

Tesis Doctoral

Evolución de la arquitectura genética del comportamiento olfativo en *Drosophila*

Lavagnino, Nicolás José

2011

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:

Lavagnino, Nicolás José. (2011). Evolución de la arquitectura genética del comportamiento olfativo en *Drosophila*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Lavagnino, Nicolás José. "Evolución de la arquitectura genética del comportamiento olfativo en *Drosophila*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

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 de la arquitectura genética del comportamiento olfativo en *Drosophila*.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos

Aires en el área Ciencias Biológicas.

Nicolás José Lavagnino

Director de tesis: Dr. Juan José Fanara.

Consejero de Estudios: Dr. Esteban R. Hasson.

Buenos Aires, 2011

Evolución de la arquitectura genética del comportamiento olfativo en *Drosophila*.

Resumen

Comprender la arquitectura genética de caracteres ecológicamente relevantes requiere de la contribución de diversas disciplinas dentro de la biología, ya que es necesario conocer numerosos factores involucrados en la expresión de la misma. Por otro lado, es también una oportunidad de poner a prueba hipótesis sobre la evolución de los organismos. Por la tanto, este tipo de análisis debe realizarse en un marco multidisciplinario y el organismo modelo *Drosophila melanogaster* es ideal para tal propósito. En el presente trabajo se han estudiado diferentes aspectos de la arquitectura genética del comportamiento olfativo en *D. melanogaster*. En particular, a) se identificaron genes candidatos a participar en el comportamiento olfativo larval, de los cuales algunos son exclusivos de larva y otros también participan en la arquitectura genética del olfato adulto; b) se describieron las propiedades de variación de la arquitectura genética del carácter en larvas y moscas adultas derivadas de poblaciones naturales de Argentina; c) basándose en resultados obtenidos en diferentes niveles de análisis se demostró que la interacción genotipo por ambiente es una parte importante de la arquitectura genética del comportamiento olfativo larval y adulto; d) se encontró que las diferencias en la arquitectura genética del olfato entre estadios del ciclo de vida repercute en que en que la canalización y la presencia de variabilidad genética crítica son más importantes en adulto que en larva y e) se analizaron las fuerzas evolutivas que actúan sobre los genes olfativos en 6 especies pertenecientes al grupo de especie *D. melanogaster*, lo que permitió determinar que la selección purificadora es el proceso que afecta a las tasas de sustituciones nucleotídicas en la mayoría de los genes olfativos y por el contrario la selección positiva tiene poca incidencia, también que las tasas de evolución de los genes olfativos dependen de la posición que ocupan en el sistema olfativo en la mayoría de las especies analizadas.

Palabras claves: arquitectura genética - comportamiento olfativo - *Drosophila melanogaster* – evolución – ontogenia.

Evolution of olfactory behavior genetic architecture in *Drosophila*.

Abstract

Understanding the genetic architecture of ecologically relevant phenotypic traits requires the contribution of several disciplines within biology, because numerous factors involved in its expression must be analysed. In addition, it is also an opportunity to test hypotheses regarding organisms' evolution. Therefore, this kind of analysis must be done in a multidisciplinary fashion and using a model organism as *Drosophila melanogaster* is pertinent for this purpose. In the present thesis, we analyzed different aspects of the genetic architecture of olfactory behavior in *D. melanogaster*. Particularly, a) we identified candidate genes to participate in *D. melanogaster* larval olfactory behavior, some of which are larva exclusive and others participate also in adult olfaction; b) variational properties of olfactory behavior genetic architecture were described, both for larva and adult wild-derived flies from natural populations of Argentina; c) based on results from different levels of analysis it was demonstrated that genotype by environment interaction is an important aspect of olfactory behavior genetic architecture in larva and adult; d) it was found that differences in olfactory behavior genetic architecture between life cycle stages has an impact on canalization and cryptic genetic variability being more important in adult than in larva; and e) evolutionary forces acting on olfactory genes were analysed for 6 species belonging to the *D. melanogaster* species group, which allowed to determine that purifying selection is the process affecting most genes and instead positive selection has a limited incidence; also in most species analyzed a relationship between evolutionary rates and the position that the gene products occupy in the olfactory system was found. In conclusion, our results point out that the genetic architecture of olfactory behavior is complex, changes along ontogenetic stages and it's influenced by the environment.

Key words: genetic architecture – olfactory behavior – *Drosophila melanogaster* – evolution – ontogeny.

Agradecimientos

Al Dr. Juan José Fanara, director de esta Tesis, por darme la oportunidad de realizarla y mostrar una constante disponibilidad para el trabajo, brindar su ayuda y consejos; y por estar siempre atento a mis consultas.

Al Dr. Esteban Hasson, quien también me abrió las puertas del Laboratorio de Evolución y siempre estuvo dispuesto a dar su opinión sobre este proyecto. Su ayuda en la escritura de parte de la tesis fue muy importante.

A los compañeros, pasados y presentes, del Laboratorio de Evolución. He aprendido y crecido mucho con (y gracias) a todos ustedes, sobre todo en lo que más importa: el aspecto humano.

A Francois Serra, Leonardo Arbiza y Hernán Dopazo por recibirme para trabajar con ellos en lo que luego sería parte de esta tesis. Fue una experiencia muy gratificante a varios niveles.

A todos/as con quienes comparto diferentes actividades fuera de la ciencia y hacen que la vida tenga un poco más de sustancia. Nos veremos allí en el camino y seguiremos hacia donde sea que vamos.

A los amigos/as.

A mi familia.

A Ceci...“En la página de nosotros mismos/ tu cuerpo escribe”.

Índice

	Página
Sección I. Introducción General.	
1.1. Intenciones y esquema general de la tesis.....	1
1.2. ¿Qué es la arquitectura genética de un carácter fenotípico y cómo se la estudia?.....	3
1.3. Caracteres fenotípicos cuantitativos y evolución de la arquitectura genética.....	3
1.4. <i>Drosophila melanogaster</i> y especies cercanamente emparentadas como organismos modelos.....	6
1.5. Descripción del carácter de estudio: el comportamiento olfativo en <i>Drosophila</i>	8
1.5.1. El sistema olfativo en adultos.....	9
1.5.2. El sistema olfativo en larva.....	15
1.6. Objetivos.....	17
Sección II. Evolución de la arquitectura genética del comportamiento olfativo en <i>Drosophila melanogaster</i>.	
2.1. Capítulo I. Genómica Funcional del Comportamiento Olfativo en la larva de <i>Drosophila melanogaster</i>	19
2.1.1. Introducción.....	19
2.1.2. Materiales y métodos.....	22
2.1.3. Resultados.....	29
2.1.4. Discusión y Conclusiones.....	36
2.2. Capítulo II. Genética cuantitativa evolutiva del comportamiento olfativo larval y adulto en poblaciones naturales de <i>Drosophila melanogaster</i>	42
2.2.1. Introducción.....	42
2.2.2. Materiales y Métodos.....	44
2.2.3. Resultados.....	50
2.2.4. Discusión y Conclusiones.....	56
2.3. Capítulo III. Arquitectura genética del comportamiento olfativo en <i>Drosophila melanogaster</i> y su relación con procesos y fenómenos involucrados en la interacción entre el genotipo y el fenotipo.....	60
2.3.1. Introducción.....	60
2.3.2. Materiales y Métodos.....	64
2.3.3. Resultados.....	67
2.3.4. Discusión y Conclusiones.....	70

Sección III. Evolución de la arquitectura genética del comportamiento olfativo en especies pertenecientes al grupo *Drosophila melanogaster*: un estudio genómico-comparativo.

3.1. Introducción.....	73
3.2. Materiales y Métodos.....	76
3.3. Resultados.....	81
3.4. Discusión y Conclusiones.....	89
3.5. Material Suplementario a la Sección III.....	93

Sección IV. Conclusiones Generales.

4.1. Resumen de los resultados.....	99
4.2. Discusión General.....	101
4.3. Palabras Finales.....	105

Bibliografía.....	106
--------------------------	------------

Sección I

Introducción General

1.1. Intenciones y esquema general de la tesis.

A lo largo de esta tesis de doctorado se presentará el desarrollo de una investigación a cerca de la evolución del comportamiento olfativo (CO) en *Drosophila*. A fin de alcanzar una mejor interpretación de los antecedentes, objetivos y diseños experimentales referidos al tema de investigación de esta tesis, la misma se ha organizado en las siguientes cuatro secciones:

- Sección I: Corresponde a la presente introducción general, en la cual se describe el marco teórico general, se detallan los conocimientos previos sobre el carácter fenotípico en estudio y también se explicitan el objetivo general y los particulares.

- Sección II: Arquitectura genética del comportamiento olfativo en *Drosophila melanogaster*. En los diferentes capítulos de esta sección se describen las bases genéticas del comportamiento olfativo en diferentes niveles de organización jerárquica de la información genética. Asimismo, se analizan los cambios genéticos, que acontecen en los diferentes estadios del ciclo de vida y entre diferentes poblaciones naturales de *D. melanogaster*, y su repercusión en el fenotipo olfativo.

- Sección III: Evolución de la arquitectura genética del comportamiento olfativo en el grupo de especies *Drosophila melanogaster*: un estudio de genómica comparada. Se detallan los resultados de la puesta a prueba de diferentes hipótesis sobre la evolución de genes involucrados en el comportamiento olfativo. Para ello, se utilizó la secuencia completa del genoma de seis especies de moscas cercanamente emparentadas pertenecientes al grupo de especies *Drosophila melanogaster* (Clark *et al.* 2007).

- Sección IV: Se realizó un resumen de las conclusiones más relevantes obtenidas a lo largo de toda la tesis, haciendo hincapié en interpretar los diferentes resultados globalmente en un mismo marco.

Como puede percibirse, el desarrollo de esta investigación requirió de diferentes “sub-disciplinas” que gravitan dentro del marco teórico general de la Biología Evolutiva. Estas “sub-disciplinas” son:

1) **Genómica funcional:** El cometido de la genómica funcional es describir la función del conjunto de genes de un genoma. Es decir, pretende establecer cuáles son las funciones moleculares y biológicas de los productos génicos. Sin embargo, no solamente éste es el objetivo de la disciplina, sino que también interesa a la genómica funcional describir la interacción entre los genes (epístasis) y sus patrones de expresión en diferentes tejidos, órganos, etc. Para cumplir cualquiera de estos objetivos esta disciplina utiliza diferentes técnicas (Gibson y Muse 2009). En el capítulo I de la Sección II se describe la investigación realizada en este marco, en la cual se realizó una búsqueda a escala genómica de genes candidatos a participar en la expresión del carácter comportamiento olfativo larval (COL) en *D. melanogaster*, utilizando para ello la técnica de pérdida de función.

2) **Genética cuantitativa:** Esta disciplina se encarga del estudio de la herencia de los caracteres cuantitativos; es decir aquellos caracteres que presentan diferencias de grado más que de clase entre individuos. Estas diferencias son el material sobre el que actúa la selección natural. Por lo tanto, el conocimiento de estos caracteres es de fundamental importancia en el estudio de la evolución. La variación poblacional de estos caracteres es el reflejo de una base genética compleja, que obedece tanto a la segregación de un alto número de genes, como a que los efectos de estos sobre el fenotipo son altamente dependientes del medio en el que se expresan (Falconer y Mackay 1996). En el marco de la genética cuantitativa se analizó la variación inter e intra-poblacional del CO (que es un carácter complejo) en los estadios larvales y el adulto de *D. melanogaster*. Los resultados obtenidos se presentan en los capítulos II y III de la Sección II.

3) **Genómica comparada:** Es el estudio comparativo de la estructura, función y evolución del genoma entre diferentes especies. En particular, en la Sección III de esta tesis se analizaron los patrones y procesos ocurridos durante la evolución de las bases genéticas del CO en especies cercanamente emparentadas (separadas por alrededor de 5 millones de años) pertenecientes al grupo de especies *Drosophila melanogaster* cuyos genomas han sido totalmente secuenciados (Clark *et al.* 2007). En este sentido, el estudio de las diferencias entre secuencias codificantes en genomas de especies con este grado de separación, es particularmente apto para entender los cambios, que como consecuencia de los procesos evolutivos, ocurrieron en las mismas (Hardison 2003).

En cada caso el estudio del carácter se desarrolló ateniéndose al marco teórico, y utilizando las herramientas que ofrece cada “sub-disciplina”.

1.2. ¿Qué es la arquitectura genética de un carácter fenotípico y cómo se la estudia?

La arquitectura genética (AG) es el patrón de factores genéticos que determinan y controlan un fenotipo y su variación (Hansen 2006). Entonces, estudiar la arquitectura genética de un carácter cuantitativo implica (Anholt y Mackay 2004; Mackay 2004):

- Identificar todos los genes que contribuyen al mismo.
- Conocer las interacciones entre estos genes como ensambles funcionales. Pueden existir de dos tipos: i) intragénicas, relaciones de dominancia entre diferentes alelos de un mismo gen ii) intergénicas, las cuales derivan en interacciones epistáticas, es decir interacciones no aditivas entre genes diferentes que afectan a un mismo carácter.
- Conocer si existen fenómenos de pleiotropía, o sea que un único gen participa en la expresión de diferentes fenotipos.
- Identificar cuáles de estos genes contribuyen a la variabilidad fenotípica natural y entender las bases moleculares de esta variación entre diferentes alelos naturales.
- Conocer la relación entre los aspectos genéticos encontrados para la AG del carácter y el ambiente.

Si entendemos a la AG no como un conjunto de parámetros estancos sino como una serie de variables dinámicas, describir la AG de un carácter también implica conocer sus aspectos variacionales (Hansen 2006) en diferentes niveles de organización biológica como interindividuales, interpoblacionales e interespecíficos.

1.3. Caracteres fenotípicos cuantitativos y evolución de la arquitectura genética.

Como se ha dicho previamente los caracteres cuantitativos son aquellos que presentan diferencias entre individuos de grado más que de clase; y por lo tanto muestran una variación fenotípica continua en las poblaciones. Esta variación continua suele deberse a que la expresión de estos caracteres es el resultado de la acción de

muchos genes, a los cuales se los llama *Genes para Caracteres Cuantitativos* o *QTG's* (por sus siglas en ingles, *Quantitative Trait Gene*). Para analizar estos fenotipos se utiliza una aproximación estadística basada en el análisis matemático de la variabilidad y no de la media (Falconer y Mackay 1996). La idea básica es partir la variabilidad fenotípica total de un carácter cualquiera en diferentes componentes atribuibles a distintas causas. La variabilidad fenotípica se ve influida tanto por el genotipo como por el ambiente en el que se expresa, y también por la interacción entre ambos. Por lo tanto, la varianza fenotípica total (V_P) de un carácter cuantitativo puede expresarse como:

$$V_P = V_G + V_A + V_{G \times A}$$

donde V_G es la varianza genotípica, V_A es la varianza ambiental y $V_{G \times A}$ es la varianza debida a la interacción entre el genotipo y el ambiente.

Asimismo, los efectos sobre la varianza fenotípica total debidos a causas genéticas no son unívocos; es decir el componente V_G está compuesto a sus vez por diferentes componentes. De acuerdo con los postulados de la genética cuantitativa, cuando se considera a los loci individualmente, el efecto genotípico es la suma del componente *aditivo* heredable de cada locus (es decir el efecto que presenta ese gen en particular sobre la varianza fenotípica sin tener en cuenta que existen los demás genes o despreciando el efecto debido a la interacción con los demás genes); y también de un efecto de *dominancia* no heredable (que es el efecto producto de la interacción de los alelos de un mismo locus sobre el fenotipo). Por último, cuando se considera a más de un locus, el efecto genotípico puede contener desviaciones adicionales no aditivas, resultante de los efectos sobre el fenotipo debido a la presencia de otro gen, que no existen cuando el locus se analiza en soledad. Este componente, que surge cuando los genes interactúan entre si, es el componente *epistático* no heredable. Entonces la varianza genotípica total de un carácter cuantitativo se expresa como:

$$V_G = V_A + V_D + V_E$$

donde V_A es la varianza aditiva, V_D es la varianza de dominancia y V_E es la varianza epistática.

Los mecanismos subyacentes a la evolución fenotípica no son fáciles de analizar. Una forma de hacerlo es plantear modelos que pongan reglas y límites a cómo

las fuerzas evolutivas repercuten sobre los componentes de la varianza fenotípica total. La historia de la Biología Evolutiva presenta en este punto un debate entre dos propuestas diferentes. Por un lado Ronald Fisher propone en su libro clásico “The genetical theory of natural selection” (Fisher 1930), que un carácter cuantitativo está determinado por la acción de muchos loci, cada uno de los cuales tiene un efecto aditivo pequeño e independiente sobre el fenotipo, descartando la influencia de los procesos no aditivos. En este caso el fenotipo será el resultado de la sumatoria de los efectos individuales de cada gen y de la varianza ambiental. Además, y estrechamente relacionado con el planteo presentado, Fisher propone que la fuerza evolutiva realmente importante es la selección natural actuando en poblaciones grandes (Fisher 1930). En cambio, Sewall Wright plantea que además de los efectos aditivos de los genes, las interacciones epistáticas y la pleiotropía cumplen roles fundamentales en la evolución del fenotipo. Es decir, los alelos que se encuentran presentes en otros loci, tienen una importancia singular en la determinación del fenotipo. En éste caso, el cambio evolutivo es gobernado por la interacción de la selección natural con procesos estocásticos como la deriva genética, situación que cobra mayor importancia en poblaciones pequeñas. Este modelo es conocido como la “Teoría de los Equilibrios cambiantes” (*Shifting Balance Theory*), cuyo nombre se debe a que en el escenario descrito una población tiene potencialmente más de un óptimo adaptativo y puede, impulsada por la deriva genética, cambiar de un pico adaptativo a otros sin estabilizarse en ninguno (Wright 1931, 1968; Wright 1969, 1977, 1978). Un buen relato de esta historia se puede encontrar en el capítulo 1 de Schlichting y Pigliucci (1998); mientras que en una serie de artículos publicados en la revista científica *Evolution* discuten, con bastante detalle, diferentes tipos de evidencias a favor y en contra de estas dos propuestas (Coyne *et al.* 1997; Wade y Goodnight 1998; Coyne *et al.* 2000; Goodnight y Wade 2000). A pesar de las diferencias, algo compartido entre los dos modelos es la fuerte importancia que se le da al efecto que ejerce la variación ambiental sobre los loci que afectan a caracteres cuantitativos.

Pero, ¿qué tiene esto que ver con la arquitectura genética de los caracteres? La V_A es uno de los factores que determina el nivel de V_A y V_E para los caracteres fenotípicos, como también determina las correlaciones genéticas entre estos. A su vez la V_A , V_E y las correlaciones genéticas entre caracteres son las que definen el grado en que los efectos de las fuerzas evolutivas (mutación, selección natural, migración y deriva génica) y el tamaño poblacional afectan a los caracteres fenotípicos de los individuos

que conforman una población (Lande 1979; Falconer y Mackay 1996; Rice 1998; Rice 2000). Entonces, la AG de los caracteres en cualquier población natural de una especie cualquiera, está íntimamente relacionada a cómo es el proceso de evolución en las poblaciones de esa especie.

1.4. *Drosophila melanogaster* y especies cercanamente emparentadas como organismos modelos.

El modelo biológico utilizado en la mayoría de los capítulos de esta tesis es la mosca *Drosophila melanogaster* (Díptera, *Drosophilidae*). En los últimos 3 años la clasificación biológica de esta especie se ha modificado, ya que ha sido demostrado que el género al que pertenecía, *Drosophila*, es parafilético y por lo tanto no puede ser mantenido como tal (van der Linde *et al.* 2007; van der Linde y Houle 2008; van der Linde *et al.* 2010). Esto ha repercutido en que se debería cambiar el componente genérico del nombre científico de *Drosophila melanogaster* al del nuevo género en el que se clasifica. El organismo encargado de legislar la nomenclatura zoológica (ICZN 2010), ha respondido negativamente a un pedido formal de dividir el género *Drosophila*, como su no monofilia lo indica, pero mantener el nombre como hasta ahora (van der Linde *et al.* 2007). El tema sigue siendo controvertido y no se ha resuelto definitivamente (O'Grady y Markow 2009); por lo tanto, en esta tesis se nombrará a la especie como *Drosophila melanogaster*.

El ciclo de vida de *D. melanogaster* se define como holometábolo y consta de una etapa embrionaria, seguida por tres estadios larvales donde el individuo va aumentando de tamaño hasta alcanzar el estadio pupal. El adulto emerge luego del pupario y alcanza la madurez sexual en pocas horas (Figura 1.1).

D. melanogaster presenta una distribución cosmopolita y desde principios del siglo XX se convirtió en un organismo modelo para estudios ecológicos, genéticos, comportamentales, fisiológicos, anatómicos, moleculares, etc. (Rubin y Lewis 2000). Presenta 3 pares de cromosomas autosómicos llamados II, III y IV (muy pequeño respecto a los otros dos) y el par de cromosomas sexuales X e Y. Las características que hacen de *D. melanogaster* un modelo excelente para diferentes tipos de estudios son: i) Su tiempo generacional corto, lo que permite generar grandes cantidades de individuos en poco tiempo, ii) que se las puede criar bajo condiciones controladas, iii) que existe

una gran cantidad de líneas (o cepas) de laboratorio modificadas genéticamente, las cuales presentan diferentes recursos genéticos, como por ejemplo: mutagénesis utilizando elementos transponibles, cromosomas balanceadores, sistemas reporteros de expresión como UAS/GAL4, ARN de interferencia, etc., iv) que su genoma ha sido secuenciado y se encuentra accesible de manera libre y gratuita (Adams *et al.* 2000; Celniker *et al.* 2002; Celniker y Rubin 2003) y v) que existe una base de datos pública, *FlyBase* (flybase.org), en donde se puede encontrar información sobre los aspectos que hemos enumerado y cualquier otro relacionado a *D. melanogaster*. Estas facilidades permiten realizar manipulaciones genéticas como por ejemplo interrumpir un gen de interés y generar líneas derivadas de la naturaleza altamente endogámicas. Estos son sólo dos ejemplos de los recursos genéticos que presenta esta especie modelo, los cuales posibilitan y facilitan el estudio genético y genómico de caracteres complejos como el olfato.

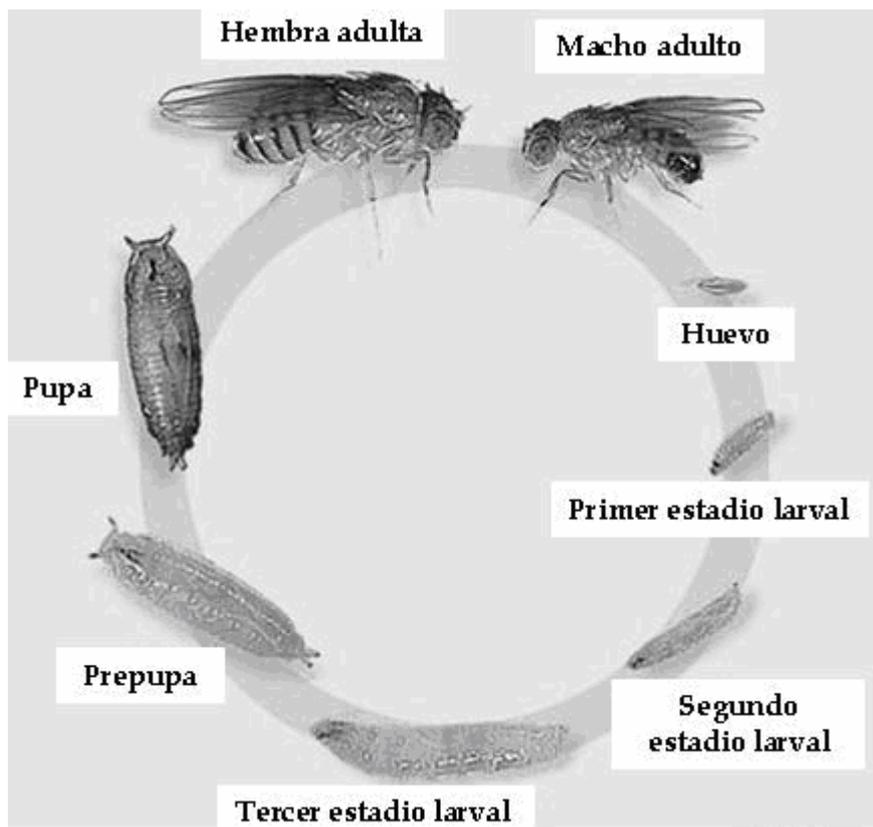


Figura 1.1: Estadios del ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. Figura modificada a partir del original extraído de la página web www.flickr.com.

A partir de los avances tecnológicos acontecidos en diversas ramas de la biología fue posible la secuenciación de los genomas completos de 12 especies (incluida *D. melanogaster*) que solían pertenecer al género *Drosophila* (Clark *et al.* 2007). Esto constituye, indudablemente, un aporte sustancial que ha abierto la posibilidad de realizar un sin número de estudios en cada especie, como también comparativos, que previamente estaban restringidos solamente a *D. melanogaster*.

1.5. Descripción del carácter de estudio: el comportamiento olfativo en *Drosophila*.

Como originalmente planteó Charles Darwin en “El origen de la especies por medio de la selección natural, o la preservación de las razas favorecidas en la lucha por la vida” (1859), la evolución adaptativa es producto de la interacción entre los organismos y el ambiente. Indudablemente, una de las observaciones empíricas más evidentes es la heterogeneidad ambiental a la cual los individuos necesariamente deben enfrentarse. En esta situación, los sentidos son el medio por el cual los organismos obtienen información sobre el ambiente y su variación. Entonces, los caracteres involucrados en la percepción del medio ambiente se constituyen como caracteres que tienen una clara importancia evolutiva, ya que la supervivencia y el éxito reproductivo de un organismo es altamente dependiente de estímulos sensoriales (Dominy *et al.* 2004).

Las hembras adultas de *D. melanogaster*, y de muchas otras especies cercanamente emparentadas, depositan sus huevos en diversos recursos que contienen bacterias y hongos, los cuales como producto de su metabolismo secretan alcoholes, ácidos, ésteres, cetonas y aldehídos alterando el medio (Begon 1982; Graf y Sokolowski 1989). Por lo tanto, el estadio adulto y en especial los estadios larvales, cuyo hábitat se circunscribe generalmente al recurso en el cual las hembras adultas depositan los huevos, están expuestos a una gran cantidad de estímulos olfativos. No cabe duda que durante el transcurso de la vida de las moscas en este entorno, la respuesta olfativa juega un rol importante en diferentes aspectos relacionados con el comportamiento como la selección de alimento (Libert *et al.* 2007), la identificación de sustancias peligrosas (Fuyama 1978), el reconocimiento y elección de pareja (Billeter *et al.* 2009) y de sitio de oviposición (Hoffmann y O'Donnell 1990; Jaenike 1990), entre otros.

En un sentido amplio se considera que el comportamiento es la acción de un animal en respuesta a su ambiente interno y externo. En general, los caracteres comportamentales se caracterizan por ser fenotipos complejos, de hecho casi cualquier comportamiento puede ser subdividido en comportamientos individuales más específicos. Se suele generalizar que los fenotipos comportamentales son inherentemente más variables y susceptibles a la heterogeneidad ambiental que fenotipos no comportamentales como por ejemplo el desarrollo de un órgano, debido que se encuentran sujetos a menos restricciones del desarrollo (Sokolowski 2001). Es así que comprender el rol biológico del comportamiento olfativo requiere de un análisis a múltiples niveles, donde es necesario caracterizar diferentes componentes del carácter comportamental y entender cómo se producen numerosos procesos.

1.5.1. El sistema olfativo en adultos.

El sistema olfativo del adulto de *D. melanogaster* es relativamente simple comparado con, por ejemplo, el sistema olfativo de los vertebrados. Los órganos olfativos se encuentran ubicados exclusivamente en la zona cefálica y son el tercer segmento antenal y los palpos maxilares (Figura 1.2). En estos órganos se encuentran los “pelos sensitivos” llamados sensilias, que sobresalen de la cutícula y a las cuales llegan las dendritas de las neuronas receptoras olfativas (NRO). Las sensilias son estructuras huecas tipo cabello llenas de un líquido llamado linfa sensiliar, que baña las dendritas de la NRO. En el estadio adulto de *D. melanogaster* hay alrededor de 1200 a 1500 NRO (Stocker 1994; Shanbhag *et al.* 1999).

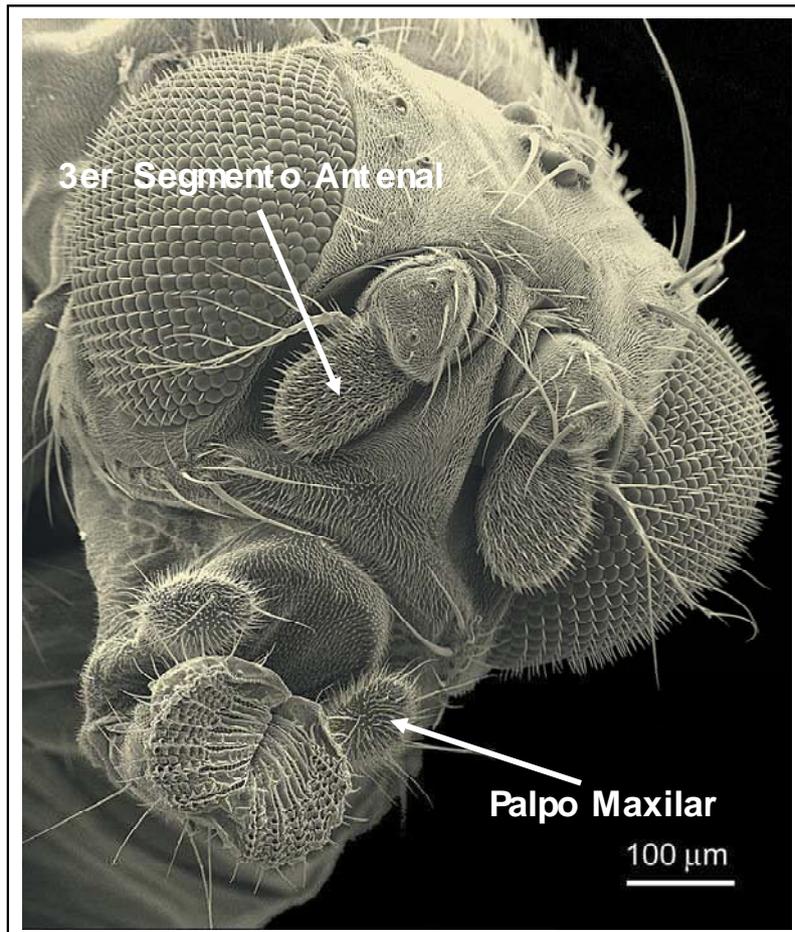


Figura 1.2: Imagen de la cabeza del adulto de *Drosophila melanogaster* obtenida por microscopio electrónico de barrido. Se indican los órganos olfativos.

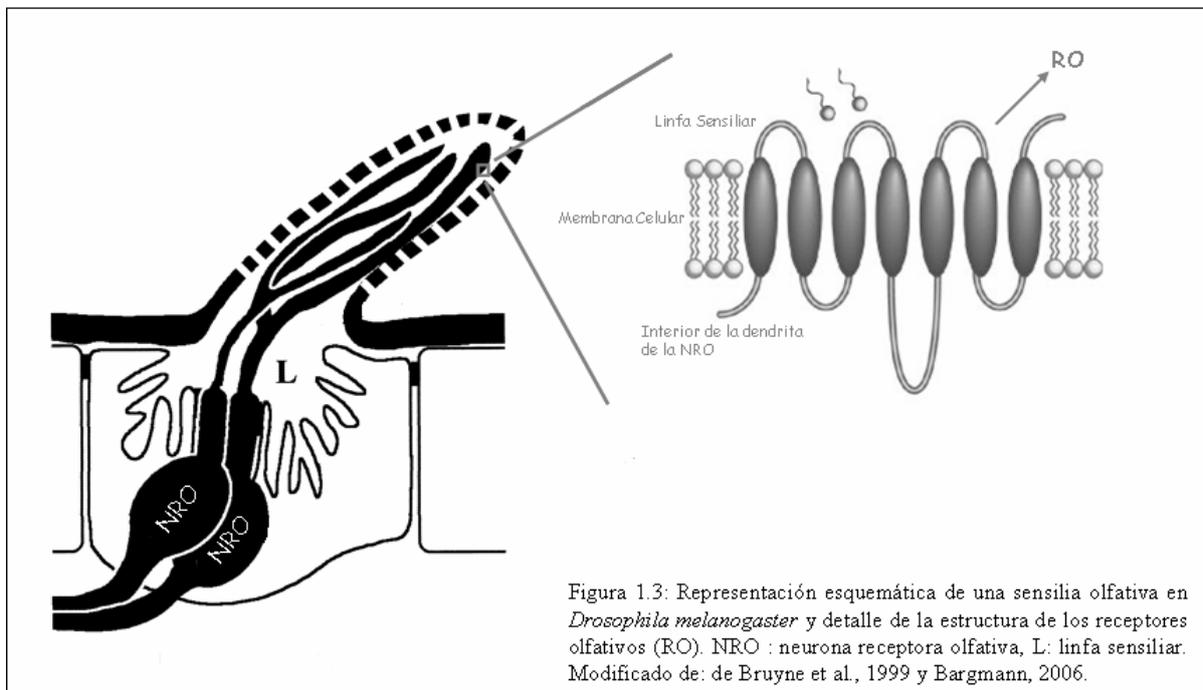
Sorprendentemente, la neuroanatomía del sistema olfativo en *D. melanogaster* es bastante similar a la de los vertebrados. Las NRO son bipolares, desde la zona basal se extiende un único axón que termina en un glomérulo olfativo en el lóbulo antenal del cerebro de la mosca (este lóbulo es el homólogo funcional del bulbo olfativo en el cerebro de los mamíferos). En la zona apical, cada NRO extiende una dendrita sensorial que termina en proyecciones ciliadas inmersas en la linfa sensiliar dentro de la caja de las sensilias. En cada sensilia hay entre 2 y 4 NRO, las cuales están rodeadas por células de soporte (Shanbhag *et al.* 1999) (Figura 1.3).

En la antena de *D. melanogaster* existen tres clases morfológicas de sensilias: Basicónicas, Tricoides y Coelocónicas; las cuales se distribuyen en la antena en un patrón estereotipado y bilateral (Stocker 1994; Shanbhag *et al.* 1999). Se ha comprobado que existen diferentes clases funcionales de sensilias, las cuales presentan diferentes especificidades olfativas (Clyne *et al.* 1997) debido al tipo de sustancias que

detectan las diferentes clases de NRO que llegan a ellas (de Bruyne *et al.* 2001). Además, cada clase funcional de NRO está restringida a una zona particular de la antena (de Bruyne *et al.* 2001). En cuanto al palpo maxilar, es un órgano par que se extiende desde la proboscis; presenta solamente 120 NRO distribuidas de a dos en cada una de las 60 sensilias que presenta. Estas sensilias son de un único tipo morfológico, basicónicas, y responden a una variedad de estímulos que también generan respuesta en la antena (de Bruyne *et al.* 2001). No está muy claro cuál es la función olfativa del palpo maxilar. Se ha propuesto que es un órgano olfativo accesorio al tercer segmento antenal (de Bruyne *et al.* 2001), pero por su ubicación cercana a las estructuras bucales otros autores proponen que su rol es integrar información olfativa con el comportamiento gustativo (Vosshall y Stocker 2007; Shiraiwa 2008).

A pesar del amplio conocimiento respecto a los aspectos anatómicos y fisiológicos del CO que se tiene desde hace ya varias décadas, los aspectos genéticos y moleculares de la periferia del sistema olfativo, fueron más difíciles de dilucidar. De hecho, no fue hasta 1999 que se descubrió la familia multigénica de receptores olfativos en *D. melanogaster*. Los genes de esta familia codifican los receptores olfativos (RO). El descubrimiento de estos genes fue realizado diez años después del primer informe de un receptor olfativo en cualquier especie animal (Buck y Axel 1991). Considerando que *D. melanogaster* es una especie modelo, llama la atención el largo lapso de tiempo que se tardó en descubrir a los genes RO. Este descubrimiento se realizó mediante la combinación de un abordaje bioinformático, utilizando algoritmos de búsqueda en las bases de datos genómicos de *D. melanogaster* (Clyne *et al.* 1999; Gao y Chess 1999; Vosshall *et al.* 1999) y técnicas experimentales de laboratorio como RT-PCR (Clyne *et al.* 1999; Gao y Chess 1999), hibridación *In situ* (Clyne *et al.* 1999; Gao y Chess 1999; Vosshall *et al.* 1999) y clonado combinado diferencial (Vosshall *et al.* 1999). La historia de estas investigaciones ha sido revisada por Smith (1999) y Vosshall (2000). Los RO son 62, codificados por 60 genes ya que 2 de estos genes (*Or46a* y *Or69a*) presentan *splicing* alternativo y producen cada uno 2 proteínas diferentes (Robertson *et al.* 2003). Los genes RO en *D. melanogaster*, al igual que en vertebrados y nematodos, codifican proteínas receptoras con siete pasos transmembrana (Clyne *et al.* 1999; Gao y Chess 1999; Vosshall *et al.* 1999) que se ubican en la membrana celular de las dendritas de las NRO (Figura 1.3). Sin embargo, los genes de esta familia presentan poca similitud con las familia de genes receptores olfativos de vertebrados (Clyne *et al.* 1999; Gao y Chess 1999; Nozawa y Nei 2007) y nematodos (Bargmann 2006) (quizás esto

explica porqué llevó tanto tiempo encontrar estos receptores); por lo tanto se considera que son una rama nueva de la familia de receptores acoplados a proteínas G y que han evolucionado independientemente de los receptores acoplados a proteínas G de otros animales (Bargmann 2006; Vosshall y Stocker 2007). En cuanto a la expresión de estos RO, cada gen se expresa en una determinada subpoblación de NRO que presentan una distribución espacial no trivial conservada tanto en la antena, el palpo maxilar o el órgano dorsal larval, excepto el gen *Or83b* que se expresa virtualmente en todas las NRO (Clyne *et al.* 1999; Gao y Chess 1999; Vosshall *et al.* 1999; Couto *et al.* 2005; Fishilevich y Vosshall 2005). En un principio se postuló que se cumplía la regla “un receptor por una neurona”, pero luego se descartó esta hipótesis y se sostiene como regla general que cada NRO co-expresa dos RO: uno es generalmente *Or83b* y el otro cualquiera de los demás RO (Larsson *et al.* 2004; Benton *et al.* 2006). Sin embargo, existe evidencia sobre excepciones a esta regla en 13 NRO que co-expresan 2 o 3 RO al lado de *Or83b* (revisado en Vosshall y Stocker 2007). Esta co-expresión contrasta fuertemente con la observación del patrón “un receptor por una neurona” en vertebrados (Malnic *et al.* 1999; Serizawa *et al.* 2003).



Además de los RO, existe evidencia directa de que otro tipo de proteína, las proteínas de unión a olores (PUO), participan en la respuesta olfativa periférica de *D. melanogaster* (Hekmat-Scafe *et al.* 1997; Kim *et al.* 1998; Galindo y Smith 2001; Kim y Smith 2001). Existen 51 genes que codifican PUOs en el genoma de *D. melanogaster*

(Hekmat-Scafe *et al.* 2002). Estas proteínas se encuentran en muchas especies de insectos (Vogt *et al.* 1991a; Vogt *et al.* 1991b; Vogt *et al.* 1999; Vogt *et al.* 2002) y generalmente están disueltas en gran número en la linfa sensiliar que baña a las dendritas de las NRO (Pelosi 1994; Anholt y Williams 2010). Se cree que su función en la respuesta olfativa podría ser la de solubilizar químicos hidrofóbicos y presentarlos al RO en la membrana plasmática de la dendrita de la NRO o remover ligandos de los receptores para terminar la respuesta neuronal (Vogt *et al.* 1991a; Pelosi 1994). Además de su función en el olfato, las PUO también estarían involucradas en la cópula, al actuar como transportadoras de ligandos fisiológicamente activos del macho hacia la hembra durante la cópula (Zhou *et al.* 2009). En la figura 1.4 se esquematiza la función de los RO y las PUO en el olfato.

Se puede resumir el funcionamiento del sistema olfativo en el adulto de la siguiente manera: un estímulo químico activa las NRO esparcidas en los órganos olfativos de la mosca en donde se expresa el mismo tipo de receptor. Estos fenómenos ocurren en la periferia del sistema olfativo (Figura 1.3 y Figura 1.4). Los axones de estas NRO que expresan el mismo RO convergen en un único glomérulo en el lóbulo antenal. Este esquema se conoce como “un RO por un glomérulo”. En los glomérulos las NRO se conectan con inter-neuronas locales mayormente inhibitorias y con neuronas de proyección colinérgicas que conectan los glomérulos con el *Mushroom Body* y el *Lateral Horn*, dos centros olfativos superiores en el cerebro de la mosca. Así, la información química captada por las NRO es traducida en un patrón de activación de glomérulos, generándose una “imagen del químico” en el cerebro del insecto. Esta “imagen” es luego procesada en los centros olfativos superiores y se genera una respuesta fisiológica y conductual. Esta descripción revela que los glomérulos del lóbulo antenal no son solamente estructuras de paso de la información sensorial, sino un centro integrador, en el que por ejemplo, una de sus funciones más importante parece ser la de extraer la información comportamentalmente relevante de las señales que le llegan cambiando la estructura temporal de las mismas mediante la acción de la inter-neuronas inhibitorias (revisado en Vosshall y Stocker 2007). Toda esta trama conforma la fracción central del sistema olfativo.

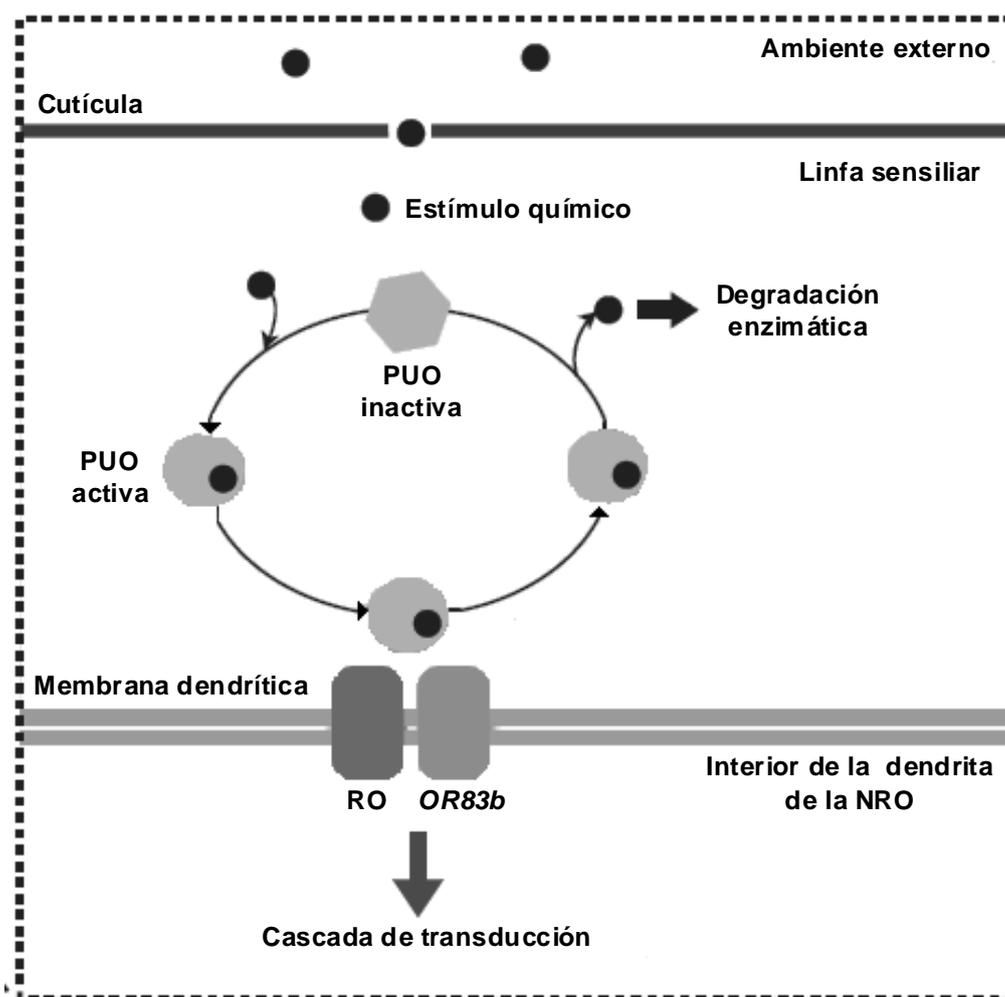


Figura 1.4: Representación esquemática de la función de los receptores olfativos (RO) y las proteínas de unión a olores (PUO) en la periferia del sistema olfativo de *D. melanogaster*. NRO: neurona receptora olfativa. Modificado de Sánchez-Gracia *et al.* (2009).

Además de los receptores y proteínas de unión a olores, se han identificado numerosos genes que participan en el olfato adulto de *D. melanogaster*, tanto en la periferia del sistema olfativo (Rollmann *et al.* 2005) como en posiciones no periféricas del mismo (Ayer y Carlson 1991; Anholt *et al.* 1996; Goulding *et al.* 2000; Shiraiwa *et al.* 2000; Anholt *et al.* 2001; Fanara *et al.* 2002; Kulkarni *et al.* 2002; Ganguly *et al.* 2003; Stoltzfus *et al.* 2003; zur Lage *et al.* 2003; Sambandan *et al.* 2006; Rollmann *et al.* 2007). Estos genes expresan productos proteicos con diversas funciones moleculares, y junto con los RO y las PUO participan en la expresión del carácter olfato. Para citar algunos ejemplos podemos nombrar *abnormal chemosensory jump 6 (acj6)* que afecta el comportamiento olfativo a nivel de procesos celulares (Ayer y Carlson 1991), *scribble* que se expresa en los órganos olfativos y en el sistema nervioso central de la mosca adulta y es necesario para que exista respuesta olfativa (Ganguly *et al.* 2003),

NaCP60E que codifica para un canal de sodio involucrado en el comportamiento olfativo (Anholt *et al.* 1996; Kulkarni *et al.* 2002) y *geko* que participa en la respuesta olfativa al etanol (Shiraiwa *et al.* 2000).

1.5.2. El sistema olfativo en larva.

Neuroanatómicamente el sistema olfativo periférico de los estadios larvales es más simple que en el estadio adulto. Presenta unas 6 sensilias a las que llegan las dendritas de 21 NRO (Stocker 1994; Python y Stocker 2002; Stocker 2006). Además, como es de esperar en un insecto holometábolo, la anatomía externa del sistema olfativo es totalmente diferente entre larva y adulto. No obstante estas diferencias, el circuito olfativo central es sorprendentemente similar en ambos estadios (revisado en Vosshall y Stocker 2007).

Los estadios larvales de *D. melanogaster* presentan en la superficie de la cabeza el órgano olfativo exclusivo llamado órgano dorsal (Singh y Singh 1984; Oppliger *et al.* 2000)(Figura 1.5). Este se forma durante la embriogénesis tardía y parece tener funciones tanto olfativas como gustativas (Python y Stocker 2002).

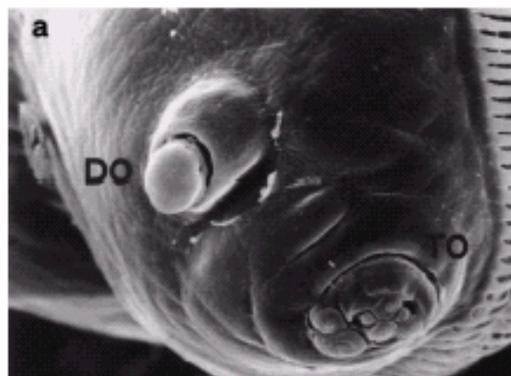


Figura 1.5: Vista anterolateral del lóbulo cefálico izquierdo de una larva de tercer estadio, en donde se observan el órgano dorsal (DO) y el órgano terminal (TO). La barra escala es de 20 μ m. Extraído de Oppliger *et al.* 2000.

El órgano dorsal es un domo cuticular con poros de los que salen canales que son atravesados por las moléculas de los diferentes compuestos químicos. El domo está rodeado por numerosas sensilias, 6 de las cuales son las olfativas. A estas llegan las dendritas de las NRO, cada una acompañada de tres células accesorias. Los axones de estas neuronas llegan al lóbulo antenal de la larva, que consiste de pequeños glomérulos

(Oppliger *et al.* 2000, Python y Stocker 2002). Aquí son conectadas entre si por interneuronas locales y a través de las neuronas de proyección con los centros olfativos superiores *Mushroom Body*, *Calyx* y *Lateral Horn* (Python y Stocker 2002). Es importante destacar que los órganos olfativos de la larva y el adulto de *D. melanogaster* tienen diferentes orígenes en el desarrollo; ya que durante la metamorfosis el órgano dorsal se degrada y los órganos olfativos adultos se desarrollan *de novo* a partir del disco imaginal ojo-antena (Levine *et al.* 1995; Tissot y Stocker 2000). Más aún, todas las neuronas sensoriales del adulto se forman *de novo* en los discos imaginales (Tissot y Stocker 2000), excepto las neuronas gustativas (Gendre *et al.* 2004). En el caso de las neuronas sensoriales de la larva, se ha descrito que las mismas se forman en el integumento embrional y, salvo contadas excepciones, mueren durante la metamorfosis larva-adulto que se produce en la etapa pupal (Gendre *et al.* 2004). Es decir, que los órganos olfativos de larvas y adultos de *Drosophila* presentan diferencias con relación al origen embriológico y desarrollo de los mismos.

Con relación a la organización y funcionamiento del sistema olfativo los estadios larvales y el adulto de *D. melanogaster* se diferencian fuertemente a nivel periférico, tal como se ha mencionado anteriormente. Sin embargo, existe una inesperada similitud en la estructura general del nivel central del sistema olfativo, con la excepción de que en la larva se observa una falta de redundancia en los circuitos neuronales. En larva existen 21 NRO cada una de las cuales es única e inerva uno de los 21 glomérulos del lóbulo antenal larval. De aquí salen aproximadamente 21 neuronas de proyección hacia aproximadamente el mismo número de glomérulos en el *Calyx*. La organización neuroanatómica de la larva presenta hasta este punto una conectividad de 1 a 1 entre NRO – glomérulo de lóbulo antenal - glomérulo del *Calyx*. Es aquí donde el circuito diverge y aparecen conexiones con 600 neuronas del *Mushroom body*. Comparativamente, el adulto presenta una conectividad que converge en el lóbulo antenal (ya que existen varias NRO por glomérulo) y luego diverge nuevamente en los centros olfativos superiores (*Calyx* y *Mushroom Bodies*); presentando una conectividad de 30:1:3:15 entre NRO – glomérulo del lóbulo antenal – glomérulos del *Calyx* – glomérulos del *Mushroom body* (revisado en Vosshall y Stocker, 2007).

El olfato ha sido intensamente estudiado en *D. melanogaster*; y hoy en día es profuso el conocimiento que se tiene del mismo. No obstante lo cual, ciertos aspectos han sido menos estudiados que otros. Entre estos se encuentran las bases genéticas del

comportamiento olfativo en los estadios larvales (especialmente a un nivel central del sistema olfativo), la variabilidad natural que presenta este carácter y las fuerzas evolutivas que actúan sobre el mismo. Abordar estos aspectos es el aporte de esta tesis al conocimiento sobre la arquitectura genética del comportamiento olfativo. A continuación se detallan los objetivos propuestos para cumplir este propósito.

1.6. Objetivos.

Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente el objetivo general de esta tesis es contribuir a la caracterización de la arquitectura genética del comportamiento olfativo en *Drosophila melanogaster* y estudiar la evolución de la misma.

Los objetivos particulares son:

i) Identificar y caracterizar genes involucrados en la expresión del comportamiento olfativo larval de *D. melanogaster* (Sección II, Capítulo I).

ii) Cuantificar las fuentes de variación que influyen en el comportamiento olfativo larval y adulto en diferentes poblaciones naturales las cuales se diferencian respecto de su distribución geográfica (latitud y altitud) y en cuanto a los recursos de cría/alimentación que presentan (Sección II, Capítulo II).

iii) Estudiar, en los diferentes estadios del ciclo de vida de *D. melanogaster*, la relación entre la arquitectura genética del comportamiento olfativo y los procesos y fenómenos involucrados en la interacción entre genotipo y fenotipo (Sección II, Capítulos II y III)

iv) Determinar, mediante un estudio de genómica comparada, qué fuerzas evolutivas y/o diferentes intensidades de una misma fuerza actúan sobre la arquitectura genética del comportamiento olfativo en diferentes especies del grupo de especies *Drosophila melanogaster*. Asimismo, poner a prueba hipótesis evolutivas relacionadas con las particularidades ecológicas y evolutivas de estas diferentes especies de moscas (Sección III).

En cada capítulo se harán explícitas las hipótesis particulares correspondientes a cada objetivo.

Sección II

**Evolución de la arquitectura genética del
comportamiento olfativo en *Drosophila
melanogaster*.**

2.1. Capítulo I.

Genómica funcional del comportamiento olfativo en la larva de *Drosophila melanogaster*.

2.1.1. Introducción.

Desde que en 1979 Aceves-Piña y Quinn demostraron que las larvas de *D. melanogaster* perciben y discriminan diferentes estímulos químicos, lo que les permitió caracterizar al mutante anósmico *smellblind* en larva y adulto (Aceves-Piña y Quinn 1979); ha habido ingentes esfuerzos en estudiar la respuesta olfativa en los estadios larvales de *D. melanogaster*. En efecto, en investigaciones posteriores se amplió el conocimiento sobre aspectos genéticos y fisiológicos relacionados con el comportamiento olfativo larval mediante el estudio de la respuesta olfativa a una alta variedad de estímulos químicos como alcoholes, acetatos, metilos y ácidos (Ayyub *et al.* 1990; Cobb *et al.* 1992; Cobb y Dannet 1994; Cobb 1996; Heimbeck *et al.* 1999; Cobb y Domain 2000; Ganguly *et al.* 2003; Fishilevich *et al.* 2005). Por otra parte, diversas investigaciones describieron la anatomía externa y la neurofisiología del sistema olfativo larval, la cual es, comparativamente, más simple que la del adulto; hecho que se mantiene cuando lo que se compara son las bases genéticas del CO en ambos estadios del ciclo de vida de *D. melanogaster* (revisado en Greber y Stocker 2007; Vosshall y Stocker 2007 y en la Sección I). Sin embargo, el conocimiento que existe sobre las bases genéticas del CO larval es mayoritariamente referido al nivel periférico del mismo; es decir, sobre los genes RO y PUO. De los 60 genes RO descritos, en larva se expresa una subpoblación de 26 genes, siendo varios de estos exclusivos de larva (Vosshall y Stocker 2007). En cuanto a los genes PUO, aproximadamente 15 se expresan en larva y, al igual que los RO, algunos se expresan únicamente en larva (Galindo y Smith 2001; Zhou *et al.* 2009). Sin embargo, si el cometido es lograr un estudio completo de las bases genéticas del olfato en larva se deben identificar y caracterizar no sólo los genes que participan en la periferia del sistema olfativo, sino también los genes cuyos productos proteicos están involucrados en otras posiciones de la compleja cadena de eventos que determina el CO. Más aún, dado que el CO se manifiesta en larva y adulto, es necesario evaluar si la arquitectura genética del CO cambia entre los diferentes estadios del ciclo de vida de esta especie y cuál es la magnitud de este cambio. Indudablemente, el análisis de caracteres y del cambio de la

arquitectura genética de los mismos en diferentes momentos del desarrollo ha llamado la atención de los biólogos en general y de los biólogos evolutivos en particular, promoviéndose un creciente interés en los estudios del área de la Evolución del Desarrollo o Evo-Devo. En el caso específico del comportamiento olfativo, diferentes estudios han abordado esta problemática para genes individuales que participan en un nivel central del sistema olfativo. Shaver *et al.* (1998) reportaron que el gen *for* afecta el comportamiento olfativo en el adulto pero no afecta las etapas larvarias, mientras que según Ayer y Carlson (1991) el gen *acj6* está involucrado en el comportamiento olfativo en ambos estadios.

Tal como se ha mencionado en la sección anterior, el comportamiento olfativo permite a las larvas detectar las diferentes señales que provienen del ambiente en el cual se completa el desarrollo hasta el estadio adulto. Para las larvas de *D. melanogaster* este proceso ocurre sobre o dentro de frutos en descomposición, donde se enfrentan a un ambiente altamente heterogéneo. Por lo tanto, resulta necesario evaluar la importancia que tienen en la arquitectura genética del CO larval, la plasticidad fenotípica y la interacción genotipo por ambiente. La plasticidad fenotípica se define como la propiedad de un genotipo de producir diferentes fenotipos cuando es expuesto a condiciones ambientales variables (Schlichting y Pigliucci 1998). Asimismo, es posible que la heterogeneidad ambiental afecte diferencialmente a los genotipos (o genes), en cuyo caso existe variabilidad genética para la plasticidad fenotípica. Cuando esto sucede, el componente de la variación fenotípica denominado interacción genotipo por ambiente (GxA) contribuye en forma significativa a la variación fenotípica total del carácter (Falconer y Mackay 1996).

Se han propuesto dos modelos que explican las causas de los cambios fenotípicos dependientes del ambiente (Schlichting y Pigliucci 1998). El primero es el de “sensibilidad alélica”, y plantea que el ambiente influye directamente en la expresión de los genes que subyacen a un carácter y consecuentemente en el efecto que esos genes tienen sobre el carácter fenotípico. Este efecto directo puede suceder de dos maneras diferentes: un cambio en la cantidad de expresión génica o en la actividad de los productos génicos, de los mismo(s) gen(es) en ambientes diferentes; o por la expresión de genes diferentes en ambientes diferentes. El segundo modelo llamado de “regulación genética”, propone que el ambiente actúa sobre genes regulatorios que subsecuentemente influyen sobre el fenotipo activando o desactivando otros genes. La respuesta plástica en un organismo está mediada por la acción epistática de unos pocos

genes que regulan la expresión de los factores genéticos que directamente afectan el fenotipo. La principal diferencia de este modelo con el de “sensibilidad alélica” es que el efecto del ambiente sobre el carácter fenotípico es indirecto, ya que es mediado por genes regulatorios que no son los que están involucrados directamente en el carácter.

El objetivo de la investigación que se describe en el presente capítulo es estudiar las bases genéticas del CO en larvas de *D. melanogaster*. Se identificaron genes candidatos a participar en la arquitectura genética del CO larval mediante la utilización de la técnica de pérdida de función por inserción de elemento móvil. A partir de la identificación de genes candidatos, se realizó una caracterización más detallada de los mismos con el propósito de dilucidar los órganos o estructuras larvales en donde se expresan. Por otra parte, se determinó en qué porcentaje cambian las bases genéticas del CO larval entre los estadios larvales y el adulto, y también en respuesta a diferentes estímulos químicos. Por último, se analizó cuantitativamente la interacción GxA del CO en diferentes “ambientes químicos” y se evaluó cuál de los diferentes modelos mecanísticos propuestos previamente estaría implicado en la interacción GxA.

Las hipótesis que se pusieron a prueba son las siguientes:

El CO larval en *Drosophila melanogaster* es un carácter complejo, en cuya expresión participan numerosos genes, y no solamente los expresados a un nivel periférico (genes RO y PUO).

La arquitectura genética del CO presenta cierto solapamiento entre estadios ontogénicos; es decir, los diferentes estadios comparten algunos factores genéticos y presentan otros que le son exclusivos.

Los genes candidatos a participar en la arquitectura genética del CO larval se expresan mayoritariamente en la parte central del sistema olfativo.

La arquitectura genética del CO larval cambia entre estímulos químicos diferentes; es decir, los factores genéticos que participan en la respuesta olfativa a los distintos estímulos químicos no son los mismos, aunque existe un número común minoritario.

Si consideramos a los diferentes estímulos químicos como ambientes diferentes, existe una interacción GxA para el CO larval en respuesta a diferentes “ambientes químicos” y las base genéticas de esta interacción son mayoritariamente congruentes con el modelo de “sensibilidad alélica”.

2.1.2. Materiales y métodos.

Generación y mantenimiento de líneas de trabajo.

Las líneas utilizadas en para los estudios descritos en el presente capítulos de la tesis provienen del *Berkeley Drosophila Genome Project* (BDGP) (Spradling *et al.* 1995; Bellen *et al.* 2004). El propósito del BDGP es estudiar genes que participen en la expresión de caracteres adaptativos (Norga *et al.* 2003; Harbison *et al.* 2004; Sambandan *et al.* 2006; Mensch *et al.* 2008; Carreira *et al.* 2009). Estas líneas se generaron utilizando el *stock* B de la cepa *Canton S*, a partir del cual se obtuvo una línea homocigota para todos los loci (isogénica) denominada línea *Canton S-B*. A esta línea se le insertó un elemento transponible en un lugar al azar del genoma mediante un esquema de cruzamientos programados. El vector utilizado como agente mutagénico es un elemento *P* modificado, el elemento *P[GT1]* (Figura 2.1.1), que funciona por el sistema *dual-tag-gene-trap* interrumpiendo la secuencia de un gen, lo cual produce en el mismo una pérdida de función por inserción mutacional (Lukacsovich *et al.* 2001; Lukacsovich y Yamamoto 2001).

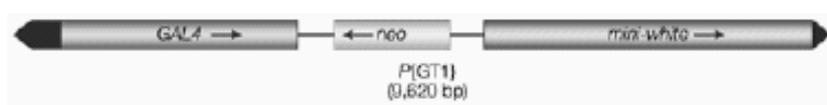


Figura 2.1.1: Esquema del elemento móvil *P[GT1]*.

La introducción mediante cruzamientos programados del elemento *P[GT1]* se realizó con la técnica *jump-start* (Cooley *et al.* 1988). En la figura 2.1.2 se muestra un esquema simplificado de los cruzamientos usados para obtener las líneas. La inserción del elemento *P[GT1]* afecta generalmente a un único gen. Como resultado de la implementación de este protocolo se generaron numerosas líneas isogénicas que comparten el mismo fondo genético (*Canton S-B*) y sólo se diferencian en la ubicación

Obtención de larvas.

Las larvas que se emplearon en el análisis se obtuvieron a partir de la eclosión de huevos colectados de las cámaras de recolección de huevos. Éstas consisten en recipientes de acrílico de 5x20x12 cm. En los mismos se colocó una caja de Petri que contenía un preparado de agar (3,4 g.) disuelto en agua (200 ml.) a la cual se le agregaron granos de levadura seca, que estimula la oviposición y sirve como alimento para las moscas y larvas. En la cámara de recolección de huevos se colocaron alrededor de 150 moscas sexualmente maduras pertenecientes todas a una misma línea. Luego de 8 horas, se retiró la caja de Petri donde las hembras pusieron huevos. Las cajas de Petri se dejaron a 25° C y 48 horas después de la puesta en la cámara de recolección se realizaron los ensayos experimentales con las larvas de segundo estadio. Se decidió utilizar larvas de esta edad ya que se ha informado que estas presentan una considerable respuesta olfativa a diferentes estímulos químicos (Cobb *et al.* 1992).

Ensayo comportamental.

El comportamiento olfativo de la larva se cuantificó en las líneas BDGP mediante sencillos y repetibles ensayos de laboratorio. El ensayo es una modificación del experimento clásico de Aceves-Piña y Quinn (1979). Entre 30 y 70 larvas se depositaron en el centro de una placa de Petri de 10 cm con agar (2,5%), en donde el compuesto químico que actuó como estímulo y el control (H₂O destilada) se situaron diametralmente opuestos en discos de papel cromatográfico y sobre tapas de tubos eppendorf (para evitar elección por degustación). Luego de transcurridos 5 minutos se contabilizó el número de individuos a un radio de 30mm de cada estímulo, así como también las larvas que quedaron entre ambas zonas (Figura 2.1.3). El tiempo del experimento se eligió en base a que la respuesta olfativa tiende a declinar luego de 5 minutos, presumiblemente por una saturación de la fase vapor. En cada ensayo (réplica) se obtuvo un índice de respuesta olfativa larval (IRL), que se calculó de la siguiente manera:

$$IRL = [(n_{\text{químico}} - n_{\text{control}}) / n_{\text{total}}] \times 100$$

donde “n” designa el número de larvas. Este índice varía entre -100 (repulsión total) y 100 (atracción total). Un IR = 0 indica comportamiento indiferente ante el estímulo químico. Todos los ensayos se realizaron entre las 14:00 y las 17:00 horas en una cámara experimental aislada del ambiente externo con temperatura ($25^{\circ} \text{C} \pm 1$), iluminación artificial ($5,4 \pm 0,2 \times 10^5 \text{ lx}$) y humedad ($42 \pm 5 \%$) controlada. De cada línea BDGP se realizaron entre 5 y 7 réplicas.

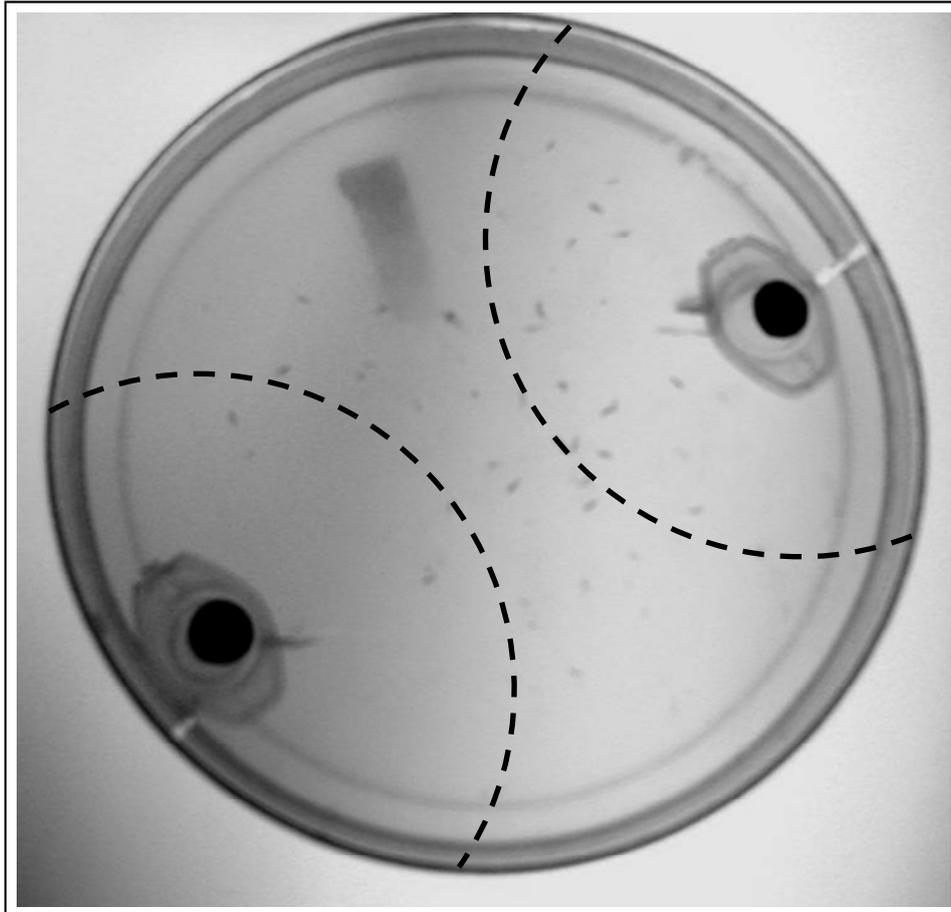


Figura 2.1.3: Fotografía de la placa de Petri de 10 cm donde se realizaron los ensayos comportamentales para cuantificar el comportamiento olfativo larval. Se observa la placa de Petri de 10 cm con agar (2,5%), los discos de papel cromatográfico sobre tapas de tubos Eppendorf situados diametralmente opuestos. Las líneas punteadas delimitan el radio de 30mm de cada estímulo. También se pueden observar larvas esparcidas a lo largo de la placa.

Diseño experimental.

El comportamiento olfativo larval se cuantificó en respuesta a 3 estímulos químicos diferentes: Ácido Propiónico puro (atractivo, reportado en Ayyub *et al.* 1990; Heimbeck *et al.* 1999; Oppliger *et al.* 2000), Benzaldehído 1 % v/v (atractivo, reportado en Ayyub *et al.* 1990; Oppliger *et al.* 2000; Ganguly *et al.* 2003) y Nonanol puro

(repulsivo, reportado en Cobb *et al.* 1992; Cobb y Domain 2000). Todos los químicos utilizados fueron obtenidos en Merck Schuchardt OHG; Hohenbrunn, Alemania y presentan una pureza $\geq 99\%$. En los tres casos se utilizó un volumen de 5 μl . Se han analizado en total 102, 100 y 106 líneas BDGP por químico respectivamente. En 76 líneas BDGP la caracterización fenotípica se realizó empleando los tres estímulos químicos. Los ensayos se dividieron en bloques, es decir en un dado día (bloque) se analizó la línea control libre de inserciones (ISOB) y un número variable de líneas mutantes.

Análisis Estadístico.

La cuantificación de la magnitud de la variabilidad genética mutacional del CO larval para cada estímulo se realizó mediante un Análisis de la Varianza (ANOVA). Los valores analizados fueron los IRL de cada réplica corregidos por el IRL medio del control (ISOB) contemporáneo. Esta sustracción permite corregir los efectos debidos a diferencias no controladas en temperatura, humedad, etc., entre los diferentes días (bloques) en que se realizaron las experiencias. El modelo de ANOVA utilizado fue el siguiente:

$$y: \mu + L + Er$$

donde μ es la media total y las fuentes de variación son: L, efecto Línea que estima las diferencias entre los efectos medios de las líneas BDGP (aleatorio) y Er que estima la varianza entre los efectos medios de las réplicas, es decir el error. Como las moscas fueron criadas en condiciones ambientales controladas y los ensayos comportamentales se realizaron también en condiciones controladas, las diferencias fenotípicas entre líneas pueden ser atribuidas a las diferencias genéticas que éstas presentan (diferentes mutaciones por inserción de elemento móvil para las líneas BDGP). Entonces, el efecto Línea significativo se interpretó como existencia de varianza genética mutacional para el comportamiento olfativo en la larva de *Drosophila melanogaster*.

A fin de determinar cuáles líneas presentan diferencias significativas con respecto al control contemporáneo libre de inserciones se realizó la prueba de Dunnett, en donde se compara la media de cada línea BDGP con la media de la línea control. Estos análisis se hicieron dentro de cada bloque y se usó el IRL de cada réplica sin corregir. En aquellas líneas que presentaron diferencias significativas con respecto al

control se consideraron líneas anósmicas para el CO larval y el gen interrumpido en esta línea se consideró un gen candidato a participar en la arquitectura genética del CO larval.

De cada línea BDGP se cuenta con la información de la secuencia nucleotídica flanqueante a la inserción. En las líneas que resultaron ser anósmicas se identificaron los genes candidatos involucrados en la expresión del CO larval. Para esto se realizó una búsqueda bioinformática en las regiones eucromáticas del genoma secuenciado de *D. melanogaster* (Adams *et al.* 2000; Celniker y Rubin 2003), utilizando la herramienta *blast* de *FlyBase* (flybase.org/blast/). Se empleó como sonda *in silico* la secuencia flanqueante antes mencionada. De esta manera se accedió a información relacionada con el gen interrumpido por el elemento *P*.

El diseño experimental que se implementó en la presente Tesis permitió aproximarse al estudio de los cambios en las bases genéticas del CO larval entre estímulos químicos diferentes. Para evaluar cuantitativamente este cambio se realizó un análisis conjunto de 21 líneas BDGP que resultaron ser anósmicas ante alguno de los tres estímulos químicos en la pruebas de Dunnett; y en las cuales el CO larval fue cuantificado en respuesta a los tres estímulos químicos. Para estas líneas se calculó la magnitud absoluta de la respuesta olfativa mutante (es decir, las diferencias fenotípicas entre la línea mutante y el control libre de mutaciones) en los tres estímulos químicos como: $|IRL_{Línea\ BDGP} - IRL_{ISOB}|$. A pesar de ser anósmicas, las líneas BG01257, BG01330, BG01376, BG01600 no se incluyeron en el análisis porque en estas líneas el CO larval no fue evaluado en todos los estímulos químicos. El análisis se realizó mediante un ANOVA, en donde cada estímulo es un nivel del factor Ambiente y cada línea BDGP un nivel del factor Genotipo. Se utilizó el siguiente modelo:

$$Y: \mu + L + E + L \times E + E_r.$$

donde las fuentes de variación son: L: Línea, E: Estímulo y LxE: interacción entre los factores Línea y Estímulo; y E_r es la varianza entre réplicas. Una interacción LxE significativa, es indicativa de que existe interacción genotipo por ambiente (interacción GxA). La interacción GxA es causada en este caso por una respuesta heterogénea entre las diferentes líneas mutantes BDGP ante los diferentes estímulos químicos; es decir por una variabilidad de las normas de reacción entre dichas líneas. La norma de reacción es

la respuesta fenotípica de un mismo genotipo en ambientes diferentes (Schlichting y Pigliucci 1998; Anholt y Mackay 2004).

Expresión de genes candidatos a participar en la arquitectura genética del CO larval utilizando el sistema GAL4/UAS-CD8GFP.

Como se aprecia en la figura 2.1.1, *P[GT1]* contiene la secuencia del regulador positivo de la expresión GAL4 y los genes reporteros *neo* y *mini-white*. Para conocer el lugar de expresión de los genes candidatos se utilizó el sistema GAL4/UAS-CD8GFP. En las líneas BDGP la secuencia GAL4, presente en el elemento *P[GT1]*, queda bajo la influencia del promotor del gen que dicho elemento interrumpió. Es decir, la proteína GAL4 se expresa en el momento y lugar en que normalmente lo hace el gen interrumpido. Por otro lado, la línea *W/+;UAS-CD8::GFP/CyO;TM3/+* presenta la secuencia de la proteína fluorescente verde (*GFP*) río abajo del promotor UAS, el cual es activado por GAL4. Al cruzar una línea BDGP cualquiera con *W/+;UAS-CD8::GFP/CyO;TM3/+*, GAL4 se une a UAS y promueve la expresión de GFP en el momento y lugar que lo hace normalmente el gen interrumpido. En este caso CD8-GFP es una proteína que se expresa en la membrana plasmática de las células. Para observar por este método la expresión de los genes candidatos las líneas BDGP que resultaron anósmicas se cruzaron con la línea *W/+;UAS-CD8::GFP/CyO;TM3/+*. Las larvas de aproximadamente 48 hs descendientes de este cruzamiento se observaron “*in vivo*” enteras en un microscopio con filtro fluorescente. En los casos que se pudo observar señal fluorescente verde en cualquier órgano, estructura, etc. larval se interpretó como que ese es sitio de expresión del gen mutado por *P[GT1]*.

Para utilizar como referencias comparativas con la señal fluorescente en las líneas BDGP cada experimento fue acompañado de un control negativo (ISOB x *W/+;UAS-CD8::GFP/CyO;TM3/+*), en donde se espera no exista señal fluorescente; y un control positivo (*engrailed-Gal4* x *W/+;UAS-CD8::GFP/CyO;TM3/+*) en donde se espera que exista señal fluorescente en zonas ya conocidas de la larva. En el control positivo utilizado, la línea *engrailed-Gal4* presentó expresión en el sistema traqueal larval. Todos los controles funcionaron correctamente.

2.1.3. Resultados.

Búsqueda de líneas mutantes para el CO larval.

En los ensayos en los cuales se utilizó Ácido Propiónico como estímulo se analizaron 102 líneas diferentes cuya localización fue: 36,8 %, 41,1 % y 22,1 % en el cromosoma II, III y el X, respectivamente. Para el Benzaldehído se analizaron 100 líneas, en un 37,5 % de las cuales el elemento *P* se localizó en el cromosoma II, en un 41,5 % en el cromosoma III y en las 21 % en el X. Para el Nonanol se analizaron 106 líneas donde la inserción se ubicó en el cromosoma II, III y el X en un 38 %, 42 % y 20 %, respectivamente.

El IRL medio de las líneas BDGP cuando el estímulo fue Ácido Propiónico fue de 20,188 y el del control 27,924. Para Benzaldehído las líneas BDGP presentaron un IRL medio de 10,276 y la línea ISOB de 13,124. En cuanto a la respuesta al Nonanol, los IRL medios fueron -14,97 y -24,67, para las líneas mutantes y el control, respectivamente. Estos resultados son los esperados según los reportes previos sobre el tipo de respuesta comportamental que los químicos empleados generan en larva de segundo estadio de *D. melanogaster*: atrayente para el Ácido Propiónico y Benzaldehído y, repelente para el Nonanol.

El análisis del total de las líneas BDGP evaluadas resultó en que el factor Línea del ANOVA general fue significativo para cada estímulo (Tabla 2.1.1).; este resultado se interpreta como la existencia de una importante variabilidad genética mutacional para el CO larval en respuesta a cada uno de los tres estímulos químicos analizados. De los 3 estímulos empleados el Ácido Propiónico fue el que exhibió la mayor variación genética mutacional ya que el 32,4 % de la variación fenotípica total del CO larval se debe a las diferencias entre líneas, es decir al efecto causado por la inserción del elemento transponible. Por su parte, las diferencias entre líneas para el Nonanol representaron el 24,6 % mientras que para el Benzaldehído el componente genético representó el 17,1 % de la variación fenotípica total.

La variabilidad genética mutacional encontrada se debe al efecto de las mutaciones por elemento *P* sobre el CO larval. Tal como se mencionó en los materiales y métodos, la comparación de las líneas mutagenizadas con el control libre de mutaciones en cada bloque permite identificar las líneas BDGP anósmicas y

posteriormente los genes interrumpidos en éstas. En la Tabla 2.1.2 se observan las líneas BDGP que presentaron un valor de IRL significativamente menor (en el caso de los estímulos atrayentes: Ácido Propiónico y Benzaldehído) o mayor (en el caso del estímulo repelente Nonanol) que la línea control libre de inserciones según la prueba de Dunnett (datos no presentados). De las 102, 100 y 106 líneas analizadas para el Ácido Propiónico, Benzaldehído y Nonanol, 17, 3 y 8 líneas presentaron un fenotipo anósmico, respectivamente. Los genes mutados en dichas líneas se consideran genes candidatos a participar en la arquitectura genética del CO larval. Los genes candidatos *Hsp27*, *CG32572* y *CG6175* son compartidos entre Ácido Propiónico y Nonanol; y *jing* entre Ácido Propiónico y Benzaldehído.

Estímulo	G. L.	<i>F</i>	<i>p</i>	% σ^2_L
Ácido Propiónico	101	3,97	$< 1 \times 10^{-6}$	32,4
Benzaldehído	99	2,265	$< 1 \times 10^{-6}$	17,1
Nonanol	105	3,032	$< 1 \times 10^{-6}$	24,6

Tabla 2.1.1: Se destacan algunos de los parámetros de los ANOVAS generales (incluyen a todas las líneas BDGP analizadas en cada estímulo). G. L.: Graos de Libertad; *F*: valor del estadístico F para cada factor; *p*:- valor de *p* del factor línea para el ANOVA general de cada estímulo, % σ^2_L : Porcentaje de la variancia fenotípica total explicado por el factor Línea.

Del total de genes candidatos a participar del CO larval identificados 5 son también genes candidatos a participar del CO adulto: *Spinophilin*, *jing*, *bicoid-interacting protein 3*, *Rtnl1* y *couch potato* (Sambandan *et. al* 2006).

Línea	Gen Candidato	Posición Citológica	Sitio de inserción de <i>p[GT1]</i>	Función Biológica
Ácido Propiónico				
BG00737	<i>Hsp27</i>	3L, 67B1	En el gen	Determinación de la longevidad - Respuesta al calor
BG01011	<i>Spinophilin (spn)* /misshapen (msn)</i>	3L, 62E6	55 pb río arriba del extremo 5' /1443 pb río abajo del extremo 3'	Comportamiento olfativo adulto/ Desarrollo
BG01179	<i>defense repressor 1 (dnr1)</i>	2R, 58E9- 58F1	En el gen	Respuesta inmune
BG01223	<i>Glutamine synthetase 2 (Gs2)</i>	X, 10B11	En el gen	Catabolismo del Glutamato
BG01228	<i>derailed (drl)</i>	2L, 37C7	22,8 kpb río abajo del extremo 3'	Desarrollo - Aprendizaje olfativo - Morfogénesis
BG01257	<i>jing*</i>	2R, 42B3	290 pb río abajo del extremo 5'	Comportamiento olfativo adulto - Desarrollo del sistema nervioso.
BG01330	<i>CG11883</i>	2R, 47B1	En el gen	Catabolismo de nucleótidos
BG01376	<i>Chd64</i>	3L, 64A6- 64A7	En el gen	Contracción muscular
BG01380	<i>Oseg4 / draper (drpr)</i>	3L, 62B1	En el gen	Fisiología celular/ Comportamiento locomotor larval

Continúa en la hoja siguiente.

Viene de la hoja anterior.

BG01399	<i>CG17646</i>	2L, 22B1- 22B2	En el gen	Metabolismo celular
BG01404	<i>bicoid-interacting protein 3</i> (<i>bin3</i>)*	2R, 42A13- 42A14	En el gen	Regulación de la transcripción - Comportamiento olfativo adulto
BG01515	<i>female sterile (1) homeotic</i> (<i>fs(1)h</i>)	X, 7D3-7D5	En el gen	Regulación de la transcripción
BG01683	<i>CG32572</i>	X, 15A3	En el gen	-
BG01733	<i>CG6175</i>	3L, 68C1-C2	2725 pb río arriba del extremo 5'	-
BG02042	<i>easily shocked (eas)</i>	X, 14B7	En el gen	Desarrollo del cerebro - Comportamiento mecanosensorial
BG02081	<i>RtnI1</i> *	2L, 25B9-C1	En el gen	Comportamiento olfativo adulto
BG02823	<i>scylla (scyl)</i>	3L, 68B4-C1	130 pb río abajo del extremo 5'	Regulación negativa del crecimiento - Muerte celular
Benzaldehído				
BG01735	<i>big brain (bib)</i>	2L, 30F5	En el gen	Desarrollo temprano Comportamiento olfativo adulto -
BG01897	<i>jing</i> *	2R, 42C1	143 pb río arriba del extremo 5'	Desarrollo del sistema nervioso central.
BG02102	<i>l(2)05510</i>	2R, 57A5-6	21, 5 kpb río arriba del extremo 5'	-

Continúa en la hoja siguiente.

Nonanol

BG00737	<i>Hsp27</i>	3L, 67B1	En el gen	Determinación de la longevidad del adulto - Respuesta al calor
BG01043	<i>Gp150</i>	2R, 58D3	En el gen	Metabolismo - desarrollo
BG01173	<i>CG5361</i>	3R; 85F9	11,8 kpb río arriba del extremo 5'	Metabolismo
BG01315	<i>couch potato(cpo)*</i>	3R, 90D1-90E1	En el gen	Comportamiento olfativo adulto - Desarrollo del sistema nervioso periférico
BG01324	<i>cricketlet (clt)</i>	2R, 57F4	En el gen	-
BG01600	<i>Chronologically inappropriate morphogenesis (chinmo)</i>	2L, 22A5-8	1244 pb río arriba del extremo 5'	Desarrollo del sistema nervioso
BG01683	<i>CG32572</i>	X, 15A3	En el gen	-
BG01733	<i>CG6175</i>	3L, 68C1-C2	2725 pb río arriba del extremo 5'	-

Tabla 2.1.2: Se muestran las líneas BDGP que mostraron una diferencia significativa del control libre de inserciones en el test de Dunnett, las cuales son consideradas anósmicas. Los genes candidatos a participar en la expresión del CO larval, son aquellos interrumpidos por el elemento *p[GT1]* en las líneas BDGP anósmicas. * indica los genes que también han sido encontrados como participantes de la expresión del CO adulto (Sambandan *et al.* 2006). En negrita se destacan las líneas que presentan un comportamiento larval anósmico en respuesta a dos estímulos químicos diferentes. La información sobre Posición citológica, Sitio de inserción de *p[GT1]* y Función biológica fue obtenida de la base de datos *FlyBase* (flybase.org).

Por otro lado, con la finalidad obtener evidencia independiente que permita fortalecer la consideración de genes candidatos a participar en el CO larval a los genes identificados en el estudio de pérdida de función, se realizaron experimentos utilizando el sistema GAL4/US-CD8GFP para localizar la estructura y/o los órganos de la larva en donde estos genes se expresan. En 9 líneas BDGP se encontró una señal de expresión lo suficientemente clara que permite puntualizar la estructura o órgano larval donde el gen candidato se expresa. Interesantemente, en 6 de los genes candidatos (*fs(1)h*, *dnr1*, *bin3*, *spn / msn* y *scyl*) la señal de expresión indica que los mismos se expresan en el sistema nervioso central de la larva; es decir, en los hemisferios cerebrales y/o en el cordón nervioso central en forma de cono. *CG32572* se expresó en una estructura del sistema nervioso (posiblemente uno de los ganglios sensoriales) cercana a la periferia del mismo, pero que no forma parte de ésta. Los genes candidatos *eas*, *scyll* y *chinmo* se expresan en el sistema traqueal. Por último, el gen *Rtn11* es el único que evidencia señales de expresarse en la periferia del sistema nervioso, en lo que parece ser un conjunto de neuronas o interneuronas que se extienden hacia al extremo anterior de la larva en donde se ubica el sistema nervioso periférico (posiblemente al complejo formado por el Órgano Dorsal y el Órgano Terminal) (Figura 2.1.4).

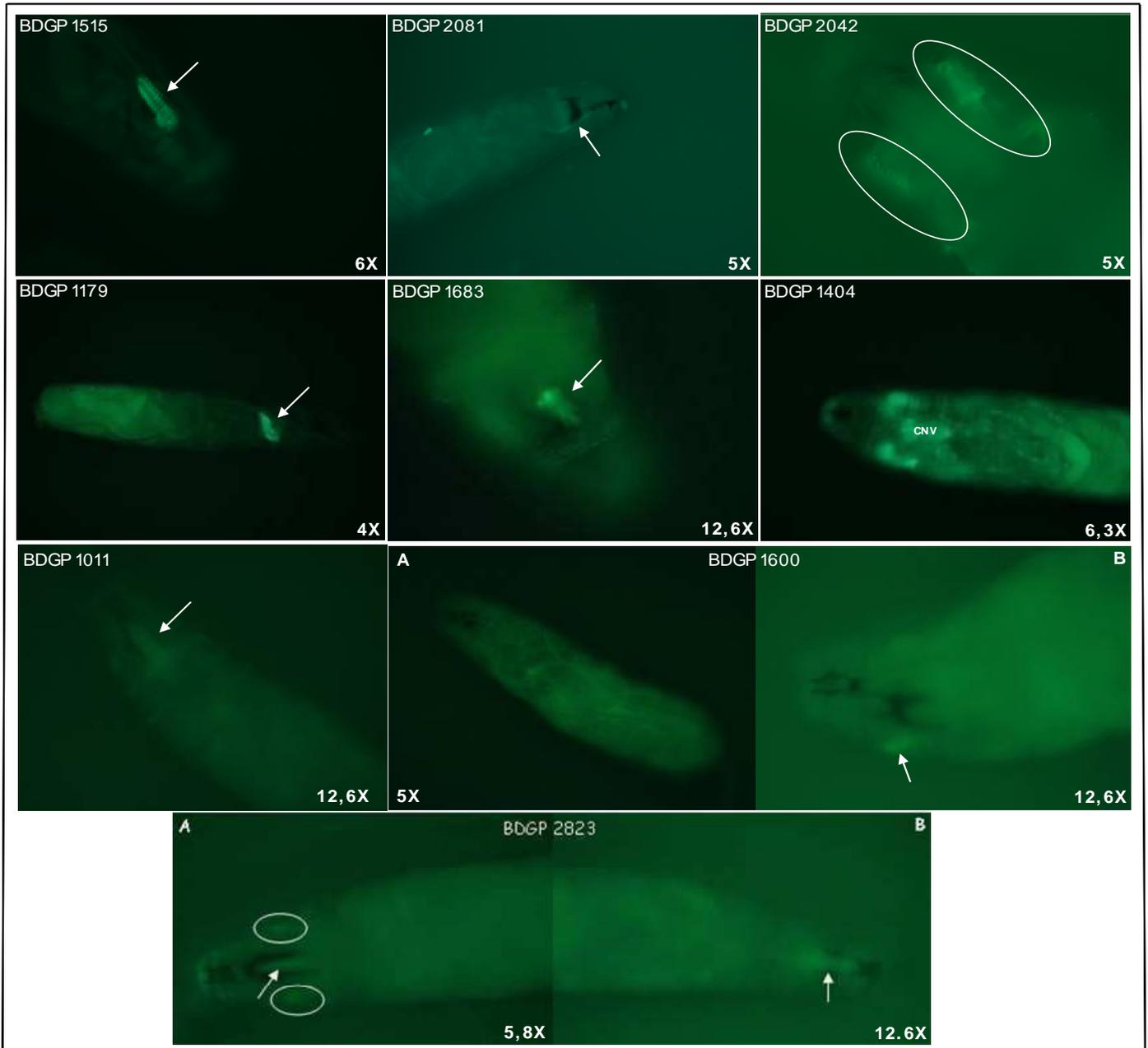


Figura 2.1.4: Fotografías de larvas *in vivo* mediante un microscopio para observar fluorescencia. Las larvas son descendientes del cruzamiento: Línea BDGP x *W+/+;UAS-CD8::GFP/CyO;TM3/+*, en las cuales la señal fluorescente indica expresión del gen mutado. En el vértice inferior derecho de cada imagen se especifica el aumento al que fue tomada. Descripción en detalle: **BG01515** (*fs(I)h*): vista ventral de la zona anterior (o cefálica); se destaca expresión en uno de los hemisferios cerebrales y en el cordón nervioso ventral en forma de cono. **BG02081** (*RtnI1*): vista dorsal de la zona anterior (o cefálica); se destaca expresión en un conjunto de neuronas que se extienden hacia al extremo anterior en donde se ubica el sistema nervioso periférico (posiblemente al complejo formado por el Órgano Dorsal y el Órgano Terminal). Estas pueden ser neuronas sensoriales o interneuronas. **BG02042** (*eas*): vista ventral de la zona anterior (o cefálica), se detectó expresión en la parte anterior del sistema traqueal. **BG01179** (*dnr1*): Vista lateral (dorsal arriba) de la larva completa; se destaca la expresión en el cordón nervioso ventral en forma de cono. **BG01683** (*CG32572*): vista dorsal de la zona anterior (o cefálica); se detectó expresión en un elementos del sistema nervioso cercano a la periferia del mismo, pero que no forma parte de ésta (la expresión se observa en lo que posiblemente sea uno de los ganglios que se ubican cercanos a los órganos sensoriales larvales). **BG01404** (*bin3*): vista dorsal de la zona anterior (o cefálica); se destaca expresión en los hemisferios cerebrales y en el cordón nervioso ventral en forma de cono (CNV). **BG01011** (*spn / msn*): vista ventral de la zona anterior (o cefálica); se destaca señal fluorescente débil en los hemisferios cerebrales y en el cordón nervioso ventral en forma de cono. **BG01600** (*chinmo*): A) vista dorsal de la larva total, se observa señal en el sistema traqueal; B) vista dorsal de la zona anterior (o cefálica), se destaca la expresión en la parte anterior del sistema traqueal. **BG02823** (*scyl*): A) vista dorsal de la zona anterior (o cefálica), se destaca el cordón nervioso ventral en forma de cono y la parte anterior del sistema traqueal; B) vista ventral de la zona anterior (o cefálica); se observa expresión en el cordón nervioso ventral en forma de cono. No se encontró señal en las líneas BG0737, BG01043, BG01223, BG01324, BG01330, BG01380, BG01399, BG01733, BG01735, BG02102. No se analizaron las líneas: BG01173, BG01228, BG01257, BG01315, BG01376, BG01897.

Análisis cuantitativo del CO larval en las líneas mutantes en diferentes ambientes químicos.

El factor Línea x Estímulo del ANOVA para evaluar cuantitativamente si existen diferencias en la respuesta olfativa de las líneas BDGP anósmicas entre los diferentes estímulos químicos resultó significativo cuando se evaluaron todas las líneas en un mismo análisis ($F_{40, 333} = 3,497$; $p < 0,0001$). Sin embargo, cuando el análisis se realizó por un lado entre las líneas que presentaron un fenotipo anósmico en respuesta a solamente un químico y por otro lado entre las que presentaron un fenotipo mutante en respuesta a más de un químico (BG0737, BG01683 y BG01733), el factor Línea x Estímulo fue significativo en el primer caso ($F_{34, 269} = 3,155$; $p < 0,0001$) y no en el segundo ($F_{4, 64} = 1,069$; $p = 0,379$). Es decir, la respuesta diferencial entre líneas ante la heterogeneidad de ambientes se debe probablemente a las líneas que son mutantes solamente para un químico. En estos ANOVAs la significancia se evaluó corrigiendo el α global según el método de Bonferroni.

Estos resultados indican que las magnitudes de la respuestas olfativas mutantes (es decir, las diferencias fenotípicas entre las líneas mutantes y el control libre de mutaciones) entre “ambientes químicos” no fueron iguales entre las diferentes líneas BDGP que fueron mutantes sólo para un estímulo y no lo fueron para las mutantes en más de un estímulo. Este resultado representa una manifestación cuantitativa del resultado previo en el cual la mayoría de las líneas presentaron un fenotipo anósmico en respuesta a un químico y no a los demás; con la excepción de BG0737, BG01683 y BG01733 que presentaron un fenotipo mutante tanto en respuesta a Ácido Propiónico como a Nonanol (Tabla 2.1.2).

El efecto de la mutación sobre el fenotipo olfativo depende del estímulo químico. Como estas líneas presentan diferencias genéticas; y si consideramos a los tres estímulos químicos utilizados como “ambientes químicos” diferentes; lo que se observó es variabilidad de las normas de reacción entre los diferentes “ambientes químicos”. Es decir, interacción GxA.

2.1.4. Discusión y Conclusiones.

En el presente capítulo de la tesis se cuantificó el comportamiento olfativo larval en respuesta a tres estímulos diferentes (Ácido Propiónico puro –atractivo-, Benzaldehído 1 % v/v –atractivo- y Nonanol puro –repulsivo-) en líneas que presentan

mutaciones únicas por la inserción de un elemento *P*. Fue posible identificar genes candidatos a participar en la arquitectura genética del CO larval (Tabla 2.1.2). Estos genes candidatos son propuestos como genes olfativos por primera vez en esta tesis.

Las funciones biológicas reportadas en la base de datos *FlyBase* para los genes candidatos son heterogéneas; pero se puede destacar que en un alto porcentaje son genes que participan en el desarrollo (en algunos caso se especifica que se trata del desarrollo del sistema nervioso o del desarrollo temprano; y en otros sólo se informa que participan en algún aspecto del desarrollo) y en diferentes caracteres comportamentales. En menor medida presentan funciones biológicas de regulación de la transcripción y metabólicas (Tabla 2.1.2). Dos de las líneas mutantes que resultaron ser anósmicas, las líneas BG01011 y BG01380, merecen una discusión más detallada, ya que las inserciones del elemento *P* en ellas afectaron a más de un gen. En el primer caso el elemento transponible se insertó a 55 pb río arriba del extremo 5' de *Spinophilin* y a 1443 pb río abajo del extremo 3' de *misshapen* (Tabla 2.1.2). Si bien la inserción se localiza más cerca del gen *spn*, no se puede descartar que el gen involucrado en el comportamiento olfativo larval sea *msn*; ya que la distancia de éste al punto de inserción queda dentro del rango de acción del elemento *P* (Bellen *et al.* 2004). En este caso un estudio de reversión de la inserción (para una descripción de la metodología ver Ganguly *et al.* 2003) permitiría discernir si solamente uno o si ambos de estos genes afectan el carácter que se está analizando. El caso de la línea BG01380 es más complejo, ya que el elemento transponible afecta a dos genes simultáneamente: *Oseg4* y *draper*. Existe una región de solapamiento entre estos dos genes de 100 pb que es donde se produjo la inserción. Lamentablemente, un estudio de revertantes no podrá esclarecer cuál de los dos o si ambos genes afectan la normal expresión fenotípica del comportamiento olfativo en larvas de *D. melanogaster*.

Del total de las líneas analizadas el 9 % mostró diferencias significativas respecto del control libre de mutaciones; este porcentaje de líneas mutantes anósmicas en el CO larval es similar al 4% (Anholt *et al.* 1996) y al 6% (Sambandan *et al.* 2006) encontrados para el CO adulto en dos estudios que utilizaron también una estrategia de pérdida de función por inserción de un elemento *P*. Por el contrario, estos porcentajes son marcadamente menores que los reportados en estudios que analizaron la arquitectura genética de otros caracteres en *D. melanogaster*. Lyman *et al.* (1996) y Norga *et al.* (2003) mostraron que alrededor del 20 % de las inserciones del elemento *P* tienen un efecto sobre el número de quetas sensoriales del adulto; Carreira *et al.* (2009)

y Mensch *et al.* (2008) reportaron que el porcentaje fue de 60 % para caracteres vinculados con el tamaño corporal y el tiempo de desarrollo, respectivamente; y Harbison *et al.* 2004 reportó que un 41% de las inserciones del elemento *P* tienen un efecto sobre la resistencia a la inanición. Es esperable que si existen diferencias en las arquitecturas genéticas, al menos en la cantidad de genes involucrados, los porcentajes de líneas que presentan pérdida de función sean también diferentes. Por lo tanto, las diferencias son menores para la arquitectura genética del olfato entre diferentes estadios del ciclo de vida de *D. melanogaster* que entre estos y otros caracteres.

La evidencia que permite caracterizar a estos genes como candidatos proviene de dos resultados experimentales independientes. Uno es el estudio de pérdida de función; al que se le suma un análisis de expresión con el sistema GAL4/UAS-CD8GFP. En éste fue posible precisar el órgano o estructura larval donde se expresan 9 de los genes candidatos. La mayoría de los genes candidatos que mostraron una señal positiva en este experimento se expresan en el sistema nervioso central de la larva, principalmente en los hemisferios cerebrales (*fs(1)h*, *bin3*, *spn / msn*) y el cordón nervioso ventral en forma de cono (*fs(1)h*, *dnr1*, *bin3*, *spn / msn*, *scyl*) (Figura 2.1.4). En estos dos órganos se encuentran la mayoría de los centros neuronales donde se procesa la información obtenida en la periferia del sistema sensorial (Greber y Stocker 2007). Únicamente el gen *Rtnll* presentó evidencias de expresarse en la periferia del sistema nervioso. En este sentido, podemos afirmar que la mayoría de los genes candidatos participan en una posición central en la compleja cadena de eventos que en última instancia termina siendo la respuesta olfativa. Cabe aclarar que un resultado positivo de este experimento es alentador para sumar evidencias sobre el rol biológico de estos genes como participantes de la arquitectura genética del CO; pero un resultado negativo (es decir no encontrar señal de expresión en larva de alguno de estos genes) no los descarta como candidatos, dado que este resultado se puede deber a una deficiencia de la técnica utilizada y no a una característica biológica del gen. Asimismo, si el gen candidato se expresa en una etapa del desarrollo previa a la analizada en este estudio, pero el efecto fenotípico se manifiesta en el estadio de larva 2 (el estadio donde se cuantificó el CO larvario y se observó expresión), posiblemente tampoco será posible detectar señal de expresión. Teniendo en cuenta los resultados discutidos hasta el momento, se demostró que la arquitectura genética del CO larval en *Drosophila melanogaster* es compleja y en ella participan numerosos genes con funciones moleculares y biológicas heterogéneas, y no solamente los expresados a un nivel periférico (genes RO y PUO).

En otro estudio utilizando las mismas líneas BDGP (Sambandan *et al.* 2006) han sido informados 5 de los genes candidatos a participar en el CO larval (*Spinophilin*, *jing*, *bicoid-interacting protein 3*, *Rtnl* y *couch potato*) como genes de olfato en el estadio adulto del ciclo de vida de *D. melanogaster* (Tabla 2.1.2). En dicho trabajo se reportan además otras 28 líneas BDGP anósmicas en respuesta al Benzaldehído que fueron analizadas también en larva en esta tesis, pero que no han presentado un fenotipo que permita calificarlas como anósmicas; y por lo tanto tampoco a los genes interrumpidos en ellas como candidatos a participar en el CO larval. Es decir, el CO larval comparte con el adulto cierto número de genes, ya sean genes RO (Vosshall y Stocker 2007), genes PUO (Galindo y Smith 2001; Zhuo *et al.* 2009) o genes que no participan en la periferia del sistema olfativo como *Spinophilin*, *jing*, *bicoid-interacting protein 3*, *Rtnl*, *couch potato*; pero además presenta genes que son candidatos a ser exclusivos del olfato larval, como los 21 restantes encontrados en esta tesis y que previamente no han sido reportados con una función biológica olfativa en adulto. Se corroboró así la hipótesis que plantea que existe un cierto grado de solapamiento entre la arquitectura genética del CO entre diferentes estadios ontogenéticos del ciclo de vida de *D. melanogaster*. Esto se da tanto a nivel periférico del sistema olfativo como en un nivel central del CO larval.

Teniendo en cuenta que se identificaron genes que participan en el CO larval frente a diferentes estímulos químicos, es posible saber qué porcentaje de los genes candidatos son exclusivos y cuáles participan en la expresión de la respuesta olfativa para más de un estímulo químico. De los 26 genes candidatos solamente 4 lo son en más de un estímulo químico: *Hsp27*, *CG32572* y *CG6175* son compartidos entre Ácido Propiónico y Nonanol; y *jing* entre Ácido Propiónico y Benzaldehído (Tabla 2.1.2). Si se considera a los diferentes estímulos químicos como representaciones de “ambientes químicos” diferentes, entonces los factores genéticos que participan en la arquitectura genética del CO en los diferentes “ambientes químicos” no son los mismos, aunque existe un número común minoritario. Como era de esperar, sólo existen diferencias cuantitativas en las magnitudes de la respuestas olfativas mutantes para los diferentes estímulos químicos entre las líneas BDGP que presentaron un fenotipo anósmico en respuesta a solamente un químico. Esta variabilidad de las normas de reacción entre los diferentes “ambientes químicos” representa un fenómeno de interacción GxA para el CO. El conjunto de los resultados discutido en los dos párrafos previos permite concluir que la arquitectura genética del CO no sólo presenta cierto grado de diferenciación entre

estadios del ciclo de vida, sino que también sucede lo mismo entre diferentes “ambientes químicos”.

En cuanto a los diferentes modelos propuestos como bases mecánicas que subyacen a la plasticidad fenotípica y la interacción GxA; la mayoría de los genes candidatos encontrados que participan diferencialmente del CO larval entre “ambientes químicos” son genes que por sus funciones biológicas aparentan hacerlo directamente sobre el fenotipo olfativo; excepto *bin3* y *fs(1)h* que claramente son genes regulatorios y por lo tanto podrían regular a genes que afecten directamente el fenotipo olfativo, influyendo en éste indirectamente. Estos resultados son más consistentes con el modelo de “sensibilidad alélica” en la versión que propone expresión de genes diferentes en ambientes diferentes. De todos modos, en menor medida también son congruentes con el modelo de “regulación genética”. Esta conclusión aparentemente contradictoria, no sería del todo inapropiada ya que como han señalado Via *et al.* (1995) estos modelos no son mutuamente excluyentes. De hecho, dos estudios previos en el olfato adulto de *D. melanogaster* han mostrado resultados que apoyan ambos modelos. Por un lado, Sambandan *et al.* (2006) demostró que variaciones sutiles en el ambiente cambian los efectos que dos genes con funciones de regulación de la transcripción tienen sobre los demás genes miembros de una red epistática que afecta al fenotipo olfativo; estos genes regulatorios controlan indirectamente el cambio fenotípico ante la heterogeneidad ambiental como plantea la hipótesis de “regulación genética”. Por otro lado, en un estudio posterior Sambandan *et al.* (2008) han encontrado que otros dos genes candidatos (que no son regulatorios) cambian su patrón de expresión y consecuentemente su influencia directa sobre el fenotipo olfativo adulto cuando la mosca es criada en ambientes diferentes; siendo ésta evidencia a favor del modelo de “sensibilidad alélica”. Entonces, existen indicios suficientes para concluir que la interacción GxA es importante en la arquitectura genética del CO larval y que las bases genéticas de esta interacción son mayormente congruentes con el modelo de “sensibilidad alélica”.

A modo de resumen se puede concluir que en una búsqueda a escala genómica de genes involucrados en la arquitectura genética del comportamiento olfativo larval se identificaron 26 genes candidatos que presentan funciones biológicas heterogéneas. La mayoría de ellos participan en una posición central en la compleja cadena de eventos que determina el olfato larval. También se ha podido corroborar que existe un solapamiento entre la arquitectura genética del CO entre estadios ontogenéticos

diferentes del ciclo de vida de *D. melanogaster*, y que esto se da tanto en un nivel periférico como central del sistema olfativo larval. El mismo patrón se repite entre diferentes “ambientes químicos”, ya que los factores genéticos que participan en la arquitectura genética del CO en los diferentes “ambientes químicos” no son los mismos, aunque existe un número común minoritario. Por último, la interacción GxA es una parte importante de la arquitectura genética del CO larval y, los resultados apoyan que las bases mecánicas de esta interacción GxA son mayormente del tipo propuestas por el modelo de “sensibilidad alélica”.

2.2. Capítulo II.

Genética cuantitativa evolutiva del comportamiento olfativo larval y adulto en poblaciones naturales de *Drosophila melanogaster*.

2.2.1. Introducción.

Como se ha expuesto en otros trabajos y en el Capítulo I de esta sección, se pueden destacar dos características, presentes en el CO de *D. melanogaster*, que permiten afirmar que la arquitectura genética del mismo es la de un carácter complejo. En primer lugar, está determinada por múltiples genes que forman ensambles funcionales a través de interacciones tanto aditivas como no lineales (Anholt *et al.* 1996; Fedorowicz *et al.* 1998; Anholt *et al.* 2001; Anholt y Mackay 2001; Anholt *et al.* 2003; Sambandan *et al.* 2006), y en segundo lugar, presenta una importante sensibilidad a la heterogeneidad ambiental (Sambandan *et al.* (2006) (2008); Capítulo I - Sección II). Hasta el presente la mayoría de los estudios sobre las bases genéticas del CO en *D. melanogaster* han examinado los efectos de mutaciones en líneas isogénicas de laboratorio y se han enfocado mayoritariamente en el estadio adulto del ciclo de vida. Pero, para situar el estudio de la arquitectura genética del CO en un contexto que sea ecológica y evolutivamente relevante, es importante conocer la variabilidad fenotípica y las causas genéticas subyacentes a la misma en escenarios naturales y en ambos estadios del ciclo de vida. De esta manera se estaría investigando uno de los aspectos determinantes de la arquitectura genética según Hansen (2006): las propiedades variacionales. Más aún, resulta paradójico que, a pesar de la riqueza de conocimientos sobre las bases moleculares y los mecanismos fisiológicos del olfato en *Drosophila*, la variabilidad fenotípica y genética natural permanezcan casi inexploradas, a excepción de unos pocos casos (Alcorta y Rubio 1989; Mackay *et al.* 1996; Fanara *et al.* 2002). En el presente capítulo se describen las investigaciones cuyos objetivos fueron conocer cómo se distribuye en la naturaleza la variabilidad fenotípica y genética del CO tanto en el adulto como en larva de *D. melanogaster* y poner a prueba hipótesis sobre las fuerzas evolutivas que determinaron estos patrones de variabilidad.

Los conocimientos previos sobre las diferencias ecológicas y el modo de vida de los estadios larvales y el adulto, hacen presuponer que en el estadio larval y en el adulto

operan diferentes fuerzas evolutivas, o eventualmente diferentes intensidades de una misma fuerza (por ejemplo selección natural).

Las poblaciones naturales de una especie con una distribución cosmopolita como *D. melanogaster* habitan en ambientes que presentan una amplia heterogeneidad climática y nutricional (dado los diversos frutos en descomposición donde se crían). Desde la genética cuantitativa evolutiva se han desarrollado metodologías que permiten estudiar la respuesta de las poblaciones naturales a esta heterogeneidad. El análisis de la plasticidad fenotípica y la interacción GxA. (Via y Lande 1987; Via 1993; Schlichting y Pigliucci 1998) es una herramienta conceptual eficaz para dilucidar la/s estrategia/s que utiliza una especie para enfrentar la heterogeneidad ambiental. La plasticidad fenotípica y la interacción GxA son dos procesos que pueden llevar a la adaptación en las poblaciones naturales, y se ha propuesto que la plasticidad fenotípica juega un rol importante en la evolución como factor diversificador al contribuir al origen de nuevos caracteres y al alterar las direcciones de cambio de los mismos (West-Eberhard 1989). Existen también evidencias de que la variabilidad genética natural puede ser mantenida por la interacción GxA (Via y Lande 1987; Gillespie y Turelli 1989; Gurganus *et al.* 1998; Fernandez Iriarte y Hasson 2000; Ungerer *et al.* 2003; Fanara *et al.* 2006). En *D. melanogaster* se ha estudiado intensamente un caso particular de interacción GxA, la interacción genotipo por sexo (GxS) (Mikasi 1992; Mackay *et al.* 1996; Mackay y Lyman 1998; Vieira *et al.* 2000; Lyman *et al.* 2002; Anholt *et al.* 2003; Goenaga 2010; Goenaga *et al.* 2010), esta interacción se da cuando existe variación entre genotipos para la cantidad de dimorfismo sexual. El dimorfismo sexual se detecta como diferencias en los valores medios de un carácter entre machos y hembras de un mismo genotipo (Anholt y Mackay 2010).

Para alcanzar los objetivos generales que se describen en el presente capítulo se realizó una cuantificación del CO en el laboratorio, tanto en el estadio larval como en el adulto, en isolíneas derivadas de seis poblaciones naturales de *Drosophila melanogaster* ubicadas en el territorio Argentino.

Las hipótesis que se pusieron a prueba son las siguientes:

Existen diferencias fenotípicas, tanto para el CO adulto como larval, entre poblaciones naturales de *D. melanogaster*.

Existe variabilidad genética para el CO dentro de poblaciones; este patrón se interpreta como existencia de diferenciación genética entre poblaciones.

En las poblaciones naturales analizadas la interacción GxS es un componente importante en la arquitectura genética del CO en adulto, y presenta una sustancial heterogeneidad entre poblaciones.

La arquitectura genética del CO, en cuanto a variabilidad fenotípica y genética, varía entre larva y adulto para *D. melanogaster*. Particularmente el potencial para que suceda una adaptación (evolucionabilidad) al “ambiente quimiosensorial” es mayor en el estadio larval que en el estadio adulto.

2.2.2. Materiales y Métodos.

Generación y mantenimiento de líneas de trabajo.

Las líneas utilizadas se generaron de la siguiente manera: se colectaron hembras fecundadas de *Drosophila melanogaster* de seis poblaciones naturales del noroeste Argentino (Neuquén, Uspallata, Lavalle, Guemes, Chilecito y Cachi), con las que se fundaron alrededor de 20 isolíneas por cada población. Cada isolínea se constituyó por la descendencia de una única hembra capturada. Una revisión detallada, así como también la evaluación de la pertinencia del uso de isolíneas en estudios genético cuantitativos de insectos, se encuentra en (David *et al.* 2005). En la figura 2.2.1 se detallan la ubicación geográfica, presencia de planta hospedadora, latitud, altitud e información climática para cada población de origen de las isolíneas. Todas las líneas se mantuvieron por diez generaciones en un medio de laboratorio basado en harina de maíz y agar bajo condiciones controladas de temperatura (25 ± 1 ° C), humedad (70%); y un ciclo lumínico de 12-h luz:12-h oscuridad. De cada población se eligieron al azar de diez a doce isolíneas en las que se cuantificó el comportamiento olfativo en respuesta a Benzaldehído.



B

Población	Hospedador	Latitud (Sur)	Longitud (Oeste)	Altitud (mts.)	Temp. media anual (° C)	Número de líneas analizadas	
						larva	adulto
Guemes	Desconocido	24° 41'	65° 03'	695	20.2	11	10
Cachi	Uva	25° 07'	69° 09'	2280	10	10	10
Chilecito	Uva	29° 10'	67° 28'	1043	20	11	11
Lavalle	Uva, Membrillo	32° 50'	68° 28'	647	17.1	10	10
Uspallata	Manzana, Membrillo	32° 35'	69° 22'	1915	12.2	10	10
Neuquén	Manzana	38° 57'	68° 04'	260	*	10	11

Figura 2.2.1: **A** Ubicación de las seis poblaciones naturales de *D. melanogaster* de Argentina donde se recolectaron moscas: 1) Guemes (Provincia de Salta), 2) Cachi (Provincia de Salta), 3) Chilecito (Provincia de La Rioja), 4) Lavalle (Provincia de Mendoza), 5) Uspallata (Provincia de Mendoza) y 6) Neuquén (Provincia de Neuquén). **B** Características de las de las seis poblaciones naturales de *Drosophila melanogaster* de Argentina. * No hay datos disponibles de la población de Neuquén.

Ensayos comportamentales.

Larva: El CO larval en respuesta al estímulo químico Benzaldehído en una dilución de 1 % (v/v), se cuantificó de la mismo modo que se detalló en Materiales y Métodos del Capítulo I de esta sección. En estos experimentos se obtuvo un índice de respuesta larval (IRL). Se ha reportado previamente que Benzaldehído 1 % (v/v) es un estímulo atractivo para la larva de *D. melanogaster* (Ayyub *et al.* 1990; Oppliger *et al.* 2000; Ganguly *et al.* 2003).

Adulto: Para cuantificar el comportamiento olfativo adulto se utilizó el ensayo descrito por Anholt *et al.* (1996). Brevemente, las moscas adultas se colectaron de 3 a 5 días luego de su eclosión utilizando CO₂ como anestésico, luego se colocaron en grupos de cinco individuos por sexos separados en tubos de plástico de 2,5 x 8 cm sin medio de cría. El ensayo experimental se realizó 2 horas después de la separación en grupos para permitir que las moscas se recuperen del efecto del CO₂. Los tubos se marcaron con 2 líneas, una a 3 cm y otra a 6 cm del fondo del mismo. Durante el experimento, el tubo de plástico con las 5 moscas se colocó horizontalmente (para evitar efectos de geotaxis negativa) sobre una superficie blanca, y dentro de una cámara con las paredes blancas (para evitar efectos de fototaxis). Se insertó un hisopo con la cabeza de algodón del mismo bañada en una solución de Benzaldehído 0,3 % (v/v), el extremo del hisopo se alineó y se dejó fijo en la marca de 6 cm. Luego de la inserción del hisopo, se dejó recuperar a las moscas de la perturbación causada por la inserción del hisopo durante 15 segundos, y se contabilizó cada 5 segundos el número de moscas presentes en los 3 cm del fondo del tubo (son 10 conteos en total) (Figura 2.2.2). Finalmente, se calculó el índice de respuesta adulto (IRA) como el promedio de las 10 mediciones, este índice varía entre 0 (atracción total) y 5 (repulsión total). Estudios previos reportaron que el Benzaldehído en diluciones como la que se utilizó en estos experimentos es un estímulo repulsivo para el estadio adulto de *D. melanogaster* (Anholt *et al.* 1996; Mackay *et al.* 1996; Anholt *et al.* 2001; Anholt y Mackay 2001; Fanara *et al.* 2002).

Tanto los ensayos en larva como en adulto se realizaron entre las 14:00 y las 17:00 horas en una cámara experimental cerrada con temperatura (25° C ± 1), iluminación artificial (5,4 ± 0.2 x 10⁵ lx) y humedad (42 ± 5 %) controlada. Se cuantificó el comportamiento olfativo para adulto hembra, adulto macho y larva en 5-7 réplicas por isolínea.

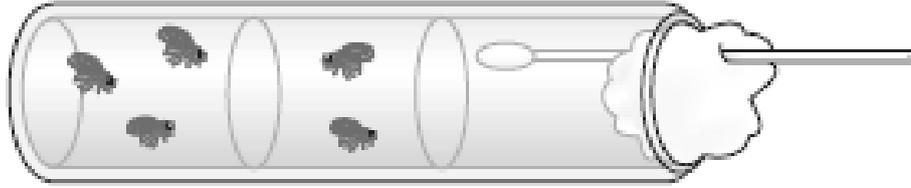


Figura 2.2.2: Representación esquemática de el ensayo comportamental para cuantificar el comportamiento olfativo en el estadios adulto. Extraído y modificado de Anholt y Mackay (2004).

Análisis Estadístico

El análisis de la magnitud de la variabilidad del CO larval se realizó mediante un ANOVA. Los valores analizados fueron los IRL de cada réplica de las diferentes isolíneas. El modelo de ANOVA utilizado fue el siguiente:

$$Y = \mu + P + L(P) + Er$$

donde μ es la media total y las fuentes de variación son: P factor Población que se consideró fijo en el análisis general comparativo y aleatorio para estimar el aporte de la variabilidad inter-poblacional, $L(P)$ es el factor aleatorio Línea anidado en Población; y Er estima la varianza entre los efectos medios de las réplicas, es decir el error.

Para cuantificar la magnitud de la variabilidad del CO adulto se utilizó un ANOVA anidado de tres factores. Los valores analizados fueron los IRA de cada réplica de las diferentes isolíneas El modelo es el siguiente:

$$Y = \mu + P + S + L(P) + PxS + L(P)xS + Er$$

donde S es el efecto fijo del Sexo y el resto de los factores son los mismos que en el análisis del CO larval. Si el factor $L(P)$ es significativo, indica que existen diferencias fenotípicas entre las isolíneas, dado que estas líneas representan genotipos diferentes y que el ambiente fue controlado; estas diferencias fenotípicas se deben entonces a las diferencias genéticas entre isolíneas. Por lo tanto, de obtener este resultado estadístico se concluye que el carácter analizado presenta variabilidad genética (el razonamiento es válido para el análisis en larva y en adulto). Mientras que si la interacción $L(P)xS$ exhibe resultado significativo, se interpreta como la existencia de una interacción genotipo por sexo (interacción GxS).

Se realizaron ANOVAs adicionales para cada población por separado de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y = u + L + S + LxS + Er$$

De la misma manera que en el ANOVA incluyendo a todas las poblaciones el factor L significativo indica que existe en la población variabilidad genética para el carácter analizado. La interacción LxS significativa se interpreta como la existencia de una interacción genotipo por sexo (interacción GxS).

La interacción GxS significativa puede surgir por causas diferentes: i) diferencias entre machos y hembras de la varianza entre líneas (cambio de magnitud) y/o ii) desviaciones de la unidad en la interacción genética entre sexos ($r_{GxS} < 1$; cambio de orden de clasificación). La contribución de estas dos fuentes de variación fue analizada por medio de la ecuación originalmente derivada por Cockerham (1963):

$$V_{GxS} = [(\sigma_{machos} - \sigma_{hembras})^2 + 2 \sigma_{machos} \sigma_{hembras} (1 - r_{GxS})] / 2$$

donde V_{GxS} es el componente de varianza del factor $L(P)xS$ del ANOVA general (o LxS en los ANOVAs por población), σ_{machos} y $\sigma_{hembras}$ son las raíces cuadradas de los componentes de varianza entre líneas en machos y hembras respectivamente y r_{GxS} es el coeficiente de correlación genética entre sexos.

$(\sigma_{machos} - \sigma_{hembras})^2$ representa la parte de la variación debida a un cambio de magnitud y se debe a las diferencias en la varianza entre líneas en diferentes ambientes. σ_{machos} y $\sigma_{hembras}$ fueron obtenidos de los ANOVAs realizados para cada sexo por separado y representan las raíces cuadradas de los componentes de varianza de los respectivos factores Línea.

$2 \sigma_{machos} \sigma_{hembras} (1 - r_{GxS})$ representa la parte de la variación debida un cambio de orden en la clasificación, se debe a desviaciones de la unidad en la correlación genética entre sexos. El coeficiente de correlación genética entre sexos (r_{GxS}) estima la correlación entre las mediciones del mismo carácter en diferentes sexos. Según Robertson (1959):

$$r_{GxS} = \sigma_{machos-hembras}^2 / \sigma_{machos}^2 \sigma_{hembra}^2$$

$\sigma^2_{machos-hembras}$ es el componente de varianza entre líneas del análisis sin separar los sexos. σ^2_{machos} σ^2_{hembra} son los componentes de varianza entre líneas de los análisis considerando a los sexos por separado.

Estimación de parámetros genético-cuantitativos

Dentro de cada población se calcularon para el CO larva y adulto diferentes parámetros genético-cuantitativos. Asumiendo un modelo aditivo, el componente de varianza entre líneas (σ^2_L) del ANOVA es una estimación de $2FV_G$ y el componente de varianza de la interacción LxS (σ^2_{LxS}) es una estimación de $2F(1/2V_G)$ (Mackay *et al.* 1996); en donde F es el coeficiente de endogamia y V_G la varianza genética. Debido a cruzamientos entre medios hermanos durante la fundación de las aislíneas, para éstas $F = 1/4$ (Hoffmann y Parsons 1988). Entonces la V_G del CO adulto equivale a $2\sigma^2_L + 4\sigma^2_{LxS}$; la varianza ambiental (V_A) fue estimada como el error del ANOVA; y la varianza fenotípica total (V_F) se estimó como $V_G + V_A$. Para el CO larval V_G se estimó como $2\sigma^2_L$, V_A como el error del ANOVA y la variancia fenotípica total es la suma de V_G y V_A . La heredabilidad se estimó, tanto para adulto como para larva, como $h^2 = V_G/V_F$ (Falconer y Mackay 1996). Dado que se asume un modelo aditivo, la heredabilidad estimada es la de sentido estricto e indica cuál es la capacidad de respuesta a la selección direccional del carácter en la población (Hedrick 2000). Para comparar la varianza genética del CO entre diferentes estadios utilizamos el coeficiente de varianza genética ($CV_G = 100(V_G)^{1/2}/X$, donde V_G es la varianza genética y X la media poblacional del IR). El CV_G es un indicador de la capacidad que presenta un determinado carácter de responder ante la selección natural y en la bibliografía se lo denomina “evolucionabilidad” (del termino en ingles *evolvability*) (Hedrick 2000). El beneficio de utilizar este parámetro alternativo al clásico h^2 , o a simplemente V_G , para comparar entre caracteres (en este caso CO de larva y adulto), radica en que dividir por la media en lugar de hacerlo por la varianza es más apropiado para estandarizar las varianzas genéticas cuando se comparan diferentes caracteres (Houle 1992; Hedrick 2000).

Todos los análisis estadísticos se realizaron empleando el software STATISTICA (Stat Soft, Tulsa, OK).

2.2.3. Resultados.

Variabilidad fenotípica para el CO de moscas adultas y larvas provenientes de diferentes poblaciones naturales.

Se cuantificó la respuesta olfativa en isolíneas derivadas de seis poblaciones naturales de Argentina (Figura 2.2.1). Las larvas provenientes de las poblaciones de Neuquén y Cachi mostraron una respuesta de rechazo al Benzaldehído, mientras que las larvas de todas las demás poblaciones mostraron un comportamiento de atracción (Figura 2.2.2A).

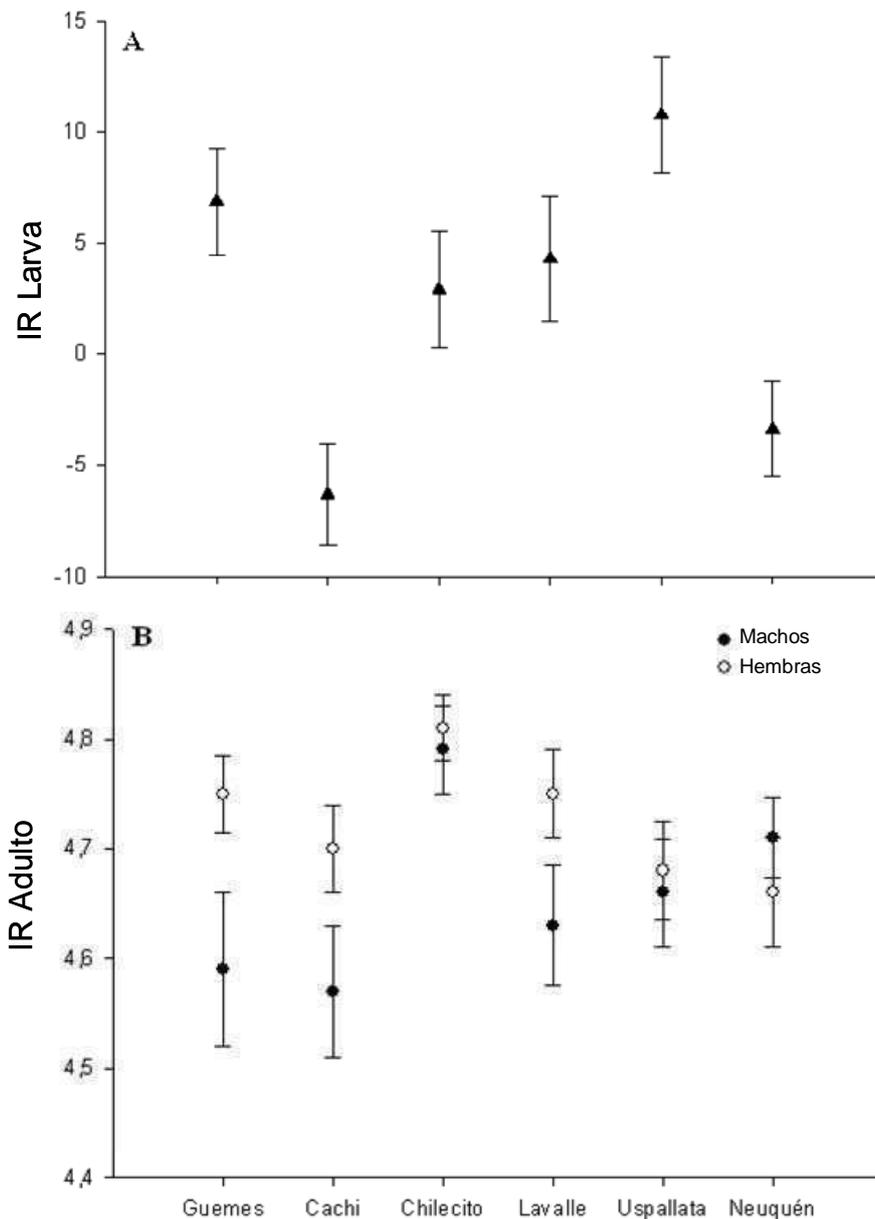


Figura 2.2.2: Respuesta olfativa larval (A) y adulta (B) de *Drosophila melanogaster* en las diferentes poblaciones naturales de Argentina. Se muestran la media y el error estándar de los IR para Benzaldehído. ▲ representa el IR medio larval, ● representa el IR medio de los machos adultos, y ○ representa el IR medio de las hembras adultas.

En cambio, las moscas adultas de todas las poblaciones rechazaron al Benzaldehído. En este estadio, los valores medios para la respuesta olfativa al Benzaldehído son similares entre las diferentes poblaciones, excepto para las moscas de Chilecito que muestran una mayor respuesta de rechazo (Figura 2.2.2B).

Los resultados de los ANOVAs generales para analizar la variabilidad del CO larval y adulto se resumen en la tabla 2.2.1. El ANOVA general reveló que existe variación entre isolíneas tanto para el CO adulto como larval (el factor Línea (Población) es significativo en ambos casos), indicando la existencia de variabilidad genética dentro de las poblaciones naturales. Sin embargo, en tanto que no existe una diferenciación fenotípica cuantitativa en la respuesta olfativa del estadio adulto en las poblaciones naturales analizadas (el factor Población del ANOVA en adulto resultó no significativo), la respuesta olfativa larval mostró una vasta diferencia entre poblaciones (el factor Población del ANOVA fue significativo), sugiriendo que entre poblaciones la información genética para este carácter (CO larval asociado a la respuesta a Benzaldehído) es diferente. De hecho, la variabilidad inter-poblacional explicó un 7,9% de la variabilidad fenotípica total del CO; es decir, si bien la variabilidad inter-poblacional tiene incidencia en la total, ésta es minoritaria.

Fuente de Variación	Larva			Adulto		
	G.L.	<i>F</i>	<i>p</i>	G.L.	<i>F</i>	<i>p</i>
Población	5	4,365	0,0019	5	0,88	0,503
Sexo	–	–	–	1	4,34	0,0415
Población x Sexo	–	–	–	5	0,96	0,4483
Línea (Población)	56	1,921	0,0002	58	2,49	0,0003
Sexo x Línea (Población)	–	–	–	58	1,99	<0,0001
Error	346	-	–	720	-	–

Tabla 2.2.1: Resumen de los ANOVAs para la respuesta olfativa adulta y larval al Benzaldehído en isolíneas derivadas de poblaciones naturales de Argentina. G.L.: Grados de Libertad, *F*: valor del estadístico *F* para cada factor, *p*: *p*-valor para cada factor. En negrita los factores significativos.

Por otra parte, no se encontró una correlación significativa entre el CO larval o adulto y la latitud o altitud de origen de las poblaciones ($F_{2,60} = 0,34$, $p = 0,71$ para latitud y altitud en CO del macho adulto; $F_{2,60} = 0,53$, $p = 0,59$ para latitud y altitud en CO de la hembra adulta; $F_{2,59} = 0,3$, $p = 0,74$ para latitud y altitud en CO larval).

Utilizando una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis se encontraron diferencias significativas, entre y dentro de poblaciones, entre los coeficientes de variación ($CV = \text{desvío estándar} / \text{media}$) del CO larval y adulto (Tabla 2.2.2). Este resultado indica que en promedio las poblaciones mostraron diferencias en la arquitectura genética del olfato entre larva y adulto de *D. melanogaster*. Además, las diferencias se manifiestan también en todas las poblaciones analizadas individualmente.

	H	p
Entre Poblaciones	76,38	< 0,001
Uspallata	14,29	< 0,001
Guemes	11,88	< 0,001
Lavalle	14,29	< 0,001
Cachi	10,08	0,015
Neuquén	8,75	0,031
Chilecito	15,51	0,001

Tabla 2.2.2: Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis entre los coeficientes de variación del CO larva y adulto.

Interacción genotipo por sexo (GxS) en el CO adulto.

El comportamiento olfativo adulto mostró un marcado dimorfismo sexual, indicado por el factor Sexo significativo en el ANOVA. Que el factor de interacción Sexo x Línea (Población) sea también significativo revela que existe en las poblaciones naturales de Argentina interacción GxS para el CO adulto (Tabla 2.2.1). Para determinar en cuáles de las poblaciones analizadas la interacción GxS contribuye a la varianza fenotípica total del CO adulto se realizaron análisis particulares en cada población. Los

resultados, resumidos en la tabla 2.2.3, muestran que mientras que la interacción GxS no contribuye a la variabilidad fenotípica total en las poblaciones Uspallata, Chilecito, Neuquén y Cachi; representa el 17,9% y el 41,8% de la variabilidad fenotípica total en Guemes y Lavalle, respectivamente.

		Guemes	Cachi	Chilecito	Lavalle	Uspallata	Neuquén
Adulto	Línea	45,6*	28,4*	8,4*	0	8,4*	0,8
	Línea x Sexo	17,9****	2,9	0	41,8*	0	5,6
Larva	Línea	15**	20**	11,2**	15**	0	14,4*

Tabla 2.2.3: Contribuciones relativas de las fuentes de variación a la varianza fenotípica total para el CO larval y adulto. El factor línea representa la contribución de la variabilidad genética y el factor Línea x Sexo representa la contribución de la interacción GxS. Los números son porcentajes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,001$.

Para investigar en mayor profundidad la naturaleza de la interacción GxS en las poblaciones de Lavalle y Guemes se construyeron las normas de reacción de la respuesta olfativa de las isolíneas de estas poblaciones (Figura 2.2.4). La interacción GxS se manifiesta gráficamente en la desviación del paralelismo que se observa en las normas de reacción entre los sexos. En la población de Guemes las diferencias dadas por el orden de clasificación explican un 7% de la interacción GxS, mientras que las diferencias debidas a un cambio en la magnitud de la respuesta dan cuenta del 93% de la interacción. En la población de Lavalle, el 22% de la interacción GxS se debe a cambios de magnitud, mientras que el 78%, puede explicarse por cambios de orden de clasificación. En consecuencia, la naturaleza de la interacción GxS difiere entre estas dos poblaciones (Figura 2.2.4).

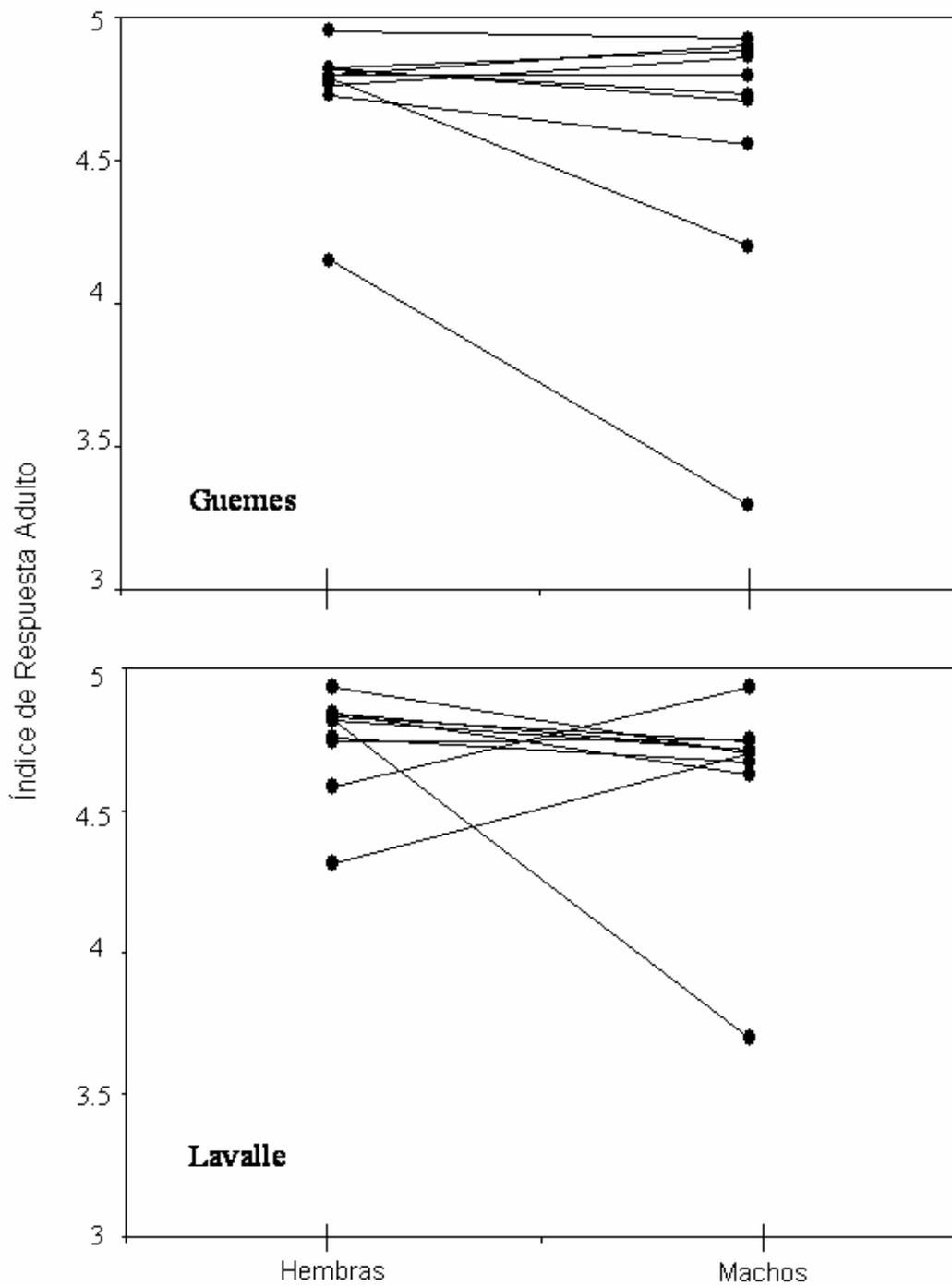


Figura 2.2.4: Normas de reacción de la respuesta olfativa adulta frente a Benzaldehído para ambos sexos en las isolíneas derivadas de las poblaciones de Guemes y Lavalle. ● representan el IR medio de cada isolínea en cada sexo por separado.

Análisis genético cuantitativo del comportamiento olfativo adulto y larval de diferentes poblaciones.

Para profundizar la comprensión de las diferencias en la arquitectura genética de la respuesta quimiosensorial en las diferentes poblaciones y entre diferentes estadios del ciclo de vida se calcularon parámetros genético-cuantitativos del CO en ambos estadios y en todas las poblaciones analizadas (Tabla 2.2.4). Las estimaciones de la varianza genética (V_G) fueron bajas para todas las poblaciones; este resultado concuerda con estimaciones de la V_G para el CO adulto realizadas en líneas de sustitución cromosómica del cromosoma II y III de *D. melanogaster*, provenientes de una población natural originaria de America del Norte (Mackay *et al.* 1996). Notoriamente, el valor de V_G para el CO larval de la población de Uspallata es cero y para adulto muy cercano a cero. Uspallata es una población aislada; en esta situación se vuelve plausible la hipótesis de endogamia luego de una fase de “cuello de botella” resultando en una pérdida de variabilidad genética.

		Guemes	Cachi	Chilecito	Lavalle	Uspallata	Neuquén
	V_G	0,2	0,1	0,02	0,32	0,02	4.10^{-3}
	CV_G	2,08	1,47	0,57	2,59	0,72	0,3
Adulto	V_A	0,08	0,12	0,1	18,43	0,14	0,14
	V_F	0,28	0,22	0,1	19,25	0,14	0,15
	h^2	0,72	0,46	0,17	0,02	0,17	0,03
	V_G	131,19	150,63	117,74	142,96	0	90,7
	CV_G	22,55	30,82	168,52	64,37	0	83,86
Larva	V_A	370,85	302,09	473,7	403,73	436,52	270,44
	V_F	502,04	452,72	591,44	546,69	436,52	361,14
	h^2	0,26	0,33	0,12	0,26	0	0,25

Tabla 2.2.4: Estimaciones de parámetros genético-cuantitativos de la respuesta olfativa larval y adulta en seis poblaciones naturales de *D. melanogaster*. V_G , V_A y V_F indican la varianza genética, ambiental y fenotípica, respectivamente; CV_G es el coeficiente de varianza genética, estimador de la evolucionabilidad; y h^2 es el estimador de la heredabilidad.

Las estimaciones de la heredabilidad (h^2) son en su mayoría bajas para ambos estadios. Debido a la ausencia de variabilidad genética, las estimaciones de h^2 en la población de Uspallata son prácticamente cero tanto para larva como para adulto. En general existe una concordancia entre las estimaciones de h^2 para larva y adulto; excepto en el caso de la población de Guemes, donde h^2 para la respuesta olfativa en adulto es inusualmente alta ($h^2 = 0,723$). Este valor se debe a una varianza ambiental (V_A) relativamente baja comparada con V_G . Las estimaciones de la evolucionabilidad (utilizando el coeficiente de variabilidad genética CV_G) entre las diferentes poblaciones oscilaron entre 0 y 168,52 para el CO larval, y entre 0,3 y 2,59 para el CO adulto (Tabla 2.2.4). Una mayor evolucionabilidad implica una capacidad superior de cambio ante la acción de la selección natural. Se ha encontrado una clara diferenciación del parámetro entre larva y adulto; y también una considerable variabilidad entre poblaciones dentro de cada estadio.

2.2.4. Discusión y Conclusiones.

En este capítulo se describen los estudios realizados acerca de las bases genéticas de la variabilidad fenotípica del comportamiento olfativo en seis poblaciones naturales de *Drosophila melanogaster* utilizando isolíneas derivadas de las mismas. Trabajos previos sobre el comportamiento olfativo en poblaciones naturales han caracterizado la variabilidad fenotípica (Alcorta y Rubio 1989) o la variabilidad genética para una única población (Mackay *et al.* 1996; Wang *et al.* 2007), pero no han reportado los parámetros genético-cuantitativos que subyacen a las diferencias en la variabilidad fenotípica entre poblaciones.

En principio se constató que existen diferencias fenotípicas entre poblaciones naturales de *D. melanogaster* para el CO larval. Por el contrario, esta hipótesis no ha sido corroborada en el CO adulto (Tabla 2.2.1, Figura 2.2.2). En este sentido, en ambos estadios del ciclo de vida se encontró que la mayor parte de la variabilidad natural en el CO es explicada por el aporte de la variabilidad intra-poblacional y no de la variabilidad inter-poblacional. Este patrón ha sido también reportado para otros caracteres complejos en poblaciones naturales de *D. melanogaster* (Hoffmann *et al.* 2001; Goenaga *et al.* 2010) y en otras especies del grupo de especies *melanogaster* (Griffiths *et al.* 2005; Arthur *et al.* 2008).

Existe una importante variabilidad genética dentro de poblaciones y el aporte de esta variabilidad a la variabilidad fenotípica total es a su vez altamente heterogéneo entre poblaciones (Tabla 2.2.3). Este patrón indica que, más allá de la inexistencia de diferencias fenotípicas en el CO entre poblaciones (como es el caso del adulto), sí existe una diferenciación en cuanto a la variabilidad genética. Esto probablemente refleja historias poblacionales diferentes. Si se analizan más en detalle los patrones de variabilidad genética se encuentran dos casos que valen la pena explorar. El primero es la ausencia de variabilidad genética, tanto para larva como para adulto, en la población de Uspallata, que en un principio apunta a respaldar la hipótesis de una historia de endogamia luego de una fase de “cuello de botella”. Sin embargo si esto fue realmente así, este proceso debió afectar a todo el genoma y por lo tanto debería encontrarse el mismo patrón de falta de variabilidad en todos los caracteres. No es el caso, dado que en un estudio de isóloneas de la misma población se ha encontrado una alta variabilidad genética para la resistencia a la inanición y la longevidad (Goenaga 2010). Entonces, la baja variabilidad genética en esta población se puede atribuir a un coeficiente de selección alto para el CO y/o, como sucede en Lavalle, a la existencia de un fuerte componente genotipo x sexo que actuaría de “refugio” para la variabilidad genética en esta situación particular. El segundo caso es el de la población de Chilecito; la dicotomía de una alta variabilidad genética en larvas, pero casi ausencia de la misma en adultos, sugiere una relación carácter-estadio-adaptación compleja. Es posible que, de manera más acentuada en esta población, exista una importante contribución a la variabilidad natural del CO larval en respuesta a Benzaldehído de factores genéticos que no contribuyen a la red de interacciones genéticas que subyacen al fenotipo olfativo adulto para este químico. En este sentido, en la Sección I y en el capítulo I de la Sección II se presenta amplia evidencia tanto propia como de otros trabajos para sustentar la propuesta de bases genéticas solapadas pero no totalmente compartidas entre el CO adulto y larval.

Particularmente para el CO adulto se ha corroborado la hipótesis que plantea que la interacción GxS es importante en la arquitectura genética del CO en adulto (Tabla 2.2.1). Además, la contribución de la interacción GxS a la varianza fenotípica total en las diferentes poblaciones varía ampliamente entre un 0 y 42% (Tabla 2.2.3). De la misma manera que para la variabilidad genética, esta heterogeneidad refleja historias poblacionales diferentes.

Los resultados previamente analizados en conjunto llevan a preguntarse cuáles son las posibles causas de las diferencias inter-poblacionales en el CO larval. *A priori*, la temperatura ambiental no parece ser un factor de importancia decisiva sobre la variación geográfica de la respuesta olfativa, como sí lo es para caracteres de historia de vida (Partridge *et al.* 1994b; Partridge *et al.* 1994a; Partridge *et al.* 1995; Kennington *et al.* 2001) y morfométricos (Loeschcke *et al.* 2000; De Jong y Bochdanovits 2003). En cambio, el recurso de cría en estas poblaciones naturales (el fruto de diferentes especies de angiospermas) aparece como un posible factor causal que determinaría los patrones de variación entre poblaciones. Diferentes “ambientes químicos” en el fruto donde se cría la larva, y se alimenta y ovipone el adulto, podrían actuar como diferentes presiones ambientales en los distintos estadios, ya que la utilización que hacen de este recurso es diferente, siendo ésta un factor determinante en larva y no en adulto. En este sentido, los resultados de esta sección dan sustento a esta última hipótesis, dado que no se ha encontrado una correlación significativa del CO, tanto larval como adulto, ni con la latitud ni con la altitud. Además, las diferencias entre los parámetros genético-cuantitativos entre el CO larval y adulto sugieren una mayor susceptibilidad a la heterogeneidad ambiental en el CO larval (Tabla 2.2.4), lo que podría llevar a adaptaciones locales. La hipótesis de que el recurso de cría es un posible factor que explique las diferencias inter-poblacionales en el CO larval debe ser evaluada de manera más directa mediante futuros experimentos.

En el capítulo anterior se discute la inexistencia de una concordancia total de los componentes genéticos que forman la arquitectura genética CO entre estadios. En este capítulo se obtuvo el mismo resultado, pero sobre las propiedades variacionales de la misma. La estimación de la evolucionabilidad es consistentemente mayor en larva que en adulto (Tabla 2.2.4), lo cual sumado a la mayor variabilidad en la respuesta olfativa larval comparada con adulto en las diferentes poblaciones, sugiere que el potencial para desarrollar una adaptación al “ambiente químico” es mayor en el estadio alimenticio larval que en el estadio reproductivo adulto. En conjunto, los resultados aquí obtenidos sugieren que diferentes fuerzas evolutivas están actuando en el CO larval y adulto.

Se puede concluir de manera general que el CO presenta en *D. melanogaster* variabilidad fenotípica entre poblaciones naturales para el estadio larval pero no para el adulto. Sin embargo, ambos estadios presentan una importante variabilidad genética intra-poblacional, siendo mayor la encontrada para el CO larval. Además, particularmente para el estadio adulto la interacción genotipo por sexo (GxS) es un

componente importante en la arquitectura genética del CO. Estos dos aspectos, variabilidad genética e interacción GxS, presentan una sustancial heterogeneidad entre poblaciones. Finalmente, la arquitectura genética del CO, en sus propiedades variacionales, no es totalmente equivalente entre larva y adulto en *D. melanogaster*.

2.3. Capítulo III.

Arquitectura genética del comportamiento olfativo en *Drosophila melanogaster* y su relación con procesos y fenómenos involucrados en la interacción entre el genotipo y el fenotipo.

2.3.1. Introducción.

La relación entre genotipo y fenotipo no se presenta como lineal y directa, sino que es sumamente compleja, siendo este intrincado sistema el objeto de estudio de una parte de la biología moderna (Lewontin 2000; Houle 2010; Houle *et al.* 2010). En este sentido, la intención del presente capítulo es profundizar en el conocimiento, que ha comenzado en el capítulo inmediatamente anterior, de la variabilidad genética y fenotípica del CO larval y adulto y comprender ciertos aspectos de la relación entre las mismas. Para lograr este objetivo se realizó una comparación entre los patrones de variabilidad del CO entre diferentes tipos de líneas: i) las isolíneas utilizadas en el capítulo II de la presente sección, que representan la variabilidad genética natural, y el efecto de ésta sobre la variabilidad fenotípica y ii) líneas de sustitución cromosómica para el cromosoma II, que representan solamente la variabilidad genética natural de una porción del genoma y el efecto de la misma sobre la variabilidad fenotípica. Por otra parte, las líneas de sustitución cromosómica constituyen una perturbación genética a los genotipos salvajes o naturales.

Tal como se mencionó previamente, para conocer la arquitectura genética de un carácter, necesariamente se deben determinar los aspectos variacionales de la misma (Hansen 2006). Entre los procesos y fenómenos que se circunscriben a la relación genotipo – fenotipo, y que contribuyen a los componentes variacionales, la canalización es uno de los que ha recibido una mayor atención (Gibson y Wagner 2000; Gibson y Dworkin 2004). El proceso de canalización se asocia a la tendencia de los caracteres de desarrollar la capacidad de reducir la variabilidad durante la evolución¹ (Gibson y Dworkin 2004). Este proceso suele estar relacionado con el fenómeno de variabilidad

¹ El concepto de canalización difiere para diferentes áreas de la biología; en esta tesis se refiere en todos los casos al concepto de canalización utilizado en biología evolutiva. Para los biólogos evolutivos la canalización es la evolución, por la acción de fuerzas evolutivas, de capacidad de amortiguación que produce la estabilización de los fenotipos.

genética críptica. La variabilidad genética críptica es variabilidad genética que no contribuye al rango normal de fenotipos en una población (genotipos que comúnmente se encuentran en la naturaleza), pero que está disponible y se evidencia produciendo diferencias fenotípicas cuando existen cambios ambientales o genéticos (Gibson y Dworkin 2004; Gibson y Reed 2008; Le Rouzic y Carlborg 2008). Es así que se propone que la canalización podría tener como una de sus consecuencias, la producción de variabilidad genética críptica (Gibson y Dworkin 2004).

En la Figura 2.3.1 se esquematiza un ejemplo de cómo se pueden detectar, en el estudio de la arquitectura genética de un carácter, canalización y variabilidad genética críptica. Se muestra la variación fenotípica de un carácter bajo dos condiciones ambientales: silvestre (o natural) y perturbada. La perturbación puede ser una alteración en el ambiente o en el genotipo. En la situación de la izquierda la media del carácter cambia ante la perturbación pero la variabilidad fenotípica del carácter es independiente de la misma; en este caso la perturbación particular que se haya empleado no tiene un efecto sobre la variabilidad fenotípica del carácter y no se puede extraer ninguna conclusión. En cambio, en la situación de la derecha, además de haber un cambio en la media del carácter, también se incrementa la variabilidad fenotípica en condiciones de un ambiente perturbado. En esta circunstancia se puede afirmar que la perturbación generó descanalización del fenotipo con la consecuente liberación de variabilidad fenotípica asociada a variabilidad genética críptica (Gibson y Wagner 2000).

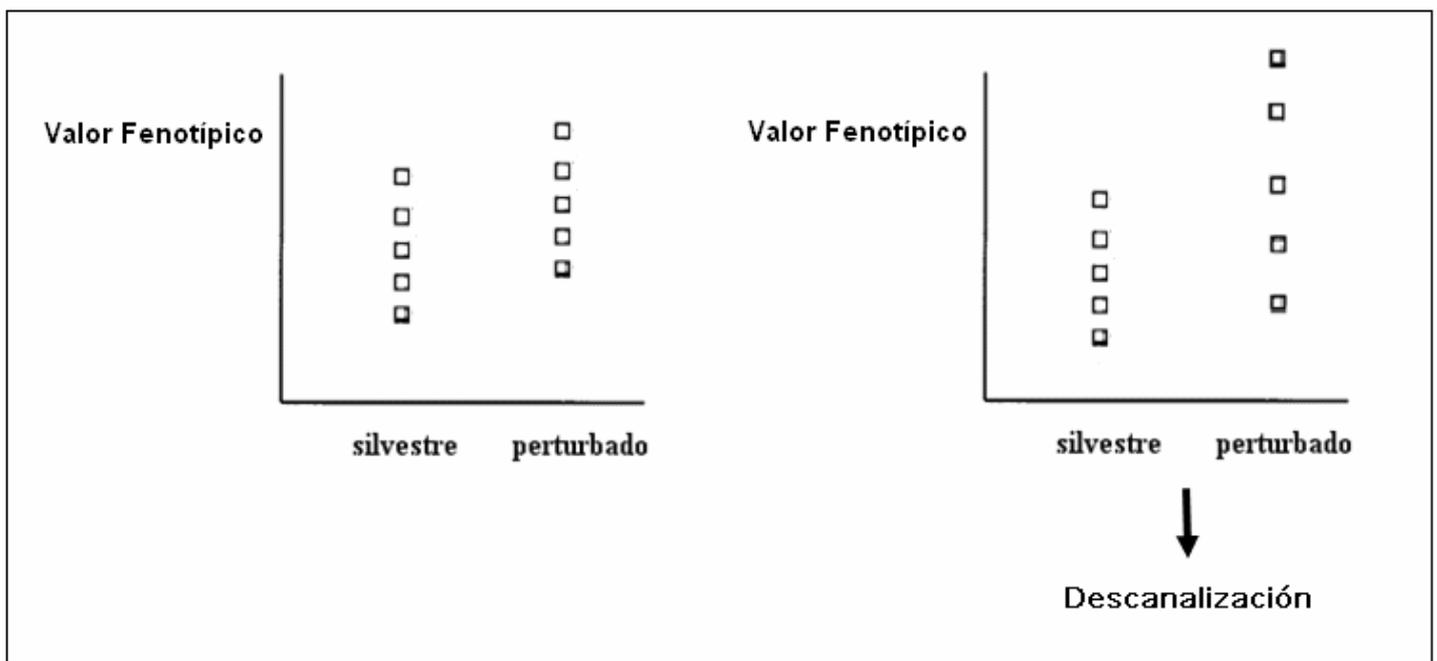


Figura 2.3.1: Cambios en la media y en la variabilidad fenotípica para diferentes líneas en las que se cuantifica un carácter fenotípico cuando existe una perturbación (perturbado) y cuando no (silvestre). La perturbación puede ser una alteración en el ambiente o en el genotipo. En la izquierda se muestra el caso en que no existe una respuesta ante la perturbación (diferencias en las medias pero no en la varianza) y en la derecha el resultado esperado cuando existe descanalización (diferencias en las medias y en la varianza en respuesta a la perturbación). Modificado de Gibson y Wagner 2000.

Se han detectado casos de descanalización como resultado de perturbaciones genéticas (cambios en el fondo genético y/o mutaciones que se mantienen en la población) tanto en caracteres de la especie modelo *D. melanogaster* (Scharloo 1991; Moreno 1995; Polaczyk *et al.* 1998; Goenaga 2010), como en otras especies. Por ejemplo, el trabajo clásico de Dunn y Fraser en *Mus musculus* (Dunn y Fraser 1958). Por otro lado, diversas investigaciones han reportado que los efectos de la variabilidad genética natural sobre el fenotipo pueden ser amortiguados (traducido del término inglés *buffered*) o liberados como resultado de perturbaciones ambientales (Hoffmann y Merila 1999; Szafraniec *et al.* 2001; Pétavy *et al.* 2004; Charmantier y Garant 2005; Swindell y Bouzat 2006; Mensch *et al.* 2008). En la Figura 2.3.2 se muestran dos ejemplos de experimentos realizados en líneas de *D. melanogaster* cuyos resultados son consistentes con fenómenos de descanalización como resultado de perturbaciones ambientales y genéticas. Se ha propuesto que los mecanismos subyacentes a esta variabilidad “oculta” son las interacciones epistáticas y las interacciones genotipo por ambiente (Wagner 1996; Rice 1998; Rice 2000; Carlborg *et al.* 2006; Wright *et al.* 2006; Le Rouzic *et al.* 2007; Le Rouzic y Carlborg 2008; Schlichting 2008).

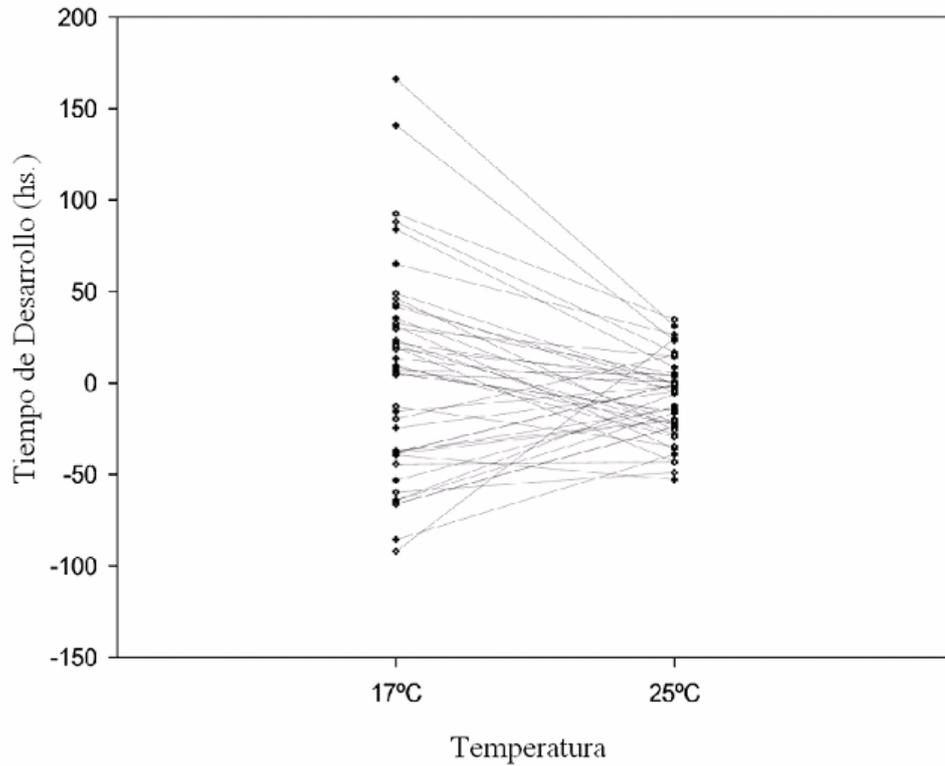
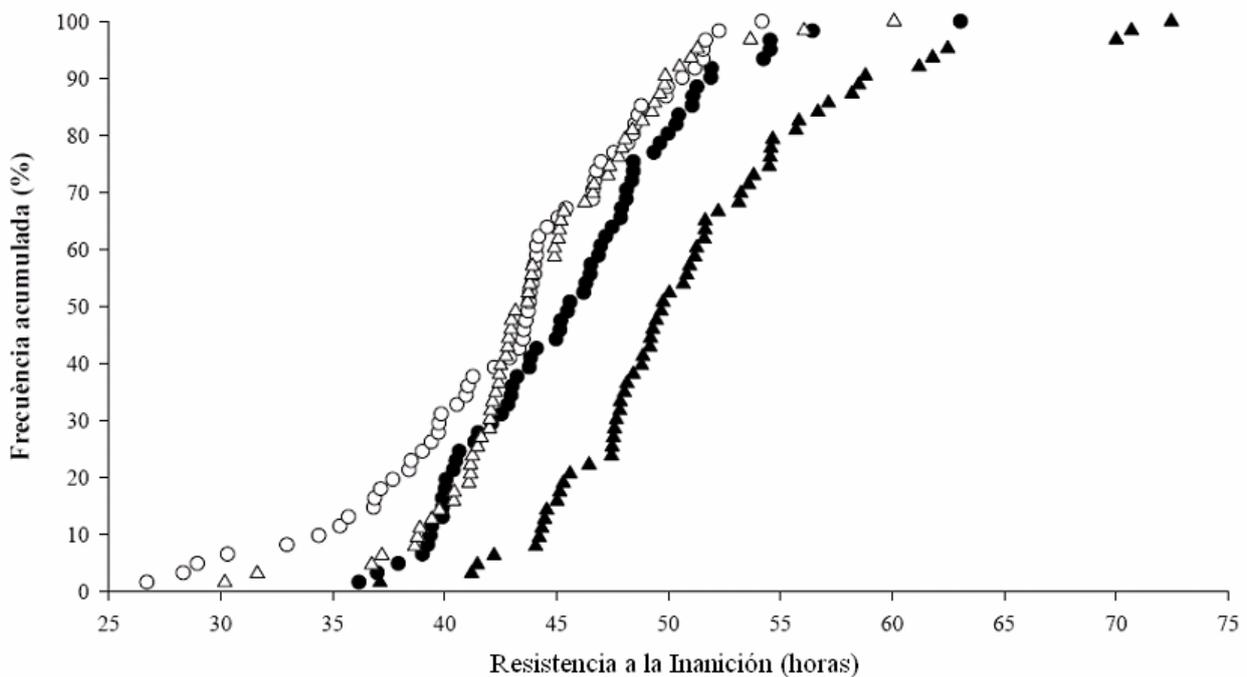
A**B**

Figura 2.3.2: Ejemplos de descanalización en diferentes caracteres de *D. melanogaster*. En ambos casos se muestra el valor fenotípico de diferentes líneas cuando existe una perturbación y cuando no; en ambos se observan diferencias en las medias y en la varianza en respuesta a la perturbación. A) El fenotipo es el tiempo de desarrollo y existe descanalización como resultado de una perturbación ambiental, en este caso se criaron a las moscas a una temperatura no habitual de 17° C (extraído de Mensch *et al.* 2008). B) El fenotipo es la resistencia a la inanición y la descanalización sucede como resultado de perturbación genética. Los triángulos representan el valor fenotípico en líneas perturbadas y los círculos en no perturbadas, los símbolos negros hembras y los blancos machos (extraído de Goenaga 2010).

El objetivo del presente capítulo es responder si solamente la fracción denominada variabilidad genética visible afecta a la variación fenotípica del CO, mientras que la variabilidad genética críptica se traduce en variación fenotípica solamente bajo condiciones genéticas perturbadas.

Las hipótesis particulares que se pusieron a prueba son las siguientes:

Factores genéticos que se encuentran localizados en el cromosoma II, contribuyen a la variabilidad genética natural del CO para larva y adulto en poblaciones naturales de Argentina.

En ambos estadios del ciclo de vida de *D. melanogaster* existe variabilidad genética natural críptica para el CO. Las interacciones epistáticas entre factores genéticos ubicados en el cromosoma II y el resto del genoma son parcialmente responsables de la existencia de la misma.

Tanto el CO larval como adulto responden ante perturbaciones de tipo genéticas mediante una descanalización.

2.3.2. Materiales y Métodos.

Generación y mantenimiento de líneas de trabajo.

Se utilizaron dos tipos diferentes de líneas: isolíneas y líneas de sustitución cromosómica para el cromosoma II. Las isolíneas son las mismas que se utilizaron en el capítulo anterior, allí se describe su generación y mantenimiento. Las líneas de sustitución cromosómica para el cromosoma II presentan en su genoma un cromosoma II natural en homocigosis (derivado de las isolíneas), el cual ha sido introgresado en un fondo genético isogénico (es decir, todos los loci homocigotas) estándar. Este fondo genético es *Canton-S B*. Durante esta sección las isolíneas serán nombradas como “Genoma Total”, ya que representan a la totalidad del genoma de los diferentes genotipos presentes en las poblaciones naturales; y las líneas de sustitución cromosómica para el cromosoma II, serán referidas como “Cromosoma II”, ya que las

diferentes líneas representan diferentes cromosomas II naturales y en ellas se puede investigar la variabilidad genética natural subyacente a dichos cromosomas. Asimismo, estas líneas constituyen un caso de perturbación por causas genéticas, ya que se han alterado las relaciones epistáticas “naturales” que ocurren en los genotipos salvajes (o naturales) de las poblaciones argentinas muestreadas entre los alelos del cromosoma II y los del resto del genoma.

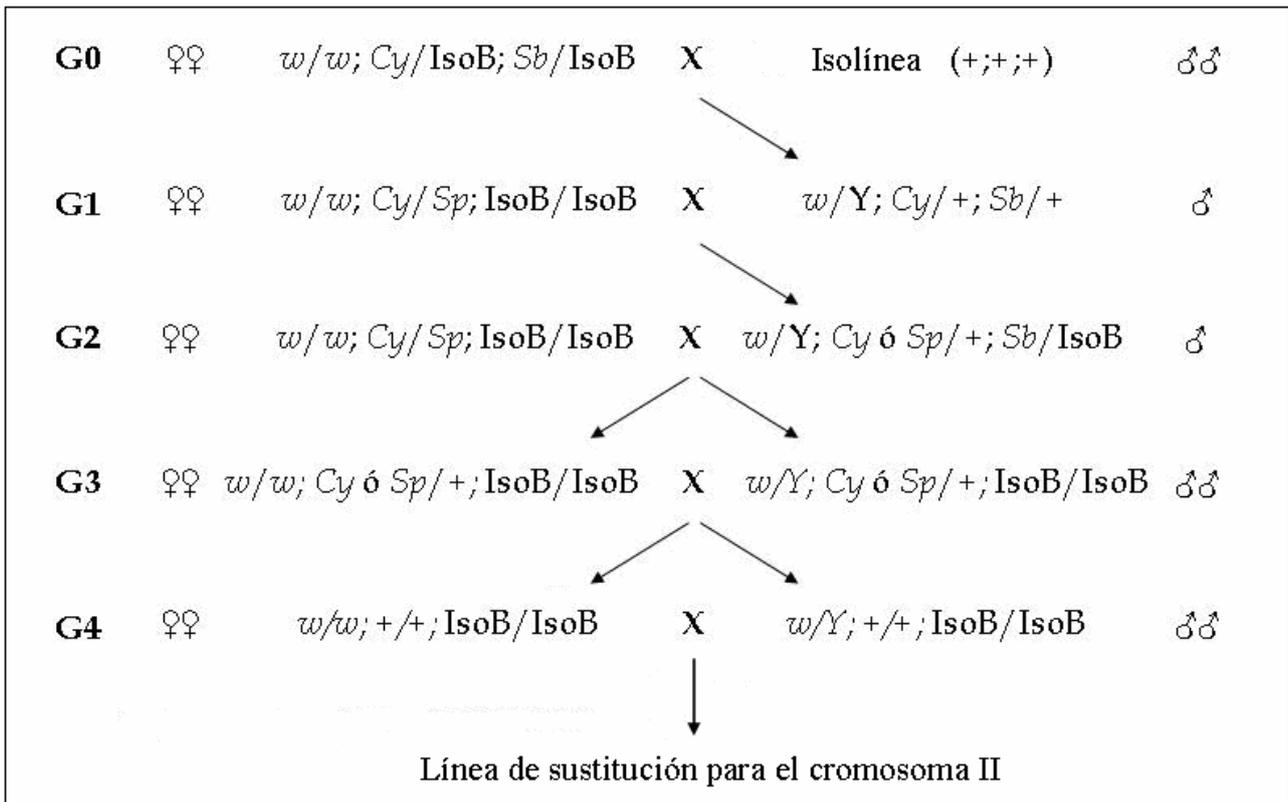


Figura 2.3.3: Esquema simplificado de los cruzamientos empleados para obtener las líneas de sustitución cromosómica. El primer cruzamiento (G0) se realiza entre una hembra homocigota para el gen marcador que confiere ojos blancos *white* (*w*) y heterocigota para los otros dos cromosomas que contienen los genes marcadores fenotípicos *Curly* (*Cy*), localizado en el cromosoma II, y *Stubble* (*Sb*), localizado en el cromosoma III (los homólogos de estos cromosomas son el II y el III de la línea *Canton-S B*, de ahora en adelante *ISOB*) y un macho de una isolínea natural portador de cromosomas salvajes (+; +; +). De la descendencia del cruzamiento anterior se eligen los machos que presentan los marcadores fenotípicos mencionados (*w*, *Cy* y *Sb*) que llevaban uno de los cromosomas II y III salvajes (+) aportados por el macho de la isolínea natural utilizada. En estos machos se puso en heterocigosis un cromosoma II y un cromosoma III de la isolínea utilizada. Por lo tanto, con cada uno de ellos se puede fundar una línea de sustitución cromosómica independiente. Debido a esto, en G1, los machos elegidos se cruzan de manera individual con hembras homocigotas para el gen *w* y el cromosoma III *ISOB* y heterocigotas para genes marcadores presentes en el cromosoma II: un homólogo lleva *Cy* mientras que el otro contiene el marcador fenotípico *Sternopleural* (*Sp*) que determina un cambio en las quetas ubicadas en los balancines. Este alelo, al igual que *Cy* y *Sb*, es un marcador fenotípico dominante letal recesivo. Para el siguiente cruzamiento (G2) se eligen machos con el mismo fenotipo que en el caso anterior (*w*, *Cy* y *Sb*) ó con el fenotipo dado por *Sp* en lugar de *Cy*; debido a que los machos con estos marcadores son los únicos que presentan el cromosoma natural II (en estos, el cromosoma natural III fue reemplazado por el *ISOB*). Estos machos son cruzados individualmente con hembras de la cepa utilizada en el caso anterior de forma tal de generar machos y hembras con el fenotipo dado solamente por los marcadores *w* y *Cy* ó *Sp*. A partir de este punto, el objetivo es poner en homocigosis el cromosoma II derivado de la isolínea correspondiente realizando cruzamientos entre hermanos (G3 y G4). Del los descendientes del primer cruzamiento entre hermanos (G3) se descartan todas las moscas con el fenotipo dado por *Cy* ó *Sp* y se cruzan entre si las moscas que tienen ojos blancos y son salvajes para el resto de los caracteres marcadores. Del segundo cruzamiento entre hermanos ya se obtiene las líneas de substitución cromosómicas para el cromosoma II, las cuales tienen ojos blancos y son salvajes para el resto de los caracteres marcadores.

La técnica de sustitución cromosómica consiste en sustituir dentro de un fondo genético homogéneo un único cromosoma completo procedente de otra cepa no relacionada. Las líneas de sustitución cromosómica para el cromosoma II se obtuvieron siguiendo un esquema de cruzamientos entre hembras vírgenes de cepas portadoras de cromosomas balanceadores y machos de isolíneas derivadas de las poblaciones naturales de Argentina. El esquema de cruzamientos utilizado para obtener estas líneas se resume en Figura 2.3.3.

Las isolíneas se obtuvieron de 6 poblaciones naturales de Argentina: Neuquén, Uspallata, Lavalle, Guemes, Cachi y Chilecito. Las líneas de sustitución cromosómica se obtuvieron de 9 poblaciones naturales: Neuquén, Uspallata, Lavalle, San Juan, San Blas, Jachal, Barreal, Guemes y Chilecito. A las líneas de San Juan no se les cuantificó el CO larval. A pesar de que los muestreos de los dos tipos de líneas no son balanceados, habiéndose muestreado más poblaciones para líneas de sustitución que para isolíneas lo cual podría afectar las comparaciones, ambos son lo suficientemente amplios como para realizar una buena estima de los parámetros a comparar.

En total se les cuantificó el CO adulto a 62 isolíneas y 66 líneas de sustitución cromosómica; y el CO larval a 62 isolíneas y 62 líneas de sustitución cromosómica.

Ensayos experimentales.

Los ensayos experimentales para cuantificar el comportamiento olfativo en larva y adulto han sido ya detallados en materiales y métodos de los capítulos anteriores. Para las líneas Cromosoma II se utilizó como estímulo en larva una dilución de Benzaldehído 1 % (v/v) y en adulto de 0,3 % (v/v).

Análisis estadístico.

La cuantificación de la magnitud de la variabilidad del CO larval y adulto para las isolíneas y las líneas de sustitución cromosómica se realizó mediante los mismos modelos de ANOVA detallados en el capítulo anterior.

Para comparar las varianzas fenotípicas del CO entre los diferentes tipos de líneas se utilizó la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene. En caso de que esta prueba fuera no significativa las medias se compararon mediante un ANOVA de un

factor; en cambio si no existió homocedacea la comparación se realizó mediante una prueba no-paramétrica de Kruskal-Wallis.

Todos los análisis estadísticos se realizaron empleando el software STATISTICA (Stat Soft, Tulsa, OK).

Estimación de CV_G .

Se estimó, para el CO larval y adulto de los diferentes tipos de líneas, el CV_G y su error estándar. $CV_G = 100(V_G)^{1/2}/X^2$, donde V_G es la varianza genética y X la media del IR. El error estándar del CV_G se calculó como: $CV_G/(2n)^{1/2} \times (1+2(CV_G/100)^2)^{1/2}$ (Van 't Land *et al.* 1999), donde n es el número de datos utilizados para estimar el CV_G , en este caso el número de líneas (ya que se utilizaron los IR medios de cada línea como datos). Las fórmulas utilizadas para calcular la V_G son para el: CO adulto $2\sigma_L^2 + 4\sigma_{LxS}^2$ y para el CO larval $2\sigma_L^2$. σ_L^2 es el componente de varianza entre líneas y σ_{LxS}^2 es el componente de varianza de la interacción Línea (Población) x Sexo del ANOVA general.

2.3.3. Resultados.

Efecto del genoma total y el cromosoma II sobre las fuentes de variabilidad para el CO de moscas adultas y larvas de diferentes poblaciones naturales.

El ANOVA general para el comportamiento olfativo en las líneas Cromosoma II mostró diferencias significativas entre líneas tanto en larva (Factor Línea (Población) del ANOVA general, $F_{54, 390} = 2,338$, $p < 0,0001$; Tabla 2.3.1) como en adulto (Factor Línea (Población) del ANOVA general, $F_{57, 793} = 7,636$, $p < 0,0001$; Tabla 2.3.1); por lo tanto el cromosoma II contribuye a la variabilidad genética natural del CO en ambos estadios. El mismo análisis para el genoma total se detalló en la sección anterior, por lo que no se repetirá en esta sección. Con la intención de realizar una apreciación comparativa, en la tabla 2.3.1 se resumen los resultados de los ANOVAs generales en los dos tipos de líneas en las que se cuantificó el CO.

	Genoma Total		Cromosoma II	
	COL	COA	COL	COA
Población	**	NS	NS	NS
Línea (Población)	**	**	**	**
Línea (Población) x Sexo	-	**	-	NS

Tabla 2.3.1: Resumen de los ANOVAs para el comportamiento olfativo larval (COL) y adulto (COA) en las aislneas (Genoma Total) y en las líneas de sustitución cromosómica de cromosoma II (Cromosoma II). NS = $p > 0,05$, ** = $p < 0,05$.

Dos resultados se destacan de este análisis. En primer lugar, en el único caso que existen diferencias inter-poblacionales significativas es para el CO larval en aislneas que representan al genoma total (Factor Población del ANOVA general, $F_{5, 56} = 4,365$, $p = 0,0019$) (Tabla 2.3.1). En segundo lugar, el resultado no significativo para el CO adulto de la interacción Línea x Sexo en las líneas de sustitución del cromosoma II (Factor Línea (Población) x Sexo del ANOVA general, $F_{57, 793} = 1,324$, $p = 0,0592$; Tabla 2.3.1). Este resultado indica que no se detectó interacción genotipo por sexo (GxS) entre los cromosomas naturales introgresados y el ambiente sexual para el carácter.

Al igual que para el genoma total no se ha encontrado una regresión significativa entre el CO larval o adulto y la latitud o altitud de origen para las líneas de sustitución del cromosoma II ($F_{2, 61} = 0,018$, $p = 0,98$ para latitud y altitud en CO del macho adulto; $F_{2, 61} = 0,72$, $p = 0,49$ para latitud y altitud en CO de la hembra adulta; $F_{2, 61} = 0,12$, $p = 0,89$ para latitud y altitud en CO larval); indicando que la variabilidad en el CO representada por el cromosoma II no esta asociada a estas variables.

Canalización y variación genética críptica para el CO de moscas adultas y larvas en poblaciones naturales.

La distribución de los valores fenotípicos de los diferentes tipos de líneas analizadas muestra que existe una mayor variabilidad fenotípica para el CO entre las líneas que han sufrido una perturbación genética (Cromosoma II) que en las silvestres (Genoma Total) en el adulto pero no en larva (Figura 2.3.4).

Este patrón descriptivo observado en la Figura 2.3.4 se ve respaldado por resultados de pruebas estadísticas que se resumen en la tabla 2.3.2. Para el CO larval

existen diferencias significativas entre las medias de los dos tipos de líneas analizadas (ANOVA, $F_{1,863} = 14,086$), pero no existen diferencias significativas entre la varianzas (Prueba de Levene, $F_{1,863} = 0,0747$). Es decir, la media del carácter cambia ante la perturbación pero la variabilidad fenotípica del carácter es independiente de la misma.

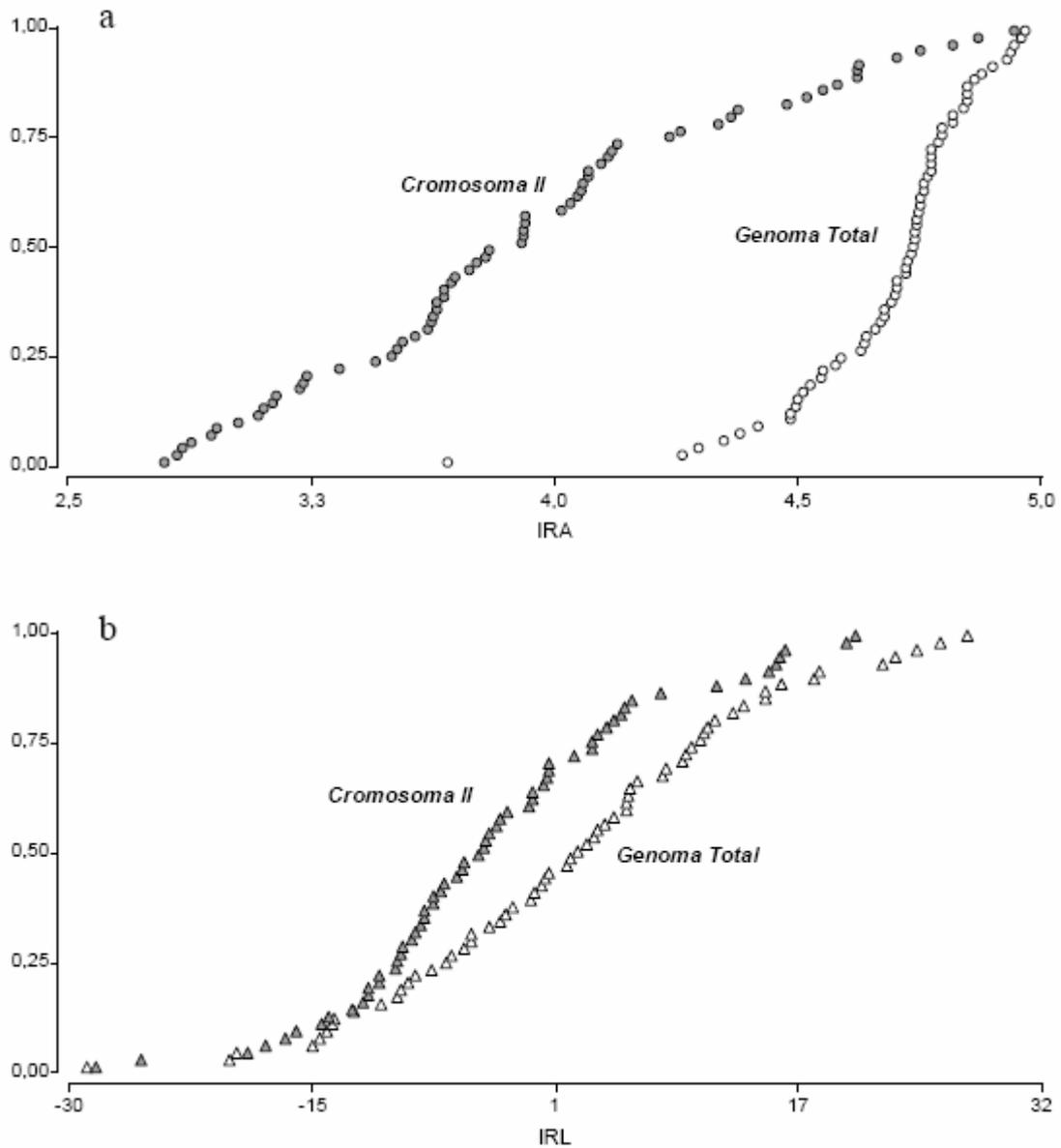


Figura 2.3.4: Distribución empírica del CO adulto (a) y larval (b). Los Δ representan el valor fenotípico medio del CO larva de las diferentes isolíneas analizadas (Genoma total) y los \blacktriangle de las diferentes líneas de sustitución cromosómica (Cromosoma II). Los \circ representan el valor fenotípico medio del CO adulto de las diferentes isolíneas analizadas (Genoma total) y los \bullet de las diferentes líneas de sustitución cromosómica (Cromosoma II). IRA: índice de respuesta adulto; IRL: índice de respuesta larval.

Para el CO adulto tanto la media (Prueba de Kruskal-Wallis, $H_{1, N=1770} = 567,07$) como la varianza (Prueba de Levene, $F_{1, 1768} = 498,12$) muestran diferencias significativas entre los dos tipos de líneas analizadas, indicando en este caso una situación de descanalización.

Genoma Total (Silvestre) vs. Cromosoma II (Perturbado)		
	CO Larval	CO Adulto
ΔX ($X_{\text{Genoma Total}} - X_{\text{Cromosoma II}}$)	p < 0,001 (ANOVA)	p < 0,0001 (Prueba de Kruskal-Wallis)
$\Delta \sigma^2$ ($\sigma^2_{\text{Genoma Total}} - \sigma^2_{\text{Cromosoma II}}$)	p = 0,785 (Prueba de Levene)	p < 0,0001 (Prueba de Levene)

Tabla 2.3.2: Resumen de los resultados de las pruebas estadísticas para evaluar si existen diferencias entre las medias y las varianzas, tanto del CO adulto como larval, entre isolíneas (Genoma Total) y líneas de sustitución cromosómica (Cromosoma II). Las variancias se compararon mediante una prueba de homogeneidad de variancias de Levene y las medias mediante un ANOVA cuando existió homocedacea (CO Larval) y una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis cuando no hubo homocedacea (CO Adulto). σ^2 : Varianza; X: media. En negrita se destaca las comparaciones que resultaron significativamente diferentes.

La Figura 2.3.4 y la tabla 2.3.2 muestran un aumento en la variabilidad del fenotipo olfativo adulto para líneas derivadas de la naturaleza que han sufrido una perturbación genética; indicando un fenómeno de descanalización. Consecuentemente con el modelo que plantea que está liberación de variabilidad fenotípica está asociada a variabilidad genética críptica se observa un aumento de la variabilidad genética (estimada como el CV_G) para el CO adulto de más del doble en las líneas perturbadas, siendo el valor estimado de $CV_G \pm$ Error Estándar en las líneas perturbadas (Cromosoma II) $5,28 \pm 0,46$, y en las líneas silvestres o naturales (Genoma Total) de $1,56 \pm 0,14$.

2.3.4. Discusión y Conclusiones.

Estudios previos han identificado genes involucrados en el CO larval y adulto ubicados en los diferentes cromosomas que conforman el genoma de *D. melanogaster*. Esto sucede tanto para los genes que participan en la periferia del sistema olfativo, aquellos que codifican para los RO (Vosshall y Stocker 2007) y las PUO (Hekmat-Scafe *et al.* 1997, 1998; Kim *et al.* 1998; Galindo y Smith 2001; Kim y Smith 2001; Shanbhag

et al. 2001; Hekmat-Scafe *et al.* 2002), como para otros genes olfativos cuyo productos actúan en posiciones no periféricas del mismo (Ayer y Carlson 1991; Anholt *et al.* 1996; Goulding *et al.* 2000; Shiraiwa *et al.* 2000; Anholt *et al.* 2001; Fanara *et al.* 2002; Kulkarni *et al.* 2002; Ganguly *et al.* 2003; Stoltzfus *et al.* 2003; zur Lage *et al.* 2003; Sambandan *et al.* 2006). Sin embargo, que un gen participe en la arquitectura genética de un carácter es un requisito necesario pero no suficiente para que ese gen contribuya a la variabilidad genética y fenotípica natural del carácter (Anholt y Mackay 2004). Este trabajo demuestra que elementos genéticos ubicados en el cromosoma II del genoma de *D. melanogaster* contribuyen a la variación genética natural del CO larval y adulto en poblaciones naturales del centro y noroeste de Argentina (Tabla 2.3.1). Es decir, existen en estas poblaciones un conjunto de alelos de diferentes loci involucrados que afectan la variación fenotípica natural del olfato. Reconociendo que la relación entre el genotipo y el fenotipo no es lineal y directa, luego de obtener este resultado se avanzó en la detección del fenómeno de variabilidad genética críptica asociada al proceso de canalización.

Las líneas de sustitución cromosómica contienen una perturbación por causas genéticas, ya que se han alterado las relaciones epistáticas “naturales” entre los alelos del cromosoma II y los del resto del genoma; mientras que las isolíneas representan los genomas naturales sin perturbación. Contar con estos dos tipos de líneas permitió realizar los experimentos que permiten detectar descanalización (Gibson y Wagner 2000). El CO adulto respondió ante las perturbaciones mediante un claro patrón que se interpreta como descanalización, observándose un incremento en la variabilidad genética (liberación de variabilidad genética críptica) que repercute en un aumento de la variabilidad fenotípica. Mientras que no sucedió lo mismo en larva, en donde solamente hay un cambio ante la perturbación en la media fenotípica del CO pero no en la varianza entre líneas (Figura 2.3.4, Tabla 2.3.2). Esta diferencia conduce a preguntarse sobre cuáles son las causas de que en el CO del estadio adulto de *D. melanogaster*, y no en la larva de segundo estadio, exista variabilidad genética críptica asociada al proceso de canalización. La respuesta a esta pregunta se esclarece al pensar sobre la relación que la arquitectura genética de un carácter tiene con la canalización. Una arquitectura genética formada por un número alto de genes que establecen redes epistáticas con numerosas interacciones es más propicia para que ocurra un proceso de canalización que amortigua (disminuyendo) la variabilidad fenotípica natural. Ya que la epístasis actúa como un corsé de la variabilidad genética y fenotípica natural (Wagner 1996; Rice 1998; Rice

2000; Carlborg *et al.* 2006; Wright *et al.* 2006; Le Rouzic *et al.* 2007; Le Rouzic y Carlborg 2008; Schlichting 2008). Entonces, el estadio adulto de *D. melanogaster* presenta una arquitectura genética del CO más compleja que en el estadio larval en cuanto a las interacciones epistáticas, y como consecuencia sólo se observa en este estadio un fenómeno de descanalización al perturbar las interacciones entre factores genéticos ubicados en el cromosoma II y el resto del genoma.

A manera de resumen se concluye que elementos genéticos ubicados en el cromosoma II aportan variabilidad genética para el CO en poblaciones naturales de *D. melanogaster*. En la introducción general (Sección I) se destacó que la arquitectura genética de un carácter está íntimamente relacionada con la evolución del mismo; en este capítulo se demostró que las diferencias en las arquitecturas genéticas del comportamiento olfativo entre el estadio larval y adulto repercuten en que la canalización y la presencia de variabilidad genética críptica son más importantes en adulto que en larva.

Sección III

Evolución de la arquitectura genética del comportamiento olfativo en especies pertenecientes al grupo *Drosophila melanogaster*: un estudio genómico-comparativo

3.1. Introducción.

La genómica comparada es la disciplina que estudia la estructura, función y evolución del genoma entre diferentes especies (Clark 2000; Hardison 2003; Bergman 2007). En el año 2007 se publicaron las secuencias completas de los genomas de 12 especies del género *Drosophila* (Clark *et al.* 2007). Por supuesto, la disponibilidad de esta información y el desarrollo de técnicas estadísticas y herramientas bioinformáticas (Chain *et al.* 2003; Blanchette 2007; Tarraga *et al.* 2007; Yang 2007; Brown 2008) para analizarla abrió la posibilidad de poner a prueba hipótesis relacionadas con la evolución de estas especies a una escala genómica. En la presente sección se presenta un estudio de genómica comparada evolutiva, en el que se pusieron a prueba hipótesis acerca de la evolución de genes involucrados en la arquitectura genética del CO en las 6 especies del grupo de especies *D. melanogaster* secuenciadas: *Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans*, *Drosophila sechellia*, *Drosophila erecta*, *Drosophila yakuba*, *Drosophila ananassae* (Figura 3.1). En especies que presentan el grado de divergencia que muestran las pertenecientes al grupo *D. melanogaster*, el estudio a nivel genómico de las diferencias entre secuencias codificantes es particularmente apto para entender los cambios que, como consecuencia de los procesos evolutivos, ocurrieron en las mismas (Hardison 2003). Precisamente, aprovechar la información genómica disponible para comprender los procesos evolutivos que actúan sobre los genes que intervienen en la arquitectura genética del CO, es el objetivo de la investigación detallada en la presente sección.

Los estudios de genómica comparada sobre la evolución del CO en especies de *Drosophila* se han enfocado exclusivamente en las familias multigénicas de RO (Guo y Kim 2007; McBride 2007; McBride y Arguello 2007; Tunstall *et al.* 2007; Gardiner *et al.* 2008; Gardiner *et al.* 2009) y PUO (Vieira *et al.* 2007), las cuales están integradas por genes que codifican proteínas que participan en la periferia del sistema olfativo. Sin embargo, para alcanzar a conocer cabalmente las propiedades variacionales de la arquitectura genética del CO, y su evolución transespecífica, es necesario extender el conjunto de genes más allá de los RO y PUO, a otros genes que se sabe también participan del CO y codifican proteínas con funciones moleculares y biológicas heterogéneas (en la Sección I se describen los reportados por otros autores y en el Capítulo I de la Sección II los encontrados en esta tesis).

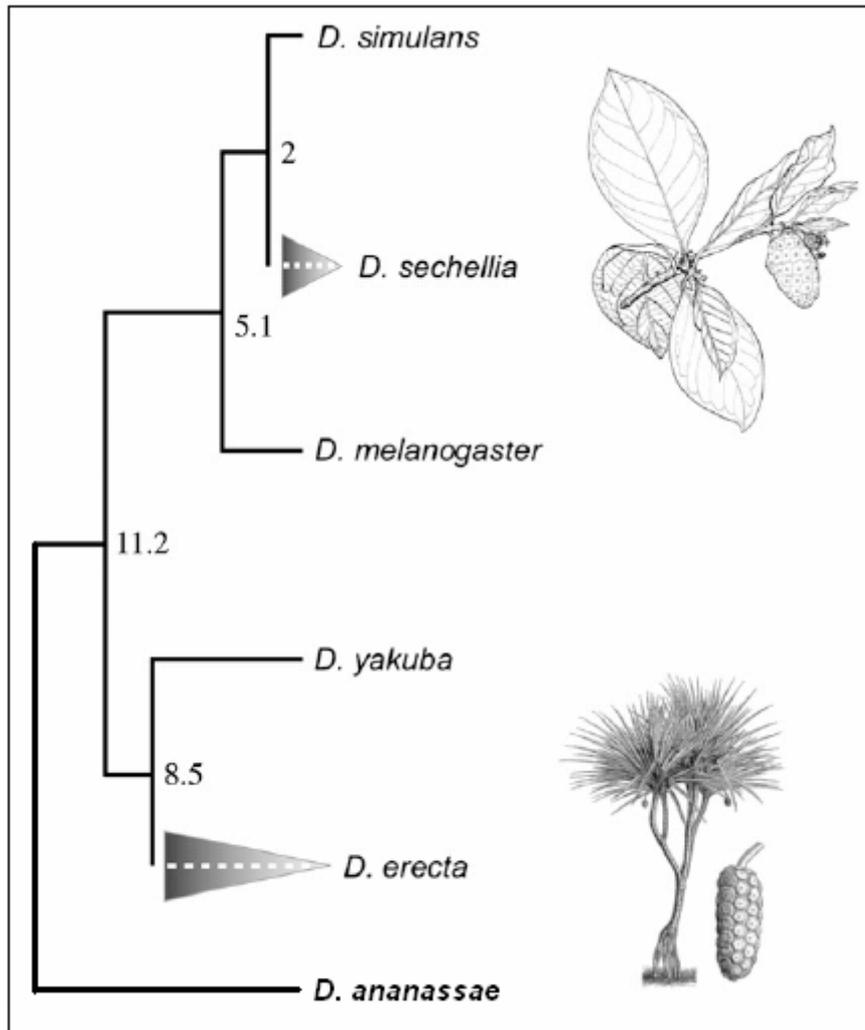


Figura 3.1: Relaciones filogenéticas entre las especies del grupo *D. melanogaster* analizadas en este estudio. Los números en los nodos son estimaciones de los tiempos de divergencia en millones de años (estimados por el método de distancias mutacionales a partir de datos de genomas completos). Se destacan los linajes que presentan un modo de vida especialista, *D. sechellia* y *D. erecta* y, además, se incluyen dibujos representativos de los hospedadores donde se crían y reproducen estas especies, *Morinda citrifolia* y *Pandanus candelabrum*, respectivamente. Modificado de McBride y Arguello (2007).

A pesar de que en el análisis realizado los genes no se agruparon en familias de genes, las hipótesis que se pusieron a prueba se refieren a grupos de genes que comparten una cierta característica biológica relacionada con el CO, y que podría ser relevante para profundizar en la comprensión de la evolución de la arquitectura genética del olfato. Como se ha descrito a lo largo de la tesis los genes pueden participar en diferentes posiciones de la compleja cadena de eventos que en última instancia son los procesos fisiológicos que conforman el comportamiento olfativo y en diferentes estadios del ciclo de vida de las moscas. De este modo, se clasificó a los genes que

participan del CO en periféricos o centrales (o no periféricos) y que se expresan exclusivamente en larva, exclusivamente en adulto o en ambos estadios.

Una de las ventajas más relevantes para los biólogos evolutivos es que los estudios de genómica comparada entre especies cercanamente emparentadas ofrecen la oportunidad de comparar los patrones de expresión génica y las tasas de evolución de genes, los mecanismos del desarrollo, y la adaptación ecológica, entre taxa con ecologías e historias evolutivas particulares y diferentes (Markow y O'Grady 2007). En este sentido, las especies del subgrupo *melanogaster* (*D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. sechellia*, *D. erecta*, *D. yakuba*) cuyos genomas se encuentran disponibles en bases de datos, pueden ser agrupadas en generalistas y especialistas en cuanto al uso de las plantas hospedadoras en las que se alimentan, oviponen y se desarrollan (David *et al.* 2007). *D. sechellia* lo hace exclusivamente en los frutos en descomposición del arbusto *Morinda citrifolia* (Tsacas y Bächli 1981; Louis y David 1986; R'Kha *et al.* 1991) y *D. erecta* es especialista estacional del fruto del árbol *Pandanus candelabrum* (Rio *et al.* 1983). Entre las restantes especies encontramos a *D. melanogaster* y *D. simulans*, dos especies generalistas cosmopolitas, y a *D. yakuba*, una especie generalista endémica del este de África subsahariana (Lachaise y Silvain 2004; David *et al.* 2007; Markow y O'Grady 2007) (Figura 3.1). Estudios previos de las familias multigénicas RO y PUO, han mostrado que los linajes especialistas presentan una tasa de evolución más acelerada que los generalistas, patrón que se ha explicado como una respuesta del sistema olfativo a la selección direccional propiciada por el “ambiente de un solo hospedador” (McBride 2007; McBride y Arguello 2007; Vieira *et al.* 2007). En esta sección se evaluó esta hipótesis pero incluyendo todos los genes olfativos conocidos, no solamente los RO y PUO.

A continuación se detallan las hipótesis que se pusieron a prueba:

La selección negativa es la fuerza evolutiva que ha gobernado la evolución del conjunto de genes olfativos

Debido a las diferencias funcionales, los genes olfativos categorizados en periféricos y centrales tienen restricciones selectivas diferenciales que explican las diferencias en las tasas de evolución.

Las tasas de evolución de genes olfativos que participan en un único estadio del ciclo de vida con respecto a los que lo hacen en más de un estadio son diferentes, ya que se espera que los genes con una expresión más ubicua experimenten mayores restricciones funcionales.

Los genes del olfato de especies especialistas del sub-grupo *melanogaster* presentan una tasa de evolución más acelerada respecto de las generalistas como consecuencia de la selección direccional que propicia el “ambiente de un solo hospedador”.

3.2. Materiales y Métodos.

En la presente sección el cambio en las secuencias nucleotídicas codificantes de los genes olfativos se estimó empleando modelos de codones utilizando una aproximación de máxima verosimilitud. Esta aproximación permite estudiar las presiones selectivas al nivel de las secuencias de proteínas. El esquema general de todos los análisis utilizados consistió en realizar, en principio, la alineación de las secuencias codificantes de los genes ortólogos de todas las especies, luego con una filogenia ya establecida para dichas especies efectuar el análisis de máxima verosimilitud mediante modelos de codones que permitieron estimar el parámetro:

$$\omega = d_N/d_S,$$

donde d_N es la tasa de sustitución no sinónima (número de sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo) y d_S es la tasa de sustitución sinónima (número de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo). También se realizaron pruebas específicas para detectar selección positiva (SP) en las secuencias codificantes.

Obtención de las secuencias y categorización de los genes olfativos.

Se utilizaron las secuencias codificantes (SC) de 115 genes olfativos descritos en *D. melanogaster* y sus secuencias ortólogas en las 5 especies restantes del grupo *D. melanogaster* previamente enumeradas. En total se utilizaron 664 SC; este número es menor al total esperado de 690 (=115 x 6) ya que algunas secuencias en determinados

linajes no se utilizaron debido a problemas en el alineamiento o en la estimación de ω (ver más adelante). Las SC fueron descargadas de *FlyBase* (flybase.org), estas fueron subidas al sitio como material adicional del trabajo de Pollard *et al.*(2006). Las SC fueron alineadas con el programa MUSCLE (Edgar 2004a, b) utilizando como molde la secuencia aminoacídica predicha. Las columnas alineadas que contenían *gaps* fueron eliminadas. En la tabla 3.1 se muestra el número de genes incluidos en el análisis junto con la información sobre el estadio del ciclo de vida (larva y/o adulto) en el cual el gen participa del CO y el nivel en el que cada gen se expresa (periférico o central) en el sistema olfativo. En la tabla suplementaria 3.1 que se encuentra al final de esta sección se muestra el detalle de esta información para todos los genes.

Categorización		Nº de genes	Referencias
Nivel	Central	53	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
	Periférico	62	11,12,13,14,15
Estadio	Larva	27	3, 4, 11, 12, 15
	Adulto	34	3, 4, 5, 11, 12, 13, 14, 15
	Larva & Adulto	13	3, 4, 11, 12, 13,14, 15

Tabla 3.1: Número de genes incluidos en cada categoría de la categorización realizada; y referencia bibliográfica de donde se obtuvo la información para realizarla. 1: Goulding *et al.* (2000), 2: zur Lage *et al.* (2003), 3: Sambandan *et al.* (2006), 4: Capítulo I, Sección II de la presente tesis, 5: Stoltzfus *et al.* (2003), 6: Fanara *et al.* (2002), 7: Pielage *et al.* (2003), 8: Shiraiwa *et al.* (2000), 9: Anholt *et al.* (1996), 10: Rollmann *et al.* (2005), 11: Galindo y Smith (2001), 12: Hekmat-Scafe *et al.* (2002), 13: Pikielny *et al.* (1994), 14: Park *et al.* (2000), 15: Vosshall y Stocker (2007). En la tabla suplementaria 3.1 que se encuentra al final de esta sección se desarrolla más en detalle la información aquí presentada.

Respecto a la categorización de los genes en cuanto al estadio del ciclo de vida en que se expresan, solamente se incluyeron en el análisis aquellos genes que fueron evaluados en ambos estadios. Entonces, si por cualquier técnica se demostró que un gen participa en el olfato de adulto pero nunca fue evaluado por ninguna técnica en larva, dicho gen no fue incluido en el análisis.

En cuanto a la clasificación en relación al nivel del sistema olfativo en el que participa del CO, los genes RO y PUO fueron categorizados como periféricos y los demás como centrales (esta distinción ha sido abordada en la Sección I y en el Capítulo I de la Sección II) (Tabla 3.1 y Tabla Suplementaria 3.1). Las categorizaciones están

basadas en resultados de experimentos en *D. melanogaster*. Aunque la función, momento y lugar de expresión de un gen puede cambiar en especies diferentes, se asumió, dado que se trata de especies cercanamente emparentadas, que es razonable extender la categorización hecha en *D. melanogaster* a las demás especies del grupo.

Modelos de codones de máxima verosimilitud.

En este apartado se detallan los modelos y pruebas de máxima verosimilitud utilizados para estimar el parámetro ω , e investigar la incidencia de la selección positiva (SP) en las secuencias codificantes de los genes olfativos en las 6 especies del grupo *D. melanogaster* estudiadas.

Las relaciones filogenéticas de las especies del grupo *D. melanogaster* están bien resueltas, con la excepción de algunos miembros del sub-grupo *melanogaster*, específicamente la relación del par *D. erecta* / *D. yakuba* con *D. melanogaster*. Solamente se muestran los resultados obtenidos considerando las siguientes relaciones entre las tres especies, (*D. melanogaster*, (*D. erecta*, *D. yakuba*), esta topología es la que cuenta con mayor apoyo (Pollard *et al.* 2006).

Del conjunto de 12 especies cuyos genomas están secuenciados, se excluyeron del presente análisis aquellas que no pertenecen al grupo de especies *D. melanogaster*, debido a que el alto grado de divergencia resultaría en una saturación de sustituciones en las posiciones sinónimas, conduciendo a una estimación poco exacta de los parámetros de interés.

a) Estimación de ω .

Se obtuvieron, para cada gen, estimaciones por máxima verosimilitud del parámetro $\omega = d_N/d_S$. Este parámetro se puede considerar como un indicador de la tasa de evolución de los genes, y también se puede utilizar para inferir qué fuerzas evolutivas han actuado a lo largo de la historia de divergencia de las especies. Las mutaciones sinónimas no cambian la secuencia de aminoácidos, por lo tanto se asume la neutralidad de este tipo de sustituciones. Por el contrario, las mutaciones no sinónimas cambian la secuencia de aminoácidos, entonces la tasa de sustitución no sinónima (d_N) depende de las presiones selectivas que actúan sobre la secuencia proteica. Así, la razón $\omega = d_N/d_S$ puede considerarse como una medida de las presiones selectivas que

gobiernan la evolución de un gen. Si las mutaciones no sinónimas son deletéreas la selección negativa disminuirá su tasa de fijación, entonces la tasa de sustitución no sinónima será menor que la tasa sinónima y, por lo tanto, ω será menor a 0,3. Cuando el valor de ω se encuentra entre 0,3 y 1 se interpreta que en la evolución de la secuencia codificante ha actuado la selección negativa débil. En cambio, si las mutaciones no sinónimas son beneficiosas, se fijarán a una tasa mayor que las mutaciones sinónimas y por lo tanto ω será mayor que 1, en cuyo caso se interpreta que ha sido la SP la que ha gobernado la evolución de la secuencia de aminoácidos. Finalmente, si $\omega = 1$ se interpreta que la divergencia entre especies a nivel de la secuencia proteica es el resultado del equilibrio entre la mutación y la deriva génica, o conforme al modelo neutro de evolución.

Las estimaciones de ω se obtuvieron aplicando un modelo de máxima verosimilitud llamado *free ratio* utilizando el programa CodeML del paquete PAML 4 (Yang 2007). Los genes con $d_s = 0$ fueron excluidos del análisis en donde se compararon los valores de las medianas de ω entre los diferentes grupos de genes, ya que en este contexto comparativo los ω que resultan de un $d_s = 0$ no son biológicamente informativos.

b) Detección de selección positiva.

Si bien se considera que un ω estimado utilizando un modelo de *free ratio* mayor que 1 es indicativo de SP, se han desarrollado otros modelos de máxima verosimilitud específicos, y más adecuados, para detectar SP en una secuencia codificante. Así, la ocurrencia de SP en los genes de olfato se evaluó mediante dos modelos de *branch-site* (Modelo A y A1) y dos pruebas de *likelihood ratio* diferentes (Prueba I y II)(Zhang *et al.* 2005). Estos modelos se implementaron utilizando también el programa CodeML del paquete PAML 4 (Yang 2007).

Para aplicar estos modelos cada rama de la filogenia se define *a priori* como linaje focal o de fondo. Bajo estos modelos solamente se puede examinar la hipótesis de existencia de eventos de SP en el linaje focal. Cada una de las especies, excepto *D. ananassae*, incluidas en el presente análisis fue independientemente evaluada como linaje focal. *D. ananassae* fue usada como grupo externo para enraizar el árbol filogenético, por lo tanto no se la puede designar como linaje focal. También se evaluaron como linajes focales los ancestros hipotéticos. Las secuencias ancestrales se

reconstruyeron por máxima verosimilitud a partir de las secuencias de las especies terminales.

A diferencia del comportamiento estadístico de pruebas de *branch-site* previas (Zhang 2004), las desarrolladas por Zhang *et al.* (2005), denominadas Prueba I y Prueba II, han demostrado ser mejores para diferenciar entre SP y relajación de las restricciones selectivas (RRS) (Zhang *et al.* 2005). La Prueba I compara el Modelo M1a con el Modelo A. El primero asume que en la secuencia hay dos clases de sitios, unos con $0 < \omega_0 < 1$ y otros con $\omega_1 = 1$, fijos en todos los linajes del árbol filogenético. El Modelo A considera cuatro clases de sitios: sitios 0 que incluyen codones conservados a lo largo de las ramas del árbol ($0 < \omega_0 < 1$ en todos los linajes), sitios 1 que incluyen codones que evolucionan neutralmente ($\omega_1 = 1$ en todos los linajes), sitios 2a y 2b que incluyen codones conservados o que evolucionan de manera neutral en los linajes de fondo pero que pueden estar seleccionados positivamente en el linaje focal (2a: $0 < \omega_0 < 1$ en los linajes de fondo y $\omega_2 > 1$ en el linaje focal; y 2b: $\omega_1 = 1$ en los linajes de fondo y $\omega_2 > 1$ en el linaje focal). La proporción de cada clase de sitios (p_0, p_1, p_{2a}, p_{2b}) y el valor medio de ω_2 (ω_{2a} y ω_{2b}) se estimaron a partir de los datos utilizando métodos de máxima verosimilitud. La Prueba II compara el modelo nulo A1 contra el modelo A. Los parámetros en A1 son iguales a los de A con la excepción de que los sitios 2a y 2b están fijos en el linaje focal con $\omega_2 = 1$. Como Zhang *et al.* (2005) demostraron mediante una simulación, la Prueba I no puede distinguir apropiadamente casos de RRS de verdaderos eventos de SP. Por el contrario la Prueba II, al permitir que los sitios que estaban selectivamente restringidos en los linajes de fondo se puedan considerar como relajados en los linajes focales (bajo la proporción de sitios con $\omega_2 = 1$ que existen en el modelo A1) permite distinguir adecuadamente entre las dos alternativas. Entonces, para distinguir entre eventos de verdadera SP de eventos de RRS se evaluaron los resultados obtenidos con ambas pruebas. Como los modelos están anidados, fue posible realizar pruebas de *likelihood ratio* y los estadísticos de estas pruebas fueron posteriormente transformados en *p*-valores exactos utilizando la función *pchisq* del paquete estadístico R (R Development Core Team 2010). Las pruebas de *likelihood ratio* fueron realizadas utilizando una distribución de χ^2 con G. L. = 2 para la Prueba I y G. L. = 1 para la Prueba II, los cuales han demostrado ser conservativos en condiciones de SP (Zhang *et al.* 2005). Los *p*-valores derivados de estos análisis fueron corregidos mediante el método de Benjamini y Hochberg (Benjamini y Hochberg 1995).

Todos los análisis estadísticos de esta sección se realizaron con el paquete estadístico R (R Development Core Team 2010); y los de máxima verosimilitud con el programa CodeML del paquete PAML 4 (Yang 2007).

3.3. Resultados.

Las estimaciones de ω usando el modelo de *free ratio* revelaron que en todas las ramas de la filogenia la mayoría de los genes presentan un valor de $\omega < 0,3$, lo cual indica que los cambios ocurridos en las secuencias codificantes de estos genes son consecuencia de la selección negativa (Figura 3.2, Tabla Suplementaria 1). La mediana del conjunto de valores de ω de los genes olfativos en cada especie fue: $\omega_{D. melanogaster} = 0,0525$, $\omega_{D. simulans} = 0,0477$, $\omega_{D. sechellia} = 0,0805$, $\omega_{D. erecta} = 0,0879$, $\omega_{D. yakuba} = 0,0641$, $\omega_{D. ananassae} = 0,0449$ (Figura 3.2). Solamente 4 genes mostraron valores de ω mayores a 1, sugiriendo la ocurrencia de SP.

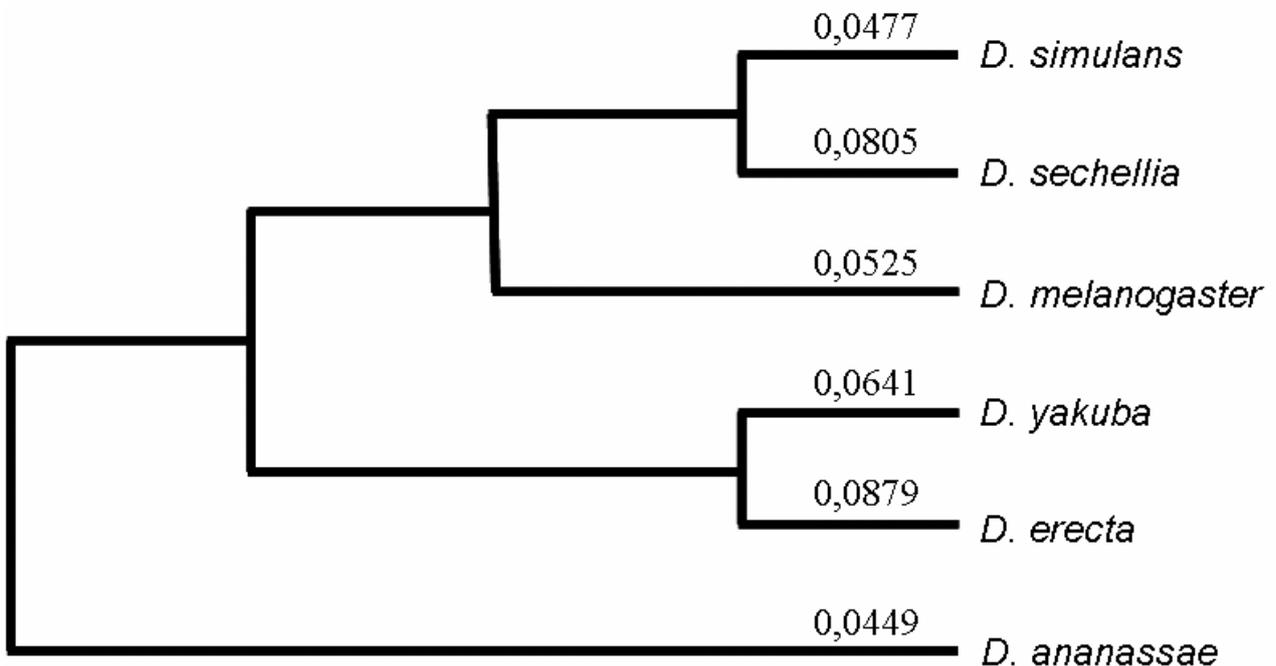


Figura 3.2: Medianas del conjunto de valores de ω de los genes olfativos estimados mediante el modelo *free ratio* en cada linaje.

Procesos que afectan la evolución de los genes olfativos en el sub-grupo *melanogaster*.

Como el modelo *free ratio* no es del todo apropiado para detectar SP, se aplicó el método de Zhang *et al.* (2005) descrito en materiales y métodos para detectar señales de SP en las secuencias de los genes olfativos. Los resultados muestran que ninguno de los genes que mostró un ω mayor a 1 con el modelo de *free ratio* fue significativo para SP o RRS al aplicar el método de Zhang *et al.* (2005). El valor de ω , estimado por *free ratio*, de estos genes fue sólo ligeramente mayor a 1, entonces debido a que las Pruebas I y II son conservativas no detectaron SP ni RRS, como lo sugerían los análisis con el modelo *free ratio*. En cambio, otros dos genes olfativos, *CG10777* en *D. sechellia* y *Xrp1* en *D. erecta*, presentaron señales de SP; y siete mostraron señales de RRS: *CG11883*, *CG32556* y *Moesin* en *D. simulans*; *discs lost* y *Or42a* en *D. erecta*; y *CG16708* y *Or82a* en *D. yakuba* (Tabla 3.2).

Gen	Prueba I		Prueba II		Interpretación Biológica: SP o RRS
	G. L.	P	G. L.	p	
<i>CG1077</i> _{<i>D.sec</i>}	2	1	1	0,0037	Gen bajo SP
<i>Xrp1</i> _{<i>D.ere</i>}	2	2x10 ⁻⁵	1	0,0007	Gen bajo SP
<i>CG11883</i> _{<i>D.sim</i>}	2	0,044	1	1	Gen que presenta señales de RRS
<i>CG32556</i> _{<i>D.sim</i>}	2	0,0054	1	0,1981	Gen que presenta señales de RRS
<i>Moesin</i> _{<i>D.sim</i>}	2	0,0026	1	1	Gen que presenta señales de RRS
<i>discs lost</i> _{<i>D.ere</i>}	2	0,0181	1	1	Gen que presenta señales de RRS
<i>Or42a</i> _{<i>D.ere</i>}	2	0,0136	1	1	Gen que presenta señales de RRS
<i>CG16708</i> _{<i>D.yak</i>}	2	0,0329	1	1	Gen que presenta señales de RRS
<i>Or82a</i> _{<i>D.yak</i>}	2	0,0045	1	0,5590	Gen que presenta señales de RRS

Tabla 3.2: Resultados de las Pruebas I y II de máxima verosimilitud. Se muestran los nombres de los genes y en subíndice la especie. G. L: Grados de libertad de la prueba de *likelihood ratio*. SP: selección positiva, RRS: relajación de las restricciones selectivas.

En general, el análisis utilizado para detectar SP en las cinco especies del sub-grupo *melanogaster* mostró que sólo 9 de los 565 (1,6%) genes olfativos analizados

presentan señales de SP o RRS. El 98,4 % restante muestra valores de ω que no fueron significativamente diferentes de lo esperado por neutralidad o fueron compatibles con selección negativa.

Evolución de grupos específicos de genes olfativos en el grupo de especies *D. melanogaster*.

En el siguiente apartado se describen, en cada una de las 6 especies del grupo de especies *D. melanogaster*, los análisis comparativos de las tasas de evolución (estimadas por el parámetro ω) entre las categorías de genes previamente establecidas.

En *D. melanogaster* la mediana del conjunto de valores de ω de los genes involucrados en el olfato larval (L) ($\omega = 0,0742$) fue dos veces mayor que en los genes que participan en el CO tanto en larva como adulto (LA) ($\omega = 0,0389$) y solamente en adulto (A) ($\omega = 0,0359$) (Figura 3.3). Sin embargo, las diferencias entre medianas no fueron significativas (Prueba de Wilcoxon, A vs. L: $w = 614$ $p = 0,0243$; A vs. LA: $w = 184,5$ $p = 0,3889$; L vs. LA: $w = 210$ $p = 0,3249$; se aplicó un ajuste para contrastes múltiples de Bonferroni). Esto sugiere que la tasa de evolución es independiente del estadio del ciclo de vida donde el gen participa del olfato; y, también, de si participa en uno o dos estadios.

Por otro lado, la mediana de ω ($\omega = 0,0326$) de los genes que se expresan en el nivel central del sistema olfativo fue significativamente menor que la de genes que se expresan en la periferia ($\omega = 0,0785$) (Figura 3.3; Prueba de Wilcoxon, $w = 987$ $p = 2,276 \times 10^{-4}$).

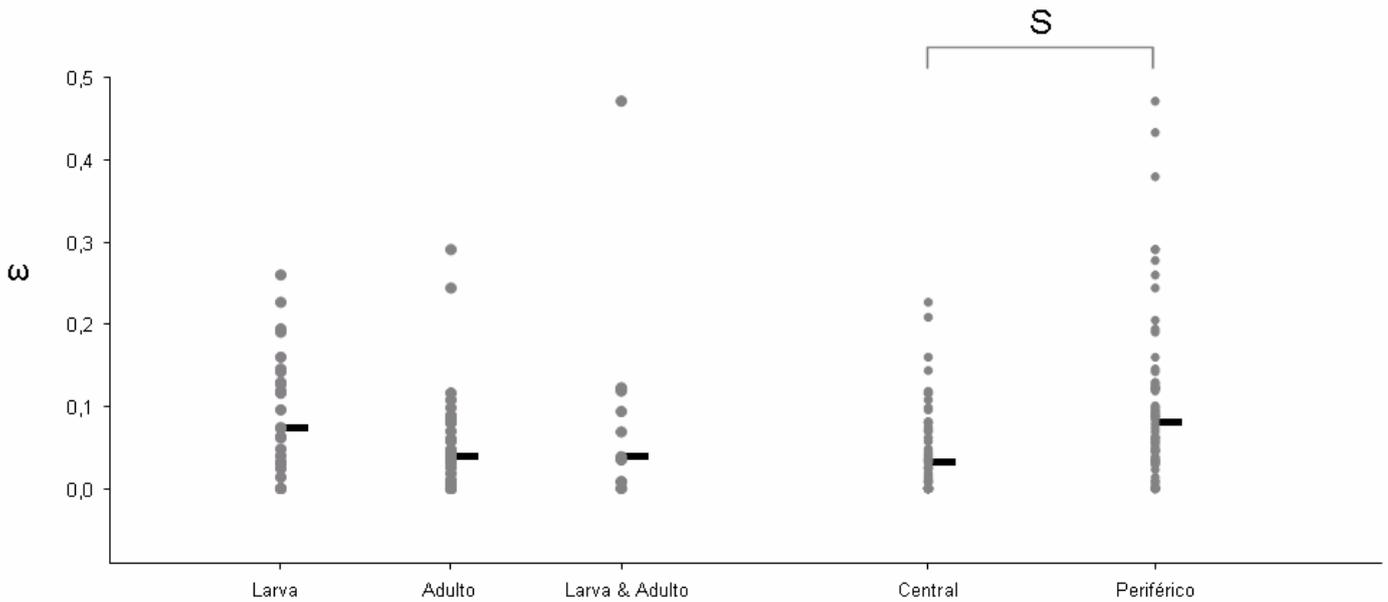


Figura 3.3: Valores de ω de los genes olfativos incluidos en cada categoría en *D. melanogaster*. Los círculos grises son las estimaciones de ω por el modelo de *free ratio* para cada gen. Las barras negras horizontales son la mediana de cada distribución de ω . Para una mejor visualización no se incluyeron los valores mayores a 0,5. Se destaca con una **S** la comparación que resultó significativa para la prueba de Wilcoxon. Se aplicó un ajuste para contrastes múltiples de Bonferroni.

Las mismas comparaciones realizadas en las otras especies del grupo revelaron diferencias significativas entre los ω de genes que participan en diferentes estadios del ciclo de vida en *D. simulans*, *D. erecta* y *D. ananassae*. En las dos primeras especies, la mediana de los valores de ω en los genes olfativos larvales fue significativamente más cercana a 1 que en genes de adulto (Figura 3.4; Prueba de Wilcoxon. A vs. L en *D. simulans*; $w = 539$ $p = 0,0057$ y en *D. erecta*: $w = 609$ $p = 0,0154$); mientras que en *D. ananassae* los genes larvales mostraron una mediana más cercana a 1 que los genes olfativos que se expresan tanto en larva como en adulto (Figura 3.4; Prueba de Wilcoxon. L vs. LA: $w = 258$ $p = 0,0165$).

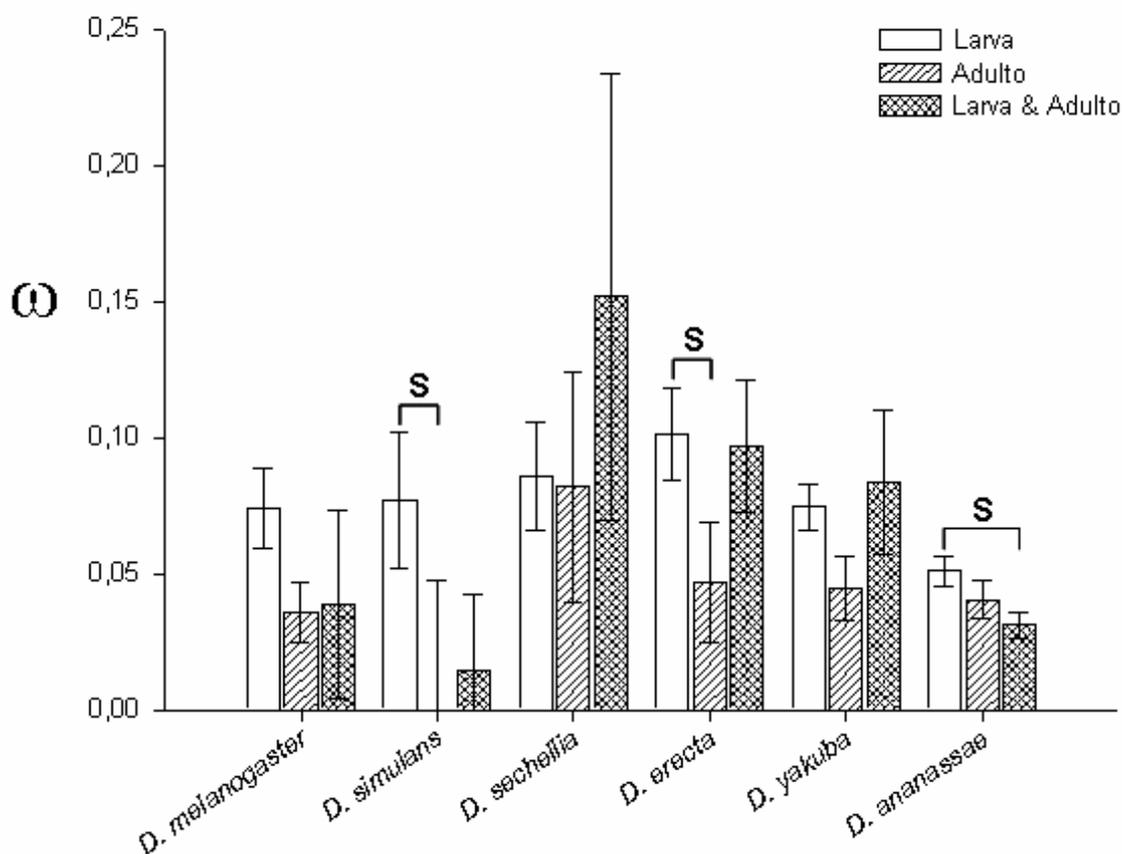


Figura 3.4: Las barras representan las medianas de la distribución de valores de ω de los genes olfativos agrupados en las categorías establecidas de acuerdo al estadio del ciclo de vida donde participan del olfato. Las barras de error son los valores de ESM (Desvío Estándar/ $N^{1/2}$, donde N es el número de genes en cada categoría). Se destacan con una **S** las comparaciones que resultaron ser significativamente diferentes en una prueba de Wilcoxon. Se aplicó un ajuste para contrastes múltiples de Bonferroni.

En cuanto a la comparación de la tasa de evolución de los genes que intervienen a diferentes niveles del sistema olfativo, las otras especies del grupo *D. melanogaster* mostraron el mismo patrón que *D. melanogaster* (Figura 3.5; Prueba de Wilcoxon. En *D. sechellia*: $w = 1696,5$ $p = 0,0111$; en *D. yakuba*: $w = 2407$ $p = 1,82 \times 10^{-5}$; en *D. erecta*: $w = 430$ $p = 1,54 \times 10^{-8}$; en *D. ananassae*: $w = 947$ $p = 9,52 \times 10^{-5}$) con la única excepción de *D. simulans*. Estos resultados sugieren que existen mayores restricciones selectivas para los genes olfativos centrales, y que este patrón es compartido por la mayoría de las especies del grupo.

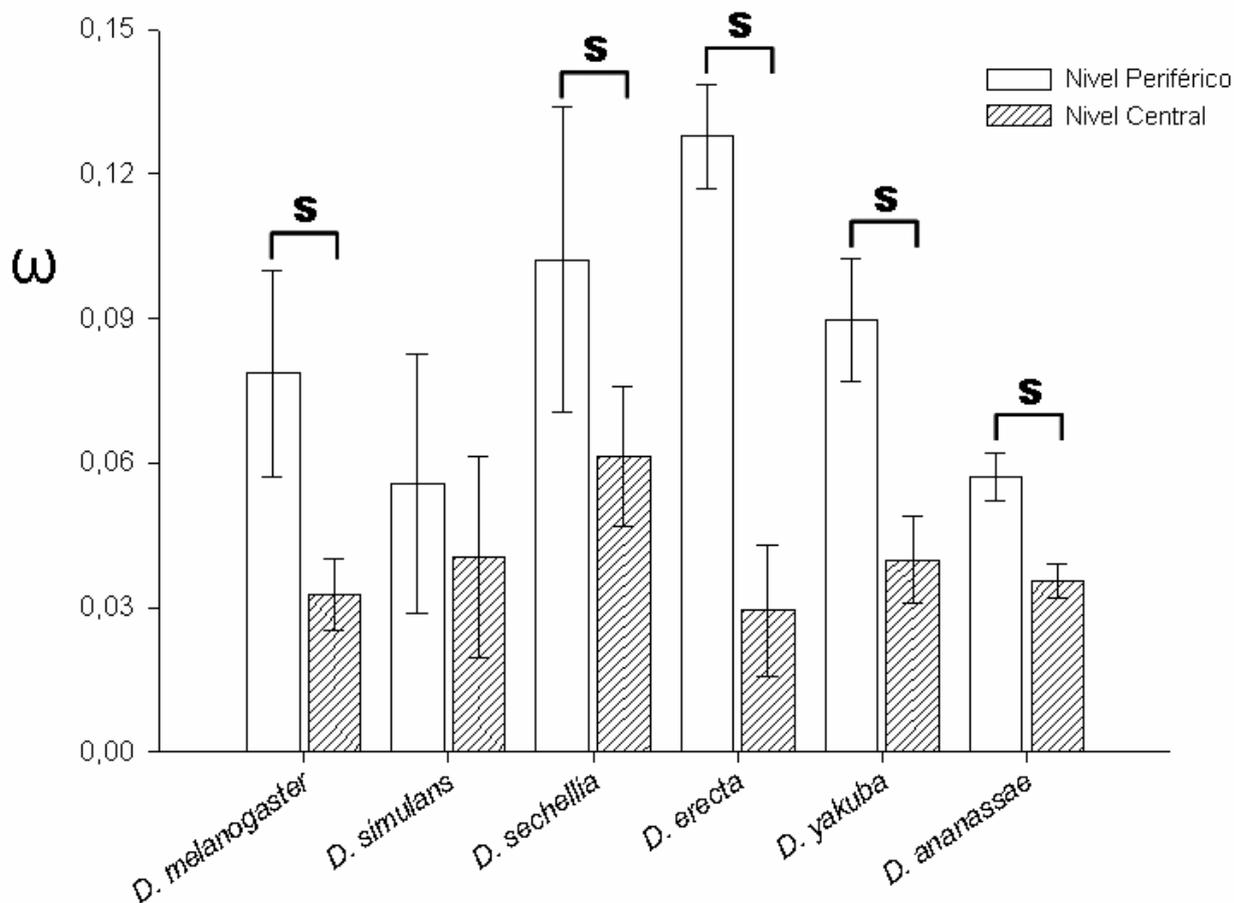


Figura 3.5: Las barras que representan las medianas de la distribución de valores de ω de los genes olfativos en las categorías establecidas de acuerdo al nivel del sistema olfativo en que se expresan. Las barras de error son los valores de ESM (Desvío Estándar/ $N^{1/2}$, donde N es el número de genes en cada categoría). Se destacan con una **S** las comparaciones que resultaron ser significativamente diferentes en una prueba de Wilcoxon. Se aplicó un ajuste para contrastes múltiples de Bonferroni.

Tasas de evolución en linajes especialistas vs generalistas.

Estudios previos han informado que en las especies especialistas del sub-grupo *melanogaster* los genes olfativos evolucionan a una tasa mayor que en las especies generalistas. En estos trabajos lo autores plantean que esto podría deberse a la selección direccional en un “ambiente de un solo hospedador” en las especies especialistas (McBride 2007; McBride y Arguello 2007; Vieira *et al.* 2007). Para poner a prueba esta hipótesis se realizaron dos análisis diferentes.

Primero, se compararon los valores de ω de los genes de olfato periféricos y centrales entre especialistas y generalistas. Como control genómico, también se

realizaron las mismas comparaciones para el resto del genoma codificante. Este control permite diferenciar efectos a escala genómica debido a eventos demográficos de efectos locales debidos a procesos que repercuten sólo en los genes olfativos. Los resultados mostraron que en las especialistas la tasa de evolución es significativamente mayor que en las generalistas para todos los genes olfativos (Tabla 3.3; Prueba de Wilcoxon. Especialistas vs. Generalistas: $w = 3,182$ $p = 0,00146$). Sin embargo, cuando se refinó el análisis separando los genes en periféricos y centrales resultó que las diferencias entre especialistas y generalistas solamente se deben a los genes periféricos (Tabla 3.3; Prueba de Wilcoxon. Especialistas vs. Generalistas: $w = 3,793$ $p < 0,001$), y por lo tanto las tasas de evolución de los genes centrales no se diferencian significativamente entre los grupos de especies con diferente modo de explotación del recurso (Tabla 3.3; Prueba de Wilcoxon. Especialistas vs. Generalistas: $w = 0,841$ $p = 0,4$). Es importante señalar que el control genómico también mostró una aceleración de la tasa de evolución en las especialistas (Tabla 3.3; Prueba de Wilcoxon. Especialistas vs. Generalistas $w = 25,277$ $p < 0,0001$). Además, comparaciones entre cada una de las especialistas con las generalistas revelaron que tal patrón de aceleración en las tasas de evolución se da solamente en *D. erecta* (Tabla 3.3; Prueba de Wilcoxon. Todos los genes olfativos: $w = 3,122$ $p = 0,0018$; genes periféricos: $w = 4,307$ $p < 0,0001$; genes centrales: $w = 0,141$ $p = 0,888$; resto del genoma: $w = 24,797$ $p < 0,0001$) y no en *D. sechellia* (Tabla 3.3; Prueba de Wilcoxon. Todos los genes olfativos: $w = 1,864$ $p = 0,0623$; genes periféricos: $w = 1,609$ $p = 0,108$; genes centrales: $w = 1,231$ $p = 0,2183$; resto del genoma: $w = 14,22$, $p < 0,0001$).

	Todos los Genes Olfativos			Genes Periféricos		
	Nº genes por grupo	Desviación	<i>p</i>	Nº genes por grupo	Desviación	<i>p</i>
Especialistas vs. Generalistas	217 – 331	0.0315	0.00146	117 – 179	0.0426	< 0.001
<i>D. erecta</i> vs. Generalistas	114 – 331	0.0358	0.0018	61 – 179	0.0496	< 0.0001
<i>D. sechellia</i> vs. Generalistas	103 – 331	0.0266	0.0623	56 – 179	0.024	0.108

	Genes Centrales			Resto del Genoma		
	Nº genes por grupo	Desviación	<i>p</i>	Nº genes por grupo	Desviación	<i>p</i>
Especialistas vs. Generalistas	100 – 152	0.0047	0.4	15968 – 23959	0.0174	< 0.0001
<i>D. erecta</i> vs. Generalistas	53 – 152	-0.0052	0.888	8288 – 23959	0.0184	< 0.0001
<i>D. sechellia</i> vs. Generalistas	47 – 152	0.0268	0.2183	7680 – 23959	0.016	< 0.0001

Tabla 3.3: Comparación de los valores de ω de los genes de olfato entre especialistas y generalistas. Las especies especialistas son *D. erecta* y *D. sechellia*, y las generalistas *D. melanogaster*, *D. simulans* y *D. yakuba* (*D. ananassae* no fue incluida en las comparaciones interespecíficas debido a que como consecuencia de ser el grupo externo, la estimación de ω en esta especie tiende a estar sobreestimada en comparación al resto). Desviación: es la diferencia de mediana entre grupos. Los *p*-valores son de pruebas de Wilcoxon. Los *p*-valores significativos están en negrita. Se aplicó un ajuste para contrastes múltiples de Bonferroni.

En segundo lugar, se evaluó, específicamente, si las tasas de sustituciones no sinónimas se habrían acelerado en las ramas que llevan a *D. erecta* y *D. sechellia*. Para realizar esto se infirieron por máxima verosimilitud las secuencias ancestrales comunes entre las especies especialistas y las generalistas más cercanas, es decir *D. erecta* / *D. yakuba* y *D. sechellia* / *D. simulans*. Estos análisis mostraron una aceleración significativa en las tasas de sustitución no sinónimas en la rama que lleva a *D. erecta* para los genes olfativos periféricos, aunque cabe señalar que lo mismo se observó para el resto del genoma codificante (Figura 3.6. Prueba de pares apareados de Wilcoxon. Genes periféricos: $N = 53$; $Z = 5,83$, $p < 0,0001$; resto del genoma: $N = 8369$, $Z = 28,526$, $p < 0,0001$). Asimismo, llama la atención el hallazgo de una aceleración similar en las tasas de sustitución no sinónimas en la rama que lleva a la generalista *D. yakuba* (Figura 3.6. Prueba de pares apareados de Wilcoxon. Genes periféricos: $N = 62$, $Z = 3,033$, $p < 0,0024$; resto del genoma $N = 8369$, $Z = 28,632$, $p < 0,0001$).

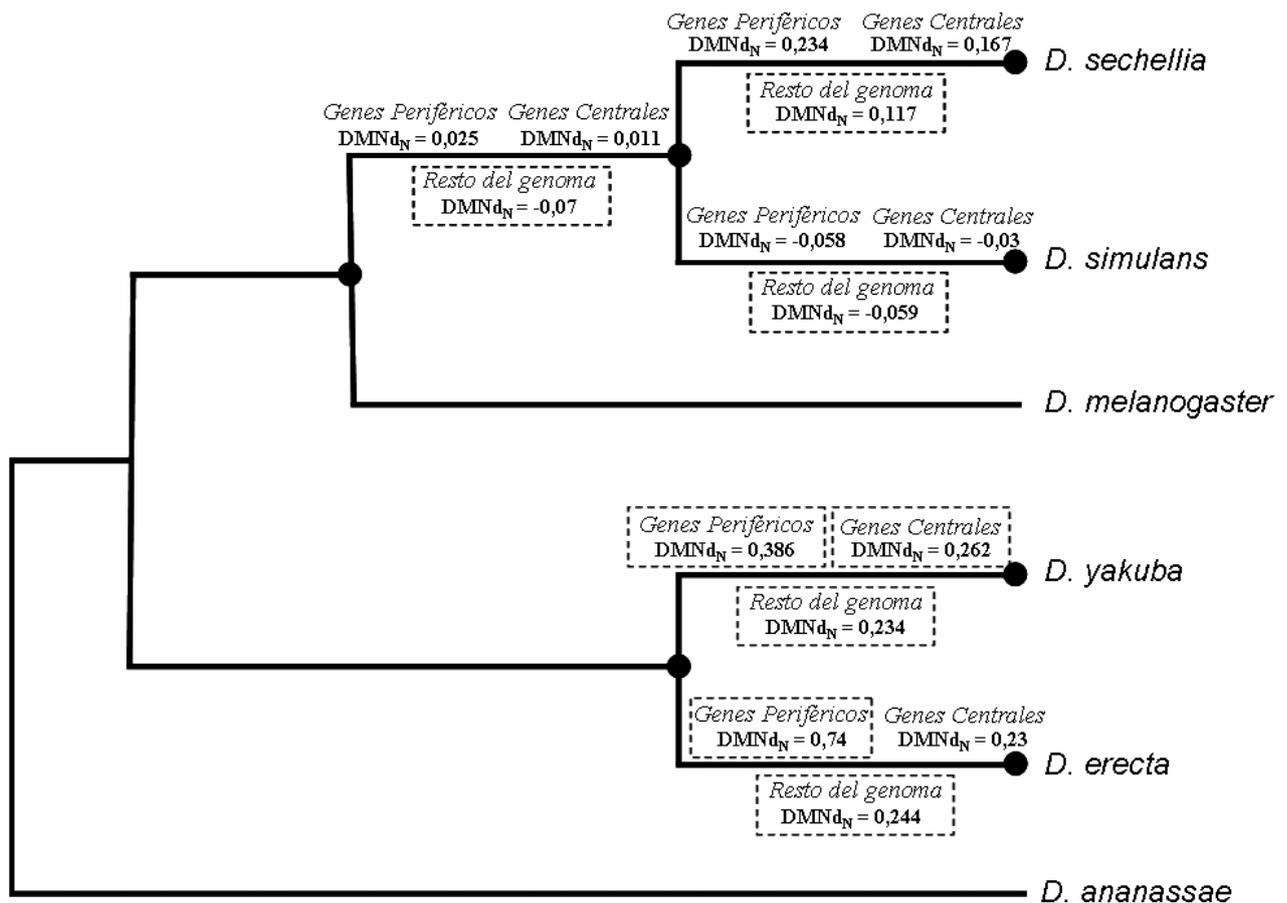


Figura 3.6: Valores de la diferencia media normalizada entre las tasas de sustitución no sinónima (DMNd_N) para las especies especialistas y las especies generalistas más cercanas. $DMNd_N = (Media\ d_N\ linaje\ actual / Desvío\ Estándar\ d_N\ linaje\ actual) - (Media\ d_N\ ancestro / Desvío\ Estándar\ d_N\ ancestro)$. $DMNd_N > 0$ indica aceleración en la tasa de sustitución no sinónima en el linaje derivado, $DMNd_N \leq 0$ indica la ausencia de aceleración en la tasa de sustituciones no sinónimas en el linaje derivado. Se destacan en rectángulos las comparaciones que mostraron un DMNd_N significativamente diferente de 0 en una prueba de pares apareados de Wilcoxon. Los puntos negros son los nodos del cladograma que se incluyeron en el análisis.

Estos resultados llevan a proponer que en *D. erecta* la aceleración de las tasas de sustitución no sinónima de los genes olfativos no está unívocamente relacionada con la utilización de un solo hospedador que ocurre en las especialistas. Por el contrario, la tasa de sustitución de reemplazo de los genes olfativos no resultó estar acelerada en la rama que lleva a *D. sechellia* (Figura 3.6. Prueba de pares apareados de Wilcoxon. Genes periféricos: $N = 62$ $Z = 1,606$ $p = 0,108$; genes centrales: $N = 53$ $Z = 1,171$ $p = 0,241$), ni en la que lleva a *D. simulans* (Figura 3.6. Prueba de pares apareados de Wilcoxon. Genes periféricos: $N = 62$ $Z = 0,382$ $p = 0,702$; genes centrales: $N = 53$ $Z = 0,08$ $p = 0,936$). Tampoco se detectó una aceleración en las tasa de evolución en los genes olfativos en la rama que va al ancestro común entre *D. sechellia* / *D. simulans* (Figura 3.6. Prueba de pares apareados de Wilcoxon. Genes periféricos: $N = 62$ $Z = 0,022$ $p = 0,982$; genes centrales: $N = 53$ $Z = 0,781$ $p = 0,435$).

3.4. Discusión y Conclusiones.

Los resultados de la presente sección muestran que es la selección negativa el proceso que afecta la evolución de la mayoría de los genes olfativos en las 6 especies del grupo *D. melanogaster* (Figura 3.2; Tabla suplementaria 3.1). Este hallazgo coincide con los resultados de otros estudios que sólo incluyeron genes olfativos periféricos (genes RO y PUO) (Guo y Kim 2007; McBride y Arguello 2007; Tunstall *et al.* 2007; Vieira *et al.* 2007; Gardiner *et al.* 2008). Se detectó selección positiva solamente en dos genes, uno en *D. sechellia* (*CG10777*) y el otro en *D. erecta* (*Xrp1*) (Tabla 3.2). Los demás genes olfativos mostraron patrones de cambio consistentes con selección negativa o neutralidad. En cuanto a otros estudios que también evaluaron la ocurrencia de SP en genes olfativos, aunque sólo en *D. melanogaster*, los resultados son conflictivos. Por un lado, Vieira *et al.* (2007) estudiando genes PUO y Gardiner *et al.* (2008) genes RO no encontraron evidencia de SP. Por otro lado, Guo y Kim (2007) y Tunstall *et al.* (2007) reportaron selección positiva en diez genes RO (*Or9a*, *Or10a*, *Or19a*, *Or43a*, *Or56a*, *OrN1*, *OrN2*, *Or33c*, *Or42a*, *Or85e*). En este estudio se analizaron seis de estos genes (*Or9a*, *Or10a*, *Or33c*, *Or42a*, *Or43a*, *Or56a*) y no se encontraron evidencias de SP. A pesar de que la mayoría de los trabajos que evaluaron los procesos evolutivos que actúan sobre los genes olfativos han encontrado que los genes olfativos que exhiben señales de SP son una pequeña fracción del total de genes

analizados, o directamente no los hay, los casos de SP reciben una atención desproporcionada y se usan para concluir que el CO está evolucionando principalmente por SP. Este escenario donde la SP es invocada a pesar de que no exista una evidencia sólida, aparece como una nueva versión de lo que Gould y Lewontin (1979) popularizaron como “contar historias adaptativas”, en donde la SP es favorecida sobre otros tipos de procesos evolutivos (incluso otros tipos de selección natural) como principal responsable de la evolución de una característica fenotípica. De hecho, Whiteman y Pierce (2008) en un artículo de revisión sobre estudios de genómica comparada en familias multigénicas de genes olfativos concluyeron que “aunque atractiva, una interpretación adaptacionista podría no estar justificada”. Reforzando lo expresado en la sentencia de Whiteman y Pierce (2008), este estudio no permite concluir que la selección positiva sea el principal factor evolutivo actuante sobre la arquitectura genética del CO en las especies del grupo *D. melanogaster*, ya que más del 98 % del extenso conjunto de genes analizados, no mostró señales de SP, sino tasas de sustituciones nucleotídicas compatibles con neutralidad o con selección negativa.

Con respecto a las hipótesis sobre las tasas de evolución de las diferentes categorías de genes involucrados en la arquitectura genética del CO, se han encontrado diferencias claras entre los genes olfativos periféricos y los centrales en todas las especies analizadas, excepto en *D. simulans*. En promedio los genes que se expresan en el nivel central del sistema olfativo exhibieron tasas de evolución menores que los periféricos (Figura 3.3 y Figura 3.5). Si se tiene en cuenta que los genes periféricos, dadas sus funciones moleculares y biológicas, solamente participan en la expresión del olfato mientras que los genes centrales tienden a ser más pleiotrópicos, es decir participan de la arquitectura genética de otros caracteres fenotípicos además de la del CO; la explicación más pausable es que los genes centrales evolucionan a una tasa menor debido a que son más pleiotrópicos. Existen evidencias empíricas en *D. melanogaster* (Alvarez-Ponce et al. 2009) y en hongos (He y Zhang 2006; Salathe *et al.* 2006), así como también modelos teóricos (Otto 2004; Gu 2007) que dan un fuerte apoyo a la hipótesis general de que genes más pleiotrópicos evolucionan más lentamente porque presentan mayores restricciones funcionales.

Por el contrario, no se corroboró categóricamente la hipótesis planteada sobre las diferencias en las tasas de evolución entre los genes que participan de la arquitectura genética del CO en uno o en dos estadios del ciclo de vida, excepto en *D. ananassae* (Figura 3.4). Tampoco se encontró una clara diferenciación en las tasas de evolución

entre los genes que se expresan sólo en el estadio larval o el adulto (Figura 3.4). McBride y Arguello (2007) obtuvieron resultados similares para los genes RO. En principio, los presentes resultados no concuerdan con los de otros trabajos, ni los descritos en secciones previas de esta tesis, acerca de la existencia de un desacople parcial entre las arquitecturas genéticas del CO larval y adulto (ver Secciones I y II). Dos escenarios diferentes explicarían esta situación: que no se realizó una selección de genes apropiada para detectar, al nivel de cambios en las secuencias codificantes, las diferencias esperadas; o que simplemente no los hay y que tales diferencias se dan, por ejemplo, en la pérdida y ganancia de genes (Guo y Kim 2007; Vieira *et al.* 2007) y/o en cambios en la expresión (Arbeitman *et al.* 2002) y no al nivel de cambios en las secuencias codificantes.

Por último, la evaluación de la hipótesis de aceleración de las tasas de evolución en especialistas vs generalistas como consecuencia de la selección direccional en un ambiente de un solo hospedador, mostró que en las primeras los genes olfativos periféricos parecen haber estado evolucionando a tasas mayores sólo en *D. erecta*. Sin embargo, el control genómico reveló que ésta parece ser una tendencia a escala genómica y no una característica particular de los genes olfativos. Por el contrario, la falta de aceleración en los genes olfativos centrales, en contra de la tendencia genómica, se reveló como una característica compartida entre *D. erecta* y *D. sechellia* (Tabla 3.3). Este patrón compartido, como se planteó previamente, puede ser consecuencia de mayores restricciones funcionales en los genes centrales debido a que son altamente pleiotrópicos y por lo tanto son menos propensos a cambiar ante presiones selectivas impuestas por ambientes de un solo hospedador. Cuando se analizó particularmente si existe una aceleración de la tasa de sustitución no sinónimas en los genes olfativos en las ramas de las especies especialistas, tampoco se encontraron evidencias claras para apoyar la hipótesis planteada (Figura 3.6). Por lo tanto, los resultados no son consistentes con la idea de que la selección direccional estaría influyendo mayormente en la evolución de la arquitectura genética del CO en especies que viven en “ambientes de un solo hospedador”. Entonces, al menos en *D. sechellia*, y de acuerdo con Gardiner *et al.* (2008), no se pueden descartar eventos demográficos históricos como determinantes de la evolución de las bases genéticas del olfato. De hecho, se sabe que durante su historia evolutiva, las poblaciones de *D. sechellia* pasaron por tamaños poblacionales pequeños asociados a un evento de colonización desde el continente hacia una isla (Kliman *et al.* 2000). Evidencia de este evento fundador son los niveles

históricos de baja variabilidad genética en esta especie (Cariou *et al.* 1990; Morton *et al.* 2004). Lamentablemente no se conoce en detalle la historia evolutiva de *D. erecta*, pero los resultados obtenidos tampoco apoyan contundentemente la hipótesis de selección direccional en un ambiente de un hospedador sobre los genes olfativos.

A modo de resumen se puede concluir que las tasas de evolución de los genes olfativos son independientes del estadio del ciclo de vida en el cual participan de la arquitectura genética del CO; pero que dependen de la posición que ocupan en el sistema olfativo, mostrando los genes que se expresan en un nivel central una tasa de evolución menor consistente con mayores restricciones funcionales sobre los mismos. Con respecto a la evolución de los genes olfativos en los linajes que presentan una especialización ecológica, los resultados no apuntan a que la especialización promueve una evolución acelerada de los genes olfativos, sino que revela patrones evolutivos idiosincráticos en las dos especies especialistas analizadas.

3.5. Material Suplementario a la Sección III.

Tabla Suplementaria 3.1.

Se muestra la estimación del valor de ω para cada gen en cada especie del grupo *D. melanogaster* incluida en el análisis. **Nivel:** nivel del sistema olfativo en el que se expresa (periférico: genes cuyos productos proteicos participan en el primer contacto con las moléculas químicas; central: genes que están involucrados en el olfato, pero no lo hacen en la periferia sino que en posiciones internas de la cadena de eventos que ocurren en un organismo para conformar la respuesta olfativa). **Estadio:** estadio/s del ciclo de vida en el cual el gen participa (o se expresa) del comportamiento olfativo (L: larva; A: Adulto; LA: Larva y Adulto). **FlyBase ID:** número de identificación en *FlyBase*. **Referencia:** referencia bibliográfica de donde se obtuvo la información para realizar la categorización de los genes, 1: Goulding *et al.* (2000), 2: zur Lage *et al.* (2003), 3: Sambandan *et al.* (2006), 4: Capítulo I, Sección II de la presente tesis, 5: Stoltzfus *et al.* (2003), 6: Fanara *et al.* (2002), 7: Pielage *et al.* (2003), 8: Shiraiwa *et al.* (2000), 9: Anholt *et al.* (1996), 10: Rollmann *et al.* (2005), 11: Galindo y Smith (2001), 12: Hekmat-Scafe *et al.* (2002), 13: Pikielny *et al.* (1994), 14: Park *et al.* (2000), 15: Vosshall y Stocker (2007). Las celdas vacías corresponden a genes con $d_S = 0$ o que se excluyeron del análisis por problemas en la alineación.

Gen	Nivel	Estadio	FlyBase ID	Referencia	<i>D. melanogaster</i>	<i>D. simulans</i>	<i>D. sechellia</i>	<i>D. erecta</i>	<i>D. yakuba</i>	<i>D. ananassae</i>
<i>amos</i>	Central	-	FBgn0003270	1; 2	0,0716	0,0952	0	0,0269	0,017	0,0362
<i>bicoid-interacting protein 3</i>	Central	LA	FBgn0033073	3; 4	0,1186	0,0409	0,157	0,0561	0,0686	0,0313
<i>big brain</i>	Central	L	FBgn0000180	4	0,0244	0,0618	0,1705	0,0247	0,0486	0,0413
<i>Calreticulin</i>	Central	A	FBgn0005585	3; 4; 5	0	0	0,0851	0	0,013	0,0198
<i>CG10064</i>	Central	A	FBgn0035724	3; 4	0,0105	0,0156	0	0,006	0,0182	0,0164

<i>CG10777</i>	Central	-	FBgn0029979	3	0,062	0,0001	0,0989	0,022	0,017	0,0269
<i>CG10778</i>	Central	-	FBgn0029980	3	0,0574	0,0788	0,0476	0,0251	0,0507	0,0257
<i>CG11883</i>	Central	L	FBgn0033538	4	0	0,1163	0	0,0043	0,0284	0,0215
<i>CG1337</i>	Central	A	FBgn0040369	3; 4	0,037	-	0,2038	0,1391	0,031	0,0449
<i>CG14411</i>	Central	-	FBgn0030582	3	0,0158	0,0312	0,0729	0,0224	0,023	0,0477
<i>CG14430</i>	Central	A	FBgn0029927	3; 4	0,1164	0	0,2323	0	0	0,0431
<i>CG14591</i>	Central	A	FBgn0033054	3; 4	0,0342	0,1031	0,0708	0,0448	0,0883	0,0164
<i>CG16708</i>	Central	A	FBgn0037315	3	0,0257	0	0,0569	0,0783	0,1103	0,0396
<i>CG17646</i>	Central	L	FBgn0031362	4	0,0482	0,0711	0,0786	0,0799	0,1382	0,0361
<i>CG32556</i>	Central	A	FBgn0052556	3; 4	0,0184	0,832	0,0805	0,0163	0,0093	0,0187
<i>CG6175</i>	Central	L	FBgn0036152	4	0,0957	0	-	0,0598	0,0526	0,051
<i>CG6783</i>	Central	A	FBgn0037913	3; 4	0	-	0,0922	0,0137	0,0918	0,0337
<i>CG8963</i>	Central	A	FBgn0034181	3; 4	0,0811	0,1545	0,0613	0,0471	0,0418	0,06
<i>CG9238</i>	Central	-	FBgn0036428	3	0,0353	0	0,163	0	0,0606	0,0579
<i>couch potato</i>	Central	LA	FBgn0000363	3; 4	0,008	0,0226	0,0361	0,0408	0,0549	0,0355
<i>Cricklet</i>	Central	L	FBgn0000326	4	0	0	-	0	0	0,0903
<i>chameau</i>	Central	A	FBgn0028387	3; 4	0,0798	0,1785	0,1875	0,1016	0,1003	0,0436
<i>discs lost</i>	Central	-	FBgn0024510	6; 7	0,2087	0,3734	0,1097	0,1882	0,0905	0,0403
<i>DNApolymerase ε</i>	Central	-	FBgn0020756	3	0,008	0,0405	0,0142	0,0146	0,0075	0,0111
<i>draper</i>	Central	L	FBgn0027594	4	0,0397	0,0532	0,0204	0,0462	0,0603	0,0309
<i>easily shocked</i>	Central	L	FBgn0000536	4	0,0326	0	0,213	0,0448	0,0248	0,0379
<i>escargot</i>	Central	-	FBgn0001981	3	0,0248	0,0365	0,0802	0,0252	0	0,0126
<i>frizzled</i>	Central	A	FBgn0001085	3; 4	0	0,1244	0	0,0258	0,0112	0,0059
<i>ftz transcription factor 1</i>	Central	-	FBgn0001078	3	0,0812	0,0533	0,0775	0,0906	0,0418	0,0557

<i>geko</i>	Central	-	FBgn0020300	8	0,1437	-	-	0,2182	0,0329	0,0354
<i>Glutamate dehydrogenase</i>	Central	-	FBgn0001098	3	0	0	0	0	0	0,0202
<i>Glutamine synthetase 2</i>	Central	L	FBgn0011455	4	0,1163	0,2191	-	0,0721	0,072	0,035
<i>Gp150</i>	Central	L	FBgn0013272	4	0,0742	0,0512	0,0761	0,1143	0,0775	0,0739
<i>Heat shock protein 23</i>	Central	-	FBgn0001224	3	0	0,1988	-	0,043	0,4182	0,0378
<i>Heat shock protein 27</i>	Central	L	FBgn0001226	4	0,1601	0,135	0	0,03	0,046	0,042
<i>High mobility group protein D</i>	Central	-	FBgn0004362	3	0	0	0	0,0909	0	0,0353
<i>innexin 2</i>	Central	-	FBgn0027108	3	0,0131	0	0	0	0,0402	0,0135
<i>lethal (2) 05510</i>	Central	L	FBgn0028622	4	0	0	0,0146	0,0289	0,0216	0,0182
<i>lilliputian</i>	Central	-	FBgn0041111	3	0,0445	0,2064	0,2094	0,0469	0,0787	0,0833
<i>misshapen</i>	Central	L	FBgn0010909	4	0	0,1487	0,1396	0,0273	0,0178	0,0451
<i>Moesin</i>	Central	-	FBgn0011661	3	0	0,1945	0,0392	0,0082	0	0,0063
<i>neuralized</i>	Central	A	FBgn0002932	3; 4	0,0415	0	0	0,0209	0,0118	0,0186
<i>NMDA receptor 1</i>	Central	A	FBgn0010399	3; 4	0,0314	0	0	0,0148	0,0047	0,0111
<i>Obp19a</i>	Periférico	A	FBgn0031109	11; 12	0	-	-	-	0	0,014
<i>Obp19c</i>	Periférico	L	FBgn0031111	11; 12	0,0306	0	0,0931	0,0919	0,0569	0,1116
<i>Obp19d (Pheromone-binding protein-related protein 2)</i>	Periférico	A	FBgn0011280	11; 12; 13; 14	0	0,1528	-	0,0917	0,2352	0,1383
<i>Obp28a (Pheromone-binding protein-related protein 5)</i>	Periférico	LA	FBgn0011283	11; 12; 13; 14	0,4717	0,2525	0	0,1208	0,3215	0,0075
<i>Obp47a</i>	Periférico	-	FBgn0033573	12	0,4337	0,0001	0,2001	0,2917	0,0461	0,1092
<i>Obp47b</i>	Periférico	-	FBgn0033614	12	0,2777	0,0782	0	0,3214	0,1525	0,0586
<i>Obp49a</i>	Periférico	-	FBgn0050052	12	0,1598	-	0,3323	0,2739	0,1197	0,0685
<i>Obp50a</i>	Periférico	-	FBgn0050067	12	1,1336	0,116	0,8217	0,1434	0,0506	0,1409
<i>Obp50e</i>	Periférico	-	FBgn0033931	12	0,205	0,2839	0,0938	0,1507	0,0421	0,0495
<i>Obp56a</i>	Periférico	-	FBgn0034468	11; 12	0,3798	0,1143	0,1047	0,1591	0,2917	0,183

<i>Obp56b</i>	Periférico	L	FBgn0046880	11; 12	0,1943	0,0702	0	0,3267	0,1572	0,0456
<i>Obp56c</i>	Periférico	LA	FBgn0046879	11; 12	0,1227	0	1,0339	0,0968	0,2155	0,0478
<i>Obp56g</i>	Periférico	L	FBgn0034474	11; 12	0,119	0,4119	0,0544	0,1154	0,0965	0,1361
<i>Obp56h</i>	Periférico	LA	FBgn0034475	11; 12	0,0389	0,1625	0	0,1191	0,0749	0,046
<i>Obp58b</i>	Periférico	-	FBgn0034768	12	0,0525	0	0,0738	0,1403	0,4557	0,0613
<i>Obp58d</i>	Periférico	-	FBgn0034770	12	0,0326	0,0871	0,0713	0,2394	0,1116	0,0716
<i>Obp59a</i>	Periférico	-	FBgn0034766	12	0	-	0	0,1864	0,0673	0,1057
<i>Obp69a (Pheromone-binding protein-related protein 1)</i>	Periférico	-	FBgn0011279	12; 13	0,1008	0,3308	0	0,2285	0,0429	0,0545
<i>Obp83a (Pheromone-binding protein-related protein 3)</i>	Periférico	A	FBgn0011281	12; 13	0,0453	0	0	0,0748	0	0,0473
<i>Obp83b (Olfactory-specific E)</i>	Periférico	A	FBgn0010403	12	0,0985	0,0001	-	0,015	0,0117	0,0077
<i>Obp83cd</i>	Periférico	A	FBgn0046878	11; 12	0,0838	0	0,0982	0,3289	0,089	0,0231
<i>Obp83ef</i>	Periférico	-	FBgn0046876	12	0,0785	-	0,1264	0,1934	0,1146	0,0388
<i>Obp83g</i>	Periférico	-	FBgn0046875	12	0,0955	-	0,1211	0,12	0,1479	0,0366
<i>Obp84a (Pheromone-binding protein-related protein 4)</i>	Periférico	-	FBgn0011282	12; 13	0,0562	0,2071	0	0,181	0,1657	0,062
<i>Obp99a</i>	Periférico	L	FBgn0039678	11; 12	0	-	0,1899	0,1674	0,1156	0,0656
<i>Obp99c</i>	Periférico	-	FBgn0039682	12	0,0487	0	-	0,0865	0,0641	0,1156
<i>Obp99d</i>	Periférico	-	FBgn0039684	11; 12	0,029	0,0668	0,1377	0,2579	0	0,1159
<i>Or10a</i>	Periférico	-	FBgn0030298	15	0,0919	0	0,4159	0,0937	0,1229	0,0673
<i>Or13a</i>	Periférico	LA	FBgn0030715	15	0	0,1554	-	0,1116	0,0834	0,0639
<i>Or1a</i>	Periférico	L	FBgn0029521	15	0,1423	0,3625	0	0,184	0,1628	0,0548
<i>Or22c</i>	Periférico	L	FBgn0026396	15	0,2602	0,1791	0,1938	0,2307	0,0991	0,0752
<i>Or23a</i>	Periférico	A	FBgn0026395	15	0,0037	0,0654	0,1727	0,0782	0,1253	0,1197
<i>Or24a</i>	Periférico	L	FBgn0026394	15	0,1457	0,1362	0,0966	0,2379	0,0901	0,0344
<i>Or30a</i>	Periférico	L	FBgn0032096	15	0,1294	0,0293	0	0,0729	0,0276	0,055

<i>Or33c</i>	Periférico	A	FBgn0026390	15	0,0476	0	0,1068	0,1278	0,0649	0,1014
<i>Or35a</i>	Periférico	LA	FBgn0028946	15	0	-	0,5743	0,2456	0,2409	0,0289
<i>Or42a</i>	Periférico	LA	FBgn0033041	15	0,0938	0	0,2599	0,3384	0,0864	0,0311
<i>Or42b</i>	Periférico	LA	FBgn0033043	15	0,069	0	0,1518	0,0387	0,0092	0,018
<i>Or43a</i>	Periférico	A	FBgn0026389	15	0,0605	0	0,0833	0,0981	0,0472	0,1097
<i>Or43b</i>	Periférico	-	FBgn0026393	15	0,0881	0,0557	0,1225	0,2515	0,1845	0,0344
<i>Or45a</i>	Periférico	L	FBgn0033404	15	0,0736	0,0441	0,1596	0,2308	0,0731	0,0825
<i>Or45b</i>	Periférico	L	FBgn0033422	15	0,0137	0,0698	0,0777	0,1977	0,0985	0,0563
<i>Or46a</i>	Periférico	A	FBgn0026388	15	0,0871	0,0531	0,336	0,201	0,156	0,0559
<i>Or47b</i>	Periférico	A	FBgn0026385	15	0,0893	0,2799	1,1902	0,1108	0,2671	0,1176
<i>Or49a</i>	Periférico	L	FBgn0033727	15	0,1903	0,4578	0,3036	0,2665	0,134	0,0877
<i>Or49b</i>	Periférico	A	FBgn0028963	15	0,0451	0	0,1429	0,0721	0,0678	0,0578
<i>Or56a</i>	Periférico	A	FBgn0034473	15	0,2441	1,1475	0,192	0,1527	0,067	0,0833
<i>Or59a</i>	Periférico	L	FBgn0026384	15	0,0631	0	0,0649	0,1216	0,0441	0,0328
<i>Or59b</i>	Periférico	-	FBgn0034865	15	0,0083	0	0	0,0372	0,0176	0,0252
<i>Or59c</i>	Periférico	A	FBgn0034866	15	0,0573	0	0,2459	0,1378	0,0638	0,0563
<i>Or63a</i>	Periférico	L	FBgn0035382	15	0,0618	0,0942	0,3287	0,1449	0,1048	0,0658
<i>Or67a</i>	Periférico	-	FBgn0036009	15	0,2913	0,6862	0,0997	0,1192	0,5008	0,079
<i>Or67b</i>	Periférico	LA	FBgn0036019	15	0,035	0,0295	0,0384	0,0882	0,1066	0,0299
<i>Or67c</i>	Periférico	-	FBgn0036078	15	0,0331	0	0,0906	0,2467	0,0279	0,0393
<i>Or69a</i>	Periférico	A	FBgn0041622	15	0,2911	0	-	0	0	0,1054
<i>Or74a</i>	Periférico	L	FBgn0036709	15	0,1273	0,0832	0,1932	0,0875	0,1001	0,0799
<i>Or7a</i>	Periférico	LA	FBgn0030016	15	0,0365	0,213	0,0587	0,0557	0,0504	0,0529
<i>Or82a</i>	Periférico	LA	FBgn0041621	15	0,1214	0	0,2038	0,098	0,1988	0,0082

<i>Or83c</i>	Periférico	-	FBgn0037399	15	0,1235	0,091	0,1956	0,1055	0,2087	0,0921
<i>Or85d</i>	Periférico	-	FBgn0037594	15	0,1221	0,0242	0,0688	0,0702	0,0863	0,04
<i>Or92a</i>	Periférico	A	FBgn0038798	15	0,0086	0	0	0,0322	0,0087	0,0088
<i>Or9a</i>	Periférico	-	FBgn0030204	15	0,023	0	0	0,1131	0,0344	0,0185
<i>Pinocchio (o smi21F)</i>	Central	-	FBgn0016926	9; 10	0,0984	-	0	0	0,1126	0,0872
<i>Ras-related protein</i>	Central	A	FBgn0015286	3; 4	0	-	0	0	0	0,0234
<i>scylla</i>	Central	L	FBgn0041094	3; 4	0,2268	0,2257	-	0,1343	0,0745	0,1156
<i>Sema-5c</i>	Central	A	FBgn0028679	3; 4	0,0348	0,012	0,0386	0,0675	0,0646	0,0416
<i>smi35A</i>	Central	-	FBgn0016930	9	0	0	0,0213	0,0386	0	0,0229
<i>Spinophilin</i>	Central	LA	FBgn0010905	3; 4	0,0086	0	0,0805	0,0392	0,0216	0,0286
<i>SRY interacting protein 1</i>	Central	A	FBgn0010620	3; 4	0	0,0536	0	0	0,0398	0,0247
<i>sugarless</i>	Central	A	FBgn0010851	3; 4	0	0	0	0,0293	0,0145	0,0111
<i>Toll</i>	Central	A	FBgn0003717	3; 4	0,0697	0	0,1175	0,1078	0,1747	0,1179
<i>Xrp1</i>	Central	A	FBgn0038661	3; 4	0,1081	-	0,5578	0,6767	0,1214	0,0762

Sección IV

Conclusiones Generales

A lo largo de la presente tesis se describió el desarrollo de una investigación sobre diferentes aspectos de la arquitectura genética de un carácter fenotípico. En principio, desmenuzar la complejidad de la arquitectura genética de un carácter para comprender más del mismo tiene valor en si mismo; pero sobre todo, realizar este tipo de investigaciones brinda la oportunidad de (o es la excusa para) describir patrones y analizar mecanismos sobre la evolución de los organismos. Hacer, en definitiva, lo que es pertinente en Biología Evolutiva. Teniendo en cuenta que la arquitectura genética de un carácter está íntimamente relacionada a cómo es y fue la evolución del mismo se comprende el proceso recorrido: partiendo del estudio del comportamiento olfativo en *Drosophila melanogaster* se abrió la posibilidad de poner a prueba hipótesis particulares sobre la evolución de este carácter fenotípico. Al respecto cabe recordar la idea de Theodosius Dobzhansky, la cuál sintetizó en la frase: “En biología nada tiene sentido si no es a la luz de la evolución”. Esta frase es citada frecuentemente pero quizás pocas veces respetada, aunque por esto no menos cierta o correcta. Durante la realización de los experimentos y luego en la redacción esta tesis intenté seguir la propuesta de Dobzhansky. Dicho esto, en lo que resta de la presente sección se revisarán los resultados más destacados con el objetivo de integrarlos en una discusión global, y se incluirá como parte de esta discusión la formulación de hipótesis que se derivan de los resultados obtenidos la cuales son propuestas para ser abordadas en futuros estudios.

4.1. Resumen de los resultados.

El estudio de la arquitectura genética del CO se realizó a diferentes niveles biológicos (y también de análisis) utilizando herramientas de diferentes disciplinas. A continuación se resumen los resultados más importantes de cada sección de la tesis.

Sección II – Capítulo I:

Se identificaron genes involucrados en la arquitectura genética del comportamiento olfativo larval de *D. melanogaster*. La mayoría de ellos participan en una posición central del sistema olfativo.

Existe solapamiento, aunque no total, de la arquitectura genética del CO entre diferentes estadios ontogénicos del ciclo de vida de *D. melanogaster*.

La interacción GxA es una parte importante de la arquitectura genética del CO larval y las bases mecánicas de esta interacción GxA se corresponden con el modelo de “sensibilidad alélica”.

Sección II – Capítulo II:

El CO presenta una importante variabilidad fenotípica entre poblaciones naturales de *D. melanogaster* para el estadio larval pero no para el adulto.

El CO presenta una importante variabilidad genética intra-poblacional en ambos estadios, siendo mayor la encontrada para el CO larval.

Las propiedades variacionales de la arquitectura genética del CO no son totalmente equivalentes entre larva y adulto en poblaciones naturales de *D. melanogaster* del noroeste de Argentina

Sección II – Capítulo III:

Existen elementos genéticos ubicados en el cromosoma II que aportan a la variabilidad genética natural del CO en poblaciones de *D. melanogaster*.

Las diferencias en las arquitecturas genéticas del CO entre el estadio larval y adulto repercuten en que la canalización y la presencia de variabilidad genética críptica son más importantes en adulto que en larva.

Sección III:

La selección negativa es el proceso que afecta a las tasas de sustituciones nucleotídicas en la mayoría de los genes olfativos en 6 especies del grupo *D. melanogaster* analizadas; y, por el contrario, la selección positiva tiene poca incidencia en la evolución de los genes involucrados en la arquitectura genética del CO.

En la mayoría de las especies analizadas las tasas de evolución de los genes olfativos son independientes del estadio del ciclo de vida en el cual participan de la arquitectura genética del CO

Las tasas de evolución de los genes olfativos cambian de acuerdo a la posición que ocupan en el sistema olfativo, mostrando los genes que se expresan en un nivel central una tasa de evolución menor.

La especialización en la utilización de un solo hospedador no parece estar relacionada con una evolución acelerada de los genes olfativos, sino que existen patrones evolutivos idiosincráticos en las dos especies especialistas analizadas.

4.2. Discusión General.

La arquitectura genética del CO presenta ciertos aspectos que son los esperados para un carácter complejo, la conforman un importante número de genes y éstos conforman complejas redes de interacciones epistáticas. Si bien la existencia de redes epistáticas para el CO larval no ha sido estudiada en esta tesis, ni en los estudios previos de otros investigadores, se ha demostrado que éstas ocurren para el comportamiento olfativo adulto (Fedorowicz *et al.* 1998; Anholt *et al.* 2003; Sambandan *et al.* 2006). Por lo tanto, es razonable esperar que los efectos derivados de la epístasis también jueguen un papel importante en la manifestación del comportamiento olfativo en los estadios larvales. Por supuesto, está hipótesis deberá ser puesta a prueba en el futuro. Más aún, en una hipótesis relacionada se podría plantear que las redes epistáticas de genes que influyen sobre el olfato larval deberían ser comparativamente más simples (en cuanto al número de genes y de interacciones entre genes) que las del adulto.

Se han encontrado a lo largo de toda la tesis numerosos ejemplos de características de la arquitectura genética del CO que cambian entre larva y adulto, ya sea cuando se analizaron los componentes funcionales de la misma (los genes que la conforman en cada estadio) o cuando se analizaron las propiedades variacionales. Esto lleva a concluir que el estadio ontogenético es uno de los aspectos que se debe tener en cuenta a la hora de analizar la arquitectura genética de este carácter. En este sentido, se

encontró que las diferencias entre larva y adulto repercuten en que la canalización y la presencia de variabilidad genética críptica son más importantes en el CO del adulto que en larva. Esto aporta evidencias en favor de la propuesta previamente enunciada de que la arquitectura genética de un carácter fenotípico está íntimamente relacionada con cómo es la evolución del mismo.

Mackay (2004) planteó que la comprensión de la arquitectura genética de un carácter requiere también conocer cuáles son las fuerzas evolutivas que gobiernan el cambio de los genes involucrados en la misma. Teniendo en cuenta lo discutido en los párrafos anteriores, se espera que fuerzas evolutivas diferentes gobiernen el cambio de los genes que participan en el CO en larva y adulto, y que esto repercuta en diferentes tasa de evolución entre los mismos. No se ha corroborado esta hipótesis, ya que en la mayoría de las especie del grupo de especies *D. melanogaster* analizadas las tasas de evolución de los genes olfativos no cambian entre los que se expresan en diferentes estadios. Solamente existe una diferencia clara en *D. simulans* y *D. erecta*. Sería importante, entonces, profundizar sobre esta hipótesis en el futuro. En principio, ampliando el conjunto de genes analizados para confirmar el resultado y descartar que se debió a una falta de potencia en el análisis. También sería pertinente poner a prueba hipótesis que apunten a evaluar si las diferentes fuerzas evolutivas que actúan en el CO de larva y adulto repercuten en otros niveles y no en cambios en la secuencia codificantes de los genes olfativos.

Los resultados obtenidos en diferentes secciones de esta tesis brindan numerosas evidencias que llevan a concluir que la arquitectura genética del CO está fuertemente influida por el ambiente externo e interno². Esto quiere decir que los componentes de la arquitectura genética del carácter no permanecen inmutables ante cambios en el ambiente o en diferentes ambientes. En efecto, la arquitectura genética del CO larval se modifica en los diferentes “ambientes químicos”; y el CO en adulto depende del sexo (que se considera ambiente interno) tal como lo indican las diferencias significativas detectadas para la interacción genotipo por sexo. Este último resultado es el esperado si se considera que es mediante el olfato que las hembras localizan el sitio para oviponer y

² Con la intención de comprender mejor los diferentes factores que afectan la expresión de la arquitectura genética de un carácter, se consideró que puede distinguirse al ambiente entre externo o interno. El ambiente externo está constituido por las características ambientales no propias del organismo y que interactúan con el mismo, como temperatura, humedad, otros organismos, etc. Mientras que definirían al ambiente interno características del propio organismo que, si bien no están siendo objeto de estudio, pueden afectar ciertos aspectos del mismo. Por ejemplo, el fondo genético afecta el patrón de expresión de un gen, siendo entonces un “ambiente” para el mismo; lo mismo ocurre con el sexo.

que los machos no realizan esta tarea (Visser 1986; Joseph *et al.* 2009). Es posible que el comportamiento de oviposición no sea el único aspecto relacionado a la diferencia de arquitectura genética entre sexos para este carácter en adultos. Lamentablemente, la interacción genotipo por sexo, no se analizó en el estadio larval debido a que no es posible determinar el sexo fácilmente como en el adulto; lo cual imposibilitó tener en cuenta este factor.

En la Figura 4.1 se muestra en un esquema los aspectos que afectan a la arquitectura genética estudiados en esta tesis y que se discutieron en los párrafos anteriores: la ontogenia (o el estadio del ciclo de vida), el ambiente externo y el sexo.

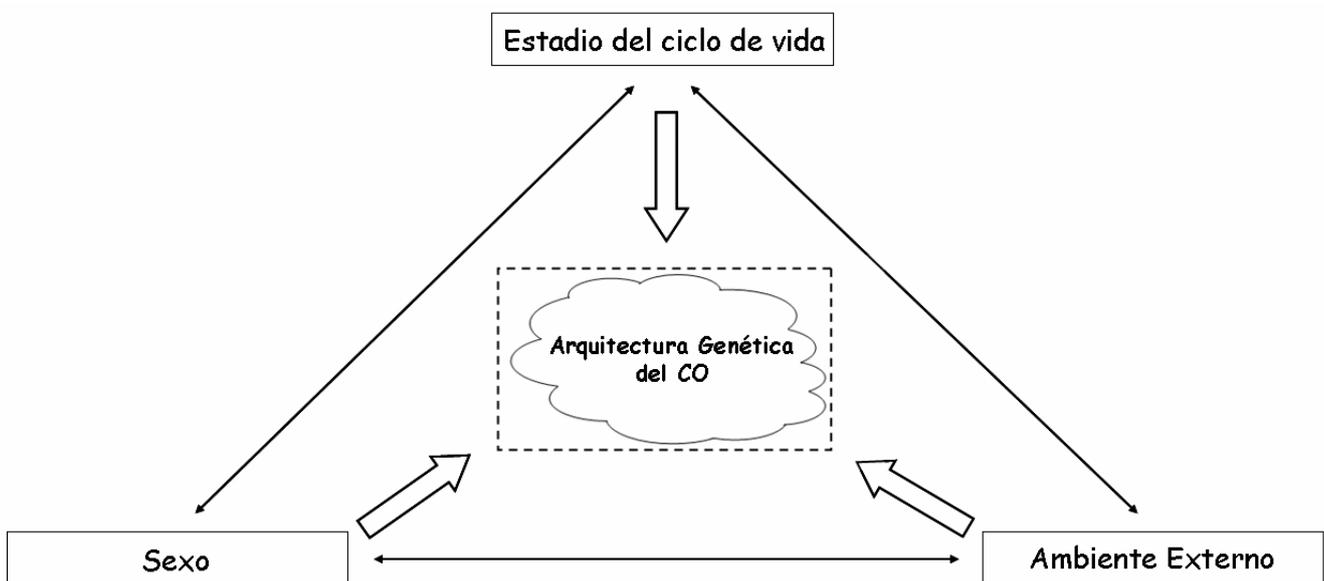


Figura 4.1: Esquema de los diferentes factores que afectan a la arquitectura genética del comportamiento olfativo estudiados en la presente tesis

Cuando se consideran estos aspectos, ya no es posible considerar a la arquitectura genética del CO (o generalizando, de cualquier otro carácter) como un cuadro estanco (representado en la figura por el rectángulo en líneas de puntos) sino que hay que pensarla como algo dinámico (Hansen 2006) que cambia en diferentes circunstancias como resultado de la influencia de diferentes factores. Este dinamismo de la arquitectura genética se representa en la Figura 4.1 como una figura con bordes irregulares. Comprender a la arquitectura genética de un carácter en su dinamismo y no sólo como una descripción de genes, es comprender mejor la evolución (o posibilidades de) evolución de ese carácter.

Durante la discusión de los resultados hemos llegado también a la conclusión de que al analizar los factores que influyen sobre la arquitectura genética del CO se debe considerar la interacción entre los mismos. Para ejemplificar esta idea se puede tener en cuenta que los estadios larvales y el adulto presentan modos de vida diferentes, por lo tanto no interactúan con el mismo ambiente y el modo en que lo hacen también difiere. En *D melanogaster*, y en muchas de las especies filogenéticamente cercanas a ella, las larvas viven inmersas en frutos en descomposición y todos sus movimientos los realizan dentro o sobre los mismos (Godoy-Herrera 1977; Godoy-Herrera 2001; Godoy-Herrera y Connolly 2007); en cambio el adulto utiliza los frutos como sitio de alimentación y oviposición pero no permanece inmerso en los mismos y tiene la capacidad de volar de un fruto a otro. Claramente, el ambiente no es el mismo para un estadio y otro, como tampoco lo son los cambios en el mismo, ya que la heterogeneidad temporal y espacial de estímulos olfativos a los que se enfrentan no es igual. Otra diferencia importante entre el “ambiente químico” de larva y adulto con relevancia para el comportamiento olfativo es que el adulto es un estadio reproductivo y el larval no, siendo las señales químicas que participan en el comportamiento sexual (feromonas) sumamente importantes en la conducta sexual del adulto (Tompkins *et al.* 1983; Gailey *et al.* 1986; Marcillac y Ferveur 2004; Grillet *et al.* 2006; Kurtovic *et al.* 2007). Entonces, la relación que los individuos de cada estadio del ciclo de vida tienen con el ambiente en donde transcurre su vida es diferente, y quizás sea la interacción entre estos factores, ontogenia y ambiente, la que influye sobre los cambios en la arquitectura genética del CO y no cada uno por separado. Cabe aclarar que los diferentes estadios larvales (ver Figura 1.1. – Sección I) también presentan entre sí diferencias en los modo de vidas (quizás no tan marcadas como con el adulto) que repercuten en diferentes aspectos de su comportamiento (Godoy-Herrera 1994) y pueden ser relevantes para el comportamiento olfativo. No se evaluaron diferencias en el CO entre estadios larvales diferentes, y esto constituye una posible temática de investigación a futuro en la que se podrían poner a prueba parte de las hipótesis que aquí se evaluaron, pero ya no entre larva y adulto, sino entre los diferentes estadios larvales.

4.3. Palabras Finales.

Durante el recorrido de la presente tesis se detallaron las investigaciones que produjeron resultados novedosos vinculados con diferentes factores de la arquitectura genética del comportamiento olfativo. Asimismo, se han discutido los resultados teniendo en cuenta los antecedentes sobre el estudio de este carácter. Se espera que este trabajo sea un aporte al conocimiento acerca de la arquitectura genética de olfato en particular y sobre la arquitectura genética de caracteres complejos en general, tanto por los resultados y conclusiones que aquí se exponen como por las preguntas que se abren a partir de los mismos.

FIN

Bibliografía

Aceves-Pina E. O. y Quinn W. G. (1979). Learning in normal and mutant *Drosophila* larvae. *Science*, 206(4414): 93-96.

Adams M. D., Celniker S. E., Holt R. A., Evans C. A., Gocayne J. D., Amanatides P. G., Scherer S. E., Li P. W., Hoskins R. A., Galle R. F., George R. A., Lewis S. E., Richards S., Ashburner M., Henderson S. N., Sutton G. G., Wortman J. R., Yandell M. D., Zhang Q., Chen L. X., Brandon R. C., Rogers Y. H., Blazej R. G., Champe M., Pfeiffer B. D., Wan K. H., Doyle C., Baxter E. G., Helt G., Nelson C. R., Gabor G. L., Abril J. F., Agbayani A., An H. J., Andrews-Pfannkoch C., Baldwin D., Ballew R. M., Basu A., Baxendale J., Bayraktaroglu L., Beasley E. M., Beeson K. Y., Benos P. V., Berman B. P., Bhandari D., Bolshakov S., Borkova D., Botchan M. R., Bouck J., Brokstein P., Brottier P., Burtis K. C., Busam D. A., Butler H., Cadieu E., Center A., Chandra I., Cherry J. M., Cawley S., Dahlke C., Davenport L. B., Davies P., de Pablos B., Delcher A., Deng Z., Mays A. D., Dew I., Dietz S. M., Dodson K., Doup L. E., Downes M., Dugan-Rocha S., Dunkov B. C., Dunn P., Durbin K. J., Evangelista C. C., Ferraz C., Ferriera S., Fleischmann W., Fosler C., Gabrielian A. E., Garg N. S., Gelbart W. M., Glasser K., Glodek A., Gong F., Gorrell J. H., Gu Z., Guan P., Harris M., Harris N. L., Harvey D., Heiman T. J., Hernandez J. R., Houck J., Hostin D., Houston K. A., Howland T. J., Wei M. H., Ibegwam C., Jalali M., Kalush F., Karpen G. H., Ke Z., Kennison J. A., Ketchum K. A., Kimmel B. E., Kodira C. D., Kraft C., Kravitz S., Kulp D., Lai Z., Lasko P., Lei Y., Levitsky A. A., Li J., Li Z., Liang Y., Lin X., Liu X., Mattei B., McIntosh T. C., McLeod M. P., McPherson D., Merkulov G., Milshina N. V., Mobarry C., Morris J., Moshrefi A., Mount S. M., Moy M., Murphy B., Murphy L., Muzny D. M., Nelson D. L., Nelson D. R., Nelson K. A., Nixon K., Nusskern D. R., Pacleb J. M., Palazzolo M., Pittman G. S., Pan S., Pollard J., Puri V., Reese M. G., Reinert K., Remington K., Saunders R. D., Scheeler F., Shen H., Shue B. C., Sidenkiamos I., Simpson M., Skupski M. P., Smith T., Spier E., Spradling A. C., Stapleton M., Strong R., Sun E., Svirskas R., Tector C., Turner R., Venter E., Wang A. H., Wang X., Wang Z. Y., Wassarman D. A., Weinstock G. M., Weissenbach J., Williams S. M., WoodageT, Worley K. C., Wu D., Yang S., Yao Q. A., Ye J., Yeh R. F., Zaveri J. S., Zhan M., Zhang G., Zhao Q., Zheng L., Zheng X. H., Zhong F. N., Zhong W., Zhou X., Zhu S., Zhu X., Smith H. O., Gibbs R. A., Myers E. W., Rubin G. M. y Venter J. C. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461): 2185-2195.

Alcorta E. y Rubio J. (1989). Intrapopulational variation of olfactory responses in *Drosophila melanogaster*. *Behav Genet*, 19(2): 285-299.

Alvarez-Ponce D., Aguade M. y Rozas J. (2009). Network-level molecular evolutionary analysis of the insulin/TOR signal transduction pathway across 12 *Drosophila* genomes. *Genome Res*, 19(2): 234-242.

Anholt R. R., Lyman R. F. y Mackay T. F. (1996). Effects of single P-element insertions on olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 143(1): 293-301.

Anholt R. R., Fanara J. J., Fedorowicz G. M., Ganguly I., Kulkarni N. H., Mackay T. F. y Rollmann S. M. (2001). Functional genomics of odor-guided behavior in *Drosophila melanogaster*. *Chem Senses*, 26(2): 215-221.

Anholt R. R. y Mackay T. F. (2001). The genetic architecture of odor-guided behavior in *Drosophila melanogaster*. *Behav Genet*, 31(1): 17-27.

Anholt R. R., Dilda C. L., Chang S., Fanara J. J., Kulkarni N. H., Ganguly I., Rollmann S. M., Kamdar K. P. y Mackay T. F. (2003). The genetic architecture of odor-guided behavior in *Drosophila*: epistasis and the transcriptome. *Nat Genet*, 35(2): 180-184.

Anholt R. R. y Mackay T. F. (2004). Quantitative genetic analyses of complex behaviours in *Drosophila*. *Nat Rev Genet*, 5(11): 838-849.

Anholt R. R. y Williams T. I. (2010). The soluble proteome of the *Drosophila* antenna. *Chem Senses*, 35(1): 21-30.

Anholt R. R. H. y Mackay T. F. C. (2010). *Principles of Behavioral Genetics*. Academic Press, London, U. K.

Arbeitman M. N., Furlong E. E., Imam F., Johnson E., Null B. H., Baker B. S., Krasnow M. A., Scott M. P., Davis R. W. y White K. P. (2002). Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 297(5590): 2270-2275.

Arthur A. L., Weeks A. R. y Sgro C. M. (2008). Investigating latitudinal clines for life history and stress resistance traits in *Drosophila simulans* from eastern Australia. *J Evol Biol*, 21(6): 1470-1479.

Ayer R. K., Jr. y Carlson J. (1991). *acj6*: a gene affecting olfactory physiology and behavior in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(12): 5467-5471.

Ayyub C., Paranjape J., Rodrigues V. y Siddiqi O. (1990). Genetics of olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet*, 6(4): 243-262.

Bargmann C. I. (2006). Comparative chemosensation from receptors to ecology. *Nature*, 444(7117): 295-301.

Begon M. J. (1982). Yeast and *Drosophila*. En *Genetics and Biology of Drosophila*. Thompson J. H. J. (eds.). Academic Press. London.

Bellen H. J., Levis R. W., Liao G., He Y., Carlson J. W., Tsang G., Evans-Holm M., Hiesinger P. R., Schulze K. L., Rubin G. M., Hoskins R. A. y Spradling A. C. (2004). The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics*, 167(2): 761-781.

Benjamini Y. y Hochberg Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Statist Soc Ser B*, 57: 289-300.

Benton R., Sachse S., Michnick S. W. y Vosshall L. B. (2006). Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *PLoS Biol*, 4(2): e20.

Bergman N. H. (2007). *Comparative genomics*. Humana Press, Totowa, N.J.

Billeter J. C., Atallah J., Krupp J. J., Millar J. G. y Levine J. D. (2009). Specialized cells tag sexual and species identity in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 461(7266): 987-991.

Blanchette M. (2007). Computation and analysis of genomic multi-sequence alignments. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 8: 193-213.

Brown J. R. (2008). *Comparative genomics: basic and applied research*. CRC Press, Boca Raton.

Buck L. y Axel R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65(1): 175-187.

Cariou M. L., Solignac M., Monnerot M. y David J. R. (1990). Low allozyme and mtDNA variability in the island endemic species *Drosophila sechellia* (*D. melanogaster* complex). *Experientia*, 46(1): 101-104.

Carlborg O., Jacobsson L., Ahgren P., Siegel P. y Andersson L. (2006). Epistasis and the release of genetic variation during long-term selection. *Nat Genet*, 38(4): 418-420.

Carreira V. P., Mensch J. y Fanara J. J. (2009). Body size in *Drosophila*: genetic architecture, allometries and sexual dimorphism. *Heredity*, 102(3): 246-256.

Celniker S. E., Wheeler D. A., Kronmiller B., Carlson J. W., Halpern A., Patel S., Adams M., Champe M., Dugan S. P., Frise E., Hodgson A., George R. A., Hoskins R. A., Lavery T., Muzny D. M., Nelson C. R., Pacleb J. M., Park S., Pfeiffer B. D., Richards S., Sodergren E. J., Svirskas R., Tabor P. E., Wan K., Stapleton M., Sutton G. G., Venter C., Weinstock G., Scherer S. E., Myers E. W., Gibbs R. A. y Rubin G. M. (2002). Finishing a whole-genome shotgun: release 3 of the *Drosophila melanogaster* euchromatic genome sequence. *Genome Biol*, 3(12).

Celniker S. E. y Rubin G. M. (2003). The *Drosophila melanogaster* genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 4: 89-117.

Clark A. G., Eisen M. B., Smith D. R., Bergman C. M., Oliver B., Markow T. A., Kaufman T. C., Kellis M., Gelbart W., Iyer V. N., Pollard D. A., Sackton T. B., Larracuenta A. M., Singh N. D., Abad J. P., Abt D. N., Adryan B., Aguade M., Akashi H., Anderson W. W., Aquadro C. F., Ardell D. H., Arguello R., Artieri C. G., Barbash

D. A., Barker D., Barsanti P., Batterham P., Batzoglou S., Begun D., Bhutkar A., Blanco E., Bosak S. A., Bradley R. K., Brand A. D., Brent M. R., Brooks A. N., Brown R. H., Butlin R. K., Caggese C., Calvi B. R., Bernardo de Carvalho A., Caspi A., Castrezana S., Celniker S. E., Chang J. L., Chapple C., Chatterji S., Chinwalla A., Civetta A., Clifton S. W., Comeron J. M., Costello J. C., Coyne J. A., Daub J., David R. G., Delcher A. L., Delehaunty K., Do C. B., Ebling H., Edwards K., Eickbush T., Evans J. D., Filipinski A., Findeiss S., Freyhult E., Fulton L., Fulton R., Garcia A. C., Gardiner A., Garfield D. A., Garvin B. E., Gibson G., Gilbert D., Gnerre S., Godfrey J., Good R., Gotea V., Gravely B., Greenberg A. J., Griffiths-Jones S., Gross S., Guigo R., Gustafson E. A., Haerty W., Hahn M. W., Halligan D. L., Halpern A. L., Halter G. M., Han M. V., Heger A., Hillier L., Hinrichs A. S., Holmes I., Hoskins R. A., Hubisz M. J., Hultmark D., Huntley M. A., Jaffe D. B., Jagadeeshan S., Jeck W. R., Johnson J., Jones C. D., Jordan W. C., Karpen G. H., Kataoka E., Keightley P. D., Kheradpour P., Kirkness E. F., Koerich L. B., Kristiansen K., Kudrna D., Kulathinal R. J., Kumar S., Kwok R., Lander E., Langley C. H., Lapoint R., Lazzaro B. P., Lee S. J., Levesque L., Li R., Lin C. F., Lin M. F., Lindblad-Toh K., Llopart A., Long M., Low L., Lozovsky E., Lu J., Luo M., Machado C. A., Makalowski W., Marzo M., Matsuda M., Matzkin L., McAllister B., McBride C. S., McKernan B., McKernan K., Mendez-Lago M., Minx P., Mollenhauer M. U., Montooth K., Mount S. M., Mu X., Myers E., Negre B., Newfeld S., Nielsen R., Noor M. A., O'Grady P., Pachter L., Papaceit M., Parisi M. J., Parisi M., Parts L., Pedersen J. S., Pesole G., Phillippy A. M., Ponting C. P., Pop M., Porcelli D., Powell J. R., Prohaska S., Pruitt K., Puig M., Quesneville H., Ram K. R., Rand D., Rasmussen M. D., Reed L. K., Reenan R., Reily A., Remington K. A., Rieger T. T., Ritchie M. G., Robin C., Rogers Y. H., Rohde C., Rozas J., Rubenfield M. J., Ruiz A., Russo S., Salzberg S. L., Sanchez-Gracia A., Saranga D. J., Sato H., Schaeffer S. W., Schatz M. C., Schlenke T., Schwartz R., Segarra C., Singh R. S., Sirot L., Sirota M., Sisneros N. B., Smith C. D., Smith T. F., Spieth J., Stage D. E., Stark A., Stephan W., Strausberg R. L., Strempel S., Sturgill D., Sutton G., Sutton G. G., Tao W., Teichmann S., Tobar Y. N., Tomimura Y., Tsolas J. M., Valente V. L., Venter E., Venter J. C., Vicario S., Vieira F. G., Vilella A. J., Villasante A., Walenz B., Wang J., Wasserman M., Watts T., Wilson D., Wilson R. K., Wing R. A., Wolfner M. F., Wong A., Wong G. K., Wu C. I., Wu G., Yamamoto D., Yang H. P., Yang S. P., Yorke J. A., Yoshida K., Zdobnov E., Zhang P., Zhang Y., Zimin A. V., Baldwin J., Abdouelleil A., Abdulkadir J., Abebe A., Abera B., Abreu J., Acer S. C., Aftuck L., Alexander A., An P., Anderson

E., Anderson S., Arachi H., Azer M., Bachantsang P., Barry A., Bayul T., Berlin A., Bessette D., Bloom T., Blye J., Boguslavskiy L., Bonnet C., Boukhgalter B., Bourzgui I., Brown A., Cahill P., Channer S., Cheshatsang Y., Chuda L., Citroen M., Collymore A., Cooke P., Costello M., D'Aco K., Daza R., De Haan G., DeGray S., DeMaso C., Dhargay N., Dooley K., Dooley E., Doricent M., Dorje P., Dorjee K., Dupes A., Elong R., Falk J., Farina A., Faro S., Ferguson D., Fisher S., Foley C. D., Franke A., Friedrich D., Gadbois L., Gearin G., Gearin C. R., Giannoukos G., Goode T., Graham J., Grandbois E., Grewal S., Gyaltzen K., Hafez N., Hagos B., Hall J., Henson C., Hollinger A., Honan T., Huard M. D., Hughes L., Hurhula B., Husby M. E., Kamat A., Kanga B., Kashin S., Khazanovich D., Kisner P., Lance K., Lara M., Lee W., Lennon N., Letendre F., LeVine R., Lipovsky A., Liu X., Liu J., Liu S., Lokyitsang T., Lokyitsang Y., Lubonja R., Lui A., MacDonald P., Magnisalis V., Maru K., Matthews C., McCusker W., McDonough S., Mehta T., Meldrim J., Meneus L., Mihai O., Mihalev A., Mihova T., Mittelman R., Mlenga V., Montmayeur A., Mulrain L., Navidi A., Naylor J., Negash T., Nguyen T., Nguyen N., Nicol R., Norbu C., Norbu N., Novod N., O'Neill B., Osman S., Markiewicz E., Oyono O. L., Patti C., Phunkhang P., Pierre F., Priest M., Raghuraman S., Rege F., Reyes R., Rise C., Rogov P., Ross K., Ryan E., Settipalli S., Shea T., Sherpa N., Shi L., Shih D., Sparrow T., Spaulding J., Stalker J., Stange-Thomann N., Stavropoulos S., Stone C., Strader C., Tesfaye S., Thomson T., Thoulutsang Y., Thoulutsang D., Topham K., Topping I., Tsamla T., Vassiliev H., Vo A., Wangchuk T., Wangdi T., Weiland M., Wilkinson J., Wilson A., Yadav S., Young G., Yu Q., Zembek L., Zhong D., Zimmer A., Zwirko Z., Alvarez P., Brockman W., Butler J., Chin C., Grabherr M., Kleber M., Mauceli E. y MacCallum I. (2007). Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature*, 450(7167): 203-218.

Clark M. (2000). *Comparative genomics*. Kluwer Academic, Boston, MA.

Clyne P., Grant A., O'Connell R. y Carlson J. R. (1997). Odorant response of individual sensilla on the *Drosophila* antenna. *Invert Neurosci*, 3(2-3): 127-135.

Clyne P. J., Warr C. G., Freeman M. R., Lessing D., Kim J. y Carlson J. R. (1999). A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila*. *Neuron*, 22(2): 327-338.

Cobb M., Bruneau S. y Jallon J. M. (1992). Genetic and developmental factors in the olfactory response of *Drosophila melanogaster* larvae to alcohols. *Proc Biol Sci*, 248(1322): 103-109.

Cobb M. y Dannet F. (1994). Multiple genetic control of acetate-induced olfactory responses in *Drosophila melanogaster* larvae. *Heredity*, 73 (Pt 4): 444-455.

Cobb M. (1996). Genotypic and phenotypic characterization of the *Drosophila melanogaster* olfactory mutation Indifferent. *Genetics*, 144(4): 1577-1587.

Cobb M. y Domain I. (2000). Olfactory coding in a simple system: adaptation in *Drosophila* larvae. *Proc Biol Sci*, 267(1457): 2119-2125.

Cockerham C. C. (1963). Estimation of genetic variances. En *Statistical Genetics and Plant Breeding*. Hanson W. D. y Robertson H. F. (eds.). pp. 53-94. National Academy of Sciences - National Research Council. Washington, D. C.

Cooley L., Kelley R. y Spradling A. (1988). Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P elements. *Science*, 239(4844): 1121-1128.

Couto A., Alenius M. y Dickson B. J. (2005). Molecular, anatomical, and functional organization of the *Drosophila* olfactory system. *Curr Biol*, 15(17): 1535-1547.

Coyne J. A., Barton N. H. y Turelli M. (1997). A critique of Sewall Wright's shifting balance theory of evolution. *Evolution*, 51(3): 643-671.

Coyne J. A., Barton N. H. y Turelli M. (2000). Is Wright's shifting balance process important in evolution? *Evolution*, 54(1): 306-317.

Chain P., Kurtz S., Ohlebusch E. y Slezak T. (2003). An applications-focused review of comparative genomics tools: capabilities, limitations and future challenges. *Brief Bioinform*, 4(2): 105-123.

Charmantier A. y Garant D. (2005). Environmental quality and evolutionary potential: lessons from wild populations. *Proc Biol Sci*, 272(1571): 1415-1425.

Darwin C. (1859). *On the origin of species by means of natural selection*. J. Murray, London.

David J. R., Gibert P., Legout H., Petavy G., Capy P. y Moreteau B. (2005). Isofemale lines in *Drosophila*: an empirical approach to quantitative trait analysis in natural populations. *Heredity*, 94(1): 3-12.

David J. R., Lemeunier F., Tsacas L. y Yassin A. (2007). The historical discovery of the nine species in the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Genetics*, 177(4): 1969-1973.

de Bruyne M., Foster K. y Carlson J. R. (2001). Odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron*, 30(2): 537-552.

De Jong G. y Bochdanovits Z. (2003). Latitudinal clines in *Drosophila melanogaster*: body size, allozyme frequencies, inversion frequencies, and the insulin-signalling pathway. *J Genet*, 82(3): 207-223.

Dominy N. J., Ross C. F. y Smith T. D. (2004). Evolution of the special senses in primates: past, present, and future. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 281(1): 1078-1082.

Dunn R. B. y Fraser A. S. (1958). Selection for an invariant character-'vibrissae number'-in the house mouse. *Nature*, 181: 1018-1019.

Edgar R. C. (2004a). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5: 113.

Edgar R. C. (2004b). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 32(5): 1792-1797.

Falconer D. S. y Mackay T. F. C. (1996). *Introduction to Quantitative Genetics*. Addison, Wesley, Longman, Harlow, Essex, UK.

Fanara J. J., Robinson K. O., Rollmann S. M., Anholt R. R. y Mackay T. F. (2002). *Vanaso* is a candidate quantitative trait gene for *Drosophila* olfactory behavior. *Genetics*, 162(3): 1321-1328.

Fanara J. J., Folguera G., Iriarte P. F., Mensch J. y Hasson E. (2006). Genotype by environment interactions in viability and developmental time in populations of cactophilic *Drosophila*. *J Evol Biol*, 19(3): 900-908.

Fedorowicz G. M., Fry J. D., Anholt R. R. y Mackay T. F. (1998). Epistatic interactions between *smell-impaired* loci in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 148(4): 1885-1891.

Fernandez Iriarte P. y Hasson E. (2000). The role of the use of different host plants in the maintenance of the inversion polymorphism in the cactophilic *Drosophila buzzatii*. *Evolution*, 54(4): 1295-1302.

Fisher R. A. (1930). *The genetical theory of natural selection*. The Clarendon press, Oxford.

Fishilevich E., Domingos A. I., Asahina K., Naef F., Vosshall L. B. y Louis M. (2005). Chemotaxis behavior mediated by single larval olfactory neurons in *Drosophila*. *Curr Biol*, 15(23): 2086-2096.

Fishilevich E. y Vosshall L. B. (2005). Genetic and functional subdivision of the *Drosophila* antennal lobe. *Curr Biol*, 15(17): 1548-1553.

Fuyama Y. (1978). Behavior genetics of olfactory responses in *Drosophila*. II. An odorant-specific variant in a natural population of *Drosophila melanogaster*. *Behav Genet*, 8(5): 399-414.

- Gailey D. A., Lacaillade R. C. y Hall J. C. (1986). Chemosensory elements of courtship in normal and mutant, olfaction-deficient *Drosophila melanogaster*. *Behavior Genetics*, 16(3): 375-405.
- Galindo K. y Smith D. P. (2001). A large family of divergent *Drosophila* odorant-binding proteins expressed in gustatory and olfactory sensilla. *Genetics*, 159(3): 1059-1072.
- Ganguly I., Mackay T. F. y Anholt R. R. (2003). *Scribble* is essential for olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 164(4): 1447-1457.
- Gao Q. y Chess A. (1999). Identification of candidate *Drosophila* olfactory receptors from genomic DNA sequence. *Genomics*, 60(1): 31-39.
- Gardiner A., Barker D., Butlin R. K., Jordan W. C. y Ritchie M. G. (2008). *Drosophila* chemoreceptor gene evolution: selection, specialization and genome size. *Mol Ecol*, 17(7): 1648-1657.
- Gardiner A., Butlin R. K., Jordan W. C. y Ritchie M. G. (2009). Sites of evolutionary divergence differ between olfactory and gustatory receptors of *Drosophila*. *Biol Lett*, 5(2): 244-247.
- Gendre N., Luer K., Friche S., Grillenzoni N., Ramaekers A., Technau G. M. y Stocker R. F. (2004). Integration of complex larval chemosensory organs into the adult nervous system of *Drosophila*. *Development*, 131(1): 83-92.
- Gerber B. y Stocker R. F. (2007). The *Drosophila* larva as a model for studying chemosensation and chemosensory learning: a review. *Chem Senses*, 32(1): 65-89.
- Gibson G. y Wagner G. (2000). Canalization in evolutionary genetics: a stabilizing theory? *Bioessays*, 22(4): 372-380.
- Gibson G. y Dworkin I. (2004). Uncovering cryptic genetic variation. *Nat Rev Genet*, 5(9): 681-690.

- Gibson G. y Reed L. K. (2008). Cryptic genetic variation. *Curr Biol*, 18(21): R989-990.
- Gibson G. y Muse S. V. (2009). *A primer of genome science*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Gillespie J. H. y Turelli M. (1989). Genotype-environment interactions and the maintenance of polygenic variation. *Genetics*, 121(1): 129-138.
- Godoy-Herrera R. (1977). Inter- and intrapopulational variation in digging in *Drosophila melanogaster* larvae. *Behav Genet*, 7(6): 433-439.
- Godoy-Herrera R. (1994). Biometrical analysis of larval digging behavior in *Drosophila melanogaster*. *Behav Genet*, 24(5): 427-432.
- Godoy-Herrera R. (2001). La conducta de larvas de *Drosophila* (Diptera; Drosophilidae): su etología, desarrollo, genética y evolución. *Rev chil hist nat*, 74: 55-64.
- Godoy-Herrera R. y Connolly K. (2007). Organization of foraging behavior in larvae of cosmopolitan, widespread, and endemic *Drosophila* species. *Behav Genet*, 37(4): 595-603.
- Goenaga J. (2010). Resistencia a la inanición en *Drosophila melanogaster*: variación genética natural y su relación con la longevidad y las reservas energéticas. Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Goenaga J., Jose Fanara J. y Hasson E. (2010). A quantitative genetic study of starvation resistance at different geographic scales in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genet Res*, 92(4): 253-259.
- Goodnight C. J. y Wade M. J. (2000). The ongoing synthesis: a reply to Coyne, Barton, and Turelli. *Evolution*, 54(1): 317-324.

Gould S. J. y Lewontin R. C. (1979). The spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 205(1161): 581-598.

Goulding S. E., zur Lage P. y Jarman A. P. (2000). *amos*, a proneural gene for *Drosophila* olfactory sense organs that is regulated by lozenge. *Neuron*, 25(1): 69-78.

Graf S. y Sokolowski M. B. (1989). The effect of development, food patch quality and starvation on *Drosophila melanogaster* larval foraging behavior. *J Insect Behav*, 2: 301-313.

Griffiths J. A., Schiffer M. y Hoffmann A. A. (2005). Clinal variation and laboratory adaptation in the rainforest species *Drosophila birchii* for stress resistance, wing size, wing shape and development time. *J Evol Biol*, 18(1): 213-222.

Grillet M., Darteville L. y Ferveur J.-F. (2006). A *Drosophila* male pheromone affects female sexual receptivity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1584): 315-323.

Gu X. (2007). Evolutionary framework for protein sequence evolution and gene pleiotropy. *Genetics*, 175(4): 1813-1822.

Guo S. y Kim J. (2007). Molecular evolution of *Drosophila* odorant receptor genes. *Mol Biol Evol*, 24(5): 1198-1207.

Gurganus M. C., Fry J. D., Nuzhdin S. V., Pasyukova E. G., Lyman R. F. y Mackay T. F. (1998). Genotype-environment interaction at quantitative trait loci affecting sensory bristle number in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 149(4): 1883-1898.

Hansen T. F. (2006). The evolution of genetic architecture. *Annu Rev Ecol Evol Syst*, 37: 123-157.

Harbison S. T., Yamamoto A. H., Fanara J. J., Norga K. K. y Mackay T. F. (2004). Quantitative trait loci affecting starvation resistance in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 166(4): 1807-1823.

Hardison R. C. (2003). Comparative genomics. *PLoS Biol*, 1(2): E58.

He X. y Zhang J. (2006). Toward a molecular understanding of pleiotropy. *Genetics*, 173(4): 1885-1891.

Hedrick P. W. (2000). *Genetics of populations*. Jones and Bartlett Publishers, Boston.

Heimbeck G., Bugnon V., Gendre N., Haberlin C. y Stocker R. F. (1999). Smell and taste perception in *Drosophila melanogaster* larva: toxin expression studies in chemosensory neurons. *J Neurosci*, 19(15): 6599-6609.

Hekmat-Safe D. S., Steinbrecht R. A. y Carlson J. R. (1997). Coexpression of two odorant-binding protein homologs in *Drosophila*: implications for olfactory coding. *J Neurosci*, 17(5): 1616-1624.

Hekmat-Safe D. S., Steinbrecht R. A. y Carlson J. R. (1998). Olfactory coding in a compound nose. Coexpression of odorant-binding proteins in *Drosophila*. *Ann N Y Acad Sci*, 855: 311-315.

Hekmat-Safe D. S., Safe C. R., McKinney A. J. y Tanouye M. A. (2002). Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res*, 12(9): 1357-1369.

Hoffmann A. A. y Parsons P. A. (1988). The analysis of Quantitative variation in natural populations with isofemale strains. *Genet Sel Evol*, 20: 87-98.

Hoffmann A. A. y O'Donnell S. (1990). Heritable variation in resource use in *Drosophila* in the field. En *Ecological and Evolutionary Genetics of Drosophila*. Barker J. S. F., Starmer W. T. y McIntyre R. (eds.). Plenum Press. New York.

Hoffmann A. A. y Merila J. (1999). Heritable variation and evolution under favourable and unfavourable conditions. *Trends Ecol Evol*, 14(3): 96-101.

Hoffmann A. A., Hallas R., Sinclair C. y Mitrovski P. (2001). Levels of variation in stress resistance in *Drosophila* among strains, local populations, and geographic regions: patterns for desiccation, starvation, cold resistance, and associated traits. *Evolution*, 55(8): 1621-1630.

Houle D. (1992). Comparing evolvability and variability of quantitative traits. *Genetics*, 130(1): 195-204.

Houle D. (2010). Colloquium papers: Numbering the hairs on our heads: the shared challenge and promise of phenomics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 Suppl 1: 1793-1799.

Houle D., Govindaraju D. R. y Omholt S. (2010). Phenomics: the next challenge. *Nat Rev Genet*, 11(12): 855-866.

ICZN (2010). OPINION 2245 (Case 3407) *Drosophila* Fallén, 1823 (Insecta, Diptera): *Drosophila funebris* Fabricius, 1787 is maintained as the type species. *Bulletin of Zoological Nomenclature*, 67(1): 106-115.

Jaenike J. (1990). Factors maintaining genetic variation for host preference in *Drosophila*. En *Ecological and Evolutionary Genetics of Drosophila*. Barker J. S. F., Starmer W. T. y McIntyre R. (eds.). Plenum Press. New York.

Joseph R. M., Devineni A. V., King I. F. y Heberlein U. (2009). Oviposition preference for and positional avoidance of acetic acid provide a model for competing behavioral drives in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 106(27): 11352-11357.

Kennington W. J., Gilchrist A. S., Goldstein D. B. y Partridge L. (2001). The genetic bases of divergence in desiccation and starvation resistance among tropical and temperate populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 87(Pt 3): 363-372.

Kim M. S., Repp A. y Smith D. P. (1998). *LUSH* odorant-binding protein mediates chemosensory responses to alcohols in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 150(2): 711-721.

Kim M. S. y Smith D. P. (2001). The invertebrate odorant-binding protein *LUSH* is required for normal olfactory behavior in *Drosophila*. *Chem Senses*, 26(2): 195-199.

Kliman R. M., Andolfatto P., Coyne J. A., Depaulis F., Kreitman M., Berry A. J., McCarter J., Wakeley J. y Hey J. (2000). The population genetics of the origin and divergence of the *Drosophila simulans* complex species. *Genetics*, 156(4): 1913-1931.

Kulkarni N. H., Yamamoto A. H., Robinson K. O., Mackay T. F. y Anholt R. R. (2002). The *DSCI* channel, encoded by the *smi60E* locus, contributes to odor-guided behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 161(4): 1507-1516.

Kurtovic A., Widmer A. y Dickson B. J. (2007). A single class of olfactory neurons mediates behavioural responses to a *Drosophila* sex pheromone. *Nature*, 446(7135): 542-546.

Lachaise D. y Silvain J. F. (2004). How two Afrotropical endemics made two cosmopolitan human commensals: the *Drosophila melanogaster*-*D. simulans* palaeogeographic riddle. *Genetica*, 120(1-3): 17-39.

Lande R. (1979). Quantitative genetic analysis of multivariate evolution, applied to brain: body size allometry. *Evolution*, 33: 402 - 416.

Larsson M. C., Domingos A. I., Jones W. D., Chiappe M. E., Amrein H. y Vosshall L. B. (2004). *Or83b* encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron*, 43(5): 703-714.

Le Rouzic A., Siegel P. B. y Carlborg Ö. (2007). Phenotypic evolution from genetic polymorphisms in a radial network architecture. *BMC Biology*, 5:50.

Le Rouzic A. y Carlborg O. (2008). Evolutionary potential of hidden genetic variation. *Trends Ecol Evol*, 23(1): 33-37.

Levine R. B., Morton D. B. y Restifo L. L. (1995). Remodeling of the insect nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 5(1): 28-35.

Lewontin R. C. (2000). *The triple helix : gene, organism, and environment*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.

Libert S., Zwiener J., Chu X., Vanvoorhies W., Roman G. y Pletcher S. D. (2007). Regulation of *Drosophila* life span by olfaction and food-derived odors. *Science*, 315(5815): 1133-1137.

Loeschcke V., Bundgaard J. y Barker J. S. (2000). Variation in body size and life history traits in *Drosophila aldrichi* and *D. buzzatii* from a latitudinal cline in eastern Australia. *Heredity*, 85 Pt 5: 423-433.

Louis J. y David J. R. (1986). Ecological specialization in the *Drosophila melanogaster* species subgroup: a case study of *Drosophila sechellia*. *Acta Oecol*, 7: 215-230.

Lukacsovich T., Asztalos Z., Awano W., Baba K., Kondo S., Niwa S. y Yamamoto D. (2001). Dual-tagging gene trap of novel genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 157(2): 727-742.

Lukacsovich T. y Yamamoto D. (2001). Trap a gene and find out its function: toward functional genomics in *Drosophila*. *J Neurogenet*, 15(3-4): 147-168.

Lyman R. F., Lawrence F., Nuzhdin S. V. y Mackay T. F. (1996). Effects of single P-element insertions on bristle number and viability in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 143(1): 277-292.

Lyman R. F., Nevo E. y Mackay T. F. (2002). Variation in *Drosophila* sensory bristle number at 'Evolution Canyon'. *Genet Res*, 80(3): 215-223.

Mackay T. F., Hackett J. B., Lyman R. F., Wayne M. L. y Anholt R. R. (1996). Quantitative genetic variation of odor-guided behavior in a natural population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 144(2): 727-735.

Mackay T. F. y Lyman R. F. (1998). Polygenic mutation in *Drosophila melanogaster*: genotype x environment interaction for spontaneous mutations affecting bristle number. *Genetica*, 102-103(1-6): 199-215.

Mackay T. F. (2004). The genetic architecture of quantitative traits: lessons from *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev*, 14(3): 253-257.

Malnic B., Hirono J., Sato T. y Buck L. B. (1999). Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, 96(5): 713-723.

Marcillac F. y Ferveur J.-F. (2004). A set of female pheromones affects reproduction before, during and after mating in *Drosophila*. *J Exp Biol*, 207(22): 3927-3933.

Markow T. A. y O'Grady P. M. (2007). *Drosophila* biology in the genomic age. *Genetics*, 177(3): 1269-1276.

McBride C. S. (2007). Rapid evolution of smell and taste receptor genes during host specialization in *Drosophila sechellia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(12): 4996-5001.

McBride C. S. y Arguello J. R. (2007). Five *Drosophila* genomes reveal nonneutral evolution and the signature of host specialization in the chemoreceptor superfamily. *Genetics*, 177(3): 1395-1416.

Mensch J., Lavagnino N., Carreira V. P., Massaldi A., Hasson E. y Fanara J. J. (2008). Identifying candidate genes affecting developmental time in *Drosophila melanogaster*: pervasive pleiotropy and gene-by-environment interaction. *BMC Dev Biol*, 8: 78.

Mikasi K. (1992). Quantitative genetic study on sexual difference in emigration behavior of *Drosophila melanogaster* in a natural population. *Jpn J Genet*, 67(6): 463-472.

Moreno G. (1995). Genetic Architecture, genetic behavior, and character evolution. *Annu Rev Ecol Syst*, 25: 31-34.

Morton R. A., Choudhary M., Cariou M. L. y Singh R. S. (2004). A reanalysis of protein polymorphism in *Drosophila melanogaster*, *D. simulans*, *D. sechellia* and *D. mauritiana*: effects of population size and selection. *Genetica*, 120(1-3): 101-114.

Norga K. K., Gurganus M. C., Dilda C. L., Yamamoto A., Lyman R. F., Patel P. H., Rubin G. M., Hoskins R. A., Mackay T. F. y Bellen H. J. (2003). Quantitative analysis of bristle number in *Drosophila* mutants identifies genes involved in neural development. *Curr Biol*, 13(16): 1388-1396.

Nozawa M. y Nei M. (2007). Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in *Drosophila* species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(17): 7122-7127.

O'Grady P. M. y Markow T. A. (2009). Phylogenetic taxonomy in *Drosophila*. *Fly (Austin)*, 3(1): 10-14.

Oppliger F. Y., P M. G. y Vlimant M. (2000). Neurophysiological and behavioural evidence for an olfactory function for the dorsal organ and a gustatory one for the terminal organ in *Drosophila melanogaster* larvae. *J Insect Physiol*, 46(2): 135-144.

Otto S. P. (2004). Two steps forward, one step back: the pleiotropic effects of favoured alleles. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 271: 705 - 714.

Park S. K., Shanbhag S. R., Wang Q., Hasan G., Steinbrecht R. A. y Pikielny C. W. (2000). Expression patterns of two putative odorant-binding proteins in the olfactory organs of *Drosophila melanogaster* have different implications for their functions. *Cell Tissue Res*, 300(1): 181-192.

Partridge L., Barrie B., Fowler K. y French V. (1994a). Thermal evolution of pre-adult life-history traits in *Drosophila melanogaster*. *J Evol Biol*, 7(6): 645-663.

Partridge L., Barrie B., Fowler K. y French V. (1994b). Evolution and development of body size and cell in *Drosophila melanogaster* in response to temperature. *Evolution*, 48(4): 1269-1276.

Partridge L., Barrie B., Barton N. H., Fowler K. y French V. (1995). Rapid laboratory evolution of adult life-history traits in *Drosophila melanogaster* in response to temperature. *Evolution*, 49(3): 538-544.

Pelosi P. (1994). Odorant-binding proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 29(3): 199-228.

Pétavy G., David J. R., Debat V., Gibert P. y Moreteau B. (2004). Specific effects of cycling stressful temperatures upon phenotypic and genetic variability of size traits in *Drosophila melanogaster*. *Evol Ecol Res*, 6: 873-890.

Pielage J., Stork T., Bunse I. y Klambt C. (2003). The *Drosophila* cell survival gene *discs lost* encodes a cytoplasmic Codanin-1-like protein, not a homolog of tight junction PDZ protein Patj. *Dev Cell*, 5(6): 841-851.

Pikielny C. W., Hasan G., Rouyer F. y Rosbash M. (1994). Members of a family of *Drosophila* putative odorant-binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hairs. *Neuron*, 12(1): 35-49.

Polaczyk P. J., Gasperini R. y Gibson G. (1998). Naturally occurring genetic variation affects *Drosophila* photoreceptor determination. *Dev Genes Evol*, 207(7): 462-470.

Pollard D. A., Iyer V. N., Moses A. M. y Eisen M. B. (2006). Widespread discordance of gene trees with species tree in *Drosophila*: evidence for incomplete lineage sorting. *PLoS Genet*, 2(10): e173.

Python F. y Stocker R. F. (2002). Adult-like complexity of the larval antennal lobe of *D. melanogaster* despite markedly low numbers of odorant receptor neurons. *J Comp Neurol*, 445(4): 374-387.

R'Kha S., Capy P. y David J. R. (1991). Host-plant specialization in the *Drosophila melanogaster* species complex: a physiological, behavioral, and genetical analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(5): 1835-1839.

R Development Core Team (2010). *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Rice S. H. (1998). The evolution of canalization and the breaking of von Baer's laws: modeling the evolution of development with epistasis. *Evolution*, 52(647-657).

Rice S. H. (2000). The evolution of developmental interactions: Epistasis, canalization, and integration. En *Epistasis and the evolutionary process*. Wolf J. B., Brodie III E. D. y Wade M. J. (eds.). pp. 82-98. Oxford University Press. New York.

Rio B., Couturier G., Lemeunier F. y Lachaise D. (1983). Evolution d'une specialisation saisonniere chez *Drosophila erecta* (Dipt., Drosophilidae). *Annl's Soc ent Fr (NS)*, 19(2): 235-248.

Robertson A. (1959). The sampling variance of the genetic correlation coefficient. *Biometrics*, 15: 469-485.

Robertson H. M., Warr C. G. y Carlson J. R. (2003). Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 Suppl 2: 14537-14542.

Rollmann S. M., Mackay T. F. y Anholt R. R. (2005). *Pinocchio*, a novel protein expressed in the antenna, contributes to olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *J Neurobiol*, 63(2): 146-158.

Rollmann S. M., Yamamoto A., Goossens T., Zwarts L., Callaerts-Vegh Z., Callaerts P., Norga K., Mackay T. F. y Anholt R. R. (2007). The early developmental gene *Semaphorin 5c* contributes to olfactory behavior in adult *Drosophila*. *Genetics*, 176(2): 947-956.

Rubin G. M. y Lewis E. B. (2000). A brief history of *Drosophila's* contributions to genome research. *Science*, 287(5461): 2216-2218.

Salathe M., Ackermann M. y Bonhoeffer S. (2006). The effect of multifunctionality on the rate of evolution in yeast. *Mol Biol Evol*, 23(4): 721-722.

Sambandan D., Yamamoto A., Fanara J. J., Mackay T. F. y Anholt R. R. (2006). Dynamic genetic interactions determine odor-guided behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 174(3): 1349-1363.

Sambandan D., Carbone M. A., Anholt R. R. y Mackay T. F. (2008). Phenotypic plasticity and genotype by environment interaction for olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 179(2): 1079-1088.

Sanchez-Gracia A., Vieira F. G. y Rozas J. (2009). Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects. *Heredity*, 103(3): 208-216.

Scharloo W. (1991). Canalization: genetic and development aspects. *Annu Rev Ecol Syst*, 22: 65-93.

Schlichting C. y Pigliucci M. (1998). *Phenotypic evolution: a reaction norm perspective*. Sinauer, Sunderland, MA.

Schlichting C. D. (2008). Hidden reaction norms, cryptic genetic variation, and evolvability. *Ann N Y Acad Sci*, 1133: 187-203.

Serizawa S., Miyamichi K., Nakatani H., Suzuki M., Saito M., Yoshihara Y. y Sakano H. (2003). Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse. *Science*, 302(5653): 2088-2094.

Shanbhag S. R., Muller B. y Steinbrecht R. A. (1999). Atlas of olfactory organs of *Drosophila melanogaster* 1. Types, external organization, innervation and distribution of olfactory sensilla. *Int J Insect Morphol Embryol*, 28: 377-397.

Shanbhag S. R., Hekmat-Scafe D., Kim M. S., Park S. K., Carlson J. R., Pikielny C., Smith D. P. y Steinbrecht R. A. (2001). Expression mosaic of odorant-binding proteins in *Drosophila* olfactory organs. *Microsc Res Tech*, 55(5): 297-306.

Shaver S. A., Varnam C. J., Hilliker A. J. y Sokolowski M. B. (1998). The foraging gene affects adult but not larval olfactory-related behavior in *Drosophila melanogaster*. *Behav Brain Res*, 95(1): 23-29.

Shiraiwa T., Nitasaka E. y Yamazaki T. (2000). *Geko*, a novel gene involved in olfaction in *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet*, 14(3): 145-164.

Shiraiwa T. (2008). Multimodal chemosensory integration through the maxillary palp in *Drosophila*. *PLoS One*, 3(5): e2191.

Singh R. N. y Singh K. (1984). Fine structure of the sensory organs of *Drosophila melanogaster* Meigen larva (Diptera: Drosophilidae). *Int J Insect Morphol Embryol*, 13: 255-273.

Smith D. P. (1999). *Drosophila* odor receptors revealed. *Neuron*, 22(2): 203-204.

Sokolowski M. B. (2001). *Drosophila*: genetics meets behaviour. *Nat Rev Genet*, 2(11): 879-890.

Spradling A. C., Stern D. M., Kiss I., Roote J., Laverly T. y Rubin G. M. (1995). Gene disruptions using P transposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(24): 10824-10830.

Stocker R. F. (1994). The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell Tissue Res*, 275(1): 3-26.

Stocker R. F. (2006). Olfactory coding: connecting odorant receptor expression and behavior in the *Drosophila* larva. *Curr Biol*, 16(1): R16-18.

Stoltzfus J. R., Horton W. J. y Grotewiel M. S. (2003). Odor-guided behavior in *Drosophila* requires *calreticulin*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, 189(6): 471-483.

Swindell W. R. y Bouzat J. L. (2006). Associations between environmental stress, selection history, and quantitative genetic variation in *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, 127(1-3): 311-320.

Szafraniec K., Borts R. H. y Korona R. (2001). Environmental stress and mutational load in diploid strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(3): 1107-1112.

Tarraga J., Medina I., Arbiza L., Huerta-Cepas J., Gabaldon T., Dopazo J. y Dopazo H. (2007). Phylemon: a suite of web tools for molecular evolution, phylogenetics and phylogenomics. *Nucleic Acids Res*, 35(Web Server issue): W38-42.

Tissot M. y Stocker R. F. (2000). Metamorphosis in *Drosophila* and other insects: the fate of neurons throughout the stages. *Prog Neurobiol*, 62(1): 89-111.

Tompkins L., Siegel R. W., Gailey D. A. y Hall J. C. (1983). Conditioned courtship in *Drosophila* and its mediation by association of chemical cues. *Behavior Genetics*, 13(6): 565-578.

Tsacas L. y Bächli G. (1981). *Drosophila sechellia*, n. sp., huitième espèce du sous-groupe *melanogaster* des Iles Seychelles (Diptera, Drosophilidae). *Rev Fr Entomol*, 3: 146-150.

Tunstall N. E., Sirey T., Newcomb R. D. y Warr C. G. (2007). Selective pressures on *Drosophila* chemosensory receptor genes. *J Mol Evol*, 64(6): 628-636.

Ungerer M. C., Halldorsdottir S. S., Purugganan M. D. y Mackay T. F. (2003). Genotype-environment interactions at quantitative trait loci affecting inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 165(1): 353-365.

- Van 't Land J., Zwaan B. J., van Putten W. F., Kamping A. y van Delden W. (1999). Latitudinal variation in wild populations of *Drosophila melanogaster*: heritabilities and reaction norms. *J Evol Biol*, 12: 222-232.
- van der Linde K., Bächli G., Toda M. J., Zhang W., Katoh T., Hu Y. y Spicer G. S. (2007). Case 3407: *Drosophila* Fallén, 1832 (Insecta, Diptera): proposed conservation of usage. *Bulletin of Zoological Nomenclature*, 64(4): 238-242.
- van der Linde K. y Houle D. (2008). A supertree analysis and literature review of the genus *Drosophila* and related genera. *Insect Syst Evol*, 39(3): 241-267.
- van der Linde K., Houle D., Spicer G. S. y Steppan S. J. (2010). A supermatrix-based molecular phylogeny of the family *Drosophilidae*. *Genet Res (Camb)*, 92(1): 25-38.
- Via S. y Lande R. (1987). Evolution of genetic variability in a spatially heterogeneous environment: effects of genotype-environment interaction. *Genet Res*, 49(2): 147-156.
- Via S. (1993). Adaptive phenotypic plasticity: target or by-product of selection in a variable environment? *Am Nat*, 142(2): 352-365.
- Via S., Gomulkiewicz R., De Jong G., Scheiner S. M., Schlichting C. D. y Van Tienderen P. H. (1995). Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversies. *Trends Ecol Evol*, 10: 212-217.
- Vieira C., Pasyukova E. G., Zeng Z. B., Hackett J. B., Lyman R. F. y Mackay T. F. (2000). Genotype-environment interaction for quantitative trait loci affecting life span in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 154(1): 213-227.
- Vieira F. G., Sanchez-Gracia A. y Rozas J. (2007). Comparative genomic analysis of the odorant-binding protein family in 12 *Drosophila* genomes: purifying selection and birth-and-death evolution. *Genome Biol*, 8(11): R235.
- Visser J. H. (1986). Host Odor Perception in Phytophagous Insects. *Annu Rev Entomol*, 31(1): 121-144.

Vogt R. G., Prestwich G. D. y Lerner M. R. (1991a). Odorant-binding-protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects. *J Neurobiol*, 22(1): 74-84.

Vogt R. G., Rybczynski R. y Lerner M. R. (1991b). Molecular cloning and sequencing of general odorant-binding proteins GOBP1 and GOBP2 from the tobacco hawk moth *Manduca sexta*: comparisons with other insect OBPs and their signal peptides. *J Neurosci*, 11(10): 2972-2984.

Vogt R. G., Callahan F. E., Rogers M. E. y Dickens J. C. (1999). Odorant binding protein diversity and distribution among the insect orders, as indicated by LAP, an OBP-related protein of the true bug *Lygus lineolaris* (Hemiptera, Heteroptera). *Chem Senses*, 24(5): 481-495.

Vogt R. G., Rogers M. E., Franco M. D. y Sun M. (2002). A comparative study of odorant binding protein genes: differential expression of the PBP1-GOBP2 gene cluster in *Manduca sexta* (Lepidoptera) and the organization of OBP genes in *Drosophila melanogaster* (Diptera). *J Exp Biol*, 205(Pt 6): 719-744.

Vosshall L. B., Amrein H., Morozov P. S., Rzhetsky A. y Axel R. (1999). A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell*, 96(5): 725-736.

Vosshall L. B. (2000). Olfaction in *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol*, 10(4): 498-503.

Vosshall L. B. y Stocker R. F. (2007). Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. *Annu Rev Neurosci*, 30: 505-533.

Wade M. J. y Goodnight C. J. (1998). Genetics and adaptation in metapopulations: When nature does many small experiments. *Evolution*, 52: 1537-1553.

Wagner A. (1996). Does evolutionary plasticity evolve? *Evolution*, 50: 1008-1023.

- Wang P., Lyman R. F., Shabalina S. A., Mackay T. F. y Anholt R. R. (2007). Association of polymorphisms in odorant-binding protein genes with variation in olfactory response to benzaldehyde in *Drosophila*. *Genetics*, 177(3): 1655-1665.
- West-Eberhard M. J. (1989). Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Ann Rev Ecol Syst*, 20: 249-278.
- Whiteman N. K. y Pierce N. E. (2008). Delicious poison: genetics of *Drosophila* host plant preference. *Trends Ecol Evol*, 23(9): 473-478.
- Wright D., Butlin R. K. y Carlborg O. (2006). Epistatic regulation of behavioural and morphological traits in the zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Genet*, 36(6): 914-922.
- Wright S. (1931). Evolution in Mendelian Populations. *Genetics*, 16(2): 97-159.
- Wright S. (1968). *Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 1: Genetic and Biometric Foundations*. University of Chicago Press, Chicago.
- Wright S. (1969). *Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 2: The Theory of Gene Frequencies*. University of Chicago Press, Chicago.
- Wright S. (1977). *Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 3: Experimental Results and Evolutionary Deductions*. University of Chicago Press, Chicago.
- Wright S. (1978). *Evolution and the Genetics of Populations. Vol.4: Variability Within and Among Natural Populations*. University of Chicago Press, Chicago.
- Yang Z. (2007). PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol Biol Evol*, 24(8): 1586-1591.
- Zhang J. (2004). Frequent false detection of positive selection by the likelihood method with branch-site models. *Mol Biol Evol*, 21(7): 1332-1339.

Zhang J., Nielsen R. y Yang Z. (2005). Evaluation of an improved branch-site likelihood method for detecting positive selection at the molecular level. *Mol Biol Evol*, 22(12): 2472-2479.

Zhou S., Stone E. A., Mackay T. F. y Anholt R. R. (2009). Plasticity of the chemoreceptor repertoire in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet*, 5(10): e1000681.

zur Lage P. I., Prentice D. R., Holohan E. E. y Jarman A. P. (2003). The *Drosophila* proneural gene *amos* promotes olfactory sensillum formation and suppresses bristle formation. *Development*, 130(19): 4683-4693.