evolución genital. En el caso del set *D. serido* podemos descartar a la selección sexual como mecanismo causal de la evolución de la genitalia porque, en cualquiera de sus variantes³, debería haber disparado la divergencia entre especies en un grado mucho mayor del esperado por la observación de los niveles de variación intraespecíficos (Arnqvist 1997) lo que significa que, como condición inicial, en el análisis de regresión el valor de la pendiente (β) tuvo que haber sido mayor a 1 (Figura 7.5b).

³ Recordemos que previamente descartamos la hipótesis de llave-cerradura

Aspecto particular ($\alpha = -1$)

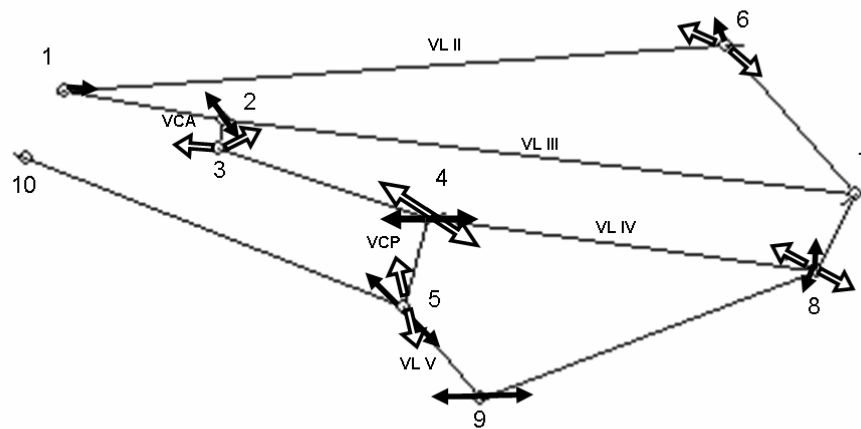


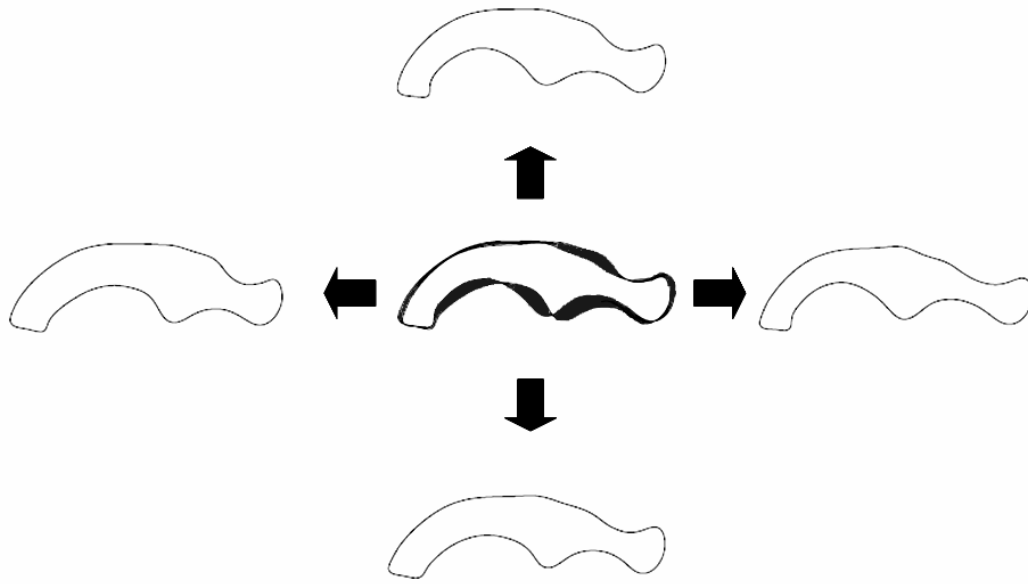
Figura 7.8: Fuerzas selectivas en aspectos particulares de la disposición de las venas del cluster *D. buzzatii*. Las flechas negras ilustran ambas direcciones del cambio morfológico explicado por las deformación relativas 1, variable con signos de selección diversificadora durante la divergencia de las especies del cluster. Las flechas blancas señalan los desplazamientos explicados por las deformaciones relativas 7 y 8. Variables con evidencias de encontrarse bajo fuerzas selectivas normalizadoras (restrictivas respecto a la divergencia). Los largos de las flechas ilustran la magnitud relativa de los desplazamientos representados en las deformaciones. VL: vena longitudinal; VCA: vena cruzada anterior; VCP: vena cruzada posterior

Sin embargo, así como con las alas, podemos buscar regiones del órgano genital cuyo comportamiento evolutivo presentó una tendencia a diferir respecto del patrón general. Esto decidimos hacerlo con las especies del set *D. serido* (a pesar de la evidencia de evolución por deriva) ya que *D. buzzatii* presenta una divergencia tan marcada y tiene una posición basal en el grupo que dificulta la interpretación de las variables. Por esto, a pesar de la evolución neutra, la punta del aedeago, la posición del proceso del margen ventral y la robustez de la sección media del órgano mostraron una divergencia más marcada entre las especies que otras características (Figura 7.9). Por el contrario, el largo de la región posterior y la curvatura de la zona posterior del margen ventral han divergido muy poco durante la cladogénesis. La concentración de cambios con tendencia a la divergencia en la zona anterior del aedeago abre la posibilidad de que esta región sea el blanco de la selección sexual, ya que es esta porción la que interactúa en forma más estrecha con el tracto genital femenino durante la cópula. En este sentido, si se pudiera comprobar que los machos difieren en su capacidad de estimulación y/o fecundación, se abrirían nuevas posibilidades de estudio en relación al éxito

reproductivo diferencial entre machos debido a variaciones en la forma de estas zonas del órgano, y en relación a qué partes de la genitalia de la hembra son las que entran en contacto con esta parte del aedeago. De todas maneras es importante remarcar que de haber sido la selección sexual la responsable de la divergencia en porciones localizadas del aedeago, la intensidad de la misma sería muy sutil ya que no han tenido la suficiente fuerza o tiempo para dejar una señal en el patrón de variación del carácter.

En este escenario queda pendiente explicar la clara divergencia de *D. buzzatii* respecto del resto de las especies. La información con la que disponemos ahora nos permite delinear algunas respuestas. *D. buzzatii* es la especie más pequeña del cluster y la que se desarrolla más rápidamente. Además, nuestros estudios han demostrado que su genitalia varía de manera correlacionada con el tamaño corporal y que ambos caracteres son fenotípicamente plásticos en cuanto a sus respuestas a la cría en distintos cactus hospedadores (Cap IV). Precisamente uno de los aspectos que destaca a *D. buzzatii* del resto de las especies del cluster es el tipo de planta hospedadora que utiliza preferencialmente en la naturaleza. Los estudios fisiológicos, morfológicos y comportamentales y de la historia biogeográfica, sugieren que *D. buzzatii* desarrolló toda una batería de características que le permiten explotar de manera más eficiente que otras especies un recurso que es temporalmente más efímero, nutricionalmente más rico y químicamente más sencillo, como son las opuntias. El patrón de uso de plantas hospedadoras de las drosófilas cactófilas sugiere que el uso de opuntias podría ser un estado derivado y los cardones serían los hospedadores ancestrales no sólo del cluster sino también de todo el complejo *D. buzzatii* (Hasson *et al.* 1992). Si bien no contamos con evidencia que sugiera que el salto de hospedador de cardones a tunas haya tenido relación causal con la cladogénesis inicial del cluster, este estudio abre nuevos interrogantes: ¿debemos agregar a la divergente morfología genital como otro subproducto del salto de hospedador que ha experimentado *D. buzzatii*? ¿La selección sexual ha ayudado a reforzar este proceso?

a) Selección diversificadora



b) Selección normalizadora

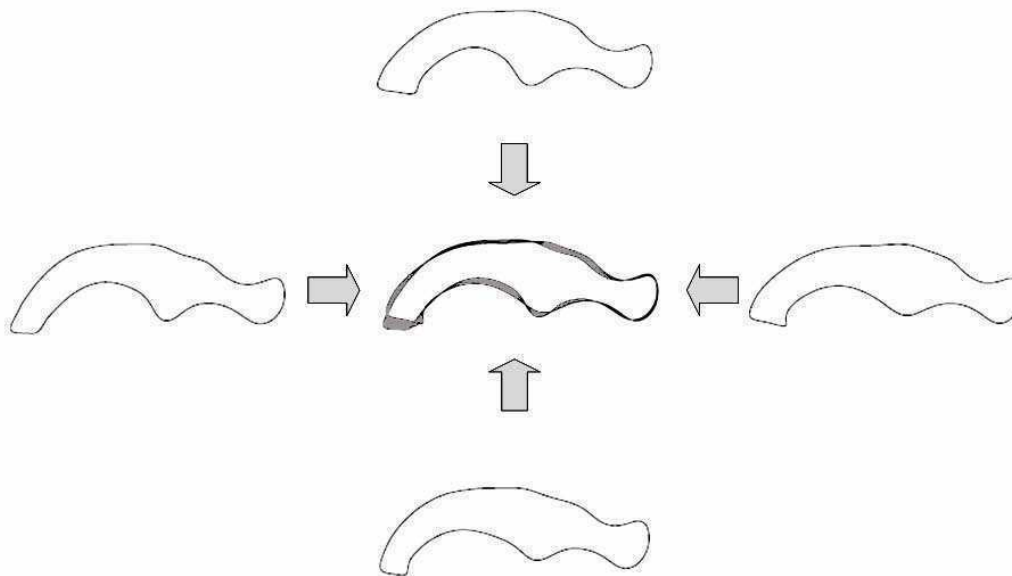


Figura 7.9: Fuerzas selectivas en la conformación del aedeago del set *D. serido*. En negro se marcan las porciones con tendencia a presentar una alta variabilidad entre especies (a). En gris se marcan las porciones con una variabilidad interespecífica reducida (b). Los contornos periféricos muestran representan los desvíos estándar de dos componentes principales de cada tipo: PC 4 y PC 5 (a) y PC 7 y PC 10 (b)

Estas nuevas cuestiones nacen a raíz de la evidencia acumulada y que esperan lo que tendrán para decir estudios comparados de expresión génica durante el desarrollo genital, los de éxito reproductivo considerando las diferencias morfológicas y las investigaciones para determinar las correlaciones fenotípicas y genéticas de la genitalia con caracteres ecológicamente relevantes.

Conclusiones generales

Ensayar algunas conclusiones generales no implica solamente resumir, sino, que también, en parte, consiste en racionalizar las vicisitudes de nuestra empresa una vez concluida. Cuando comencé las investigaciones que terminarían siendo este trabajo la incertidumbre era general. Para comenzar nos proponíamos utilizar técnicas (Descriptores Elípticos) nunca antes aplicadas para el análisis de un órgano que, además hasta ese momento no había recibido atención en lo que respecta a sus patrones de variabilidad. Para peor, los únicos antecedentes habían sido meramente descriptivos. Nuestro desafío era instalar las técnicas de morfometría geométrica como metodologías estándar de trabajo y comenzar a estudiar más detalladamente las respuestas y diferencias que presentaban las alas de *D. buzzatii* y *D. koepferae* pero que no podían ser comparadas directamente con el corpus que se había acumulado en otras especies del género donde la morfometría geométrica se estaba aplicando.

Asimismo, y en pos de jerarquizar nuestro modelo de estudio dimos los primeros pasos para conocer la variación de caracteres de historia de vida y morfológicos en otras especies del cluster cuya distribución no abarca nuestro territorio y en las cuales la respuesta al hospedador nunca había sido evaluada. Por todo esto, antes de encarar las preguntas más generales y abarcadoras debimos resolver cuestiones básicas mas no ensayadas hasta ese momento. Caminar antes de correr sin la certeza de esto último.

Así es como hoy, gratamente vemos cómo las conclusiones generales involucran necesariamente información inédita, a veces incluso para todo el género, epítome de modelo genético-evolutivo. Pero lo que es más importante es que durante el desarrollo de esta tesis se han generado nuevos interrogantes que podrían abrir líneas de investigación de gran potencial teórico y práctico y que eran insospechadas cinco años atrás. Establecidas las técnicas, conocidas las variables biológicas básicas en nuevas especies, ahora repasaremos los otros resultados relevantes del trabajo.

Primero y principal resaltar al organismo clave en este estudio y que, sin embargo, puede quedar vedado por un inconsciente zoocentrismo: el cactus.

La vida de las *Drosophilas* del cluster prácticamente gira alrededor de estas plantas, fuente de sustrato de cría y alimento para las larvas y los adultos, protección contra la desecación y por qué no, factor de aislamiento y dispersión. Capitulo tras capitulo observamos que los cactus influyeron enormemente sobre la morfología del ala y los caracteres de historia de vida estudiados, rasgos ambos con sobrado historial de comportamiento plástico. La sorpresa fue grande cuando los experimentos revelaron efectos del cactus hospedador sobre la morfología de un órgano que como la genitalia masculina se esperaba, ‘a priori’, presentara poca variabilidad en cuanto a su respuesta a la variación ambiental. Por otro lado, los presuntos ambientes químicos distintos que ofrecen los diferentes géneros de cactáceas afectaron de alguna manera el desarrollo larvario al punto de observar no solo diferencias de viabilidad (Capitulo II) sino incrementos en los niveles de asimetría bilateral (Capitulo III). ¿Cuál es el factor químico que ejerce efectos tóxicos sobre el desarrollo?, ¿qué parte del desarrollo ontogenético afecta? ¿Cuáles son y cómo actúan los genes que ofrecen a los organismos capacidades diferenciales en el aprovechamiento de un mismo recurso?

Para el caso del estudio de *D. gouveai* y *D. antonietae* los efectos del hospedador fueron tales que fue posible inferir la dirección más probable de la introgresión en la naturaleza. En este caso, la distribución de los hospedadores y (probablemente) su composición química podrían ser los posibles factores determinantes de la magnitud y dirección del flujo génico.

La morfología del ala es distinta en todas las especies estudiadas y en todos los casos algún aspecto mostró alguna dependencia del sustrato de cría. Por lo que pudimos observar en las especies mejor estudiadas, esta respuesta al ambiente interesa a toda el ala y no hay evidencia de modularidad, aunque cabe destacar que las diferencias entre especies parecen concentrarse en la porción distal-posterior del ala. Estudios sobre los patrones de variación intra e interespecíficos de genes involucrados en el desarrollo de esta región podrían llegar a explicar por qué esta zona es la más variable dentro y entre especies que muestran una morfología general muy similar.

Los aedeagos del cluster son órganos genéticamente variables y con respuesta plástica frente al cambio de hospedador en 3 de las 4 especies. Ambas observaciones constituyen fuertes evidencias en contra del modelo de evolución genital “llave y cerradura” que parece completamente perimido. Todas las especies difirieron entre sí,

no solo en el aspecto general del órgano, sino también en el porcentaje de variación alométrica y el tipo de cambios conformacionales que esta involucra. Resta determinar si la variación en el tamaño o la conformación genital tienen alguna relación con algún componente del éxito reproductivo del macho, así como identificar las porciones del órgano masculino que interactúan con las distintas zonas de la genitalia femenina.

Cuando indagamos las bases genéticas de las diferencias entre especies mediante experimentos de hibridación observamos desvíos respecto del modelo aditivo poligénico tanto para el ala de ambos sexos como para la morfología genital de los machos, es decir, los fenotipos híbridos no mostraron características intermedias respecto de los parentales. De hecho, el aspecto final del híbrido así como su desempeño larval en el sustrato de cría dependió del genotipo de cada padre.

Por la baja eclosionabilidad de los huevos híbridos podemos arriesgar que la gran mayoría de las interacciones entre los genomas de *D. buzzatii* y *D. koepferae* resulta en embriones inviables y he ahí la mayor barrera post-copulatoria. Por otro lado, al analizar la morfología de los híbridos adultos en comparación con los parentales observamos evidencias de epistasis y dominancia de un genoma sobre otro lo que nos lleva a sospechar la segregación de elementos de efectos mayor. Esta observación nos llevó a preguntarnos, ¿qué papel juegan los polimorfismos de inversión? nuestra sospecha es que podrían ser los elementos de efecto mayor. Una pregunta pertinente en este sentido es ¿difieren las inversiones en su capacidad introgresiva? Frente a la potencialidad de hibridación en las poblaciones naturales estas observaciones llevan a interesantes preguntas acerca de los patrones de introgresión cromosómica. Por otro lado, queda abierta la posibilidad de continuar con protocolos de hibridación introgresiva y mapear las regiones genómicas asociadas con los distintos caracteres con el fin de alcanzar una mayor precisión en la caracterización de la arquitectura genética de las diferencias interespecíficas en la morfología alar y de la genitalia.

En *D. buzzatii* y *D. serido* estudiamos la variación en la morfología de la genitalia entre poblaciones y comprobamos que las poblaciones más cercanas geográficamente son, a su vez, las más similares morfológicamente y de manera proporcional a la distancia que las separa. Sin embargo, en *D. buzzatii* también detectamos una correlación entre el aspecto genital y las frecuencias de algunos rearrreglos del cromosoma 2. Si bien el diseño solo permitió una inferencia indirecta,

también constituye el punto de partida para determinar si debemos agregar el aspecto genital a la lista de caracteres afectados por las distintas ordenaciones cromosómicas originadas por inversiones paracéntricas y explorar la posibilidad que, además, del aislamiento por distancia la morfología se vea afectada de manera indirecta por los procesos selectivos que determinan los patrones clinales de las inversiones cromosómicas.

Por último, cuando nos preguntamos acerca de la importancia relativa de la selección natural y la deriva génica como fuerzas diversificadoras que gobiernan la evolución de morfológica descartamos a la primera como explicación de la diversificación en la conformación del ala (tanto es su aspecto general como en las variaciones de los patrones localizados de venación). Esta conclusión es válida tanto para todo el cluster como para el grupo de especies que forman el “set” *D. serido*. Los experimentos futuros deberán buscar la geometría específica de esta observación y determinar: a) el aspecto y/o el tamaño de ala favorecido por la selección natural y b) si algún aspecto de la forma y/o el tamaño del ala se relaciona con el canto u otro aspecto del cortejo del macho y consecuentemente con su éxito reproductivo.

En cambio, en el caso de la morfología genital la evolución neutra es suficiente para explicar la divergencia dentro del grupo *D. serido* aunque resta la interesante posibilidad de sectorizar el órgano según se vaya conociendo su interacción con la anatomía femenina. Sin embargo, hay evidencia suficiente para proponer a la selección como fuerza responsable de la divergencia dentro del cluster como un todo, en particular como explicación de la divergencia de *D. buzzatii* respecto del resto del enjambre de especies.

Esta tesis, de alguna manera, marca el comienzo de la consolidación de un modelo *Drosophila*- cactus- levadura neotropical que rivaliza y complementa el tradicional grupo de drosófilas cactófilas norteamericanas.

Cuánto nos hemos acercado a resolver el lo que Charles Darwin llamó el misterio de los misterios. En este sentido dejo flotando algunas preguntas: ¿Cuál es la relación de esta divergencia morfológica y el cambio de hospedador? ¿Estamos observando el fruto de un proceso de selección sexual dentro del linaje de *D. buzzatii* o por el contrario el efecto indirecto y pleiotrópico de la adaptación a la explotación de opuntias? Una vez más *D. buzzatii*, la especie cosmopolita y generalista del grupo se

aparta de sus hermanas, ¿esto tiene alguna relación con que es la única de las 7 especies del cluster que explota un nicho con ciertas particularidades. Como siempre, preguntarnos sobre ella nos llevara, si somos afortunados, a respuestas generales sobre la diversidad biológica y su generación, porque como dijo Plotino (Eneadas, V, 8.4):

"Todo, en el cielo inteligible; está en todas partes. Cualquier cosa es todas las cosas. El sol es todas las estrellas y cada estrella es todas las estrellas y el sol"

Ignacio María Soto

Febrero de 2008

Anexos metodológicos

Resumen

En esta sección se detallan las metodologías comentadas en los distintos capítulos con énfasis en las técnicas de morfometría geométrica: superposición de Procrustes y Descriptores Elípticos de Fourier. La primera técnica se utilizó en la descripción geométrica de las alas de *Drosophila* mientras que la segunda es la que permitió la cuantificación de la morfología del aedeago. La intención de esta sección no es hacer una revisión exhaustiva de las técnicas pero sí brindar las generalidades teóricas y prácticas básicas para comprender los distintos análisis que se comentan a lo largo de la tesis.

**A- Comentarios generales sobre los análisis de varianza:
ANOVA – MANOVA- MANCOVA.**

En todos los casos en que se realizaron análisis de varianza, los supuestos de dichas pruebas se comprobaron con un α del 10 %. Para probar la homogeneidad de varianzas se utilizó la prueba de Levene y la distribución normal de los valores de la muestra se probó con la prueba de Lilliefors. Aquellos casos en los que los supuestos no se cumplieron se comentan en el texto. Cabe aclarar que en los modelos más complejos en los que había factores anidados y réplicas el supuesto de normalidad se alcanza a través del Teorema del Límite Central¹ ya que los tamaños muestrales en los ANOVAs fueron grandes y las medias de los factores principales se calculan a partir de otras medias de factores menores o anidados.

Los análisis de co-varianza poseen el supuesto adicional de que la relación entre los cambios de la variable dependiente y los cambios en los valores de la covariable es lineal y con la misma pendiente a lo largo de todos los tratamientos o muestras. Por este motivo realizamos pruebas de paralelismo que consistieron en evaluar la interacción Covariable x Tratamiento y en el caso que haya sido significativa se da el supuesto por incumplido y no continuamos con el análisis.

El paquete estadístico utilizado fue el Statistica en su versión 6.0 (StatSoft, Inc. 2001).

¹ El Teorema Central del Límite dice que si tenemos un grupo numeroso de variables independientes y todas ellas siguen el mismo modelo de distribución (cualquiera que éste sea), la suma de ellas se distribuye según una distribución normal: Sea X_1, X_2, \dots, X_n una muestra aleatoria de una distribución con media μ y varianza σ^2 . Entonces, si n es suficientemente grande, X_{media} tiene aproximadamente una distribución normal con $\mu_x = \mu$ y $\sigma_x^2 = \sigma^2/n$. Cuanto mas grande sea el valor de n , mejor será la aproximación.

“Las abejas están dotadas de un alma
y por ello son capaces de hacer geometría”

J. Kepler

B- Morfometría geométrica

Los análisis morfológicos son fundamentales y fueron seminales en el desarrollo de la biología. En los tiempos premodernos era básicamente el único criterio de identificación de los organismos y todavía se encuentra en el centro de las investigaciones de la paleontología, la sistemática, la biología evolutiva y la biología del desarrollo por nombrar algunas disciplinas.

Así, la medición y cuantificación de las diferencias morfológicas fueron refinándose con el desarrollo de la estadística que acompañó el crecimiento y sofisticación de las ciencias biológicas hasta consolidarse en lo que se conoce como Morfometría.

La morfometría es el estudio de las variaciones de conformación y su covariación con otras variables (Bookstein 1991; Dryden & Mardia 1998). Tradicionalmente, la morfometría constituía la aplicación de distintos análisis estadísticos a grupos de variables cuantitativas que típicamente consistían en mediciones de anchos, largos y alturas. Sin embargo, a principio de la década del 90 del siglo pasado se produjo un cambio en la forma de cuantificar las estructuras y en la forma de analizar los datos derivados. Estos cambios buscaban capturar la geometría de la estructura y conservarla a lo largo de todo el proceso de análisis. Una revisión del tema en 1993 bautiza a esta nueva escuela de metodologías como morfometría geométrica (*geometric morphometrics*) y sugiere que constituye un cambio de paradigma que desencadenó una “revolución en la morfometría” (Rohlf & Marcus, 1993). Ahora lejos de esos primeros años, la morfometría geométrica es una forma estándar de trabajo, sin embargo, las bases metodológicas no son de manejo cotidiano y por lo tanto ameritan una breve reseña que es el propósito de esta parte del anexo.

Primero algunos comentarios sobre la terminología utilizada y su correlato en inglés, idioma en el que se encuentra la mayoría de la literatura al respecto. En términos coloquiales, en castellano, cuando hablamos que dos cuerpos tienen distinta forma no estamos estableciendo ningún juicio sobre si esos mismos cuerpos difieren en tamaño.

Sin embargo, en inglés hay palabras distintas para explicar si dos cuerpos solo difieren en su forma y no su tamaño (*shape*) y si difieren en ambas variables (*form*). Esta distinción es fundamental en la morfometría geométrica y ha llevado a la discusión de la terminología y su correcta traducción entre los investigadores hispano-parlantes.

En nuestro trabajo el término “conformación” será el equivalente al inglés *shape*. La definición de conformación será la relación entre las partes de una estructura que no se ve modificada por rotaciones, traslaciones, reflexiones o escalas. Consecuentemente “forma” aludirá al término inglés *form* y se referirá a diferencias simultáneas en conformación y tamaño de la estructura.

Existen dos grupos de métodos geométricos de morfometría. El grupo de uso más generalizado son los métodos de referencias anatómicas (*landmarks*). El otro grupo son los métodos de contornos, que cuantifican el borde o las superficies de las estructuras. Métodos de ambas familias fueron utilizados en nuestros estudios por lo que reseñaremos brevemente las características principales de cada uno para luego detallar las aplicaciones concretas en nuestros datos.

Métodos de referencias anatómicas.

Todos estos métodos comienzan con la recolección de las coordenadas en 2 o 3 dimensiones de hitos o referencias (*landmarks*) biológicamente definibles en las estructuras de un organismo como por ejemplo el punto de unión de huesos, o de anastomosis de venas. Sería inapropiado analizar estas variables así dadas porque, además, poseen información sobre la orientación, posición y escala de los especímenes. Toda esta variación que no es conformacional debe ser removida matemáticamente así las variables se vuelven variables conformacionales (*shape variables*) y pueden ser usadas en la comparación de muestras. Los métodos denominados de superposición hacen este trabajo superponiendo las referencias homólogas siguiendo algún criterio específico de optimización. Uno de los métodos más utilizados es el análisis generalizado de Procrustes (*Generalized Procrustes analysis, GPA*) que superpone las configuraciones de referencias utilizando el criterio de cuadrados mínimos para los parámetros de rotación y traslación. Para otros criterios recomendamos consultar la bibliografía especializada (Bookstein 1986, Rohlf & Slice 1990).

Primero, el centroide de cada configuración, el centro geométrico de cada espécimen, se traslada hasta el origen de coordenadas. Entonces, cada configuración se

escala a una unidad común de tamaño. Esto se efectúa dividiendo a cada configuración por el tamaño de su centroide (Bookstein, 1986), el cual se define como la raíz cuadrada de la sumatoria de las distancias de cada referencia al centro de gravedad (centroide) de la configuración (Dryden & Mardia 1998). Luego, a modo de optimización, las configuraciones son rotadas buscando minimizar los cuadrados de las diferencias entre referencias correspondientes (Gower 1975; Rohlf & Slice 1990). Esto permite calcular una conformación media que previo a todo el proceso es inestimable. En ese momento, todas las diferencias conformacionales entre objetos son descriptas por las diferencias de coordenadas de las referencias correspondientes. Alternativamente, se puede utilizar la técnica de “*thin-plate spline*” para describir un espécimen como la deformación de otro, más precisamente de la configuración promedio (Bookstein, 1991). Las diferencias conformacionales expresadas de esta manera son la aplicación matemática de la antigua idea de D’Arcy Thompson (1917) de utilizar grillas de deformación para “torcer” una figura hasta desarrollar la configuración de otra (Figura A1). De esta manera las diferencias de conformación entre los especímenes pasan a ser diferencias en las grillas que poseen parámetros específicos, descriptores de cada tipo de deformación. Estos parámetros se denominan valores de deformaciones parciales (*partial warp scores*) y pueden ser utilizados como variables conformacionales en pruebas estadísticas para comprobar diferencias entre y dentro de las muestras o poblaciones. Una aproximación derivada consiste en aplicar a estas variables un análisis de componentes principales para obtener lo que se denominan deformaciones relativas. La ventaja de estas variables reordenadas es la posibilidad de pesarlas por la escala espacial en la cual ocurren las transformaciones. Esto se hace a través de un parámetro denominado alfa (α) descripto por Rohlf (1993). Por defecto en los estudios se aplica un valor de $\alpha = 0$ dándole así igual peso a todas las deformaciones parciales. Un valor mayor a 0 (por ejemplo 1) dará un énfasis mayor a las deformaciones que incluyen variación conformacional en escalas espaciales grandes, o sea que involucran, por ejemplo a toda la estructura. Por el contrario, valores de alfa negativos pesarán las diferencias a pequeñas escalas o localizadas.

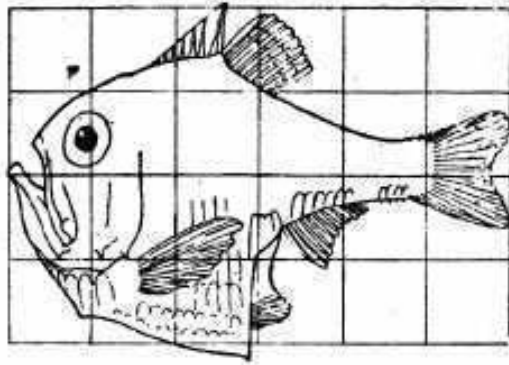


Fig. 517. *Argyropelecus Olfersi*.

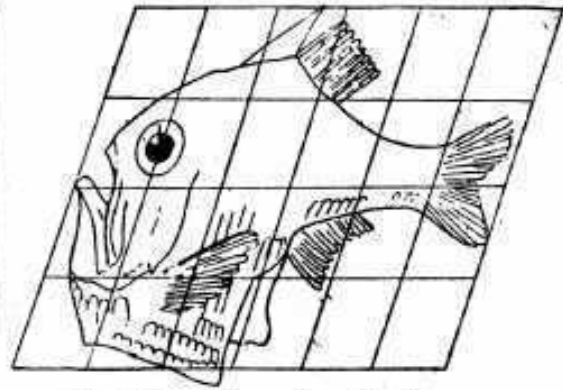


Fig. 518. *Sternoptyx diaphana*.

Figura A1: Láminas extraídas del libro *On Growth and Form* de D'arcy Thompson (1917) que ilustran el uso de grillas que aplicadas en *Argyropelecus* son deformadas llegando a la conformación de *Stenoptyx*.

En la Figura A2 podemos observar una síntesis de los pasos fundamentales de un análisis de morfometría geométrica mediante referencias anatómicas aunque la estructura lógica es compartida también con los estudios de contornos.

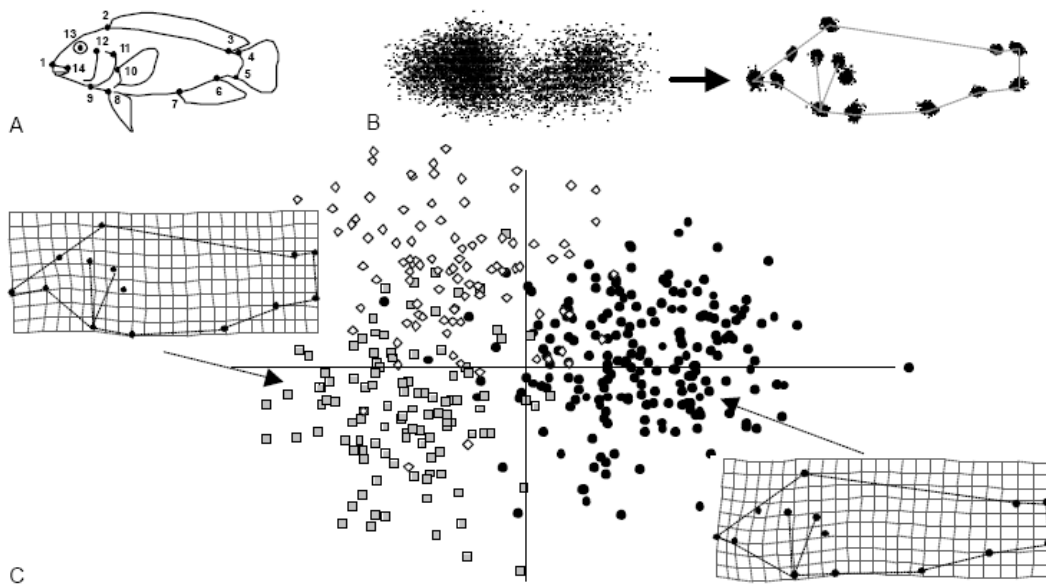


Figura A2: Síntesis gráfica de los pasos básicos de un protocolo de un estudio de morfometría geométrica. **A:** Determinación de las referencias anatómicas. Obtención de los datos crudos. **B:** Remoción de la variación no relacionada con la conformación en el conjunto de datos enteros. Corrección de las diferencias de posición, orientación y rotación (Antes de la superposición). **C:** Análisis estadístico y representación gráfica de los resultados. En este ejemplo un análisis de variables canónicas y la presentación mediante grillas de deformación de las diferencias entre dos especies de cíclidos (Figura modificada de Adams *et al.* 2002)

Concepto de espacio. Los espacios conformacionales y sus relaciones

En estadística se conoce como espacio a la colección de objetos o sus mediciones que son tratados como si fueran puntos en un plano, en la superficie de una esfera o cualquier generalización en mayores dimensiones de estas estructuras intuitivas (Slice *et al.* 2008). Entre los ejemplos de espacios están los euclidianos, los muestrales y un tipo particular que nos incumbe, el espacio conformacional (*shape space*).

Un espacio conformacional es aquel en el que la conformación de distintas figuras se representan con puntos individuales. Las dimensiones del espacio dependerán de si la figura es bi o tridimensional y el número de referencias anatómicas utilizadas. Será de $2p-4$ dimensiones si los datos son coordenadas bidimensionales y será de $3p-7$ dimensiones en el caso de datos tridimensionales siendo p el número de puntos o referencias anatómicas utilizadas.

El espacio conformacional de Kendall es la construcción fundamental que permitió fundar la morfometría moderna. Este espacio provee un marco geométrico para los análisis de las distancias de Procrustes² existentes entre cualquier conjunto arbitrario de referencias anatómicas (Slice *et al.* 2008). Cada punto ubicado en este espacio representa una configuración de puntos (referencias, una conformación) en un espacio Euclidiano³ que no involucra información de tamaño, orientación ni posición. La dispersión de los puntos en el espacio de Kendall corresponde a diferencias en las configuraciones enteras de puntos de referencias y no a dispersiones de referencias anatómicas puntuales. Este espacio es curvo y los puntos se ubican en una esfera multidimensional (hiperesfera). La mayoría de los métodos de morfometría geométrica son linearizaciones de los análisis estadísticos de distancias y direcciones de este espacio subyacente. Si la variación conformacional de la muestra es chica, es decir, los puntos (conformaciones) no están muy dispersas, entonces las distancias Euclidianas del espacio tangente pueden ser utilizado como una buena aproximación a las distancias de Procrustes del espacio de Kendall. Dado que este espacio tangente es lineal, permite la aplicación de métodos estadísticos convencionales para estudiar la variación de conformación (Rohlf 1996, Bookstein 1996). Para validar esta aproximación se analiza la correlación entre las distancias de Procrustes (espacio conformacional) y las Euclidianas (espacio tangencial). En nuestros estudios utilizamos, para este propósito, el

² Las distancias de Procrustes son, aproximadamente (Ver Bookstein 1991 y Slice *et al.* 2008), la raíz cuadrada de la sumatoria del cuadrado de las diferencias posicionales entre las referencias de dos figuras óptimamente superpuestas (y corregidas por tamaño de centroide). Es la distancia que define la métrica del espacio de Kendall.

³ Espacio Euclidiano: Un espacio donde la distancia entre dos puntos está definida por una distancia euclidiana en un sistema de coordenadas. Es la geometría lineal clásica de uso generalizado.

programa tpsSmall (Rohlf, 2003). En todos los casos la correlación fue perfecta ($r = 1$; $p < 0,0001$) por lo que consideramos validada la utilización de esta aproximación incluida en posprogramas morfométricos.

B 1: La técnica de Procrustes aplicada a la morfometría del ala

En este trabajo, la captura geométrica de la conformación del ala se realizó digitalizando, en fotografías de alas disectadas, la posición de 10 referencias anatómicas siguiendo a Debat *et al.* (2003) y utilizando el programa TpsDig 1.38 (Rohlf 2003). Todas las referencias consistieron en puntos de unión de venas o de estas con el borde del ala. Se buscó abarcar todas las zonas del órgano minimizando la cantidad de puntos utilizados (Figura A3):

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

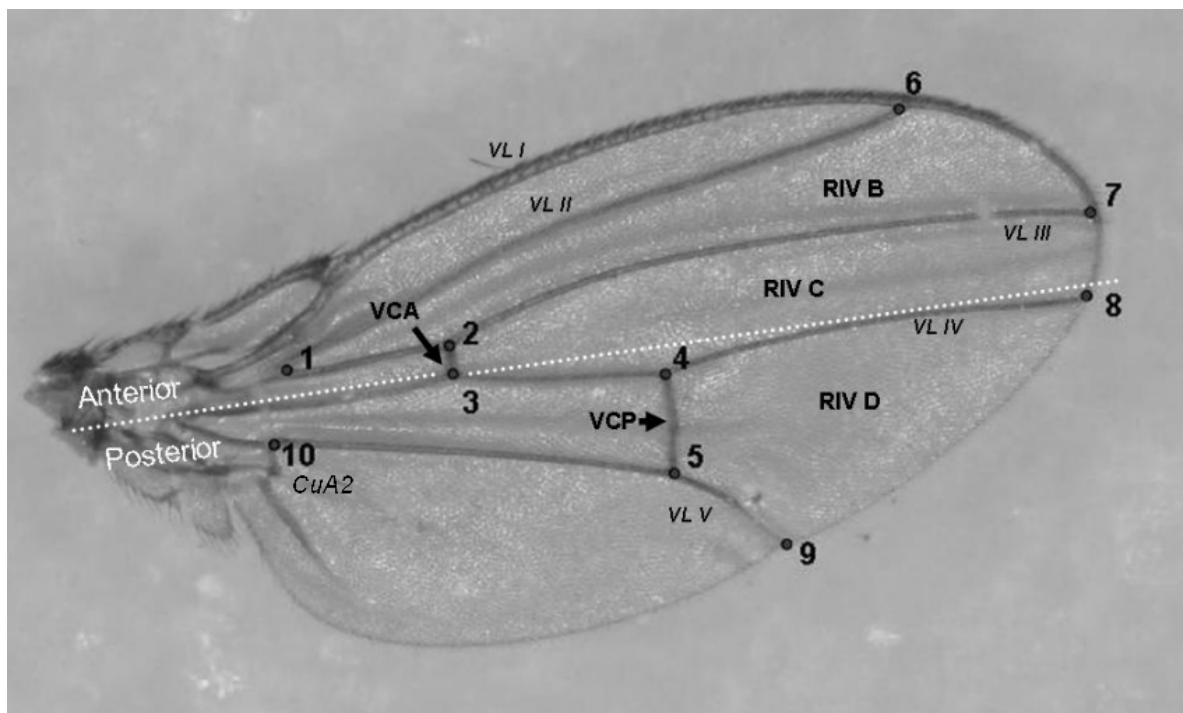


Figura A3: Posicionamiento de las referencias anatómicas del ala. VCA: vena cruzada anterior; VCP: vena cruzada posterior; RIV: región intervenosa; VL: vena longitudinal.

A través de la técnica morfométrica, la forma del ala de cada individuo se desdobra en 2 variables, su tamaño y su conformación. El tamaño de ala del individuo esta estimado por el tamaño de centroide (ver más arriba) que es la variable en las pruebas de análisis de varianza. La variación en conformación como anticipamos se investiga a través de la técnica de Procrustes mediante la superposición de todas las alas y el examen de las diferencias en la posición de las referencias anatómicas. La optimización de las coordenadas computacionales se basa en el método de Procrustes de cuadrados mínimos (Bookstein 1996, Dryden & Mardia 1998). Luego se calculan las deformaciones parciales, estos vectores jerárquicamente escalados según los cambios que abarcan en el espacio morfológico y son complementadas por dos dimensiones de cambio conformacional que se denominan uniformes. Los componentes uniformes de cambio no rompen el paralelismo de las líneas de la grilla (como el caso de la Figura A1) y pueden ser de dos tipos: compresión (*compression*) y cizallamiento (*shearing*). Estos efectos hacen de un rectángulo uno más angosto o un paralelogramo, respectivamente. Con un análisis de componentes principales de las deformaciones parciales y los componentes uniformes reducimos la dimensionalidad de la matriz constituida por estas variables produciendo las denominadas deformaciones relativas (Bookstein, 1991; Rohlf, 1993). Para esto utilizamos el programa TpsRelw (Rohlf, 2003c), variables utilizadas en las pruebas estadísticas de los distintos capítulos.

Covariación de conformaciones basado en una técnica de cuadrados mínimos parciales

En el Capítulo III se estudia la covariación de las conformaciones de dos regiones del ala de *D. buzzatii* y *D. koepferae* (RIV-B y RIV-D). Esto se realizó mediante la comparación de los dos sets de deformaciones parciales por medio de un análisis de cuadrados mínimos incluido en el programa tpsPLS 1.14 (Rohf 2005). La técnica consiste en calcular vectores (combinaciones lineales) para cada grupo de variables conformacionales. Estos vectores seorean (ej.: el primer vector para RIV-B con el primer vector de RIV-D, los segundos entre sí, etc). Lo que se busca es maximizar el grado de covariación del primer par de vectores, principalmente, pero de los dos grupos de vectores en general. Mientras que los vectores del primer par están correlacionados entre sí, el resto no (ej.: el *i*-ésimo vector de RIV-B es independiente del *i*-ésimo vector de RIV-D). Es un método similar a la correlación canónica pero a diferencia de esta, en el de covariación conformacional los vectores no son ortogonales dentro de cada grupo (Bookstein *et al.* 1996, McIntosh *et al.* 1996).

Métodos de contornos

Estos fueron los primeros métodos de morfometría geométrica que se usaron. A diferencia de los métodos de referencias, estos se basan en considerar que el borde entero de una estructura puede ser considerado homólogo entre especímenes. Son especialmente útiles en aquellas partes u órganos que carecen de referencias anatómicas o puntos distinguibles a lo largo de su estructura. Los casos típicos son las hojas pero también son útiles para, en nuestro caso, describir los rebordes del aedeago.

La técnica usual consiste en digitalizar puntos a lo largo del contorno, ajustarlos a una función matemática (que suele consistir en un análisis de Fourier) y luego proceder a comparar los especímenes utilizando los coeficientes de las funciones como las variables conformacionales en pruebas multivariadas (Rohlf 1990).

Los coeficientes de los descriptores elípticos de Fourier (DEF) se calculan con una transformación de Fourier de contornos codificados digitalmente tal como propusieron Kuhl y Giardina (1982). Una síntesis del procedimiento sería: se representa una forma digitalizada como un contorno que consiste en una serie de coordenadas *x* e *y* de puntos ordenados, medidos en sentido antihorario a partir de un punto inicial arbitrario.

Suponiendo que el contorno entre dos puntos puede interpolarse linealmente y que el largo del segmento entre el $(i-1)$ -ésimo y el i -ésimo punto es Δt_i , entonces el largo del contorno desde el punto inicial al p -ésimo punto es

$$\Delta t_p = \sum_{i=1}^p \Delta t_i$$

si el perímetro del contorno es $T = t_k$, donde K es el número total de puntos del contorno. Nótese que el K -ésimo punto es equivalente al punto inicial cerrándose la figura.

La coordenada en el eje x de un punto p es

$$x_p = \sum_{i=1}^p \Delta x_i$$

Donde Δx_i es el desplazamiento a lo largo del eje x del contorno entre el $(i-1)$ -ésimo y el i -ésimo punto. Entonces, la expansión elíptica de Fourier de las secuencias de coordenadas en x es

$$x_p = x_{cen} + \sum_{n=1}^{\infty} \left(a_n \cos \frac{2n\pi t_p}{T} + b_n \sin \frac{2n\pi t_p}{T} \right),$$

Donde:

$$a_n = \frac{T}{2n^2 \pi^2} \sum_{p=1}^K \frac{\Delta x_p}{\Delta t_p} \left(\cos \frac{2n\pi t_p}{T} - \cos \frac{2n\pi t_{p-1}}{T} \right)$$

y

$$b_n = \frac{T}{2n^2 \pi^2} \sum_{p=1}^K \frac{\Delta x_p}{\Delta t_p} \left(\sin \frac{2n\pi t_p}{T} - \sin \frac{2n\pi t_{p-1}}{T} \right)$$

En la ecuación anterior x_{cen} es la coordenada del punto central y n es el número de armónicos de los coeficientes (a_n y b_n). Esto en lo que respecta al eje x, los valores de coeficientes para las coordenadas del eje y se calculan de la misma manera.

Cabe aclarar que los contornos siguen en este punto, conservando la información de tamaño, rotación y traslación. Para permitir la comparación de las diferencias de

conformación únicamente entre especímenes los coeficientes de los DEF son normalizados respecto de su tamaño, centrados en su punto medio y rotados hasta hacer coincidir su punto inicial. Esto se realizó en nuestro caso a través de la elipse del primer armónico aunque existe la alternativa de realizar la normalización utilizando el radio mayor de la figura (ver Kuhl & Giardina 1982 para mayores detalles sobre la normalización)

B2: Uso de descriptores elípticos de Fourier para la cuantificación de la morfología genital masculina en *Drosophila*.

Debido a la complejidad morfológica del órgano intromitente masculino (aedeago), su estudio como un carácter cuantitativo presenta un desafío metodológico. Por ejemplo, si consideramos a *D. buzzatii* y *D. koepferae* son solo distinguibles por la genitalia de los machos. Sin embargo, la naturaleza misma de estas diferencias morfológicas evita el uso de referencias anatómicas puntuales para cuantificar apropiadamente esta divergencia anatómica ya que la posibilidad de determinar estos puntos está restringida y criterios como “punta” o porción de mayor grosor son de un grado de homología muy discutible y que no puede ser asegurada fehacientemente (ver figura 1.7)⁴. Sin embargo, existe la posibilidad de aplicar un método de cuantificación de “contorno” en la medida que uno supone que el borde del órgano en su totalidad puede ser considerado homólogo entre individuos (Adams et al 2004).

El aedeago es un órgano plano y esto facilita una descripción efectiva de su tamaño y forma considerando solamente 2 dimensiones (e.g. considerando la vista lateral). Por este motivo, propusimos la aplicación de descriptores elípticos de Fourier (Kuhl y Giardina 1982) como una solución idónea al problema de la cuantificación de la forma.

Este es un tipo de análisis en el que diferencias en un sistema de coordenadas de valores x e y de un contorno son ajustadas de manera separada para cada eje a funciones de largo de arco utilizando un análisis de Fourier. De esta manera, el contorno es descompuesto en una suma pesada de funciones seno y coseno (armónicos). Este procedimiento genera una función que reproduce el contorno original con un grado de perfección que solo depende del número de armónicos utilizados. En el caso de todas

⁴Sin embargo algunos grupos de investigación han aplicado medidas lineales y *landmarks* a la genitalia con relativo éxito (Silva y Sene, 1991)

las experiencias reportadas en esta tesis se utilizaron funciones de 30 armónicos que son mas que suficientes para reproducir el contorno original de la genitalia masculina (Ver figura A4). Cada armónico involucra la estimación de hasta 4 coeficientes. Por esto, cuando un contorno de relativa complejidad involucra la utilización de 30 armónicos el número de coeficientes elípticos estimados se vuelve grande. Una posibilidad en estos casos es recurrir a un análisis de componentes principales de la matriz de varianza/covarianza de estos coeficientes (Rohlf & Archie 1984) tal cual hemos hecho nosotros. Esto permite evaluar la variación morfológica al mismo tiempo que se reduce el número de variables consideradas ya que estos valores pueden utilizarse subsecuentemente como variables conformacionales en análisis posteriores.

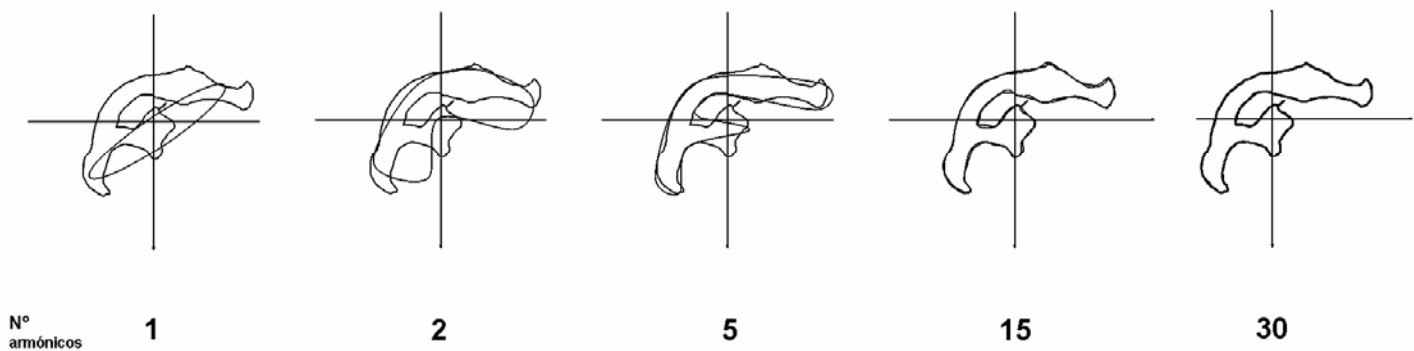


Figura A4: Efecto de utilizar un número creciente de armónicos en la descripción de un contorno. El contorno original de un aedeago de *D. koepferae* se dibujó superpuesto a la reconstrucción de su contorno a partir de funciones de complejidad creciente. Para el caso particular de este órgano una función con 30 armónicos asegura la reproducción fiel de todos los detalles anatómicos (ver texto)

Prueba piloto

Debido a que no existían antecedentes previos de aplicación de esta metodología en la cuantificación de aedeagos, consideramos apropiado efectuar una evaluación previa del método y cuyos resultados presentaremos en esta sección. Esta prueba se realizó utilizando ejemplares de *D. buzzatii* y *D. koepferae*. Asimismo, los detalles de disección del aedeago que comentamos a continuación fue el mismo seguido en las distintas experiencias reportadas en los capítulos.

Se analizaron 15 isolíneas de cada especie. Ellas representaban la cuarta generación en el laboratorio de moscas recolectadas originalmente en la región de Suyuque, provincia de San Luis, Argentina.

Las moscas fueron criadas en medio semi natural de *Opuntia sulphurea* preparado con piezas de cactus licuado. El cactus verde fue volcado en tubos de vidrio (6 gramos por tubo) e inoculados con 0,1 ml. de jugo fermentado de *Opuntia* recogido en la naturaleza. Las larvas de cada línea fueron sembradas en su primer estadio en 4 réplicas a una densidad de 30 individuos por tubo. Toda la experiencia se realizó a 25 +/- 1°C y bajo un régimen de luz-oscuridad de 12:12 horas.

Los adultos emergidos fueron recolectados simultáneamente de todas las líneas. De cada réplica se tomaron entre 2 y 5 machos y se les extrajo el aedeago bajo lupa y utilizando agujas entomológicas. Estas estructuras fueron calentadas en una solución de 10 % KOH a “baño maría” durante 15 minutos con el fin de remover tejidos grasos y restos de musculatura. Luego se montaron en portaobjetos con medio de montaje. Los preparados fueron fotografiados con una cámara digital montada en un microscopio con un aumento de 100x. Se obtuvieron de esta manera 647 aedeagos, 302 de *D. buzzatii* y 345 de *D. koepferae*.

Las funciones descriptoras de los contornos se obtuvieron con el paquete de programas SHAPE (Iwata & Ukai 2002) que son de dominio público y están disponibles por Internet⁵. Con este programa también se obtiene el tamaño de los aedeagos y se puede realizar el análisis de Componentes Principales de los coeficientes. El tamaño es calculado a partir del área de la imagen del órgano y si bien el dato inicial está en pixeles, este puede ser transformado a unidades de área si se le provee al programa con una imagen de área conocida a manera de escala. Para asegurar la independencia de la forma con respecto al tamaño, todas las siluetas fueron reescaladas hasta poseer una unidad de área. También se utilizó el eje mayor de la silueta como criterio de estandarización del punto de inicio de la cuantificación del contorno.

La repetibilidad del proceso se calculó con 30 aedeagos de cada especie. Los mismos fueron fotografiados y sus contornos fueron digitalizados tres veces por la misma persona. La repetibilidad se calculó con el coeficiente de correlación intra-clase (Lessels & Boag 1987). Para poner a prueba las diferencias en el cálculo de tamaño y forma de los distintos eventos de digitalización utilizamos ANOVAs de un factor con los valores de las variables calculadas anidadas dentro de los individuos como réplicas. Para evaluar el grado de distinción entre muestras (especies) que puede ser obtenido por el método se realizó un análisis de funciones discriminantes. Especie fue la variable de

⁵ <http://cse.naro.affrc.go.jp/iwatah/shape>.

agrupamiento con 2 niveles (*D. buzzatii* y *D. koepferae*) y los valores de los Componentes Principales como variables independientes. El tamaño de la genitalia fue incluido en un segundo examen. Las probabilidades de asignación *a priori* a cada grupo fueron consideradas iguales, esto es independientes de los tamaños muestrales de cada grupo.

Resultados y discusión

Todos los coeficientes de repetibilidad calculados fueron significativos y altos. Para el tamaño del órgano *Drosophila buzzatii* presentó valores de repetibilidad de 0,87 y *D. koepferae* de 0.92 ($p < 0.0001$ en ambos casos).

En el caso de la conformación, el PCA estableció 12 ejes principales que explicaron una proporción de la variabilidad morfológica mayor a $1/(N^{\circ}$ de Componentes analizados). El resto de los componentes comprenden en su conjunto el 7 % de la variación total. Los coeficientes de repetibilidad fueron calculados para cada una de estas variables. Sus valores van de 0,79 a 0,95 en *D. buzzatii* y de 0,83 a 0,96 en *D. koepferae* ($p < 0.005$ en todos los casos).

El análisis discriminante separó a las especies consistentemente. Los factores reclasificaron correctamente al 100 % de los individuos independientemente de la inclusión del tamaño genital como variable informativa adicional.

Por todo esto, pudimos comprobar que la técnica de descriptores elípticos de Fourier es aplicable para la cuantificación de los aedeagos ya que preserva la información morfológica sin necesidad de tener que recurrir a la determinación de referencias anatómicas (*landmarks*) o a la medición de distancias entre partes de la estructura. A los componentes principales derivados del método se les puede utilizar como variables conformacionales en subsiguientes pruebas estadísticas sin mayores dificultades.

- Los resultados informados y discutidos en este trabajo han contribuido a las siguientes publicaciones:

Wing morphology and fluctuating asymmetry are dependent of the host plant in cactophilic *Drosophila*. 2008

Soto IM, VP Carreira, E Soto and E Hasson. *Journal of Evolutionary Biology*. (21)598-609

Wing morphology is related to host plants in cactophilic *Drosophila gouveai* and *D. antonietae* (Diptera, Drosophilidae). 2008

Soto IM., Hasson E and MH Manfrin. *Biological Journal of the Linnean Society*. *En prensa*

Host-dependent phenotypic plasticity of male genital morphology in cactophilic *Drosophila*. 2008

Soto IM, MH Manfrin and E Hasson. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. *En prensa*

Host-related life history traits in interspecific hybrids of cactophilic *Drosophila*. 2008

Soto EM, Soto IM, Carreira VP, Fanara JJ and ER Hasson. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 126(1): 18-27

Evolution of male genitalia: environmental and genetic factors affecting genital morphology in sibling *Drosophila* species and their hybrids. 2007

Soto IM, Carreira VP, Fanara JJ and E Hasson. *BMC Evolutionary Biology* 7: 77

Viability and developmental time in the cactophilic *Drosophila gouveai* and *D. antonietae* (Diptera: Drosophilidae) are dependent of the cactus host. 2007

Soto, IM., Manfrin MH, Sene F and E Hasson. *Annals of the Entomological Society of America* 4:490-496.

A study of wing morphology and fluctuating asymmetry of interspecific hybrids between *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae*. 2007

Carreira V, Soto IM, Fanara JJ and E Hasson. *Genetica*

Patterns of variation in wing morphology in the cactophilic *Drosophila buzzatii* and its sibling *D. koepferae* 2006

Carreira V, Soto IM, Fanara JJ and E. Hasson. *Journal of Evolutionary Biology* 9 (4): 1275-1282. .

Use of elliptic Fourier descriptors for quantification of male genitalia morphology 2005.

Soto IM. *Drosophila Information Service* 88:42-45

Y contribuyeron a enriquecer las siguientes tesis de licenciatura (FCEN-UBA):

Arquitectura genética de las diferencias fenotípicas entre las especies *Drosophila buzzatii* y *D. koepferae*. 2004 Valeria P. Carreira

Componentes ecológicos y genéticos de la variación en caracteres de historia de vida en *Drosophila buzzatii*, *D. koepferae* y sus híbridos 2005. Eduardo M. Soto

Bibliografia

A

- Adams DC, Rohlf FJ & DE Slice. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology* 71: 5–16
- Ackermann RG & JM Cheverud. 2002. Discerning evolutionary processes in patterns of tamarin (genus *Saguinus*) craniofacial variation. *American Journal of Physical Anthropology* 117: 260–271
- Alibert P & JC Auffray. 2003. Genomic coadaptation, outbreeding depression, and developmental stability. En: Polak M ed. *Developmental Instability: Causes and Consequences*. Pp. 116–134. Oxford University Press, Oxford
- Andersson M. 1994. *Sexual selection*. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ.
- Andrade CAC, Hatadania LM & LB Klaczko. 2005. Phenotypic plasticity of the aedeagus of *Drosophila mediopunctata*: Effect of the temperature. *Journal Thermal Biology* 30: 518–523
- Anholt RR, Dilda C, Chang S, Fanara JJ, Kulkarni N *et al.* 2003. The genetics architecture of odor-guided behaviour in *Drosophila melanogaster*: epistasis and the transcriptome. *Nature Genetics* 35: 180-184.
- Arnold SJ. 1983. Morphology, performance and fitness. *American zoology* 23: 347-361.
- Arnold ML. 1997. *Natural Hybridation and Evolution*. Oxford University Press, New York, NY, USA.
- Arnqvist G. 1997a. The evolution of animal genitalia: distinguishing between hypotheses by single species studies. *Biological. Journal of the Linnean. Society.* 60: 365-379.
- Arnqvist, G. 1997b. The evolution of water strider mating systems: causes and consequences of sexual conflicts, pp 146-163 En. Choe JC & BJ Crespi (Eds.), *The Evolution of Mating Systems in Insects and Arachnids*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Arnqvist G 1998. Comparative evidence for the evolution of genitalia by sexual selection. *Nature* 393: 784–786.
- Arnqvist G & L Rowe. 1995 Sexual conflict and arms races between the sexes: a morphological adaptation for control of mating in a female insect. *Proceedings of the Royal Society of London (B)* 261:123-127.
- Arnqvist G & R Thornhill. 1998. Evolution of animal genitalia: Patterns of phenotypic and genotypic variation and condition-dependence of genital and non-genital morphology in a

water strider (Heteroptera: Gerridae). *Genetical Research* 71:193-212.

Ashburner M. 1989. *Drosophila: A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Ashburner M. 2004. *Drosophila: A Laboratory Handbook*, Vol. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Auffray JC, Alibert P, Renaud S, Orth A. & F. Bonhomme. 1996. Fluctuating asymmetry in *Mus musculus* subspecific hybridization. Pp. 275-283 En Marcus LF, ed. *Advances in morphometrics*. Plenum Press, New York.

Awmack CS & SR Leather. 2002. Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annual Review of Entomology* 47: 817-844

Ayala FJ & M Coluzzi. 2005. Chromosome speciation: Humans, *Drosophila*, and mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 6535-6542

B

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

Baimai V, Sene FM & MAQR. Pereira. 1983. Heterochromatin and karyotypic differentiation of some Neotropical cactus-breeding species of the *Drosophila repleta* species group. *Genetica* 60: 81-92.

Barker JSF & WT Starmer. 1982. *Ecological Genetics and Evolution: The*

Cactus-Yeast-Drosophila Model System. Academic Press, New York.

Barker JSF, Starmer WT & RJ MacIntyre. 1990. *Ecological and Evolutionary Genetics of Drosophila*. Plenum Press, New York.

Barker JSF, Starmer WT & JC Fogleman. 1994. Genotype specific habitat selection for oviposition sites in the cactophilic species *Drosophila buzzatii*. *Heredity* 72: 384-395.

Barton NH 2001. The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology* 10: 551-568.

Barton NH & M Turelli. 1989. Evolutionary quantitative genetics: how little do we know? *Annual Review of Genetics* 23: 337-370.

Baylis M & NE Pierce. 1991. The effect of host-plant quality on the survival of larvae and oviposition by adults of an ant-tended lycaenid butterfly, *Jalmenus evagoras*. *Ecological Entomology* 16: 1-9

Berstein S & R Berstein. 2002. Allometry of male genitalia in a species of soldier beetle: support for the one-size-fits-all hypothesis. *Evolution* 56: 1707-1710

Bertin A & D J Fairbain. 2005. One tool, many uses: precopulatory sexual selection on genital morphology in *Aquarius remigis*. *Journal of Evolutionary Biology* 18 : 949-961.

Betran E, Santos M & A Ruiz. 1998. Antagonistic pleiotropy effect of second chromosome inversions on body size and early life-history traits in *Drosophila buzzatii*. *Evolution* 52: 144-154.

- Birkhead TR & FM Hunter. 1990. Mechanisms of sperm competition. *Trends in Ecology & Evolution* 5: 48-52.
- Birdsall K, Zimmerman E, Teeter K & Gibson G. 2000. Genetic variation for the positioning of wing veins in *Drosophila melanogaster*. *Evolution & Development*. 2: 16–24.
- Bitner-Mathé BC & LB Klaczko. 1999a. Heritability, phenotypic and genetic correlations of size and shape of *Drosophila mediopunctata* wings. *Heredity* 83: 688–696.
- Bitner-Mathé BC & LB Klaczko. 1999b. Size and shape heritability in natural populations of *Drosophila mediopunctata*: temporal and microgeographical variation. *Genetica* 105: 35–42.
- Bizzo NMV. 1983. Estudos sobre a biologia e isolamento reprodutivo em *Drosophila serido*. Master Thesis. Depto. Genética, Instituto Biociências, USP, São Paulo, Brazil.
- Bizzo NMV & FM Sene. 1982. Studies on the Natural populations of *Drosophila* from Peruipe, SP, Brazil. *Revista. brasileira. de biología.* 42: 539–544.
- Bond JE, Beamer DA, Hedin MC & P Sierwald. 2003. Gradual evolution of male genitalia in a sibling species complex of millipedes. *Invertebrate Systematics*, 17: 711–717.
- Bookstein FL 1986. Size and shape spaces for landmark data in two dimensions. *Statistical Science*. 1:181-222.
- Bookstein FL. 1991. Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bookstein FL. 1996. Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis. *Bulletin of mathematical biology* 58: 313-365.
- Bundgaard J & JSF Barker. 2000. Remating, sperm transfer, and sperm displacement in the cactophilic species *Drosophila buzzatii* Patterson & Wheeler (Diptera: Drosophilidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 71: 145– 164.
- Burke JM & ML Arnold. 2001. Genetics and the fitness of hybrids. *Annual Review of Genetics* 35: 31-52.
- C**
- Campbell G & A Tomlinson. 1998. The roles of the homeobox genes *aristales* and *Distal-less* in patterning the legs and wings of *Drosophila*. *Development* 125: 4483-4493.
- Cannon WB. 1932. The wisdom of the body. Norton, New York.
- Carreira VP, Soto IM, Fanara JJ & E Hasson. 2006. Patterns of variation in wing morphology in the cactophilic *Drosophila buzzatii* and its sibling *D. koepferae*. *Journal of Evolutionary Biology*. 9: 1275-1282
- Carrol SB, Weatherbee SD & JA Langeland. 1995. Homeotic genes and the regulation and

evolution of insect wing number. *Nature* 375: 58–61.

Carson, HL. 1971. The ecology of *Drosophila* breeding sites. University of Hawaii, Harold L Lyon Arboretum Lecture Number 2, 1–28.

Cavalcanti MJ. 2005. Mantel for Windows. Test for association between two symmetric distance matrices with permutations iterations. Version 1.18 <http://maurobio.infobio.net>

Cavicchi S, Guerra D, Giorgi G & C. Pezzoli. 1985. Temperature-related divergence in experimental populations of *Drosophila melanogaster*. I. Genetic and developmental basis of wing size and shape variation. *Genetics* 109: 665–689.

Cheverud JM. 1982. Phenotypic, genetic and environmental morphological integration in the cranium. *Evolution* 36: 499–516.

Cheverud JM. 1988. A comparison of genetic and phenotypic correlations. *Evolution* 42:958–968.

Cheverud JM. 1996. Quantitative genetic analysis of cranial morphology in the cotton-top (*Saguinus oedipus*) and saddle-back (*S. fuscicollis*) tamarins. *Journal of Evolutionary Biology* 9: 5–42.

Chippindale AK, Gibson JR & WR Rice 2001 Negative genetic correlation for adult fitness between sexes reveals ontogenetic conflict in *Drosophila* *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 1671-1675

Clayton GA & A Robertson. 1955. Mutation and quantitative variation. *American Naturalist* 89:151–158.

Congdon BC, Piatt JF, Martin K & VL Friesen. 2000. Mechanisms of population differentiation in marbled murrelets: historic vs. contemporary processes. *Evolution*, **54**, 974–986.

Conner JK & DL Hartl. 2004. A Primer of Ecological Genetics. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.

Cortese M, Norry FM, Piccinali R & E Hasson. 2002. Direct and correlated responses to selection on wing length and developmental time in *Drosophila buzzatii*. *Evolution* 56: 2541–2547.

Couso JP, Bishop SA & A Martinez Arias. 1994. The wingless signalling pathway and the patterning of the wing margin in *Drosophila*. *Development* 120: 621-636.

Coyne JA. 1983 Genetic basis of differences in genital morphology among three sibling species of *Drosophila*. *Evolution* 37: 1101-1118.

Coyne JA. & HA Orr 2004. Speciation. Sinauer, Sunderland, MA.

Crespi B J. 2000. The evolution of maladaptation. *Heredity*. 84:623–629.

D

Darwin C. 1859. The origin of species by means of natural selection, or the preservation of

favoured races in the struggle for life. Modern Library, New York.

Dambroski HR, Linn C, Berlocher S, Forbes AA, Roelofs W & JL Feder. 2005. The genetic basis for fruit odor discrimination in Rhagoletis flies and its significance for sympatric host shifts. *Evolution* 59: 1953-1964.

David J. 1962. A new medium for rearing *Drosophila* in axenic conditions. *Drosophila Information Service* 36:128.

David JR, Moreteau B, Gauthier JP, Pétavy G, Stockel A & AG Imasheva. 1994. Reaction norms of size characters in relation to growth temperature in *Drosophila melanogaster*: an isofemale lines analysis. *Genetics, selection, evolution.* 26 229–251.

David JR, Gibert P, Pétavy G & B Moreteau. 2002. Variable modes of inheritance of morphometrical traits in hybrids between *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Proceedings of the Royal Society of London (B)* 269: 127-135.

David JR, Gibert P, Legout H, Petavy G, Capy P & B Moreteau. 2005. Isofemale lines in *Drosophila*: an empirical approach to quantitative trait analysis in natural populations. *Heredity* 94: 3–12.

Debat V, Alibert P, David P, Paradis E & JC Auffray. 2000. Independence between developmental stability and canalization in the skull of the house mouse: *Proceedings of the Royal Society of London. (B)* 267: 423–430.

Debat V, Bégin M, Legout H & David JR. 2003. Allometric and non allometric components of

Drosophila wing shape respond differently to developmental temperature. *Evolution* 57: 2773-2784.

DeBrito RA, Manfrin MH & FM Sene 2002. Nested cladistic analysis of Brazilian populations of *Drosophila serido*. *Molecular phylogenetics and evolution.* 22: 131–143.

De Celis JF. 2003. Pattern formation in the *Drosophila* wing: the development of the veins. *Bioessays.* 25: 443–451.

Dhondt AA, Adriaensen F, Matthysen E. & B Kempenaers. 1990. Nonadaptive clutch size in tits. *Nature* 348: 723–725.

Dryden I L & KV Mardia. 1998. Statistical Shape Analysis. Wiley, Chichester.

Dufour L. 1844. Anatomie générale des Diptères. *Annuaire de Science Naturelle* 1: 244–264.

Dujardin JP & D Slice. 2007. Geometric morphometrics: Contributions to Medical Entomology. En: Encyclopedia of Infectious Diseases – Modern Methods (M. Tibayrenc, ed) Pp: 435–445. John Wiley and Sons.

Durando CM, Baker RH, Etges WJ, Heed WB, Wasserman M. & R DeSalle. 2000. Phylogenetic analysis of the *repleta* species group of the genus *Drosophila* using multiple sources of characters. *Molecular phylogenetics and evolution.* 16, 296–307.

E

- Eberhard WG. 1985. Sexual selection and animal genitalia: Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.
- Eberhard WG. 1990. Animal genitalia and female choice. *American Scientist* 78: 134–141.
- Eberhard WG. 1993. Evaluating models of sexual selection: genitalia as a test case: *American Naturalist*. 142: 564–571
- Eberhard WG. 1996. Female control: sexual selection by cryptic female choice: Princeton Univ. Press, Princeton, NJ
- Eberhard WG. 1998. Female roles in sperm competition. En Birkhead TR & AP Miller eds., Sperm Competition and Sexual Selection pp. 91–118, Academic Press
- Eberhard WG, Huber BA & RL Rodriguez. 1999. Don't forget the biology: a reply to Green. *Evolution*. 53: 1624–1627
- Endler JA. 1977. Geographic variation, speciation and clines. Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Etges WJ. 1990. Direction of life-history evolution in *Drosophila mojavensis*. Pp. 37–56 En J. S. F. Barker, W. T. Starmer, and R. J. MacIntyre, eds. Ecological and evolutionary genetics of *Drosophila*. Plenum Press, New York.
- Etges WJ. 1993. Genetics of Host-Cactus Response and Life-History Evolution among Ancestral and Derived Populations of Cactophilic *Drosophila mojavensis*. *Evolution* 47: 750-767
- Etges WJ, Veenstra CL & LL Jackson. 2006. Premating isolation is determined by larval rearing substrates in cactophilic *Drosophila mojavensis*. VII. Effects of larval dietary fatty acids on adult epicuticular hydrocarbons. *Journal of Chemical Ecology* 32: 2629-2646.
- Etges WJ, Cardoso C, Gragg E, Ortíz-Barrientos D, Noor MAF, Ritchie MG. 2007. Genetics of incipient speciation in *Drosophila mojavensis*. I. male courtship song, mating success, and genotype x environment interactions. *Evolution* 61: 1106–1119
- F**
- Falconer DS. 1990. Selection in different environments: effects on environmental sensitivity (reaction norm) and on mean performance. *Genetical Research* 56: 57–70.
- Fanara JJ, Hasson E, Rodríguez C & J Vilardi.. 1995. Influences of chromosome two arrangements on viability and developmental time of *Drosophila buzzatii*. *Brazilian Journal of Genetics* 18: 17–21.
- Fanara JJ, Hasson E, Rodriguez C, Santos M & A Fontdevila.. 1996. Are *Opuntia* hosts a selective factor for the inversion polymorphism? *Heredity* 77: 500–508.

- Fanara JJ & E Hasson. 2001. Oviposition acceptance and fecundity schedule in the cactophilic sibling species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae* on their natural hosts. *Evolution* 55: 2615-2619.
- Fanara JJ, Fontdevila A & E. Hasson. 1999. Oviposition preference, viability, developmental time and body size in the cactophilic sibling species *Drosophila koepferae* and *D. buzzatii* in association to their natural hosts. *Evolutionary Ecology* 13: 173–190.
- Fanara JJ, Mensch J, Folguera G & E Hasson. 2004. Developmental time and thorax length differences between the cactophilic species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae* reared in different natural hosts. *Evolutionary Ecology* 18: 203-214.
- Fanara JJ, Folguera G, Fernández Iriarte P, Mensch J & E Hasson. 2006. Genotype by environment interactions in viability and developmental time in populations of cactophilic *Drosophila*. *Journal of Evolutionary Biology* 19: 900-903
- Felsenstein J. 1988. Phylogenies and quantitative characters. *Annual Review of Ecology and Systematics* 19: 445–471.
- Ferguson M. 1986. Developmental stability of rainbow trout hybrids: genomic coadaptation or heterozygosity? *Evolution* 40: 323-330.
- Fernández Iriarte P & E Hasson. 2000. The role of the use of different host plants in the maintenance of the inversion polymorphism in the cactophilic *Drosophila buzzatii*. *Evolution*. 54: 1295–1302.
- Ferris GF. 1950. External morphology of the adult. En Demerec M & BP Kaufmann, eds., *Drosophila* Guide: Introduction to the Genetics and Cytology of *Drosophila melanogaster*. Pp. 368–419. Carnegie Institution of Washington, Washington, DC.
- Ferson S, Rohlf FJ & RK Koehn 1985. Measuring shape variation of two-dimensional outlines. *Systematic Zoology* 34: 59-68
- Fisher RA. 1930. The genetical theory of natural selection. Clarendon, Oxford.
- Floate KD & Fox AS. 2000. Flies under stress: a test of fluctuating asymmetry as a biomonitor of environmental quality. *Ecological Applications* 10: 1541–1550
- Fogleman JC. 1982. The role of volatiles in the ecology of cactophilic *Drosophila*. En Barker JSF & WT Starmer (eds.), *Ecological genetics and evolution: The cactus-yeast-Drosophila* model system. Pp. 191–206. Academic Press, Australia.
- Fogleman JC & JR Abril. 1990. Ecological and evolutionary importance of host plant chemistry. En Barker JSF, Starmer WT & R. MacIntyre eds. *Ecological and Evolutionary Genetics of Drosophila*. Pp. 121-143. Plenum Press, New York.
- Fontdevila A, Pla C, Hasson E, Wasserman, M, Sanchez A, Naveira H & A Ruiz. 1988. *Drosophila koepferae*: a new member of the *Drosophila serido* (Diptera-Drosophilidae) super-species taxon. *Annals of the Entomological Society of America* 81: 380-385.

Franco FF, Soto IM, Sene FM & MH Manfrin 2008 Phenotypic variation of male external genitalia of *Drosophila serido* species (*D. repleta* group, *D. buzzatii* cluster). *Neotropical Entomology* En consideracion

G

Garcia-Bellido A, Ripio P & G. Morata. 1973. Developmental compartmentalization of the wing disk of *Drosophila*. *Nature*. 245:251–253.

Gibson G. 1999. Insect evolution: redesigning the fruitfly. *Current Biology* 9: 86–89

Gilchrist AS & L. Partridge. 1999. A comparison of the genetic basis of wing size divergence in three parallel body size clines of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 153: 1775-1787

Gilchrist AS & L. Partridge. 2001. The contrasting genetic architecture of wing size and shape in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 86: 144-152.

Gilchrist GW, Huey RB, Balanyà J, Pascual M & L Serra. 2004. A time series of evolution in action: A latitudinal cline in wing size in south american *Drosophila suboscuro*. *Evolution*. 58: 768–780

Gockel J, Robinson SJW, Kennington WJ, Goldstein DB & L Partridge. 2002. Quantitative genetic analysis of natural variation in body size in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 89: 145-153

Godoy-Herrera R, Burnet B & K Connolly. 2005. Hybrid disadvantage in the larval foraging behaviour of the two neotropical species of *Drosophila pavani* and *Drosophila gaucha*. *Genetica* 124: 33-40.

Gómez GA & E Hasson. 2003. Transpecific polymorphisms in an inversion linked esterase locus in *Drosophila buzzatii*. *Molecular Biology and Evolution*. 20: 410-423

Gomulkiewicz R & M. Kirkpatrick. 1992. Quantitative genetics and the evolution of reaction norms. *Evolution* 46: 390–411.

Gould SJ & RC Lewontin. 1979. The spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme. *Proceedings of the Royal Society of London (B)* 205: 581-98

Gower J C. 1975. Generalized Procrustes analysis. *Psychometrika*. 40:33–51.

Graham JH. 1992. Genomic coadaptation and developmental stability in hybrid zones. *Acta Zoologica Fennica* 191: 121–131

Graham JH., Freeman DC, JM Emlen. 1993a Antisymmetry, directional asymmetry, and dynamic morphogenesis. *Genetica* 89: 121–137.

Graham JH, Roe KE & TB West.1993b. Effects of lead and benzene on the developmental stability of *Drosophila melanogaster*. *Ecotoxicology* 2: 185–195.

Graham JH, Emlen JM, Freeman DC, Leamy LJ & JA Kieser. 1998. Directional asymmetry and

the measurement of developmental instability.
Biological Journal Linnean Society 64: 1–16

Gavrilets S & SM Scheiner. 1993. The genetics of phenotypic plasticity. 5. Evolution of reaction norm shape. *Journal of Evolutionary Biology* 6: 31–48.

Green AJ. 1999, Allometry of genitalia in insects and spiders: one size does not fit all: *Evolution*. 53 1621–1624

Grimaldi DA. 1990. A phylogenetic, revised classification of genera in the Drosophilidae (Diptera). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 197: 1–139.

Guerra D, Pezzoli MC, Giorgi G, Garoia F & S Cavicchi. 1997. Developmental constraints in the *Drosophila* wing. *Heredity* 79: 564–571

Gurganus MC, Fry JD, Nuzhdin SV, Pasyukova EG, Lyman RF & TCF Mackay. 1998. Genotype-environment interaction for quantitative trait loci affecting sensory bristle number in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 149:1883-1898.

H

Harbison S, Yamamoto A, Fanara JJ & TCF Mackay TF. 2004. Quantitative trait loci affecting starvation resistance in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 166: 1807-1823.

Hartl DL, AG Clark. 1987 Principles of population genetics Sinauer Associates, Sunderland, Mass

Hasson E. 1988. "Ecogenética evolutiva de *D. buzzatii* y *D. koepferae* (genero *Drosophila*; grupo *repleta*) en las zonas áridas y semiáridas de la Argentina". Tesis Doctoral. FCEN-UBA

Hasson ER, Vilardi J, Naviera H, Fanara JJ, Rodriguez C, Reig OA & A Fontdevila. 1991. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XVI. Fitness components analysis in a natural population from Argentina. *Journal of Evolutionary Biology* 4: 209-225.

Hasson E, Fanara JJ, Rodríguez C, Vilardi JC, Reig OA. & A Fontdevila.1992. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXIV: Second chromosome inversions have different average effect on thorax length. *Heredity* 68: 557–563.

Hasson E, Fanara JJ, Rodriguez C, Vilardi J, Reig OA & A Fontdevila. 1993. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXVII. Thorax length is positively correlated with longevity in a natural population from Argentina. *Genetica* 92: 61–65.

Hasson E, Rodríguez C, Fanara JJ, Naveira H, Reig AO & A Fontdevila. 1995. Macrogeographic patterns in the inversion polymorphisms of *Drosophila buzzatii* in New World populations. *Journal of Evolutionary Biology* 8: 369–384

Hawthorne DJ & S Via. 2001. Genetic linkage of ecological specialization and reproductive isolation in pea aphids. *Nature* 412: 904-907.

- Hedrick P, Jain S & L Holden. 1978. Multilocus systems in Evolution. *Evolutionary Biology* 11: 101-184.
- Hedrick P. 2000. Genetics of Populations, 2nd edn. Jones and Bartlett Publishers, London. UK.
- Heed WB. 1982. The origin of *Drosophila* in the Sonoran Desert. *Ecological Genetics and Evolution: The Cactus– Yeast–Drosophila Model System* (eds Barker JSF & WT Starmer). Pp. 65–80. Academic Press, Sydney.
- Heed WB & RL Mangan. 1986. Community ecology of Sonoran Desert *Drosophila*, pp. 311-345. En Ashburner M, Carson H & JN Thompson eds. The genetics and biology of *Drosophila*. Academic, San Diego, CA.
- Hendry AP, Day T & EB Taylor. 2001. Population mixing and the adaptive divergence of quantitative traits in discrete populations: a theoretical framework for empirical tests. *Evolution* 55: 459–466.
- Hendry AP, Taylor EB & JD McPhail. 2002. Adaptive divergence and the balance between selection and gene flow: lake and stream stickleback in the Misty system. *Evolution* 56: 1199–1216.
- Hey J & RM Kliman. 1993. Population genetics and phylogenetics of DNA sequence variation at multiple loci within the *Drosophila melanogaster* species complex. *Molecular Biology and Evolution* 10: 804-822
- Hennig W. 1965. Die Acalptprate des Baltischen Bernsteins. *Stuttg. Beitr. Naturkd.* 145.
- Hoffmann AA & J Shirrifs. 2002. Geographic variation for wing shape in *Drosophila serrata*. *Evolution* 56: 1068–1073.
- Hosken DJ & P Stockley. 2004. Sexual selection and genital evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 87–93.
- House CM & LW Simmons. 2003. Genital morphology and fertilization success in the dung beetle *Onthophagus taurus*: an example of sexually selected male genitalia. *Proceedings of the Royal Society of London (B)* 270: 447– 455.
- Hribar LJ. 1996. Larval rearing temperature affects morphology of *Anopheles albimanus* (Diptera:Culicidae) male genitalia. *Journal of the American Mosquito Control Association* 12: 295–297
- I**
- Iwata H & Y Ukai 2002 SHAPE: A Computer Program Package for Quantitative Evaluation of Biological Shapes Based on Elliptic Fourier Descriptors. *Journal of Heredity* 93: 384-385.
- J**
- Jaenike J. 1990. Host specialization by phytophagous insects. *Annual review of ecology and systematics* 21: 243–273.
- Jaenike J & RD Holt. 1991. Genetic variation for habitat preference: Evidence and explanations. *American Naturalist* 137: 567–590

Jagadeeshan S & RS Singh. 2006. A time-sequence functional analysis of mating behaviour and genital coupling in *Drosophila*: role of cryptic female choice and male sex-drive in the evolution of male genitalia. *Journal of Evolutionary Biology* 19: 1058–1070

Jaureguy LM & WJ Etges WJ. 2007. Assessing patterns of senescence in *Drosophila mojavensis* reared on different host cacti. *Evolutionary ecology research* 9: 91-107

Jones CD. 1998. The Genetic Basis of *Drosophila sechellia*'s Resistance to a Host Plant Toxin. *Genetics* 149: 1899-1908

Jones CD. 2004. Genetics of egg production in *Drosophila sechellia*. *Heredity* 92: 235–241

Jones AG, Arnold SJ & Bürger R. 2003. Stability of the G-Matrix in a population experiencing pleiotropic mutation, stabilizing selection, and genetic drift. *Evolution* 57: 1747–1760

Joshi A & JN Thompson. 1995. Trade-offs and evolution of host specialization. *Evolutionary Ecology* 9: 82–92.

Joshi A & JN Thompson. 1997. Adaptation and Specialization in a Two-Resource Environment in *Drosophila* Species *Evolution* 51: 846-855

K

King RB & R Lawson. 1995. Color-pattern variation in Lake Erie water snakes: the role of gene flow. *Evolution* 49: 885–896.

Kircher HW. 1982. Chemical composition of cacti and its relationship to Sonoran desert *Drosophila*. En, Barker JSF & WT Starmer WT eds., *Ecological Genetics and Evolution*. Pp.143-158. Academic Press, Sydney, Australia.

Klingenberg CP. 2002. Developmental instability as a research tool: using patterns of fluctuating asymmetry to infer the developmental origins of morphological integration. En Polak M. ed. *Developmental instability: causes and consequences*. Pp. 427–442 Oxford Univ. Press, New York.

Klingenberg CP & S McIntyre. 1998. Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution* 52: 1363-1375.

Klingenberg CP & SD Zaklan. 2000. Morphological integration between development compartments in the *Drosophila* wing. *Evolution* 54: 1273-1285.

Klingenberg CP, McIntyre GS & SD Zaklan. 1998. Left-right asymmetry of fly wings and the evolution of body axes. *Proceedings of the Royal Society of London (B)* 265: 1255-1259

Klingenberg CP, Barluenga M & A Meyer. 2002. Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* 56: 1909-1920.

Kobayashi T. 1998. Seasonal changes in body size and male genital structures of *Procladius choreus* (Diptera: Chironomidae: Tanypodinae). *Aquatic Insects* 20: 165–172

Koots KR & JP Gibson. 1996. Realized sampling variances of estimates of genetic parameters and the difference between genetic and phenotypic correlations. *Genetics* 143: 1409–1416.

Krebs RA & SF Barker. 1991. Coexistence of ecologically similar colonizing species. Intra and interspecific competition in *Drosophila aldrichi* and *D. buzzatii*. *Australian Journal of Zoology* 39: 579–593.

Krzeminski W & E Krzeminska. 2003. Triassic Diptera: descriptions, revisions and phylogenetic relations. *Acta Zoologica Cracoviensia*, 46(suppl.-Fossil Insects): 153–184.

Kuhl FP & CR Giardina. 1982. Elliptic Fourier features of a closed contour. *Computer Graphics and Image Processing*. 18: 236–258.

L

Lamb T & JC Avise. 1987. Morphological variability in genetically defined categories of anuran hybrids. *Evolution* 41: 157–165.

Lande R. 1979. Quantitative genetic analysis of multivariate evolution, applied to brain/ body size allometry. *Evolution* 33: 402–416.

Lande R. 1980. The genetic covariance between characters maintained by pleiotropic mutations. *Genetics* 94: 203–215.

Lande R. & SJ Arnold. 1983. The measurement of selection on correlated characters. *Evolution* 37: 1210–1226.

Lawrence PA. 1992. The making of a fly: the genetics of animal design. Blackwell Scientific, Oxford.

Lawrence PA & G Morata. 1976. The compartment hypothesis. *Symposium of the Royal Entomological Society of London* 8:132–149.

Leamy L. 1984. Morphometric studies in inbred and hybrid house mice. V. Directional and fluctuating asymmetry. *American Naturalist* 123: 579–593

Leamy LJ, Doster MJ & YM Huet-Hudson. 1999. Effects of methoxychlor on directional and fluctuating asymmetry of mandible characters in mice. *Ecotoxicology* 8: 63–71

Lemeunier F. & M Ashburner. 1976. Relationships within the melanogaster species subgroup of the genus *Drosophila* II. Phylogenetic relationships between six species based upon polytene chromosome banding sequences. *Proceedings of the Royal Society of London Series (B)* 193: 275–294

Lenormand T. 2002. Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology and Evolution* 17:183–189

Lerner IM. 1954. Genetic Homeostasis. Oliver and Boyd, Edinburgh.

- Lessels CM & PT Boag. 1987. Unrepeatable repeatabilities: a common mistake. *Auk* 13: 116–121.
- Lestrel PE. 1997. Fourier Descriptors and Their Applications in Biology. Cambridge University Press. UK.
- Lindroth RL & Peterson SS. 1988. Effects of plant phenols on performance of southern armyworm larvae. *Oecologia* 75: 185- 189
- Liu J, Mercer JM, Stam LF, Gibson GC, Zeng ZB & CC Laurie. 1996. Genetic analysis of a morphological shape difference in the male genitalia of *Drosophila simulans* and *D. mauritiana*. *Genetics* 142: 1129-1145
- Lloyd JE. 1979. Mating behavior and natural selection. *Florida Entomologist* 62: 17-34.
- Lofsvold D. 1988. Quantitative genetics of morphological differentiation in *Peromyscus*. II. Analysis of selection and drift. *Evolution* 42: 54–67.
- Lu G & L Bernatchez. 1999. Correlated trophic specialization and genetic divergence in sympatric lake whitefish ecotypes (*Coregonus clupeaformis*): support for the ecological speciation hypothesis. *Evolution*. 53: 1491–1505
- Lynch M. & B Walsh. 1998. Genetics and Analysis of Quantitative Traits. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Machado LPB, Madi-Ravazzi L & WJ Tadei. 2006 Reproductive relationships and degree of synapsis in the olytene chromosomes of the *Drosophila buzzatii* species cluster. *Brazilian Journal of Biology* 66: 279-293
- Mackay TFC. 2004. The genetic architecture of quantitative traits: lessons from *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14: 253-257.
- Maggenti AR. & S Gardner. 2005. Online Dictionary of Invertebrate Zoology: Complete Work University of Nebraska - Lincoln. <http://digitalcommons.unl.edu/onlinedictinvertezoology/2>
- Manfrin MH, DeBrito ROA & FM Sene, 2001. Systematics and evolution of *Drosophila buzzatii* cluster using mtDNA. *Annals of the Entomological Society of America* 94: 333– 346.
- Manfrin MH & FM Sene. 2006. Cactophilic *Drosophila* in South America: A Model for Evolutionary Studies. *Genetica* 126: 57 – 75
- Marin I. & A Fontdevila. 1998. Stable *Drosophila buzzatii*- *Drosophila koepferae* hybrids. *Journal of Heredity* 89: 336–339.
- Marin I, Ruiz A, Pla C & A Fontdevila. 1993. Reproductive relationships among ten species of the *Drosophila repleta* group from South America from the West Indies. *Evolution* 47: 1616-1624.
- Markow TA & JP Ricker. 1991. Developmental stability in hybrids between the sibling species

M

- pair, *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Genetica* 84: 115-121.
- Markow TA & JP Ricker 1992. Male size, developmental stability, and mating success in natural populations of three *Drosophila* species. *Heredity* 69: 122-127.
- Markow TA & S Sawka. 1992. Dynamics of male mating success in experimental groups of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Insect Behaviour* 5: 375-383.
- Marroig G, de Vivo M & JM. Cheverud. 2004. Cranial evolution in sakis (*Pithecia*, Platyrrhini) II: evolutionary processes and morphological integration. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 144-155.
- Mayr E. Animal species and evolution. 1963. Harvard University Press Cambridge, MA, USA.
- McAlpine JF. 1981. Morphology and terminology - adults. En McAlpine JF, Peterson BV, Shewell GE, Teskey HJ, Vockeroth JR & DM Wood. Manual of Nearctic Diptera. 1: 9-63. *Research Branch, Agriculture Canada Monograph* 1-674.
- McBride CS. 2007. Rapid evolution of smell and taste receptor genes during host specialization in *Drosophila sechellia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 12: 4996-5001.
- McIntosh AR, Bookstein F, Haxby J & C Grady. 1996. Multivariate analysis of functional brain images using partial least squares. *NeuroImage* 3:143-157.
- McKenzie JA. & GM Clarke. 1988. Diazinon resistance, fluctuating asymmetry and fitness in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Genetics* 120: 213-220.
- Mitter C & DJ Futuyma. 1983. An evolutionary-genetic view of host-plant utilization by insects. En Denno RF & MS McClure, eds. Variable plants and herbivores in natural and managed systems. Pp. 427-459 Academic Press, New York.
- Mody K, Unsicker SB & KE Linsenmair. 2007. Fitness related diet-mixing by intraspecific host-plant-switching of specialist insect herbivores. *Ecology* 88: 1012-1020
- Møller AP & JP Swaddle. 1997. Asymmetry, developmental stability, and evolution. Oxford University Press, Oxford.
- Moraes EM & FM. Sene. 2002. Breeding structure of an isolated cactophilic *Drosophila* population on a sandstone table hill. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 40: 123-128.
- Moraes EM, Abreu AG, Andrade SCS, Sene FM & VN Solferini. 2005. Population Genetic Structure of Two Columnar Cacti with a Patchy Distribution in Eastern Brazil *Genetica* 125: 311- 323
- Moraes EM, Spressola VL, Prado PRR, Costa LF & FM Sene. 2004. Divergence in wing morphology among sibling species of the *Drosophila buzzatii* cluster. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 42: 154-158.

Morales AC, Manfrin MH & FM Sene. 2004. Entendendo as relações evolutivas de duas espécies do “cluster” *buzzatii*: *Drosophila serido* e *Drosophila antonietae*, através de filogeografia e análise isoenzimática. In: Sociedade Brasileira de Genética. Anais do 50º Congresso Nacional de Genética, Florianópolis-SC. p.400. CD-ROM.

Moreteau B, Imasheva AG, Morin JP & JR David. 1998. Wing shape and developmental temperature in two *Drosophila* sibling species: different wing regions exhibit different norms of reaction. *Genetika* 34: 248–258.

Morin JP, Moreteau B, Pétavy G & JR David. 1999. Divergence of reaction norms of size characters between tropical and temperate populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Journal of Evolutionary Biology* 12: 329–339.

Morris DW. 1999. Has the ghost of competition passed? *Evolutionary Ecology Research* 1: 3-20.

N

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

Noor MA & JL Feder. 2006. Speciation genetics: evolving approaches. *Nature Reviews Genetics* 7: 851-861.

Noor MAF, Grams KL, Bertucci LA & J Reiland. 2001. Chromosomal inversions and the

reproductive isolation of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 98:12084-12088

Norry FM, Vilardi JC, Fanara JJ & E Hasson. 1995. Courtship success and multivariate analysis of sexual selection on morphometric traits in *Drosophila buzzatii* (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Insect Behaviour* 8: 219–229

Norry FM, Vilardi JC & E Hasson. 1998. Sexual selection related to developmental stability in *Drosophila buzzatii*. *Hereditas* 128: 115-119.

O

O’Grady PM, Baker RH, Durando CM Etges WJ & R DeSalle. 2001. Polytene chromosomes as indicators of phylogeny in several species groups of *Drosophila*. *BMC Evolutionary Biology* 1, 6

Otte D & JA Endler. 1989. Speciation and its consequences. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts

P

Palmer AR. 1994. Fluctuating asymmetry analyses: a primer. En Markow TA, ed. *Developmental instability: its origins and evolutionary implications*. Pp. 335-364 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Palmer AR & C Strobeck. 1986. Fluctuating asymmetry: measurements, analysis, patterns.

- Annual review of ecology and systematics* 17: 391-421.
- Palmer AR & C Strobeck. 1992. Fluctuating assymetry as a measure of developmental stability: implications of non-normal distributions and power of statistical tests. *Acta Zoologica Fennica* 191: 57-72.
- Pascual M, Serra L & J Ayala. 1998. Interspecific laboratory competition of the recently sympatric species *Drosophila subobscura* and *Drosophila pseudobscura*. *Evolution* 52: 269-274.
- Partridge L & K Fowler. 1993 Responses and correlated responses to artificial selection on thorax length in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 47: 213-226
- Patterson JT & WS Stone. 1952. Evolution in the genus *Drosophila*. Macmillan, New York
- Pezzoli MC, Guerra D, Georgi G, Garoia F & S Cavicchi. 1997. Developmental constraints and wing shape variation in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 79: 527-572.
- Piccinali R, Aguadé M & E Hasson. 2004. Comparative Molecular Population Genetics of the *Xdh* Locus in the Cactophilic Sibling Species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae*. *Molecular Biology and Evolution* 21: 141-152.
- Piccinali R, Mascord LJ, Barker JSF, Oakeshott JG & E Hasson. 2007. Molecular population genetics of the α -Esterase 5 gene locus in original al colonized populations of *Drosophila buzzatii* and its sibling *Drosophila koepferae*. *Journal of Molecular Evolution* 64: 158-170
- Pimm SL, Rosenzweig ML & W Mitchell. 1985. Competition and food selection: field test of a theory. *Ecology* 66: 798-807.
- Polack M. ed 2003. Developmental instability: causes and consequences. Oxford Univ. Press, New York.
- Powell JR. 1997. Progress and prospects in evolutionary biology: the *Drosophila* model. Oxford Univ. Press, New York.
- Pomiankowski A.& AP Möller. 1995 A resolution of the lek paradox. *Proceedings of the Royal Society of London (B)* 260: 21-29.
- Preziosi RF & DA Roff. 1998, Evidence of genetic isolation between sexually monomorphic and sexually dimorphic traits in the water strider *Aquarius remigis*: *Heredity* 81: 92-99
- Price GR. 1970. Selection and covariance. *Nature* 227: 520-521
- R**
- Rausher MD. 1982. Population differentiation in *Euphydryas editha* butterflies: larval adaptation to different hosts. *Evolution* 36:581-590.
- Rego C, Matos M & M Santos. 2006. Symmetry breaking in interspecific *Drosophila* hybrids is not due to developmental noise. *Evolution* 60: 746-761

- Reusch T & WU Blackenhorn. 1998. Quantitative genetics of the dung fly *Sepsis cynipsea*: Cheverud's conjecture revisited *Heredity* 81: 111-119
- Rice WR. 1996. Sexual antagonistic male adaptation triggered by experimental arrest of female evolution. *Nature* 381 232-234
- Riechert SE. 1993. Investigation of potential gene flow limitation of behavioral adaptation in an aridlands spider. *Behavioral ecology and sociobiology* 32: 355-363.
- Riechert SE, Singer FD & TC Jones. 2001. High gene flow levels lead to gamete wastage in a desert spider system. *Genetica*. 112: 297-319
- Riechert SE & RF Hall. 2000. Local population success in heterogeneous habitats: reciprocal transplant experiments completed on a desert spider. *Journal of Evolutionary Biology* 13: 541-550
- Rieseberg LH. 2001 Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 351-358.
- Robertson FW. 1954. Studies in quantitative inheritance. V. Chromosome analysis of crosses between selected and unselected lines of different body size in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Genetics* 52: 494-520
- Robertson FW. 1957. Studies in quantitative genetics. XI. Genetic and environmental correlation between body size and egg production in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Genetics* 55: 428-443.
- Robertson FW. 1959. Studies in quantitative inheritance. XII. Cell size and number in relation to genetic and environmental variation of body size in *Drosophila*. *Genetics* 44: 869-896.
- Rodríguez C, Fanara JJ & E. Hasson. 1999. Inversion polymorphism, longevity and body size in a natural population of *Drosophila buzzatii*. *Evolution* 53: 612-620.
- Roff D. 1977 Dispersal in Diptera: its costs and consequences. *Journal of Animal Ecology* 46: 443-456.
- Roff DA. 1995. The estimation of genetic correlations from phenotypic correlations: a test of Cheverud's conjecture. *Heredity* 74: 481-490.
- Roff DA. 1996. The evolution of genetic correlations: an analysis of patterns. *Evolution* 50: 1392-1403.
- Roff DA. 1997. Evolutionary quantitative genetics. Chapman & Hall, New York.
- Rohlf F J. 1990. Fitting curves to outlines. Proceedings of the Michigan morphometrics workshop. En Rohlf FJ & FL Bookstein eds., Proceedings of the Michigan morphometrics workshop. Pp. 167-177
- Rohlf FJ. 1993. Relative warp analysis and an example of its application to mosquito wings. En Marcus LF, Bello E & A Garcia-Valdecasas, eds. Contributions to morphometrics. Pp 131-159 Monografías, Museo Nacional de Ciencias Naturales. Madrid.

- Roff DA. 1996. The evolution of genetic correlations: an analysis of patterns. *Evolution* 50: 1392–1403.
- Rohlf FJ. 2003. TpsDig versión 1.38 <http://morph.bio.sunysb.edu/morph/index.html>. Department of Ecology and Evolution, State University of New York.
- Rohlf FJ. 2003. TpsSmall version 1.20 <http://morph.bio.sunysb.edu/morph/index.html>. Department of Ecology and Evolution, State University of New York.
- Rohlf FJ. 2003. TpsRelw versión 1.31. <http://morph.bio.sunysb.edu/morph/index.html>. Department of Ecology and Evolution, State University of New York.
- Rohlf FJ. 2005. TpsPLS versión 1.14. <http://morph.bio.sunysb.edu/morph/index.html>. Department of Ecology and Evolution, State University of New York.
- Rohlf FJ & JW Archie. 1984. A comparison of Fourier methods for the description of wing shape in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Systematic Biology* 33:302–317
- Rohlf FJ & D Slice. 1990. Extensions of the procrustes method for the superimposition of landmarks. *Systematic Zoology* 39: 40-59
- Rohlf FJ & Marcus LF. 1993. A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution* 8: 129-132.
- Ross KG & L Keller. 1995. Joint influence of gene flow and selection on a reproductively important genetic polymorphism in the fire ant *Solenopsis invicta*. *American Naturalist* 146: 325–348.
- Ross KG & JL Robertson. 1990. Developmental stability, heterozygosity, and fitness in two introduced fire ants (*Solenopsis invicta* and *S. richteri*) and their hybrids. *Heredity* 64: 93-104.
- Ruiz A & A Fontdevila. 1985. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. VI. Adaptive chromosomal changes in experimental populations with natural substrates. *Genetica* 66: 63–71.
- Ruiz A & WB Heed. 1988 Host-Plant Specificity in the Cactophilic *Drosophila mulleri* Species Complex. *The Journal of Animal Ecology* 57: 237-249
- Ruiz A & M Wasserman. 1993. Evolutionary cytogenetics of the *Drosophila buzzatii* species complex. *Heredity* 70: 582-596.
- Ruiz, A, Fontdevila A & M Wasserman. 1982. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. III: Cytogenetic relationship between two sibling species of the *buzzatii* cluster. *Genetics* 101: 503–518.
- Ruiz A, Naveira H & A Fontdevila. 1984. La historia evolutiva de *Drosophila buzzatii*. IV. Aspectos citogenéticos de su polimorfismo cromosómico. *Genética Ibérica* 36: 13–35.
- Ruiz A, Fontdevila A, Santos M, Seoane M & E Torroja. 1986. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. VIII. Evidence for endocyclic selection acting on the inversion polymorphism in a natural population. *Evolution* 40: 740–755.

Ruiz A., Cansian AM, Kuhn GCS, Alves MAR & FM Sene. 2000. The *Drosophila serido* speciation puzzle: putting new pieces together. *Genetica* 108: 217–227.

S

Saint-Laurent R, Legault M & L Bernatchez. 2003. Divergent selection maintains adaptive differentiation despite high gene flow between sympatric rainbow smelt ecotypes. *Molecular Ecology* 12: 315–330.

Sandoval CP. 1994. The effects of relative geographic scales of gene flow and selection on morph frequencies in the walking stick *Timema cristinae*. *Evolution* 48: 1866–1879

Santos M, Ruiz A, Barbadilla A, Quezada-Díaz JE, Hasson E & A Fontdevila. 1988. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XIV. Larger flies mate more often in nature. *Heredity* 61: 255-262.

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

Santos M. 2001. Fluctuating asymmetry is nongenetically related to mating success in *Drosophila buzzatii*. *Evolution* 55: 2248-2256.

Santos, M 2002. Genetics of wing size asymmetry in *Drosophila buzzatii*. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 720-734.

Sasabe M, Takami Y, Sota T. 2007. The genetic basis of interspecific differences in genital morphology of closely related carabid beetles. *Heredity* 98: 385-391.

Schilthuizen M. 2000. Dualism and conflicts in understanding speciation. *BioEssays* 22: 1134-1141.

Schlichting C & Pigliucci M. 1998. Phenotypic Evolution: A Reaction Norm Perspective. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Schmidt-Nielsen K. 1984. Scaling: Why is Animal Size so Important? Cambridge Univ. Press, Cambridge.

Schluter D. 1998. Ecological causes of speciation. En Howard DJ & SH Berlocher eds. Endless forms: species and speciation. Pp. 114–129. Oxford Univ. Press, Oxford, U.K

Schluter D. 2000. The ecology of adaptive radiation. Oxford Univ. Press, Oxford, U.K.

Sene FM, Pereira MAQR & CR Vilela. 1982. Evolutionary aspects of cactus breeding *Drosophila* Species in South America. En Barker JSF & WT Starmer eds. Ecological Genetics and Evolution. Pp. 97–106. Academic Press, Sydney, Australia.

Sene, F.M., M.A.Q.R. Pereira & C.R. Vilela, 1988. Contrasting patterns of differentiation inferred from traditional genetic markers in the process of speciation. *Pacific Science* 42(1– 2): 81–88.

- Sevenster SM & van Alphen JM. 1993. A life history trade off in *Drosophila* species and community structure in variable environments. *Journal of Animal Ecology* 62: 720-736.
- Sgro CM & A. Hoffmann. 2004. A Genetic correlations, tradeoffs and environmental variation. *Heredity* 93: 241-248
- Shapiro AM & AH Porter. 1989. The Lock-and-Key Hypothesis: Evolutionary and Biosystematic Interpretation of Insect Genitalia. *Annual Review of Entomology* 34: 231-245
- Shingleton AW, Frankino WA, Flatt T, Nijhout HF & DJ Emlen. 2007 Size and shape: the developmental regulation of static allometry in insects. *Bioessays* 29: 536-48.
- Silva AFG & FM Sene. 1991. Morphological geographic variability in *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Revista brasileira de Entomologia*. 35: 455-468.
- Slice D, Bookstein FL, Marcus LF & FJ Rohlf. 2008. A Glossary for Geometric Morphometrics.
<http://life.bio.sunysb.edu/morph/glossary/gloss1.html>
- Smith RL. 1984. Sperm competition and the evolution of animal mating systems. Academic Press, Orlando.
- Slatkin M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*. 236: 787-792.
- Smith TB, Wayne RK, Girman DJ & MW Bruford. 1997. A role for ecotones in generating rainforest biodiversity. *Science* 276: 1855-1857
- Sokal RR & FJ Rohlf. 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 3rd edition. W. H. Freeman and Co.: New York.
- Stalker HD. 1980. Chromosome studies in wild populations of *Drosophila melanogaster*. II. Relationship of the inversion frequencies to latitude, wing loading and flight activity. *Genetics* 95: 211-223.
- Starmer WT, Lachance M, Phaff HJ & WB Heed. 1990. The biogeography of yeast associated with decaying cactus tissue in North America, the Caribbean, and Northern Venezuela. *Evolutionary Biology* 24: 115-190.
- StatSoft. 2001. Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 6.0 www.statsoft.com
- Stearns SC, de Jong G & B Newman. 1991. The effect of phenotypic plasticity on genetic correlations. *Trends in Ecology & Evolution* 6: 122-126
- Stern DL & DJ Emlen DJ. 1999. The developmental basis for allometry in insects. *Development* 126: 1091-1101.
- Storfer A & A Sih. 1998. Gene flow and ineffective antipredator behavior in a stream-breeding salamander. *Evolution* 52: 558-565.
- Storfer A, Cross J, Rush R & J Caruso. 1999. Adaptive coloration and gene flow as a constraint to local adaptation in the streamside

salamander, *Ambystoma barbouri* *Evolution*. 53: 889–898

Sturtevant AH. 1942. The classification of the genus *Drosophila* with the description of nine new species. *University of Texas Publications* 4213, 5–51.

T

Telles MPC & JAF Diniz-Filho. 2005. Multiple Mantel tests and isolation-by-distance, taking into account long-term historical divergence *Genetics and Molecular Research* 4: 742-748

Thomas RH & JSF Barker. 1993. Quantitative genetic analysis of the body size and shape of *Drosophila buzzatii*. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 598–608.

Thompson DW. 1917. On Growth and Form. pp 1062. Cambridge University Press, London

Throckmorton LH. 1975. The phylogeny, ecology, and geography of *Drosophila*. En: King RC ed. *Handbook of Genetics*. 3: 421–469. Plenum, New York.

Throckmorton LH. 1982. The *virilis* species group. En Ashburner M, Thmopson JN & HL Carson, eds. *The Genetics and Biology of Drosophila*. Academic Press, New York.

Tidon-Sklorz R & FM Sene. 1995a. *Drosophila seriema*: a new member of the *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae) superspecies

taxon. *Annals of the Entomological Society of America* 88: 139–142.

Tidon-Sklorz R & FM Sene. 1995b. Evolution of the *buzzatii* cluster (*Drosophila repleta* species group) in the Northeastern South America. *Evolutionary Biology* 9: 71–85.

Tidon-Sklorz R & FM Sene 2001. Two New Species of the *Drosophila serido* Sibling Set (Diptera, Drosophilidae). *Iheringia (Série Zoología)* 90: 141–146.

Tosi D & FM Sene. 1989. Further studies on chromosomal variability in *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Revista brasileira de Genética* 1: 729–746

Turelli M. 1988. Phenotypic evolution, constant covariances and the maintenance of additive variance. *Evolution* 43: 1342–1347

U

Ungerer MC, Halldorsdottir SS, Purugganan MD & TFC Mackay. 2003. Genotype-environment interactions at quantitative trait loci affecting inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 165: 353–365.

V

Van Tienderen PH. 1997. Generalists, specialists, and the evolution of phenotypic plasticity in sympatric populations of distinct species *Evolution* 51: 1372-1380

Van Valen L. 1962. A study of fluctuating assymetry. *Evolution* 16: 125-142.

Via S. 1990. Ecological genetics and host adaptation in herbivorous insects: The experimental study of evolution in natural and agricultural systems. *Annual Review of Entomology* 35: 421-446

Via S. 2001. Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. *Trends in Ecology & Evolution* 16: 381-390

Via S & R Lande. 1987. Evolution of genetics variation in a spatially heterogeneous environment. *Genetical Research* 49: 147-156

Via S, Gomulkiewicz R, De Jong G, Scheiner SM, Schlichting CD & PH Van Tienderen. 1995. Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversies. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 212-217

Vilela CR. 1983. A revision of the *Drosophila repleta* species group (Diptera, Drosophilidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 1-114

Vilela CR & FM Sene. 1977. Two new neotropical species of the *repleta* group of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Papeis Avulsos Zool.* 30: 295-299.

Vilela CR, Pereira MAQR & FM Sene. 1983. Preliminary data on the geographical distribution of *Drosophila* species within morphoclimatic domains of Brazil II. The *repleta* group. *Ciencia e Cultura* 35: 66-70.

Villano JL & FN Katz. 1995. Four-jointed is required for intermediate growth in the proximal-distal axis in *Drosophila*. *Development* 121: 2767-2777

W

Wasserman M. 1982. Evolution of the *repleta* Group. En Ashburner M, Carson HL & JN Thompson eds. *The Genetics and Biology of Drosophila*. London, Academic. 3b: 61-139.

Wasserman M. 1992. Cytological evolution of the *Drosophila repleta* species group. En CB Krimbas & JR Powell eds. *Drosophila Inversion Polymorphism*. Pp. 455-552. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Weber KE. 1990. Selection on wing allometry in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 126: 975-989.

Weber KE. 1992. How small are the smallest selectable domains of form? *Genetics* 130 345-353.

Weber K, Eisman R, Higgins S, Morey L, Patty A, Tausek M & Zeng ZB. 2001. An analysis of polygenes affecting wing shape on chromosome 2 in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 159: 1045-1057

Wheeler, M. R. 1982. Drosophilidae: a taxonomic overview. Ashburner M, Thompson JN & HL Carson eds. En *The genetics and biology of Drosophila* 3b: 1-105. Academic Press, New York.

Wiens JA. 1976. Population Responses to Patchy Environments. *Annual Review of Ecology and Systematics* 7: 81-120

Williams JA, Paddock SW & SB Carroll. 1993. Pattern formation in a secondary field: a hierarchy of regulatory genes subdivides the developing *Drosophila* wing disc into discrete subregions. *Development* 117: 571-584.

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

Wright,S. 1969. Evolution and the genetics of populations. The theory of gene frequencies. University Academic Press.

Z

Zakharov VM. 1992. Population phenogenetics: analysis of developmental stability in natural populations. *Acta Zoologica Fennica* 191: 7-30.

Zapi DC. 1994. *Pilosocereus* (Cactaceae): the genus in Brazil. En Hunt D & N Taylor eds. Royal Botanic Gardens, Kewin Pp. 160. David Hunt, England.

Zeng Z, Liu J, Stam LF, Kao C, Mercer JM & CC Laurie. 2000. Genetic architecture of a morphological shape difference between two *Drosophila* species. *Genetics* 154: 299-310.

Zimmerman E., Palsson A. & G Gibson. 2000. Quantitative trait loci affecting components of wing shape in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 155: 671-683.

Zwaan BJ, Bijlsma R & RF Hoekstra. 1995. Direct selection on life span in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 49: 649-659.