

Tesis Doctoral

QTL para estrés de alta temperatura y evolución experimental de hormesis en el modelo *Drosophila*

Gómez, Federico Hernán

2010

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:

Gómez, Federico Hernán. (2010). QTL para estrés de alta temperatura y evolución experimental de hormesis en el modelo *Drosophila*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Gómez, Federico Hernán. "QTL para estrés de alta temperatura y evolución experimental de hormesis en el modelo *Drosophila*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

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**

QTL para estrés de alta temperatura y evolución experimental de hormesis en el modelo *Drosophila*.

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

Federico Hernán Gómez

Director de Tesis: Dr. Fabián M. Norry
Consejero de Estudios: Dr. Norberto D. Iusem

Buenos Aires, 2010

Tabla de Contenidos

Resumen.....	4
Abstract.....	7
Agradecimientos.....	10
Reconocimientos.....	12
1. Introducción	13
1.1 Caracteres cuantitativos y el mapeo de QTL.....	14
1.2 Hormesis en longevidad	19
1.3 Resistencia a la inanición	22
1.4 Resistencia a la radiación ultravioleta.....	24
1.5 Tamaño corporal: longitud del ala.....	27
1.6 Asimetría Fluctuante	28
1.7 Termotolerancia.....	30
1.8 Objetivos generales	28
1.9 Objetivos específicos	30
2. Materiales y métodos.....	34
2.1 Hormesis en longevidad	35
2.1.1 Stocks de laboratorio y líneas de selección	35
2.1.2 La aclimatación como tratamiento para inducir hormesis.....	37
2.1.3 Determinación de la longevidad	38
2.1.4 Análisis de la mortalidad	38
2.2 Mapeo de QTL.....	40
2.3 Resistencia al la inanición.....	41
2.3.1 Líneas recombinantes endocriadas (RIL).....	41
2.3.2 Fenotipo de inanición	44
2.4 Tamaño corporal: largo y ancho del ala.....	46
2.4.1 Mediciones morfométricas de la longitud del ala.....	46
2.4.2 Genes candidatos	48
2.5 Asimetría fluctuante	49
2.6 Termotolerancia – fenotipo de termo-resistencia.....	50
2.7 Radiación UV-C – fenotipo de resistencia a la irradiación	52

3. Resultados	53
3.1 Hormesis en la longevidad.....	54
3.1.1 Selección para knockdown por alta temperatura	54
3.1.2 Selección para recuperación al coma inducido por frío.....	55
3.1.3 Análisis de parámetros de mortalidad	56
3.2 Resistencia a la inanición	64
3.3 Resistencia a la radiación UV	69
3.4 Tamaño corporal: largo y ancho del ala.....	76
3.5 Asimetría fluctuante	83
3.6 Termotolerancia.....	91
4. Discusión	96
4.1 Hormesis en la longevidad.....	97
4.2 Resistencia a la inanición	100
4.3 QTL para Termotolerancia, resistencia a la radiación UV y tamaño del ala	103
4.4 Asimetría fluctuante	108
5. Referencias Bibliográficas	111

QTL para estrés de alta temperatura y evolución experimental de hormesis en el modelo *Drosophila*

Resumen

Drosophila melanogaster se encuentra distribuida en amplias zonas geográficas, desde regiones tropicales a templadas en la mayoría de los continentes. Diversos fenotipos adaptativos han evolucionado en este organismo modelo cosmopolita, dependiendo los individuos y las poblaciones de conjuntos de mecanismos de resistencia al estrés ambiental, tanto basales como inducibles para la adaptación a las condiciones climáticas variantes. La resistencia al estrés por calor, hambre y radiación representan fenotipos ecológicamente relevantes de adaptación a los ambientes en la etapa adulta del ciclo de vida de *Drosophila*.

Se ha hallado que los tratamientos de estrés térmico con frecuencia inducen hormesis en la longevidad en varios organismos. Hormesis es un concepto fundamental en la biología evolutiva de la respuesta al estrés, siendo utilizado ampliamente para definir un fenómeno de respuesta de dosis sobre diversos caracteres, incluyendo la longevidad. El efecto de hormesis sobre la longevidad ocurre cuando la exposición a un factor de estrés moderado (ej., estrés por calor) extiende la longevidad de un organismo o bien reduce su tasa de senescencia o envejecimiento. La radiación ultravioleta (UV) es otra forma de estrés ambiental que, como ocurre con la temperatura, puede afectar la distribución, abundancia y evolución de los organismos. Los niveles de radiación UV incrementan a mayores latitudes y altitudes. El presente escenario de calentamiento global está caracterizado por un gradual deterioro de la capa de ozono y mayores niveles de radiación ultravioleta que alcanzan la superficie del planeta. Debido a que los caracteres de historia de vida han evolucionado en un ambiente donde la radiación está presente, es de interés investigar la base genética de la resistencia a la radiación ultravioleta.

Otro carácter de importancia adaptativa en insectos es la resistencia a la inanición. Este carácter es importante para la supervivencia cuando los

recursos alimenticios son escasos. En los insectos es común que las poblaciones tengan que soportar inanición en forma periódica, y la evolución de caracteres de historia de vida puede haber ocurrido bajo condiciones ambientales que incluyan la falta de alimento. El tamaño corporal puede estar relacionado a la tolerancia a la inanición además de ser otro carácter de gran importancia adaptativa para la dispersión y la capacidad para encontrar recursos de alimento y cría en *D. melanogaster*. Este carácter se encuentra muy influenciado por la temperatura durante el desarrollo embrionario.

Utilizando el mapeo de QTL (Quantitative Trait Loci) como herramienta y *Drosophila melanogaster* como organismo modelo, se investigó e identificó la ubicación de loci que son importantes para la variación en la resistencia a las altas temperaturas, al hambre y a la radiación UV. En este trabajo de tesis también se realizó un mapeo de QTL para el tamaño del ala (un índice del tamaño corporal) y la asimetría fluctuante como un indicador de la inestabilidad del desarrollo, tanto en benigna como en alta temperatura experimentada durante el desarrollo embrionario. En las regiones de QTL descubiertas se encuentran genes que desempeñan un rol importante en la evolución adaptativa de estos caracteres. Por otro lado, se investigaron e identificaron patrones adaptativos de hormesis en la longevidad en líneas de *Drosophila buzzatii* seleccionadas artificialmente para alta y baja resistencia a diferentes formas de estrés térmico. La tolerancia al estrés por inanición fue consistentemente más alta en las hembras que en los machos. El mapeo del intervalo compuesto identificó un QTL entre las bandas 64D-66E2 del cromosoma 3 en los machos y ningún QTL en las hembras. Se identificaron muchos genes candidatos dentro de dicha región de QTL. Los QTL para el tamaño del ala tampoco co-localizaron con el QTL para la tolerancia a la inanición. Los resultados se discuten con respecto a los múltiples genes candidatos y la falta de co-localización con QTL de termotolerancia previamente detectados en estudios recientes en *Drosophila melanogaster*.

En el análisis de hormesis se utilizaron líneas de selección bi-direccional para mayor (K+) y menor (K-) resistencia al estrés por calor, así como también se utilizaron líneas seleccionadas para mayor (CCR+) o menor (CCR-) resistencia al estrés por frío. La hormesis inducida por estrés de calor fue sustancial en las hembras K- y CCR-, mientras que no se detectó ningún

efecto de hormesis en las líneas K+, CCR+ y de control. Las diferencias en la longevidad entre las diversas líneas desaparecieron luego de un tratamiento por estrés de calor. Los efectos de hormesis sobre la tasa de senescencia demográfica fueron específicos de sexo y consistentemente más altos en las líneas menos longevas que en las líneas más longevas. Los resultados indicaron que la hormesis es una respuesta adaptativa, dado que su magnitud puede aumentar evolutivamente con la sensibilidad térmica.

Respecto de los QTL de termotolerancia se detectó un QTL de gran efecto sobre la resistencia al coma por calor en la región central (pericentromérica) del cromosoma 2 de *Drosophila melanogaster*. Los efectos de este QTL fueron mucho mayores en moscas no aclimatadas (resistencia basal) que en moscas aclimatadas (termotolerancia inducida). Este QTL explicó un 18% de la variación en fenotipos de resistencia al coma por calor, y no co-localizó con QTL de tolerancia a la inanición. Este QTL de termotolerancia colocó con un QTL del tamaño del ala y con un QTL de la resistencia a la radiación UV en el presente estudio. Se detectaron otros QTL para el tamaño del ala en los tres cromosomas mayores de la especie, que fueron específicos de la temperatura de desarrollo y del sexo. Respecto de los QTL para la asimetría fluctuante (AF), el resultado más interesante fue que ningún QTL para AF fue significativo en temperatura benigna y todos los QTL para AF fueron significativos en condiciones de estrés y parecieron ser específicos de cada sexo. El alelo del QTL que aumenta la tolerancia al calor fue el mismo que el que aumenta la tolerancia a la radiación UV-C, Este resultado es interesante porque indica que la tolerancia al calor y la resistencia a la radiación UV pueden tener QTLs en común. En la naturaleza, ambos caracteres podrían responder a la selección natural a través del mismo QTL, en ambientes con alta temperatura y elevada radiación UV. Por lo tanto, el QTL identificado será de gran interés para futuros análisis sobre termo-tolerancia y radiación ultravioleta, y el estudio presente discute posibles genes candidatos implicados en este QTL.

Palabras clave: estrés ambiental, termo-tolerancia, hormesis, QTL, inanición, resistencia a la radiación UV, tamaño del ala, asimetría fluctuante.

High temperature QTL and experimental evolution of hormesis in the *Drosophila* model

Abstract

Drosophila melanogaster is distributed over wide geographic areas, ranging from tropical to temperate regions in most continents. A great number of adaptive stress resistance mechanisms have evolved in this cosmopolitan model organism, and individuals as well as populations depend on sets of basal and inducible traits to adapt to the changing climatic conditions.

Resistance to heat stress, starvation and radiation represent ecologically relevant phenotypes of adaptation to environments in the adult stage of the *Drosophila* life cycle. Thermal stress is known to induce hormesis on longevity in several organisms. Hormesis is a fundamental concept in the evolutionary biology of stress resistance and is widely used to define a dose-response phenomenon on several traits, including longevity. Hormesis on longevity takes place when exposure to a mild stress factor, a mild heat stress for example, either extends the lifespan of an organism, or reduces its senescence or ageing rate.

Another form of environmental stress that can affect the distribution, abundance and evolution of organisms is UV radiation. UV radiation levels increase at higher altitudes and latitudes. The present global warming scenario is characterized by a gradual ozone layer deterioration and higher levels of ultraviolet radiation reaching the planet surface. Because life history traits have evolved in an environment where radiation is present, it is of interest to further investigate the genetic architecture of ultraviolet radiation resistance.

Another trait of adaptive importance is starvation resistance. This trait is crucial to survival when food resources are scarce. In insect populations periodic starvation is fairly common, and evolution of life history traits may have occurred under environmental conditions that included food shortage.

Body size may be related to starvation resistance and is another adaptive trait under the influence of several environmental factors, including

temperature, and of great importance for dispersion and resource finding. This trait is greatly influenced by temperature during the embryony stage of development in *D. melanogaster*.

Using QTL (Quantitative Trait Loci) mapping as a tool and *Drosophila melanogaster* as model organism, I investigated and identified the arrangement of loci relevant to variation in resistance to high temperature, starvation and UV radiation. Also, in this thesis we used QTL mapping to search for loci relevant for wing size (an index of body size) and fluctuating asymmetry, an indicator of developmental instability, at both benign and high developmental temperatures. Discovered QTL regions contain genes that play a significant role in the adaptive evolution of these traits. In addition, we investigated and identified adaptive patterns for hormesis in longevity in *Drosophila buzzatii* lines artificially selected for high and low resistance to different forms of thermal stress.

Starvation stress tolerance was consistently higher in females than in males. Composite interval mapping revealed a QTL between bands 64D-66E2 in chromosome 3 in males and none in females. Several candidate genes were identified within said QTL region. QTL for wing size did not co-localize with starvation resistance QTL. Results are discussed regarding the multiple candidate genes and lack of co-localization with QTL previously identified for thermotolerance in recent studies in *D. melanogaster*.

For hormesis analysis, bidirectional selection lines for high (K^+) and low (K^-) resistance to heat stress were utilized, as were lines selected for high (CCR^+) and low (CCR^-) resistance to cold stress. Heat stress induced hormesis was significant in K^- and CCR^- females, whereas no hormetic effect was detected in control, K^+ and CCR^+ lines. Differences in longevity among the several lines disappeared following a heat stress treatment. The effects of hormesis on the demographic senescence rate were sex-specific and consistently higher in shorter-lived lines than in longer-lived lines. Results indicate that hormesis is an adaptive response, as its magnitude may evolutionarily increase with thermal sensitivity.

Regarding thermotolerance, a QTL of great effect for heat-shock resistance was detected in the pericentromeric region of chromosome 2 in *Drosophila melanogaster*. The effects of this QTL were much higher in non-

hardened flies (basal resistance) than in hardened flies (induced thermotolerance). This QTL explained 18% of the variation in heat-shock resistance phenotypes, and did not colocalize with starvation resistance QTL. Additionally, this QTL did colocalize with a QTL for wing size and a QTL for UV radiation resistance in the present study. Other QTL were detected for wing size in the three major chromosomes of the species, these QTL were sex specific and also development-temperature specific. In regards to fluctuating asymmetry (FA), the most interesting result was that all FA QTL were significant under stressful temperature development and seemed to be sex-specific, whereas no significant benign temperature QTL were detected for AF.

The QTL allele increasing heat tolerance was the same as the one increasing UV-C radiation tolerance. This is an interesting result because it hints that heat tolerance and UV radiation resistance could have QTL in common. In nature, both traits may respond to natural selection through the same QTL in high-temperature and high-UV radiation level environments. Therefore, the identified QTL is of great interest for future analyses on thermotolerance and ultraviolet radiation, and the present study discusses possible candidate genes implicated in this QTL.

Keywords: environmental stress, thermotolerance, hormesis, QTL, starvation, UV radiation resistance, wing size, fluctuating asymmetry.

Agradecimientos

Gracias a mis padres, Gina y Alberto, por su amor y apoyo total durante toda la vida.

Gracias Lumi, por ser la abuela más genial de este mundo.

Gracias a mis hermanos, Mati, Nico y Maru. Cada uno de ustedes tiene cosas que admiro y de las que aprendo constantemente.

Gracias a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA, por haber sido por momentos un segundo hogar para mí durante mis estudios, y por haberme dado después un lugar donde trabajar e investigar.

Gracias a todos los profesores que en estos años guiaron mi formación y despertaron mi interés por la ciencia.

Gracias al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgar las becas de Doctorado que permitieron que investigara y llevara adelante mi formación doctoral y profesional.

Gracias a mi Director, Fabián Norry, por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de formar parte de un grupo de investigación en el que crecí y aprendí mucho. Gracias por el estímulo, los consejos, la orientación y el apoyo constante.

Gracias a mis amigos en el laboratorio, con quienes compartí muchos momentos entre experimentos a lo largo de estos cinco años; Pablo, Raquel, Alejandra, Carlos y Leticia.

Gracias Ingrid, por tu cariño, ser una gran amiga y estar siempre.

Gracias Gon, Leo, Mati y Gaby. Por los momentos de risas y más risas que compartimos.

Y gracias Micaela. Cualquier cosa que pueda escribir acá no sería suficiente. Sos hermosa y especial.

Reconocimientos

Esta investigación fue financiada por subsidios de la Universidad de Buenos Aires, la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), y CONICET al Dr. Fabián Norry.

Este trabajo fue realizado a partir de los subsidios UBACYT (X139 y X475), ANPCyT (PICT 611 y PICT 25619), CONICET (PIP5805).

1. Introducción

1.1 Caracteres cuantitativos y el mapeo de QTL

Una descripción completa de la base genética de la variación cuantitativa debe tener en cuenta las propiedades de los genes individuales, sus frecuencias génicas y la magnitud de sus efectos sobre el carácter estudiado (Falconer & Mackay 1996). La teoría de la genética cuantitativa está basada en el supuesto de que todo carácter fenotípico se encuentra influenciado por los genes y por el ambiente, estando conformada la varianza fenotípica en una población por componentes atribuibles a los efectos ambientales y a la varianza genotípica entre los individuos.

$$V_P = V_E + V_G$$

Siendo V_P la varianza fenotípica total, V_E la varianza ambiental y V_G la varianza genética.

La varianza genética tiene a su vez componentes de aditividad (V_A), dominancia (V_D) y epistasis (V_I). La varianza genética aditiva es el único de estos componentes que es heredable. La varianza genética total puede representarse de la siguiente manera:

$$V_G = V_A + V_D + V_I$$

Muchos de los estudios de caracteres cuantitativos se basan en correlaciones padre-hijo, análisis de respuesta a selección artificial, y estimaciones de componentes de varianza y heredabilidad. Los métodos de mapeo de QTL (Quantitative Trait Loci) permiten abordar el estudio de genes individuales, algo que no es posible en el marco de la genética Mendeliana clásica, que considera los efectos agregados de todos los genes responsables de la variación, sin discriminar sus efectos individuales. Las limitaciones de la genética mendeliana clásica se profundizan bajo el consenso de que los caracteres de distribución continua tienen una base poligénica y están determinados por un gran número de genes de pequeño efecto.

La identificación de genes individuales aumenta nuestra comprensión de los mecanismos evolutivos subyacentes a la variación fenotípica y es esencial para entender la adaptación a nivel funcional. Cabe aclarar que un QTL es, sin embargo, un segmento de cromosoma con un efecto sobre el carácter de estudio, y no necesariamente un único locus (Falconer & Mackay 1996).

Los diseños experimentales para estimar los efectos y la posición de QTL están basados, como el mapeo de genes individuales, en el desequilibrio de ligamiento entre los alelos de un locus marcador y los alelos de un QTL ligado a dicho marcador. El mapeo de QTL tiene, en consecuencia, los siguientes requerimientos:

- Un mapa de ligamiento correspondiente a loci marcadores polimórficos que cubra adecuadamente el genoma completo en estudio.
- Que el carácter cuantitativo en estudio presente variación dentro o entre poblaciones o líneas.

La elección de marcadores moleculares apropiados es crucial para la realización del mapeo de QTL. Idealmente, deben cumplir con los siguientes criterios:

- Deben ser altamente polimórficos, de manera que diferentes líneas sean, con alta probabilidad, portadoras de diferentes variantes alélicas en cada locus.
- Abundantes, para lograr una buena cobertura del genoma en estudio.
- Neutrales con respecto al carácter cuantitativo de interés y a la aptitud biológica.
- Co-dominantes, para poder identificar todos los genotipos posibles en un locus marcador. Este criterio no es tan restrictivo, y según el diseño pueden utilizarse marcadores dominantes o recesivos.

El mapeo de intervalo compuesto (CIM) (Zeng 1994) es la metodología utilizada en todos los análisis de QTL efectuados en este estudio. Este

método permite la detección de múltiples QTL y está basado en el mapeo de intervalo (Lander & Botstein, 1989) y en el análisis por regresión múltiple. La utilización de los microsatélites como grupo de marcadores y la consideración en el modelo de la posible existencia de otros QTL permite alcanzar un aumento de la resolución con respecto al mapeo de intervalo.

El procedimiento de CIM pone a prueba la hipótesis de que un intervalo comprendido entre dos marcadores contiene un QTL que afecta al carácter en estudio a la vez que, mediante regresión múltiple sobre marcadores que están por fuera del intervalo analizado, controla estadísticamente los efectos producidos por otros QTL que están segregando fuera del intervalo. Estos otros QTL o *background loci* pueden tener dos efectos. Primero, aquellos que no están ligados al QTL que está siendo mapeado se comportan como fuentes de variación ambiental adicionales y reducen la significancia de la asociación entre el QTL mapeado y el intervalo analizado en su búsqueda. Segundo, aquellos que están ligados al QTL que se está mapeando introducen un sesgo en la estimación de la posición de ese QTL. EL CIM es un método de mapeo que permite reducir la variación residual causada por estos otros QTL que segregan fuera del intervalo analizado.

Los datos necesarios para llevar adelante el mapeo por este procedimiento consisten en observaciones (n individuos) del carácter cuantitativo y de genotipos de un número de marcadores ordenados y distribuidos lo más uniformemente posible en el genoma.

Para poner a prueba la presencia de un QTL en el intervalo $(i, i+1)$, el método utiliza a los marcadores i e $i+1$, cuya posición en cM es conocida, como indicadores del genotipo del tentativo QTL dentro del intervalo. El modelo estadístico del CIM, propuesto por Zeng (1994), es el siguiente:

$$y_j = b_0 + b'x_j' + \sum_{i \neq i, i+j} b_k x_{jk} + e_j \quad \text{para } j = 1, 2, \dots, n$$

donde y_j es el valor fenotípico del individuo j -ésimo, b_0 es la media del modelo, b' es el efecto producido por el QTL expresado como la diferencia entre los efectos del homocigota y el heterocigota, x_j' es una variable

indicadora que puede tomar los valores 2 ó 0 (la probabilidad con que toma su valor depende del genotipo de los marcadores i e $i+1$ y de la posición genómica que está siendo evaluada para la búsqueda del QTL), b_k es el coeficiente de regresión parcial del valor fenotípico en el k -ésimo marcador (estos marcadores están siempre por fuera del intervalo que en ese momento está siendo analizado), x_{jk} es un coeficiente para el k -ésimo marcador en el j -ésimo individuo y es conocido (su valor es 2 si el marcador es homocigota ó 0 si el marcador es heterocigota), y e_j es una variable aleatoria.

Asumiendo que los e_j siguen una distribución normal con media cero y varianza σ^2 , la función de verosimilitud utilizada en el algoritmo puede ser definida como:

$$L_1 = \prod_{j=1}^n [p_j(1)f_j(1) + p_j(0)f_j(0)]$$

donde $p_j(1)$ es la probabilidad de que $x_j = 2$, $p_j(0) = 1 - p_j(1)$ es la probabilidad de que $x_j = 0$, $f_j(1)$ y $f_j(0)$ especifican una función de densidad normal para el valor fenotípico con varianza σ^2 y medias $b_0 + b' + \sum b_k x_{jk}$ y $b_0 + \sum b_k x_{jk}$, respectivamente.

El software QTL-Cartographer obtiene estimadores de máxima verosimilitud para los parámetros b' , b_k 's, y σ^2 , y pone a prueba las hipótesis

$$H_0: b' = 0$$

$$H_1: b' \neq 0$$

La función de verosimilitud bajo la hipótesis nula es $L_0 = \prod_{j=1}^n f_j(0)$ y el software también calcula estimadores de máxima verosimilitud para los parámetros b_k 's, y σ^2 en este caso.

La posición más probable de un QTL corresponde al valor máximo del estadístico de prueba $LR = -2\ln(L_0/L)$, que es dos veces el negativo del logaritmo del cociente entre las funciones de máxima verosimilitud, y es calculado para las distintas posiciones en el genoma estudiado. También

puede calcularse el valor LOD, que es un estadístico similar y equivale a LR/4.61. En este estudio utilicé el programa QTL-Cartographer (versión 2.5) para llevar a cabo los análisis de CIM.

1.2 Hormesis en longevidad

La longevidad es un carácter cuantitativo determinado por factores genéticos y ambientales. *Drosophila melanogaster* es un sistema modelo ampliamente utilizado en la exploración de la determinación genética de la longevidad, con sus poderosas herramientas genéticas y su variabilidad a lo largo de una importante heterogeneidad ambiental, es un sistema importante no sólo en el estudio de la base genética de la longevidad sino también de la biología del envejecimiento. En él se han identificado genes involucrados en el envejecimiento mediante abordajes genéticos clásicos, y se han caracterizado la contribución de la varianza genética natural al fenotipo de longevidad, las respuestas a selección artificial y las respuestas a selección natural.

Hormesis es un concepto fundamental en teoría evolutiva y es utilizado ampliamente en los campos de la biología, medicina y toxicología para definir un fenómeno de dosis-respuesta de dos fases. Una fase es caracterizada por un estímulo o efecto beneficioso a bajas dosis, mientras que la otra fase presenta un efecto inhibitorio o tóxico a dosis elevadas. (Calabrese et al. 2007). La vida sobre la tierra ha existido en ambientes severos, células y organismos han debido desarrollar complejos mecanismos para sobrevivir a las amenazas ambientales. Hasta el momento, se tienen evidencias de que en la respuesta hormética intervienen vías de señalización celulares y mecanismos moleculares que involucran enzimas como kinasas y desacetilasas, y también factores de transcripción. Como resultado, las células aumentan la producción de proteínas restauradoras y cito-protectoras, entre las cuales se encuentran factores de crecimiento, enzimas antioxidantes y chaperonas. Se han identificado importantes categorías de proteínas de resistencia al estrés que participan en respuestas horméticas, entre ellas se encuentran las proteínas de *heat-shock*, enzimas antioxidantes como las superóxido dismutasas y glutatión peroxidasas, y factores de crecimiento como los de tipo insulina (Mathers et al. 2004; Mattson et al. 2004; Young et al. 2004; Cuervo 2007; Staud 2007).

Se ha hallado que los tratamientos de estrés térmico con frecuencia inducen hormesis en varios organismos, incluyendo *Drosophila* (Khazaeli et al. 1997; Minois 2000; Le Bourg et al. 2001; Hercus et al. 2003; Scannapieco et al. 2007; Le Bourg & Rattan 2008; Sørensen et al. 2008). El efecto de hormesis sobre la longevidad ocurre cuando la exposición a un factor de estrés moderado extiende la longevidad media de un organismo o bien reduce su tasa de senescencia o envejecimiento.

El proceso biológico de senescencia, así como muchos otros, puede ser alterado por estrés térmico debido a que implica cambios en los niveles de expresión de muchos grupos de genes (Sørensen et al. 2005a; Vermeulen & Loeschcke 2007). Con frecuencia se encuentran correlaciones entre la longevidad y la resistencia al estrés (Kirkwood & Austad 2000; Hoffmann et al. 2003; Le Bourg & Rattan 2008; Sørensen et al. 2008).

En *D. melanogaster* se han encontrado correlaciones positivas entre la resistencia al estrés por alta temperatura y la longevidad en líneas seleccionadas para supervivencia al estrés por calor (Norry & Loeschcke 2003). Sin embargo, no se ha encontrado que la selección para resistencia al estrés por frío extienda sustancialmente la longevidad (Norry & Loeschcke 2002a, b; Anderson et al. 2005).

En estudios previos, Scannapieco et al. (2007) hallaron que la hormesis inducida por calor está correlacionada positivamente con la longevidad media, pero la longevidad está negativamente correlacionada con la resistencia *knock-down* por alta temperatura en comparaciones inter-específicas entre las especies hermanas *Drosophila buzzatii* y *Drosophila koepferae*. A nivel intra-específico, aún resta poner a prueba una hipótesis evolutiva: precisamente, que el nivel de hormesis inducido por calor evoluciona como respuesta correlacionada a la selección sobre caracteres de estrés térmico.

En este estudio el objetivo es obtener mayor información sobre la respuesta a la selección correlacionada con la longevidad. En particular respuestas a selección bi-direccional para tolerancia al calor y al frío en otra especie de *Drosophila*.

Aquí se investigan las posibles trayectorias evolutivas de la hormesis en la longevidad mediante experimentación en líneas de evolución experimental seleccionadas previamente en ambas direcciones tanto para resistencia al estrés por calor como para resistencia al estrés por frío. En el caso de las líneas de calor utilizadas en el estudio, los individuos fueron seleccionados en el laboratorio para alta o baja resistencia al knock-down por alta temperatura (líneas K^+ y K^- , respectivamente). En forma similar, las líneas de frío fueron seleccionadas para rápida y lenta recuperación del coma inducido en el laboratorio por exposición al frío (líneas CCR^+ y CCR^- , respectivamente).

Este estudio en líneas seleccionadas artificialmente para dos caracteres de adaptación térmica ecológicamente relevantes en insectos, explora las posibles respuestas correlacionadas, de hormesis inducida por calor y longevidad, a la selección.

1.3 Resistencia a la inanición

La resistencia a la inanición es importante para la supervivencia cuando los recursos alimenticios son escasos. En insectos es común que las poblaciones tengan que soportar inanición en forma periódica, y la evolución de caracteres de historia de vida puede haber ocurrido bajo condiciones ambientales que incluyan la falta de alimento (Hoffmann & Harshman 1999, Rion & Kawecki 2007, Wang et al. 2004). La respuesta fisiológica a la inanición aparece relativamente conservada a lo largo del reino animal (Rion & Kawecki 2007, Tatar et al. 2003, Partridge et al. 2005, Arsham y Neufeld 2006). En organismos modelo como *Drosophila melanogaster*, el mapeo de loci de caracteres cuantitativos (QTL) ha sido utilizado previamente para identificar en todos los cromosomas principales QTL que controlan la variación para la tolerancia al estrés nutricional o a la inanición (Wang et al. 2004, Harbison et al. 2005, Nuzhdin et al. 2007). Estos hallazgos indican que la resistencia a la inanición es un carácter cuantitativo dependiente de múltiples loci.

D. melanogaster se encuentra distribuida en grandes áreas geográficas en la mayoría de los continentes. Fenotipos adaptativos de resistencia a la inanición son generalmente divergentes entre poblaciones separadas geográficamente en este insecto modelo (Hoffmann et al. 2001). En forma adicional, la resistencia a la inanición presenta clinas geográficas en ésta y otras especies de *Drosophila* (Hoffmann & Harshman 1999, Karan et al. 1998, Robinson et al. 2000, Sørensen et al. 2005). El mapeo de QTL puede identificar regiones genómicas en las que se encuentran genes relevantes para la evolución adaptativa de la resistencia a la inanición (Wang et al. 2004). Aplicaciones de los procedimientos de mapeo de QTL para resistencia a la inanición revelaron varios QTL en líneas endocriadas recombinantes (RIL) de *Drosophila melanogaster* de una única población de origen (Wang et al. 2004). Más aun, otros QTL que solapan parcialmente fueron previamente identificados en otro grupo de RIL proveniente de dos cepas isogénicas, Oregon-R y la línea rusa 2b (Harbison et al. 2005). Uno de los objetivos de nuestro trabajo es identificar QTL que contribuyen a la variación geográfica

de fenotipos de resistencia a la inanición en *D. melanogaster*. Utilizamos en nuestro mapeo poblaciones provenientes de ambientes térmicos diferentes, ya que tales poblaciones han mostrado diferentes tendencias de resistencia a la inanición en trabajos previos (Hoffmann & Harshman 1999, Karan et al. 1998, Robinson et al. 2000, Schmidt et al. 2005).

En este trabajo se presenta mapeo de QTL para fenotipo de resistencia a la inanición en un grupo de RIL construido a partir de líneas provenientes de distintos continentes y seleccionadas para resistencia al estrés por calor en adultos. Una de las líneas parentales proviene de una muestra de moscas salvajes tomada en Dinamarca (población de clima frío) y posteriormente seleccionada para baja resistencia al estrés por calor. La otra línea parental proviene de una población muestreada en Melbourne, Australia (población de clima templado) y perteneciente a una clina geográfica para resistencia al estrés por frío (Hoffmann et al. 2002). Esta línea fue artificialmente seleccionada para alta resistencia al estrés por calor. En el presente trabajo se plantean varios objetivos. En primer lugar se examina si la supervivencia bajo condiciones de repetidos eventos de inanición está influenciada por QTL de efecto mayor. Segundo, se examina si los alelos que incrementan la resistencia a la inanición provienen de la población australiana originaria de clima templado o de la población escandinava proveniente de clima relativamente más frío (Bubliy et al. 2002), y si nuestras RIL difieren significativamente en su capacidad de resistir condiciones de inanición. La variación genética entre las líneas parentales es sólo una fracción de la variación total para resistencia a la inanición entre y/o dentro de poblaciones de *D. melanogaster*.

Sin embargo, detectar QTL en estas líneas divergentes para comparar con QTL previamente identificados en otras cruas entre líneas de orígenes geográficos distintos representa un intento útil para encontrar nuevos QTL para resistencia a la inanición. Finalmente, ponemos a prueba si la resistencia a la inanición se encuentra influenciada por QTL que co-localizan con otros previamente reportados para termotolerancia en estas RIL (Norry et al. 2008), ya que la resistencia a la inanición puede estar correlacionada con la resistencia al estrés por frío (Rion & Kawecki 2007, Hoffmann et al. 2005, Ayroles et al. 2009).

1.4 Resistencia a la radiación ultravioleta

La radiación ultravioleta (UV) es otra forma de estrés ambiental que afecta la distribución, abundancia y evolución de los organismos. Los niveles de radiación UV incrementan a mayores latitudes y altitudes. Uno de los principales factores de impacto directo sobre el nivel de radiación UV que alcanza la superficie del planeta es el daño a la capa de ozono. El presente escenario de calentamiento global está caracterizado por un gradual deterioro de la capa de ozono y mayores niveles de radiación ultravioleta que alcanzan la superficie del planeta.

Es de interés investigar la base genética de la resistencia a la radiación ultravioleta, ya que los caracteres de historia de vida han evolucionado en un ambiente donde la radiación está presente y los organismos no podrían adaptarse a los cambios ambientales sin preservar la función y estructura de sus células. La radiación UV causa daños en la estructura del ADN. En la forma de dímeros de pirimidina, este daño es tanto tóxico como potencialmente mutagénico para la célula. Los dímeros de pirimidina actúan como una barrera a la transcripción y la replicación. Los mecanismos de reparación son cruciales para impedir la acumulación del daño inducido por la radiación UV sobre el ADN.

El mecanismo de reparación por escisión nucleotídica (NER) es uno de los más estudiados. Por otro lado, las fotoliasas constituyen un mecanismo de foto-reactivación enzimático que repara dos de las clases mayoritarias de lesiones por dímeros de pirimidina introducidas en el ADN por la radiación UV: el fotoproducto pirimidina (6-4) pirimidona (producto 6-4) y el dímero ciclobutano pirimidina (CPD) (Friedberg 1985; Setlow & Setlow 1972). Las fotoliasas se unen a los productos dañados del ADN y los degradan por medio de un mecanismo dependiente de luz UV-A/luz azul. Son enzimas específicas, existen fotoliasas para los CPDs y fotoliasas para los productos 6-4. Esta enzima se encuentra ausente en mamíferos, incluyendo humanos, pero está presente en plantas y en el resto de los animales. La actividad fotoliasa CPD se encuentra ampliamente distribuida entre las especies, incluida *Drosophila melanogaster*, y genes de fotoliasa 6-4 han sido clonados

y secuenciados en esta especie. En *Drosophila*, la fotoliasa 6-4 presenta fuerte similitud de secuencia con la fotoliasa CPD de clase I.

En eucariotas, algunos genes involucrados en la foto-reactivación enzimática también lo están en el mecanismo de reparación por escisión nucleotídica (Yamamoto, Fujiwara & Shinagawa 1983; Yamamoto, Satake & Shinagawa 1984). Tanto el mecanismo NER como el de foto-reactivación son capaces de reparar con eficiencia el daño inducido en el ADN por la radiación UV. NER es un mecanismo complejo en el que interviene un complejo proteico de gran tamaño, mientras que la foto-reactivación sólo requiere de la enzima fotoliasa para eliminar los dímeros de pirimidina. La utilización eficiente de la luz de la misma fuente que induce lesiones en el ADN sugiere que las fotoliasas son enzimas antiguas con un rol evolutivo importante en ambientes donde la radiación UV está presente.

La energía de la radiación UV puede ser absorbida *in vivo* y se han detectado correlaciones positivas entre irradiación UV y la formación de especies reactivas del oxígeno (*reactive oxygen species, ROS*) (Black, 1987). Coenzimas y pigmentos tienen la capacidad de absorber la radiación UV *in vivo*, transfiriendo luego la energía de excitación a moléculas de H₂O y formando ROS (aniones superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo son las especies más comunes). Muchos componentes celulares y estructuras como las mitocondrias, ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y elementos extracelulares son dañados por ROS inducidos por la radiación UV (Jurkiewicz & Buettner 1994, Shindo et al. 1994).

En este estudio se analiza la tolerancia a la irradiación con luz UV-C en líneas recombinantes endocriadas (RIL) de *Drosophila melanogaster*. Los detalles de la construcción de las RIL usadas en este trabajo pueden consultarse en el apartado de Materiales y Métodos. Se utilizaron dos tratamientos diferentes de exposición a la irradiación UV-C. Las líneas experimentales fueron sometidas en forma separada a cada uno de ellos. En un primer experimento las líneas fueron irradiadas en forma continua hasta registrar la muerte de todos los individuos. En otro experimento las líneas fueron expuestas a ciclos de una hora de irradiación UV-C cada dos días hasta que todos los individuos murieron. El objetivo de someter las líneas a dos regímenes de exposición diferentes fue identificar las diferencias que

pueden aparecer como resultado de permitir tiempo de recuperación o por efectos de aclimatación. El tratamiento de exposición cíclica permite 48 horas de recuperación a los individuos experimentales, previamente a ser sometidos nuevamente a un severo evento de estrés.

Se utilizó la metodología de mapeo de QTL en los tres cromosomas mayores de *Drosophila melanogaster*. Este abordaje permite, en el marco de este estudio, el análisis de la base genética cuantitativa de la variación fenotípica y adaptación a la irradiación UV-C (Falconer & Mackay 1996, Lynch & Walsh 1998, Mackay 2001, 2004, Erickson et al. 2004, Slate 2005, Morgan & Mackay 2006).

1.5 Tamaño corporal: longitud del ala

La variación en el tamaño corporal dentro y entre poblaciones y especies es considerable. Este carácter adaptativo se encuentra influenciado por múltiples factores ambientales, incluyendo la temperatura. Los animales que se desarrollan a mayores temperaturas generalmente poseen un menor tamaño corporal al momento de alcanzar la madurez (Atkinson 1994, Gilchrist & Huey 2004) y se ha observado que el tamaño corporal se encuentra afectado por plasticidad fenotípica inducida por la temperatura (Loeschcke et al. 1999, van't Land et al. 1999, Gilchrist & Huey 2004, Frazier et al. 2008).

Diferentes partes del cuerpo pueden tener un impacto importante en la evolución general del tamaño corporal y en su dimorfismo sexual a diferentes temperaturas (Stillwell et al. 2010). En *Drosophila melanogaster*, la identificación de regiones genómicas asociadas a la variación fenotípica en el tamaño corporal es de gran interés evolutivo (Hoffmann & Daborn 2007). El mapeo de QTL puede ser utilizado como punto de partida para determinar la ubicación de los loci que son importantes para la variación en el tamaño corporal y que son susceptibles de ser regulados térmicamente. Para ello es necesario realizar escaneados del genoma completo a diferentes temperaturas. En este insecto modelo se han logrado mapear con éxito QTL para tamaño del ala en individuos desarrollados a temperaturas benignas (Mezey et al. 2005), pero no a altas temperaturas. Argumentos evolutivos implican a las interacciones genotipo-ambiente en el mantenimiento de la variación existente en los caracteres cuantitativos (Gillespie & Turelli 1989, Mackay 2004). La utilización de líneas recombinantes endocriadas (RIL) en el estudio de caracteres cuantitativos con posible plasticidad fenotípica es una herramienta de valor porque nos permite examinar líneas casi completamente homocigotas en múltiples ambientes.

1.6 Asimetría Fluctuante

La asimetría fluctuante (AF) es utilizada con frecuencia como una medida de inestabilidad durante el desarrollo. AF puede describirse como el desvío no direccional con respecto a la simetría bilateral (Van Valen, 1962; Palmer & Strobeck, 1986). Un aumento de AF puede estar asociado a disturbios aleatorios en la homeostasis durante el desarrollo, y es un carácter de utilidad para monitorear niveles de estrés en el laboratorio y en los ambientes naturales (Parsons 1990). El deterioro de la homeostasis del desarrollo puede darse a nivel molecular, cromosomal o epigenético como consecuencia de cambios genómicos y/o ambientales, siendo observable un aumento de AF en la morfología de los individuos adultos (Parsons 1990).

La asimetría fluctuante es un indicador útil de estabilidad durante el desarrollo porque, generalmente, existe muy poca varianza genética para el valor absoluto de la diferencia entre los lados, y una desviación observable de un lado respecto al otro es atribuible al resultado de diferentes respuestas al “ruido ambiental” (Palmer & Strobeck, 1986).

Para poder producir fenotipos predecibles, la progresión del desarrollo debe ser protegida de los impactos dañinos de las perturbaciones ambientales y genéticas (Takahashi et al. 2010). Waddington sugirió el mecanismo conceptual de canalización (Waddington, 1942). Este mecanismo actúa como “*buffer*” durante los procesos del desarrollo ayudando a producir fenotipos constantes. Las chaperonas moleculares, entre las que se encuentran las proteínas de *heat-shock* (*Hsps*), intervienen en el mantenimiento de la homeostasis de proteínas proporcionando cierto grado de protección contra varias formas de estrés ambiental (Morimoto, 1998). Hsp90 es una proteína de heat-shock implicada en el mecanismo de canalización. Varios estudios en *Drosophila*, *Arabidopsis* y el pez cebra (*Danio rerio*) hallaron que la inhibición de Hsp90 acarrea un incremento en la diversidad fenotípica (Rutherford & Lindquist, 1998; Queitsch et al., 2002; Yeyati et al., 2007). Hsp90 es única en sus funciones. No interviene en la maduración o en el mantenimiento de la mayoría de las proteínas *in vivo*. Los principales blancos celulares de Hsp90 que se han identificado suelen ser

interruptores moleculares (transductores de señales, reguladores del ciclo celular y reguladores del desarrollo). Estudios en levadura demostraron que a temperaturas normales, una disminución de los niveles de Hsp90 lleva al cese de vías de señalización Hsp90-dependientes. Por otro lado, en condiciones que causan daño a las proteínas, Hsp90 actúa sobre las proteínas parcialmente desnaturalizadas, disminuyendo su nivel de interacción con los transductores de señales. Este comportamiento dual de Hsp90, por un lado implicada en la transducción de señales y por otro lado implicada en la respuesta al estrés celular, sugiere que los programas del desarrollo están vinculados a las contingencias ambientales.

Aunque los genes que afectan AF pueden ser diversos, lo esperado es que existan más QTL para AF en condiciones de estrés ambiental que en ausencia de estrés. Esta es la hipótesis evaluada en el presente estudio. Para ello se utilizó el estrés por alta temperatura como factor de estrés durante el desarrollo embrionario y se investigó la AF de diversas dimensiones del ala de *D. melanogaster*.

1.7 Termotolerancia

En la naturaleza, los animales no dependen solamente de caracteres fenotípicos individuales, sino de conjuntos de caracteres tanto basales como inducibles para la adaptación a las condiciones climáticas variantes y al calentamiento global (Hoffmann & Parsons 1991; Hoffmann *et al.* 2003; Hoffmann & Daborn 2007; Reusch & Wood 2007). En insectos, tanto la respuesta adaptativa a la aclimatación por calor (termotolerancia inducida) como la resistencia basal al coma por alta temperatura (no inducida) representan fenotipos ecológicamente relevantes de adaptación a ambientes térmicos en la etapa adulta del ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (Huey *et al.* 1992; Gibert *et al.* 2001; Hoffmann *et al.* 2002, 2003; David *et al.* 2003; Morgan & Mackay 2006; Rako *et al.* 2007; Norry *et al.* 2007a). *D. melanogaster* se encuentra distribuida en amplias zonas geográficas, desde regiones tropicales a templadas en la mayoría de los continentes. Fenotipos adaptativos de termotolerancia inducible han evolucionado en este organismo modelo cosmopolita. Como resultado de la aclimatación por calor (ver Feder & Hofmann 1999; Hoffmann *et al.* 2003), la resistencia al coma por alta temperatura (RCAT) por lo general aumenta luego de la exposición a temperaturas relativamente elevadas (Norry *et al.* 2007b). Poblaciones de *D. melanogaster* provenientes de Australia y Dinamarca fueron previamente seleccionadas para producir fenotipos de alta y baja resistencia al coma por alta temperatura, respectivamente. Estas moscas fueron luego cruzadas para obtener las líneas recombinantes endocriadas utilizadas en este trabajo de tesis. La RCAT puede medirse como la temperatura a la que las moscas entran en un estado de coma y pierden la capacidad de vuelo por efecto de la temperatura en aumento (Huey *et al.* 1992; Gilchrist & Huey 1999), o bien como el tiempo que tardan las moscas en perder la capacidad de vuelo y caer “knockeadas” en estado de coma al ser expuestas a una temperatura elevada pero constante (Bubli *et al.* 1998; Hoffmann *et al.* 2002).

El mapeo de loci de caracteres cuantitativos (QTL mapping) es una herramienta que permite identificar regiones genómicas en las que se localizan genes importantes para cambios adaptativos en la termotolerancia

(Norry *et al.* 2004, 2007a, b; Morgan & Mackay 2006). Las RIL son herramientas importantes para el análisis genético de los fenotipos de termotolerancia, ya que el mapeo de QTL en poblaciones de RIL puede ser llevado a cabo en conjuntos de caracteres relacionados al estrés térmico (Morgan & Mackay 2006). Por ejemplo, RCAT puede aumentar debido a exposiciones previas a altas temperaturas (Norry *et al.* 2007b), y este efecto de aclimatación a corto plazo es un fenotipo con plasticidad fisiológica que puede ser estudiado por mapeo de QTL en poblaciones de RIL. Además, existe una extensa literatura acerca de los genes candidatos putativos para resistencia térmica y la respuesta adaptativa a la aclimatación en el modelo *D. melanogaster* (Feder *et al.* 1997; Hoffmann *et al.* 2003; Morgan & Mackay 2006; Sorensen *et al.* 2007; Rako *et al.* 2007; Hoffmann & Willi 2008). Los genes sobre-regulados por estrés térmico, incluyendo los loci que codifican para chaperonas moleculares o heat-shock proteins (Hsps), son loci candidatos primarios tanto para aclimatación por calor como para termotolerancia basal (McColl *et al.* 1996; Feder *et al.* 1997, 2000; Feder & Hofmann 1999; Bettencourt *et al.* 2002; Frydenberg *et al.* 2003; Walser *et al.* 2006). Sin embargo, aún no está claro cuáles son los genes de heat-shock funcionalmente variables para RCAT (Sorensen *et al.* 2007).

Los tres cromosomas mayores de *D. melanogaster* contienen o bien QTL dominantes o bien QTL con efectos aditivos para termotolerancia basal (no inducida, ver Norry *et al.* 2004, 2007a, b; Morgan & Mackay 2006). Sin embargo, todavía no se han identificado QTL para termotolerancia inducida en el modelo *Drosophila*.

Para comprender la base genética de la RCAT, es de interés determinar si los QTL para RCAT inducida presentan co-localización con los QTL para RCAT basal. La constancia de los QTL en su efecto y distribución cromosómica en diversas poblaciones de mapeo es un tema importante de la dinámica evolutiva de las regiones de QTL (Mackay 2001; Norry *et al.* 2007a), especialmente en estudios de la base genética de la adaptación a ambientes afectados por el calentamiento global (Reusch & Wood 2007; Hoffmann & Daborn 2007; Hoffmann & Willi 2008). En este trabajo también se investiga si los QTL presentan co-localización en diferentes poblaciones de mapeo o si son específicos de cada población.

1.8 Objetivos generales

Los objetivos generales, a los cuales contribuyen los objetivos específicos, son:

1. Elucidar la base genética de la tolerancia al estrés térmico, y los posibles efectos beneficiosos del estrés sobre la longevidad (hormesis) en ectotermos, utilizando *Drosophila* como organismo modelo.
2. Elucidar la base genética de la tolerancia a la radiación UV-C y a la inanición, utilizando *Drosophila* como organismo modelo.
3. Identificar los genes que determinan la variabilidad en la morfología del ala y en la estabilidad del desarrollo, utilizando *Drosophila* como organismo modelo.

1.9 Objetivos específicos

1. Identificar e investigar regiones (QTL o “*Quantitative Trait Loci*”) que contienen genes que afectan la resistencia a las altas temperaturas, el hambre y la radiación UV. en *D. melanogaster*, utilizando microsatélites como marcadores y mapeo del intervalo compuesto como herramienta analítica.
2. Identificar e investigar regiones (QTL o “*Quantitative Trait Loci*”) que contienen genes que afectan la morfología del ala (un índice del tamaño corporal) y la asimetría fluctuante (un índice de la estabilidad durante el desarrollo) en *D. melanogaster*, utilizando microsatélites como marcadores y mapeo del intervalo compuesto como herramienta analítica.
3. Determinar si los QTL identificados mapean en las mismas regiones que genes candidatos o QTL previamente descritos, o si representan

genes con funciones aún desconocidas sobre el genoma secuenciado y anotado de *D. melanogaster*.

4. Investigar las trayectorias evolutivas de la hormesis sobre la longevidad mediante un extensivo análisis de diferentes líneas de evolución experimental que fueron obtenidas por selección artificial sobre diferentes formas de estrés en *D. buzzatii* y recopilar mayor información sobre la respuesta a la selección correlacionada con la longevidad en esta especie.

2. Materiales y métodos

2.1 Hormesis en longevidad

2.1.1 Stocks de laboratorio y líneas de selección

Las líneas de *D. Buzzatii* utilizadas en este estudio fueron seleccionadas de un stock preparado a partir de una única población salvaje muestreada a mediados de abril 2003 en la localidad de Chumbicha, provincia de Catamarca, Argentina (28.52°S, 66.15°O). El stock fue mantenido en laboratorio, en botellas a 25°C, por aproximadamente 35 generaciones previamente al procedimiento de selección térmica.

A partir de la generación de laboratorio 35 (G35) se seleccionaron tres líneas réplica para corto y largo tiempo de *knock-down* en elevada temperatura. Las líneas de largo tiempo de *knock-down*, más resistentes al *shock* de calor, se denominaron K⁺ y las líneas de corto tiempo de *knock-down* y menor resistencia al *shock* de calor se denominaron K⁻. La selección se realizó utilizando una columna de *knock-down* estabilizada a una temperatura de 37±1°C (Huey et al. 1992). La selección artificial se llevó a cabo inicialmente por 7 generaciones consecutivas, y luego cada dos generaciones hasta alcanzar otras 11 generaciones de selección.

Para cada réplica de las líneas K, aproximadamente 150 individuos experimentales de 4 días de edad (razón de sexo 1:1) fueron liberados dentro de la columna de *knock-down*. Los 50 individuos que exhibieron los más cortos tiempos de *knock-down* (aproximadamente el 30% de las moscas liberadas) fueron seleccionados como progenitores de las líneas K⁻ en cada generación subsiguiente de selección. Para las líneas K⁺, aproximadamente el 30% de los individuos que mostraron los mayores tiempos de permanencia en la columna fueron seleccionados como progenitores de las subsiguientes generaciones. Este procedimiento se realizó en cada generación de selección. Cada línea réplica fue mantenida a 25°C como una población independiente hasta el momento de realización del experimento de inducción de hormesis por alta temperatura. Las líneas de selección fueron cruzadas, respetando cada tratamiento selectivo (K⁺ o K⁻), para llegar a obtener las poblaciones F₂ K⁺ y K⁻ en las que se llevó a cabo el estudio. Las poblaciones

F₁ fueron establecidas en cinco botellas con medio de cultivo estándar por línea réplica, y con diez moscas de cada sexo por botella (10 moscas x 2 sexos x 5 botellas estándar x 3 réplicas = 300 individuos por línea de selección).

Las líneas CCR (*chill coma recovery*) fueron seleccionadas a partir de la generación de laboratorio 35 (G35) en tres réplicas tanto para lenta (CCR⁻) como para rápida (CCR⁺) recuperación al coma por frío. La selección artificial se aplicó por 7 generaciones consecutivas, y luego cada dos generaciones hasta alcanzar otras 11 generaciones de selección. En cada una de las tres réplicas, a partir de un total de 350 individuos, aproximadamente el 30% de los que mostraron los más largos tiempos de recuperación al coma por frío fueron seleccionados como progenitores de la siguiente generación para las líneas CCR⁻. Asimismo, aproximadamente el 30% de los individuos con los más cortos tiempos de recuperación al coma por frío fueron seleccionados como progenitores de la siguiente generación para las líneas CCR⁺. Cada línea réplica fue mantenida a 25°C como una población independiente hasta el momento de realización del experimento de inducción de hormesis. Las líneas de selección fueron cruzadas, respetando cada tratamiento selectivo (CCR⁺ o CCR⁻), para llegar a obtener las poblaciones F₂ CCR⁺ y CCR⁻ en las que se llevó a cabo el presente estudio. De la misma manera que para las líneas K, las poblaciones F₁ fueron establecidas en cinco botellas con medio de cultivo estándar por línea réplica, y con diez moscas de cada sexo por botella (10 moscas x 2 sexos x 5 botellas estándar x 3 réplicas = 300 individuos por línea de selección).

Las líneas C fueron establecidas como controles al mismo tiempo que las líneas K y CCR, sus tres líneas réplica derivadas como cultivos de rutina a 25°C del stock de laboratorio proveniente del muestreo realizado en Chumbicha. Las líneas C fueron mantenidas en las mismas condiciones que las líneas K y CCR, pero no fueron sometidas a regímenes selectivos (cabe aclarar que estas líneas son controles en lo que se refiere a regímenes selectivos, y sí recibieron un tratamiento de aclimatación por calor o bien no fueron sometidos a tratamiento alguno al momento del ensayo para evaluar hormesis). Las tres líneas C fueron cruzadas entre sí para obtener los

individuos F_2 sobre los que se efectuó el presente estudio. Las poblaciones F_1 fueron establecidas para cada línea réplica C en cinco botellas con medio de cultivo estándar, y con diez moscas de cada sexo por botella (10 moscas x 2 sexos x 5 botellas estándar x 3 réplicas = 300 individuos).

Los individuos experimentales F_2 fueron en todos los casos los descendientes de las poblaciones F_1 descritas anteriormente. El razonamiento por el cual se utilizaron cultivos F_2 obtenidos a partir de juntar los descendientes de las tres réplicas F_1 fue reducir los posibles efectos que puede tener la endocría sobre la longevidad.

Todos los individuos experimentales pertenecientes a las F_2 de cada línea se desarrollaron en condiciones de baja a moderada densidad en cinco botellas estándar a 25°C, utilizando aproximadamente sesenta moscas por botella como progenitores. Los progenitores fueron removidos de las botellas luego de tres días, al observarse las primeras larvas pequeñas. Los adultos eclosionados fueron recolectados, su sexo determinado por observación bajo lupa tras leve anestesia con CO₂, y transferidos a una densidad de veinte moscas a tubos plásticos de 95 x 20 mm con medio de cultivo estándar. Todos los análisis se realizaron en un ambiente de sexo único, con los tubos estándar conteniendo o bien hembras vírgenes, o bien machos. Se prepararon 12 tubos por línea de selección y 12 tubos control (240 moscas por línea).

2.1.2 La aclimatación como tratamiento para inducir hormesis

Los individuos experimentales de la F_2 de cada línea recibieron un tratamiento de aclimatación por calor o bien no fueron sometidos a tratamiento alguno. El tratamiento de aclimatación consistió en tres exposiciones a niveles moderados de estrés por calor. Los individuos fueron sometidos al tratamiento a los 5, 9 y 16 días de edad. Cada una de las exposiciones se efectuó a 36°C durante 40 minutos.

Tratamientos de aclimatación de características similares efectuados durante edades tempranas pueden percibirse como un estrés moderado capaz de inducir hormesis en *D. melanogaster* (Hercus et al. 2003).

2.1.3 Determinación de la longevidad

La longevidad fue medida a 25°C en aproximadamente 120 machos y 120 hembras de cada tipo de línea (K⁻, K⁺, CCR⁻, CCR⁺ y C). Las mediciones se realizaron tanto en individuos sometidos al tratamiento de aclimatación como en individuos no aclimatados. Cada dos días los tubos fueron revisados para registrar las muertes y los individuos vivos fueron recolectados y pasados a tubos nuevos con medio de cultivo fresco. Con la progresión del experimento, el número de tubos disminuyó gradualmente y los adultos sobrevivientes se trataron de mantener a una densidad lo más cercana posible a 20 moscas por tubo, para lo cual a medida que ocurrían las muertes se fueron juntando los individuos de distintos tubos para mantener constante el número.

2.1.4 Análisis de la mortalidad

La mortalidad media fue puesta a prueba mediante ANOVA. Debido a interacciones significativas, fue necesario recurrir a comparaciones múltiples empleando la prueba de Tukey. Generalmente, se define a la senescencia como el aumento progresivo de la mortalidad con la edad. La tasa de mortalidad dependiente de la edad $\mu(x)$ fue estimada como la forma continua de la mortalidad edad-específica, donde:

$$\mu(x) = -\ln(1-q_x)$$

siendo $q_x = d_x/N_x$, donde d_x es el número de moscas que murieron en el intervalo temporal que va de x a $x+1$. N_x es el número de moscas con vida al día x (Elandt–Johnson & Johnson 1980, Tatar et al. 1997).

En la mayoría de los casos, un modelo logístico ofreció un mejor ajuste que otros modelos para describir la mortalidad en el conjunto de datos analizados. El modelo logístico es de la forma:

$$\mu(x) = ae^{bx}/[1+(as/b)(e^{bx}-1)]$$

En este modelo, el parámetro a corresponde a la tasa de mortalidad inicial, mientras que el parámetro b representa la tasa de incremento exponencial de la mortalidad, también llamada tasa demográfica de envejecimiento. El parámetro s es un indicador de la posible desaceleración en la mortalidad que ocurre a edades avanzadas (Pletcher 1999).

Este modelo difiere del modelo de Gompertz en la incorporación del parámetro s para describir los posibles *plateaus* en la mortalidad a edades tardías. Se implementaron pruebas de máxima verosimilitud con el software WinModest (Pletcher 1999), comparando moscas aclimatadas con moscas no aclimatadas. Todas las pruebas de mortalidad se realizaron a partir del primer día en que los individuos recibieron el tratamiento de aclimatación (5 días de edad).

2.2 Mapeo de QTL

En el análisis de los caracteres que se detallan de aquí en adelante, utilicé el mapeo de intervalo compuesto (CIM) para buscar QTL. Este procedimiento permite poner a prueba la hipótesis de que una región genómica flanqueada por dos marcadores adyacentes contiene un QTL. La prueba se llevó a cabo bajo el modelo 6 del software QTL Cartographer Windows Version 2.5 (Wang et al. 2007), y el diseño empleado fue Ri2 en todos los análisis (este diseño corresponde a RIL generadas por apareamiento entre hermanos). Inicialmente se usó un tamaño de ventana de 10 cM y 5 marcadores control. Las regiones de QTL halladas con esta combinación inicial de parámetros fueron consistentes al explorar los efectos de modificar dicha combinación. Los valores LR de los umbrales de significación fueron determinados en todos los casos por 1000 permutaciones al azar, o bien se trabajó con un umbral por defecto de 11.5, cuando el determinado por las permutaciones fue inferior a este valor.

En algunos casos se evaluaron las interacciones epistáticas entre pares de marcadores utilizando un modelo lineal:

$$y = m_x + m_y + m_x m_y + e$$

donde m_x y m_y son los genotipos de los marcadores x e y (Morgan & Mackay 2006).

2.3 Resistencia a la inanición

2.3.1 Líneas recombinantes endocriadas (RIL)

Las líneas utilizadas en este estudio se encuentran descritas en detalle en Norry et al. (2008). En resumen, dos líneas cuasi-homocigotas denominadas SH2 y D48 se seleccionaron como progenitoras para la construcción de las RIL. Los *stocks* parentales provienen de Melbourne (Australia) y Jutland oriental (Dinamarca), respectivamente, y fueron seleccionados para recuperación al coma inducido por calor y luego endocriados. Las líneas SH2 y D48 divergen dramáticamente en su resistencia al estrés inducido por calor en adultos (Tabla 7.1, pero ver Norry et al. 2004). Las hembras F₁, progenie de la cruce SH2 x D48, fueron utilizadas para obtener las líneas RIL. Hembras F₁ fueron retrocruzadas a machos D48 y la progenie de esta retrocruza apareada al azar por dos generaciones. Luego de la segunda generación de apareamiento aleatorio, se conformaron pares individuales y su progenie fue endocriada por apareamiento entre hermanos por 15 generaciones para obtener el conjunto de líneas RIL-D48. Se siguió el mismo procedimiento para obtener el conjunto de líneas RIL-SH, con la diferencia de que en este caso las hembras F₁ fueron inicialmente retrocruzadas a machos SH2 (Norry et al. 2008). La construcción de las dos retrocruzas recíprocas en vez de la utilización de introgresión unidireccional, responde a un intento de aumentar el poder estadístico para detectar QTL. Se utilizaron loci de microsatélites como marcadores. El mapa genético para las RIL en este estudio está constituido por un total de 36 marcadores distribuidos a lo largo de todos los cromosomas mayores de *D. melanogaster*.

En este estudio y en los de los caracteres que se describen más adelante, utilicé el mapa genético estimado en Norry et al. (2008). La distancia promedio entre marcadores en el mapa estándar de *Drosophila melanogaster* fue de 8 cM, pero la generación de RIL tuvo como resultado un mapa expandido (ver Tabla 1). Las distancias del mapa fueron promediadas sobre RIL-SH2 y RIL-D48. El mapa genético para RIL es un mapa expandido en relación a un mapa de retrocruza (Norry *et al.* 2004) porque la cantidad de

eventos de recombinación que ocurren durante la construcción de las líneas es mayor. Las distancias del mapa genético obtenidas en este estudio fueron menores que las distancias para otras RIL (Nuzhdin et al. 1997). Este resultado es consistente con el hecho de que se llevaron adelante menos rondas de recombinación para generar las RIL utilizadas aquí.

Tabla 1. Loci de microsatélites utilizados como marcadores para las líneas recombinantes endocriadas (RIL-D48 y RIL-SH2) de *D. melanogaster*. Las posiciones genéticas son las del mapa expandido para estas RIL (reproducido desde Norry et al. 2008).

Marcador	Posición citológica	Posición genética	Nro. de acceso GenBank	
AFO47180	1B8	1-0	AFO47180	††††
X2297267gt	3A	1-2	--	***
DS06577	3C1-C6	1-5	--	†
DMU56661	4F1-F2	1-15	U56661	††††
DMU96440	7B3	1-21.7	U96440	†††††
DROSEV	10A1-A2	1-40	J03158	††
X11347407ca	10C3	1-45	-	****
AC010705	12D-E	1-54	C01705	†††††
DMTROPINI	16F3-F6	1-71	X58188	††
AF017777	19F3-F6	1-85	AFO17777	††††
DROEXPAND	21C3	2-1	L14768	††
DROYANETSB	22C	2-6.44	M97694	††
AC009392	23A-E	2-10.98	AC009392	**
DROGPDHA	25F5-26A	2-25	J04567	††
DRONINAC	28A1-A3	2-37	J03131	††
AC005889	30A3-A6	2-49	AC005889	*

Tabla 1. Continuación

AC006302	34C4-D2	2-70	AC006302	††
AC004759	38E1-E9	2-76	AC004759	††††
DROTG121	42A	2-80	J01139	††
SU(Z)2	49C	2-97	X56798	††
DMMASTER	50C	2-100	X54251	††
DS00361	54B1-B2	2-115	-	†
AC004307	56D11-E6	2-129	AC004307	†††††, **
DS08011	59A1-A2	2-142	DS08011	††
DMRHOb	62A	3-0.1	X52454	††††
AC004658	63D2-F1	3-9	AC004658	††††
3L5235154gt	64D	3-17	---	****
AC008198	66D10-E2	3-34	AC008198	†††††
3L9222187ca	67A	3-45	-	*****
DM22F11T	73A1-B7	3-59	Z83456	††††
DROPROSA	86E3	3-71	D10609	**
DMEHAB	90B1-B2	3-84	X72303	††
DRONANOS	90E-F	3-95	M72421	††
DMTF125	95C6-C8	3-112	X98235	**
3R23156893gt	97F	3-128	-	****
DMU43090	99D6-D9	3-140	U43090	††††

† Schlötterer et al. (1997); †† Schug et al. (1998); ††† Harr et al. (1998); †††† Colson et al. (1999); ††††† Isabelle Colson (unpubl); * Gockel et al. (2001); ** Gockel et al. (2002); *** Kauer et al. (2002); **** Kauer et al. (2003); ***** Kauer & Schlötterer (2004).

2.3.2 Fenotipo de inanición

Todos los *stocks* de RIL fueron mantenidos en tubos estándar de 95 x 20 mm con medio de cultivo instantáneo a 25°C. Las RIL fueron expandidas por una generación a partir de los stocks, para ello se utilizaron entre 3 y 4 botellas estándar por línea RIL a baja densidad (10 machos y 10 hembras por botella). Las botellas estándar son botellas de vidrio de 125 mL conteniendo medio de cultivo instantáneo a base de papa desecada (este medio de cultivo no contiene azúcar ni levadura). Este medio es rico en carbohidratos, pero pobre en proteínas y contenido energético cuando se lo compara con otro tipo de medios de cultivo que contienen azúcares y levadura. Los individuos experimentales fueron moscas de 1 día de edad emergidas de las botellas estándar a 25°C bajo un ciclo de 12 horas luz/12 horas oscuridad.

Para medir la resistencia a la inanición (RI), utilizamos un tratamiento de hambreado cíclico en vez de uno continuo y agudo. Esto se debe a que la tasa de mortalidad fue extremadamente elevada para las RIL sometidas a períodos continuos y agudos de hambre en ensayos piloto. Los individuos experimentales se recolectaron de las botellas estándar en un período de 24 horas y ambos sexos fueron separados bajo leve anestesia con CO₂. Las moscas así obtenidas se colocaron en tubos estándar con individuos de un único sexo y conteniendo el medio de cultivo mencionado anteriormente. Se prepararon entre 1 y 2 tubos por línea RIL y sexo, con 20 moscas por tubo.

Luego de tres días, los individuos experimentales fueron transferidos a nuevos tubos con 10 mL de agar 1,5% y 5mL de agua. En estos tubos el medio no contiene valor nutricional alguno. Luego de dos días en este medio, todas las moscas fueron transferidas a tubos estándar con medio a base de papa desecada.

El procedimiento de hambreado cíclico, consistente en dos días de exposición a medio de hambreado a base de agar seguido por dos días en medio a base de papa desecada, fue repetido hasta registrar la muerte del último individuo experimental. Los tubos fueron revisados diariamente para registrar el número de muertes, y la resistencia a la inanición se registró como la longevidad media (en días) bajo las condiciones de hambre periódica descritas anteriormente. El experimento completo fue llevado adelante en dos

réplicas, y el promedio entre las mediciones de ambas réplicas fue utilizado como el valor fenotípico de RI para cada RIL. Al momento de ser analizados, los valores de RI de cada RIL fueron sometidos a la transformación raíz cuadrada para mejorar la normalidad de los datos.

Para determinar si nuestro tratamiento de hambre cíclico fue suficiente para reducir la longevidad por inanición en cada RIL, se realizó una comparación de la longevidad máxima con y sin el tratamiento de hambreado. La longevidad máxima bajo condiciones de hambre se estimó realizando el promedio sobre las réplicas de la edad a la que el individuo más longevo murió en cada RIL. Simultáneamente, se realizaron mediciones de la longevidad máxima en otro grupo de individuos experimentales que, con la diferencia de que no estuvieron sometidos a tratamiento de inanición, fueron mantenidos en condiciones similares a las moscas hambreadas (con 2 tubos por RIL y por sexo, y conteniendo cada tubo entre 15 y 20 moscas). En este caso, los tubos fueron revisados para anotar las muertes cada 2-3 días y luego los individuos vivos transferidos a nuevos tubos con medio de cultivo fresco hasta que muriera la última mosca para cada RIL. Se registró la longevidad máxima sin hambre como la edad a la que murieron los últimos individuos de cada RIL. El análisis estadístico de los datos de RI consistió en un ANOVA de dos factores, con línea y sexo como factores fijos.

2.4 Tamaño corporal: largo y ancho del ala

2.4.1 Mediciones morfométricas de la longitud del ala

Todos los stocks (RIL) fueron mantenidos a 25 ± 1 °C en tubos de cultivo estándar replicados de 95 x 20 mm conteniendo 6 mL de medio de cultivo preparado con papa deshidratada y agua. Los individuos experimentales de 30 RIL-D48 y 20 RIL-SH2 fueron desarrollados en alguna de dos temperaturas constantes de incubación, 25 ó 30 °C, con 30 larvas de 1-2 h de edad por tubo de cultivo estándar, bajo un ciclo de 12 h luz /12 h oscuridad. Algunas RIL presentaron muy baja viabilidad (< 35%) de huevo a adulto en ambas temperaturas y en ellas no se realizaron mediciones morfométricas del ala. Fueron medidos diez individuos experimentales por sexo, temperatura de desarrollo y RIL. El análisis estadístico de los datos consistió en un ANOVA con línea, sexo y temperatura de desarrollo como factores fijos.

Las alas fueron removidas, ubicadas en una gota de ácido láctico sobre un portaobjetos y cubiertas con cubreobjeto. Los caracteres morfométricos de las alas fueron medidos utilizando una cámara ubicada en un microscopio de disección y una computadora con el software de análisis de imágenes ImageJ (Rasband 2001). Los datos obtenidos consistieron en las coordenadas x e y de puntos específicos del ala (*landmarks*) utilizados para obtener medidas de distancia posteriormente convertidas a mm. Estimamos el largo del ala (LA) como la distancia entre la vena humeral y la punta distal de la vena III, mientras que el ancho del ala (AA) se determinó como la distancia entre las puntas distales de las venas II y V.

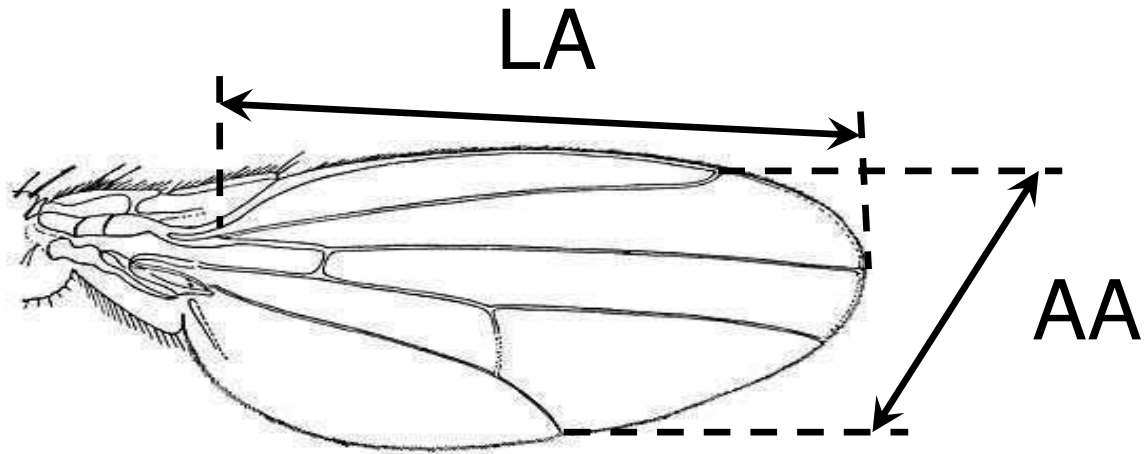


Fig. 1.1 Descripción de las medidas utilizadas para determinar el largo del ala (LA) y el ancho del ala (AA).

Para cada carácter se estimaron las diferencias entre los grupos de líneas utilizando el índice $DZ = X_i - X_j$, donde X_i y X_j son, respectivamente, los valores de las medias (en mm) para los grupos RIL-D48 y RIL-SH2 a cada temperatura de incubación. En promedio, se espera que las RIL-D48 posean 75% de genes D48, mientras que se espera que las RIL-SH2 posean 75% de genes SH2 (Norry et al. 2008), y DZ representa la diferencia en el valor medio del carácter entre los paneles de RIL. Los valores DZ de los paneles de RIL fueron levemente inferiores pero consistentes con los valores DZ entre moscas de las líneas parentales D48 y SH2. La significancia de los valores DZ se puso a prueba por medio de ANOVA de dos factores con sexo y RIL como factores fijos, de forma separada para cada temperatura de desarrollo. De manera adicional, también se estimó un DZ_{TEMP} entre temperaturas para cada panel de RIL ($DZ_{TEMP} = X_{T1} - X_{T2}$). En este caso, llamamos X_i y X_j a los valores medios (en mm), en RIL-D48 ó RIL-SH2, a 25°C y 30°C, respectivamente.

2.4.2 Genes candidatos

Los genes candidatos fueron identificados de acuerdo a su posición escaneando cada región de QTL en busca de loci con efectos conocidos o inferidos sobre fenotipos del ala, como se encuentran representados en la base de datos de ontología de genes de FlyBase (FlyBase Consortium, 2003). También se consideraron como loci candidatos a aquellos genes cuya abundancia de transcripción fue asociada al tamaño corporal en estudios previos (Coffman et al. 2005).

2.5 Asimetría fluctuante

Para el análisis de asimetría fluctuante (AF) se trabajó con los valores medios de las estimaciones del largo del ala (LA) y el ancho del ala (AA) calculados para el análisis de tamaño corporal. En este caso, los datos utilizados para el cálculo del índice de asimetría (AF) consistieron en las coordenadas x e y de los landmarks del ala derecha y del ala izquierda. En forma adicional, se calculó el índice de asimetría fluctuante (AF) para el carácter de superficie del ala (SA).

Para cada carácter se estimaron las diferencias entre el carácter para el ala derecha y el ala izquierda utilizando el índice de asimetría fluctuante, $AF = |D - I|$, donde para cada línea analizada D corresponde al valor del carácter para el ala derecha e I corresponde al valor del carácter para el ala izquierda. El análisis estadístico de los datos consistió en diferentes ANOVAs con sexo y temperatura de desarrollo como factores fijos. Para el análisis de QTL de asimetría fluctuante trabajé con los paneles RIL-D48 y RIL-SH2 en forma agrupada, para cada temperatura experimentada durante el desarrollo embrionario; 25°C ó 30°C. El índice AF representa el valor absoluto de la desviación en el valor medio del carácter respecto de la simetría bilateral perfecta.

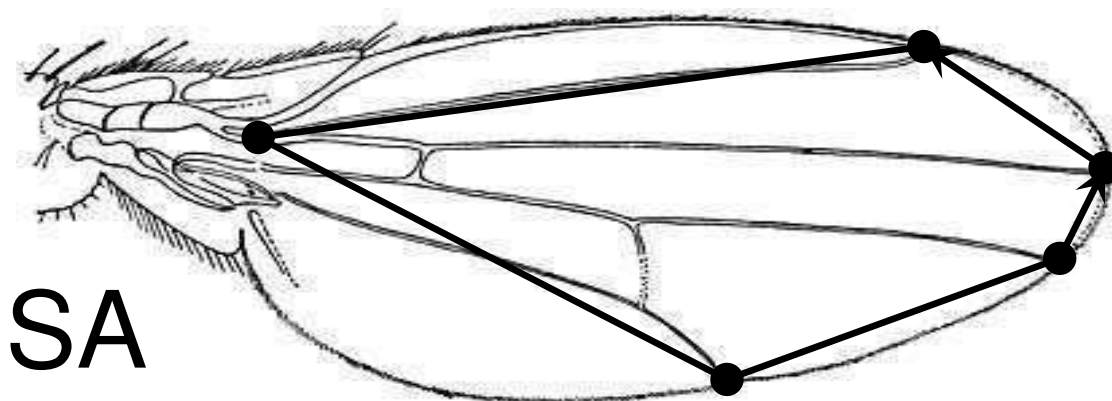


Fig. 1.2 Descripción de los *landmarks* utilizados en la determinación de la superficie del ala (SA).

2.6 Termotolerancia – fenotipo de termo-resistencia

Todos los individuos experimentales fueron obtenidos bajo condiciones estandarizadas a 25°C. Para cada RIL, ochenta larvas de 1-2 h de edad fueron introducidas en botellas estándar preparadas con 40 mL de medio de cultivo Carolina (Biological Supply, Burlington, NC, USA).

RCAT fue medida como el tiempo de *knock-down* utilizando dos columnas de *knock-down* construidas idénticamente y conectadas a un baño termostático por una serie de tubos plásticos y a una bomba encargada de hacer circular el agua.

Las columnas fueron utilizadas simultáneamente por diferentes operadores para aumentar el número de líneas en las que se midió RCAT por día. Para evitar posibles variaciones debidas a ciclos circadianos, todas las mediciones de RCAT se llevaron adelante entre las 11:30 y las 16:00 horas, ya que se ha reportado que RCAT aumenta luego del ocaso incluso en moscas desarrolladas en el laboratorio (Sørensen & Loeschcke 2002).

Todos los individuos experimentales liberados dentro de la columna de *knock-down* fueron de 3 días de edad. Se liberaron dentro de la columna de *knock-down* a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ aproximadamente 100 moscas para las pruebas en las líneas parentales SH2 y D48, ó entre 60 y 70 moscas para las pruebas en cada RIL (con una proporción de sexos de 50:50). RCAT se determinó empleando una serie de tubos de recolección reemplazados cada 30 seg, hasta que la última mosca en la columna cayó debido al estado de coma inducido por efecto del calor. No se utilizó anestesia en la manipulación de los individuos experimentales.

Las mediciones de RCAT fueron replicadas dos veces en diferentes días, y los valores medios de cada réplica fueron promediados para obtener la estimación final de RCAT para cada RIL. RCAT fue medida en moscas que recibieron previamente un tratamiento de aclimatación y en moscas no aclimatadas. El tratamiento de aclimatación consistió en una exposición leve al calor, 35 minutos a 36°C, 22 horas antes de la liberación de los individuos experimentales dentro de la columna de *knock-down* para medir RCAT. El

análisis estadístico de los datos consistió en un ANOVA con línea, sexo y temperatura de desarrollo como factores fijos.

Pruebas piloto con tratamientos de aclimatación más severos resultaron ser letales para varias RIL. Para evitar posibles variaciones circadianas, el tratamiento de aclimatación siempre se realizó entre las 11:00 y las 13:00 horas.

2.7 Radiación UV-C – fenotipo de resistencia a la irradiación

Los individuos experimentales fueron obtenidos bajo condiciones estandarizadas a 25°C. Para cada línea RIL, aproximadamente 40 individuos en proporción de sexos 1:1 fueron introducidos en tubos estándar preparados con medio de cultivo a base de papa desecada y agua. Los tubos fueron cubiertos con una tela delgada que permitió la llegada de la luz a su interior. La exposición a la fuente de radiación se llevó a cabo introduciendo a los individuos experimentales en una pequeña cámara con una lámpara UV-C en su interior. El experimento fue replicado una vez y la longevidad de los individuos sometidos a los tratamientos de irradiación fue utilizada como índice de resistencia a la radiación UV.

Se trabajó con dos regímenes de exposición a la radiación. Por una parte se efectuó un tratamiento continuo donde los tubos fueron retirados de la cámara de exposición solamente para registrar las muertes. Por otra parte se implementó un tratamiento menos severo, donde las moscas fueron expuestas día de por medio durante una hora a la fuente de radiación. Para evitar posibles variaciones debidas a ritmos circadianos, todas las mediciones de este último tratamiento se llevaron adelante entre las 13:00 y las 14:00 horas.

Todos los individuos experimentales fueron de 1 día de edad al comenzar este estudio. No se utilizó anestesia en la manipulación de los individuos experimentales. Para cada régimen de exposición, los valores de longevidad media de cada réplica cada fueron promediados para obtener la estimación final de resistencia a la radiación UV-C para cada RIL. El análisis estadístico de los datos de resistencia a la radiación UV se realizó para cada tratamiento por separado y consistió en un ANOVA de dos factores, con línea y sexo como factores fijos. Inicialmente se había llevado a cabo un ANOVA de tres factores, con línea, tratamiento y sexo como factores fijos. En este análisis, la interacción entre línea y tratamiento fue significativa. Aún así, la tendencia fue la misma en ambos tratamientos, presentando las líneas SH2 mayor resistencia que las D48.

3. Resultados

3.1 Hormesis en la longevidad

3.1.1 Selección para knock-down por alta temperatura

Las líneas K mostraron una divergencia significativa por selección artificial sobre resistencia al *knock-down* por alta temperatura. Los valores medios (\pm ES en seg.) se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Tiempos medios de permanencia en columna de *knock-down* y respectivos errores estándar (en seg. \pm ES) de líneas seleccionadas para alta y baja resistencia al shock por alta temperatura.

	<i>Machos</i>	<i>Hembras</i>
K ⁺	1012.97 \pm 122.52	840.45 \pm 112.23
C	523.71 \pm 147.59	662.40 \pm 277.73
K ⁻	457.63 \pm 87.53	631.91 \pm 173.12

Un ANOVA con línea y sexo como factores fijos mostró diferencias significativas entre líneas K⁺ y K⁻ para la resistencia al *knock-down* por alta temperatura. ANOVA con los factores fijos (1) K⁺ vs C vs K⁻ y (2) sexo: $F_{2, 290} = 17.88^{***}$ para (1), $F_{1, 290} = 0.41$ para (2), $F_{2, 290} = 0.58$ para (1) x (2); $^{***}p < 0.005$). Comparaciones de a pares utilizando el estadístico de Tukey confirmaron diferencias significativas para este carácter entre las líneas K⁺ y K⁻ ($^{***}p < 0.005$).

3.1.2 Selección para recuperación al coma inducido por frío

Las líneas CCR mostraron diferencias significativas por selección artificial sobre recuperación al coma por frío. Los valores medios (\pm ES en seg.) se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Tiempos medios de recuperación de líneas seleccionadas para lenta y rápida recuperación al coma por enfriamiento.

	<i>Machos</i>	<i>Hembras</i>
CCR ⁺	816.15 \pm 1009.62	661.46 \pm 551.17
C	1750.81 \pm 885.54	1665.00 \pm 673.28
CCR ⁻	2682.00 \pm 1651.63	1927.84 \pm 1104.79

Un ANOVA con línea y sexo como factores fijos mostró diferencias significativas en los tiempos de recuperación entre las líneas CCR⁺ y CCR⁻ tanto para machos como para hembras. ANOVA con los factores fijos (1) línea y (2) sexo: $F_{2, 423} = 94.56^{***}$ para (1), $F_{1, 423} = 9.34^{**}$ para (2), $F_{2, 423} = 4.17^*$ para (1) x (2); $^{***}p < 0.005$, $^{**}p < 0.01$, $^*p < 0.05$). Valores F para los efectos simples: $F_{2, 423} = 67.1^{***}$ para machos; $F_{2, 423} = 31.7^{***}$ para hembras. La prueba de Tukey confirmó diferencias significativas entre líneas CCR⁺ y CCR⁻ para ambos sexos ($^{***}p < 0.005$).

3.1.3 Análisis de parámetros de mortalidad

Las curvas de supervivencia y la longevidad media se muestran para cada línea en la Figura 2.1 y Tabla 2.3, respectivamente. Esta información se detalla tanto para individuos aclimatados como no aclimatados. En la Tabla 2.3 también se informan los valores de los parámetros del modelo logístico, estimados por el software WinModest.

Tabla 2.3 Longevidad media (días \pm ES) a 25°C en las líneas de *D. buzzatii* estudiadas. Se muestran los tres parámetros estimados para el modelo logístico de la curva de mortalidad (*a*, *b* y *s*). Abreviaciones: K⁺ alta resistencia al *shock* por calor, K⁻ baja resistencia al *shock* por calor, CCR⁺ rápida recuperación al coma por frío, CCR⁻ lenta recuperación al coma por frío, C línea control. (T) indica a las líneas que fueron aclimatadas con el objetivo de inducir hormesis en la longevidad. ES corresponde al error estándar de la media de la longevidad.

Machos					Hembras				
Línea	Longevidad	Parámetros de mortalidad			Línea	Longevidad	Parámetros de mortalidad		
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>s</i>			<i>a</i>	<i>b</i>	<i>s</i>
C	28.7 \pm 0.9	0.00348	0.105	0.0907	C	31.9 \pm 0.9	0.0009	0.165	1.0502
C (T)	32.0 \pm 0.9	0.00216	0.107	0.0002	C (T)	33.6 \pm 0.9	0.0008	0.163	1.5623
CCR ⁻	23.1 \pm 0.9	0.00001	0.680	7.3901	CCR ⁻	24.0 \pm 0.9	0.0014	0.239	1.8935
CCR ⁻ (T)	25.0 \pm 0.7	0.00157	0.191	0.8863	CCR ⁻ (T)	30.1 \pm 0.8	0.0008	0.175	0.7912
CCR ⁺	27.2 \pm 1.0	0.00482	0.091	0.0381	CCR ⁺	26.2 \pm 0.8	0.0012	0.161	0.0002
CCR ⁺ (T)	24.1 \pm 1.0	0.00088	0.271	2.0802	CCR ⁺ (T)	28.9 \pm 0.9	0.0001	0.287	2.0014
K ⁻	23.4 \pm 0.9	0.00061	0.314	2.9625	K ⁻	21.4 \pm 0.8	0.0006	0.300	1.8952
K ⁻ (T)	26.5 \pm 0.9	0.00280	0.144	0.6532	K ⁻ (T)	29.1 \pm 1.0	0.0047	0.087	0.0002
K ⁺	24.6 \pm 1.0	0.00567	0.098	0.0004	K ⁺	31.6 \pm 0.8	0.0010	0.139	0.0007
K ⁺ (T)	27.7 \pm 0.9	0.00324	0.112	0.0004	K ⁺ (T)	30.1 \pm 1.1	0.0031	0.120	0.8891

Tabla 2.4 Comparaciones relevantes de los parámetros de mortalidad entre moscas aclimatadas y no aclimatadas de cada línea de *D buzzatii* presente en la Tabla 3.

Comparaciones	Valor χ^2 para cada comparación de parámetro de mortalidad		
	a	b	s
<i>Machos</i>			
C vs C (T)	1.06	0.01	0.16
CCR ⁻ vs CCR ⁻ (T)	8.83*	14.3**	16.71**
CCR ⁺ vs CCR ⁺ (T)	4.59	11.8**	9.51*
K ⁻ vs K ⁻ (T)	1.71	3.62	3.54
K ⁺ vs K ⁺ (T)	1.42	0.41	0.01
<i>Hembras</i>			
C vs C (T)	0.02	0.01	0.38
CCR ⁻ vs CCR ⁻ (T)	0.374	1.58	3.05
CCR ⁺ vs CCR ⁺ (T)	4.45	5.06*	11.6**
K ⁻ vs K ⁻ (T)	8.17*	22.6**	12.6**
K ⁺ vs K ⁺ (T)	5.32	0.70	14.1**

Los valores p se encuentran corregidos teniendo en cuenta las comparaciones múltiples (10 comparaciones relevantes) utilizando el método secuencial de Bonferroni (Rice 1989). *p < 0.05; **p < 0.01. Abreviaciones: K⁺ alta resistencia al *shock* por calor, K⁻ baja resistencia al *shock* por calor, CCR⁺ rápida recuperación al coma por frío, CCR⁻ lenta recuperación al coma por frío, C línea control. (T) indica a las líneas que fueron aclimatadas con el objetivo de inducir hormesis en la longevidad. ES corresponde al error estándar de la media de la longevidad.

La selección por estrés térmico no incrementó la longevidad y las líneas de selección exhibieron un valor de longevidad media similar o inferior a la línea control (Tabla 2.3). Un ANOVA de tres factores fijos (línea, tratamiento de aclimatación y sexo) mostró interacciones significativas para la longevidad media entre los tres factores. (ANOVA de tres factores con (1) línea, (2) aclimatación vs no aclimatación y (3) sexo como factores fijos: $F_{4,2513} = 35.9^{***}$ para (1); $F_{1,2513} = 38.8^{***}$ para (2); $F_{1,2513} = 37.1^{***}$ para (3); $F_{4,2513} = 6.21^{***}$ para (1) x (2); $F_{4,2513} = 3.19^*$ para (1) x (3); $F_{1,2513} = 4.33^*$ para (2) x (3); $F_{4,2513} = 6.33^{***}$ para (1) x (2) x (3); * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$).

La variación en la longevidad de moscas no aclimatadas fue sustancial y se detectó interacción entre tipo de línea y sexo. En las hembras en particular, las moscas no aclimatadas de las líneas K^+ y C vivieron más en promedio que las moscas no aclimatadas de las líneas K^- , CCR^- y CCR^+ . (ANOVA de dos factores con (1) línea y (2) sexo como factores fijos: $F_{4,1281} = 27.2^{***}$ para (1); $F_{1,1281} = 8.43^{***}$ para (2); $F_{4,1281} = 8.38^{***}$ para (1) x (2); *** $p < 0.005$. Prueba de Tukey para los casos mencionados: $p < 0.005$).

En contraste con las líneas no aclimatadas, la longevidad media luego de la aclimatación no fue significativamente diferente entre las líneas seleccionadas por estrés térmico (Tabla 2.3). Un ANOVA con línea y sexo como factores fijos mostró que la línea control exhibió mayor longevidad media que todas las otras líneas. (ANOVA de dos factores con (1) línea y (2) sexo como factores fijos: $F_{4,1232} = 14.9^{***}$ para (1); $F_{1,1232} = 31.9^{***}$ para (2); $F_{4,1232} = 1.54$ para (1) x (2); *** $p < 0.005$. La prueba de Tukey fue significativa solamente al comparar la línea C con cada una de las líneas restantes: $p < 0.005$).

Los individuos aclimatados mostraron tendencia a vivir más que los no aclimatados, con excepción de los machos de la línea CCR^+ y las hembras de la línea K^+ (Tabla 2.3). En particular, los individuos aclimatados de la línea control fueron más longevos que los no aclimatados de la misma línea, y el tratamiento de aclimatación de la misma manera incrementó significativamente la longevidad de las moscas K^- (Tabla 2.1), como muestran los ANOVA con sexo y tratamiento de aclimatación como factores fijos para esas líneas. Por último, el valor del estadístico para el efecto simple también

indica un efecto significativo de hormesis en la longevidad media en hembras de la línea CCR⁻.

La tasa demográfica de senescencia (parámetro b) es significativamente menor en las hembras K⁻ aclimatadas respecto de las hembras no aclimatadas (Tablas 2.3 y 2.4; Figs. 2.1B y 2.2B). En machos aclimatados CCR⁻ también se observa una disminución en el valor del parámetro b , en este caso también acompañado por incrementos en los otros parámetros de la curva de mortalidad, a y s (Figs. 2.1D y 2.2A; Tablas 2.3 y 2.4). En las moscas CCR⁺ aclimatadas se observó una aparente desaceleración en la mortalidad (Fig. 2.1E). Esta tendencia fue confirmada por una variación significativa en el parámetro s de la curva (Tablas 2.1 y 2.2). Sin embargo, en marcado contraste con el resto de las líneas, la tasa de senescencia b fue mayor en los individuos aclimatados que en los no aclimatados (Tablas 2.1 y 2.2, Figs. 2.1E, 2.2C y 2.2D). Esta respuesta de la línea CCR⁺ es opuesta a la hormesis, y contrasta agudamente con la disminución del parámetro b observada en las moscas de las líneas K⁻ y CCR⁻ (Tablas 2.3 y 2.4).

Mientras la longevidad media fue significativamente mayor en machos K⁺ aclimatados, esta tendencia no se presentó en las hembras (Tabla 2.1; Fig. 2.1C). Aunque no hay un efecto de incremento de la longevidad media en hembras de esta línea, las curvas de supervivencia muestran una aparente desaceleración en la mortalidad en individuos aclimatados de este sexo (Fig. 2.1C). Esta tendencia fue confirmada contrastando el parámetro s de las hembras K⁺ aclimatadas con el de las no aclimatadas (Tablas 2.3 y 2.4).

En general, los efectos de hormesis sobre la longevidad son consistentemente mayores en las líneas de vida más corta que en las líneas más longevas, siendo las hembras las que muestran una relación negativa entre la longevidad y el efecto del tratamiento de aclimatación en el tiempo de vida (Fig. 2.3; pendientes de las curvas de regresión: $b = 0.73^*$ para las hembras, y $b = 0.33$ para los machos; * $p < 0.05$).

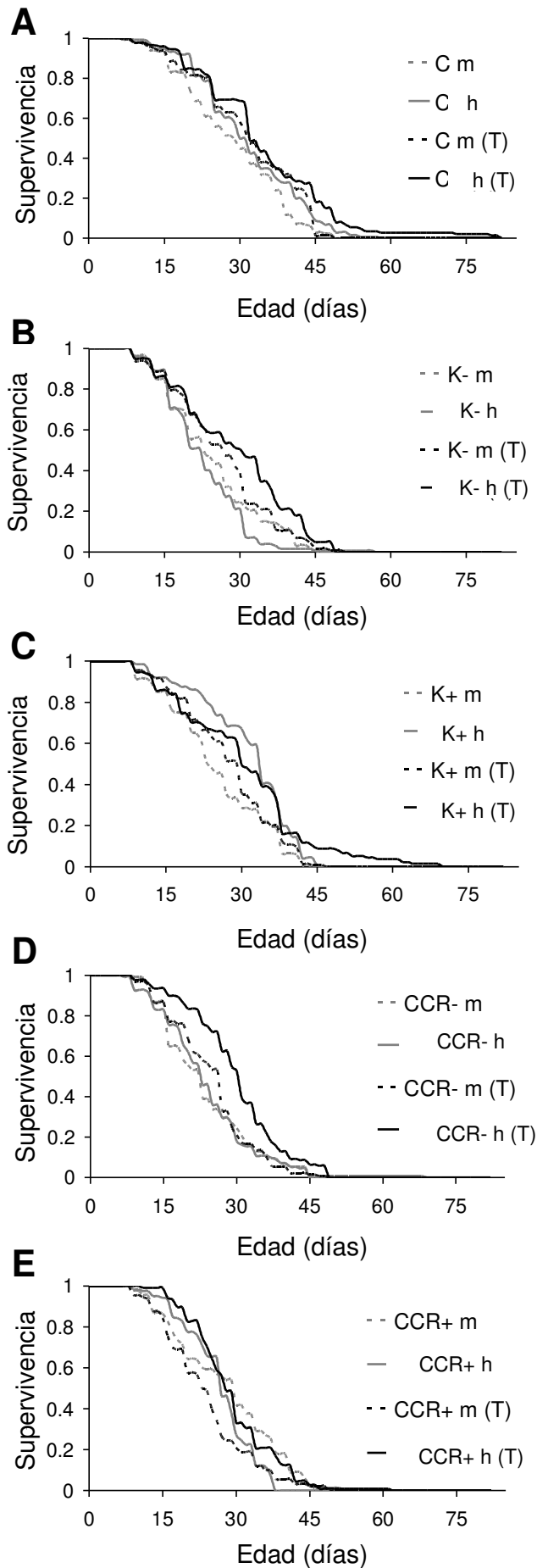


Fig. 2.1 Curvas de supervivencia para machos y hembras de *D. buzzatii* seleccionadas artificialmente.

A: curva de supervivencia de la línea control, B: curva de supervivencia de la línea K⁻, C: curva de supervivencia de la línea K⁺, D: curva de supervivencia de la línea CCR⁻, E: curva de supervivencia de la línea CCR⁺; (T): líneas aclimatadas (36°C, 40 min) a los 5, 9 y 16 días de edad. Las abreviaciones pueden consultarse en la Tabla 2.3.

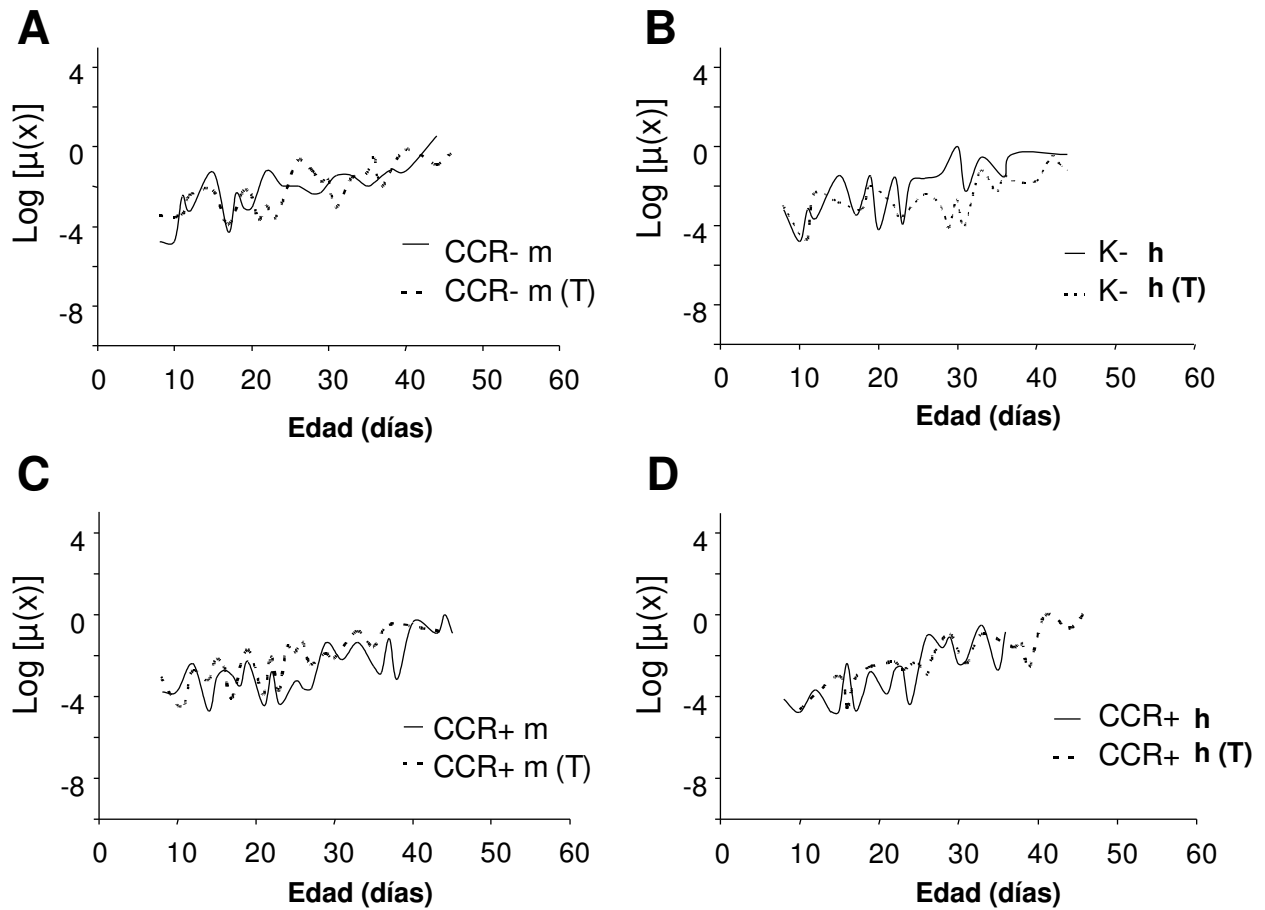


Fig. 2.2 Logaritmos de las tasas de mortalidad para aquellas líneas que mostraron diferencias significativas entre los individuos aclimatados (líneas punteadas) y los no aclimatados (líneas sólidas). A: machos CCR^- , B: hembras K^- , C: machos CCR^+ , D: hembras CCR^+ .

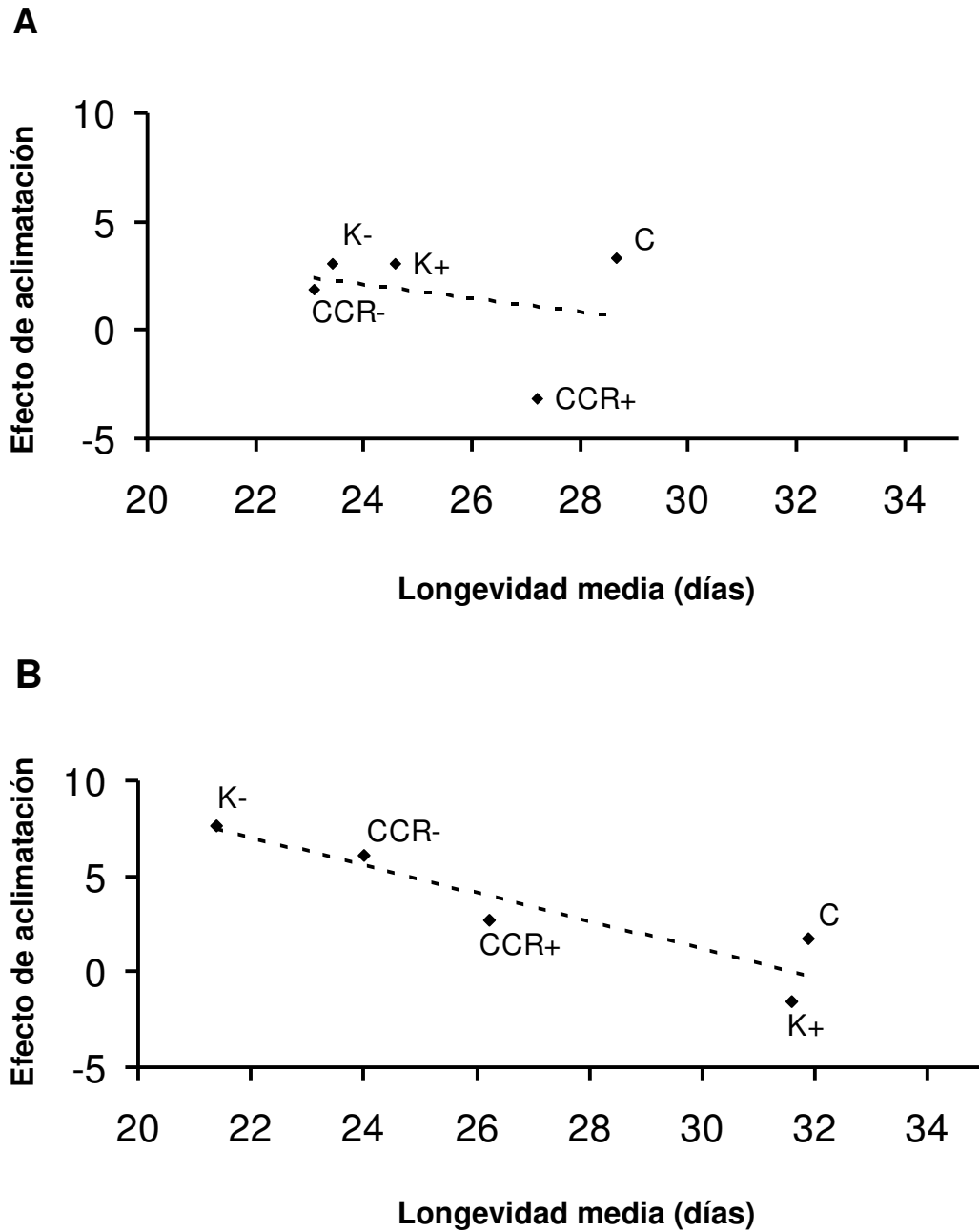


Fig. 2.3 Efecto del tratamiento de aclimatación como función de la longevidad media en líneas de *D. buzzatii* seleccionadas artificialmente. Definimos el efecto de la aclimatación como la diferencia de la longevidad media entre las moscas tratadas y las no tratadas. A: machos, B: hembras. Las abreviaciones para las líneas pueden ser consultadas en la Tabla 2.3.

3.2 Resistencia a la inanición

El tratamiento de inanición produjo una disminución marcada de la longevidad máxima (Fig. 3.1, ANOVA de tres factores). Este resultado indica con claridad que el tratamiento de inanición fue lo suficientemente severo como para inducir estrés nutricional en este grupo de RIL.

La resistencia a inanición fue mayor en RIL-SH2 que en RIL-D48 (Fig. 3.2, ANOVA de dos factores con (1) RIL-D48 vs RIL-SH2 y (2) sexo como factores fijos: $F_{1,92} = 7.17^{**}$ para (1); $F_{1,92} = 55.32^{***}$ para (2); $F_{1,92} = 0.002$ para (1) x (2). $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$). Las hembras mostraron mayor resistencia a la inanición que los machos (Fig. 3.2). En contraste, la longevidad máxima en las líneas control no fue significativamente diferente entre RIL-SH2 y RIL-D48, ni entre sexos (ANOVA de dos factores con (1) RIL-D48 vs RIL-SH2 y (2) sexo como factores fijos: $F_{1,92} = 1.23$ para (1); $F_{1,92} = 0.53$ para (2); $F_{1,92} = 1.34$ para (1) x (2)).

El mapeo de intervalo compuesto reveló un QTL en el cromosoma 3 en machos y ninguno en hembras (Fig. 3.3). El mapeo se realizó utilizando todas las líneas fenotipadas (resultados resumidos en la Tabla 3.1 y Fig. 3.3) como así también quitando del análisis los pocos casos en los que el tratamiento de inanición no produjo la tendencia esperada de disminución en la longevidad (hembras de las líneas 47 y 78 en RIL-D48 y de las líneas 32, 38 y 145 en RIL-SH2, Fig. 3.1). En ambos casos el análisis arrojó idénticas conclusiones; un único QTL significativo para resistencia a la inanición.

Se puso a prueba la existencia de posibles interacciones epistáticas entre combinaciones de pares de marcadores, pero ninguna interacción fue significativa luego de hacer la corrección para múltiples pruebas. Resultados similares se obtienen al juntar ambos grupos de RIL en un único análisis de mapeo de intervalo compuesto (Fig. 3.3).

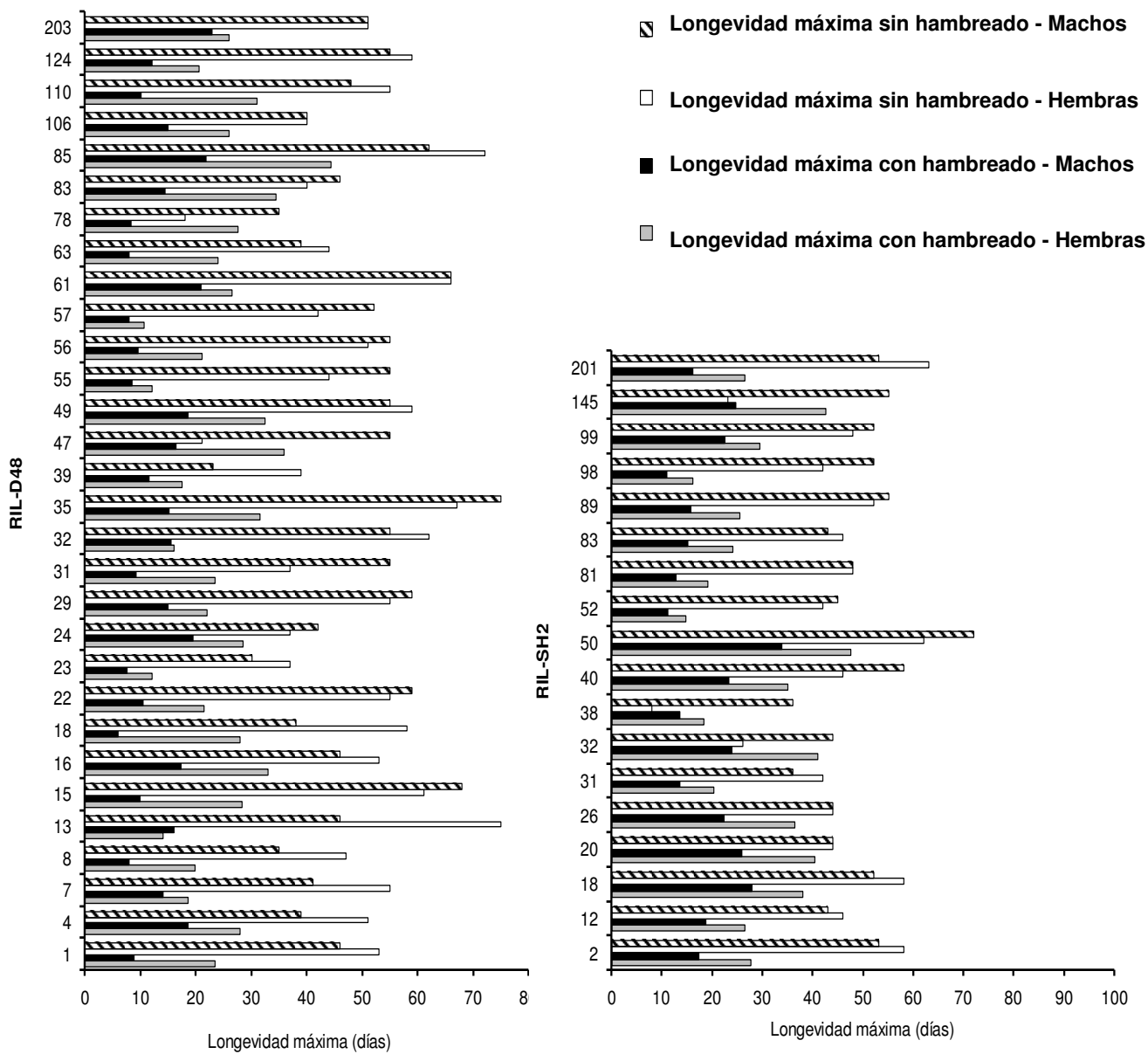


Fig. 3.1 Longevidad máxima con y sin tratamiento de hambre para cada una de las RIL fenotipadas.

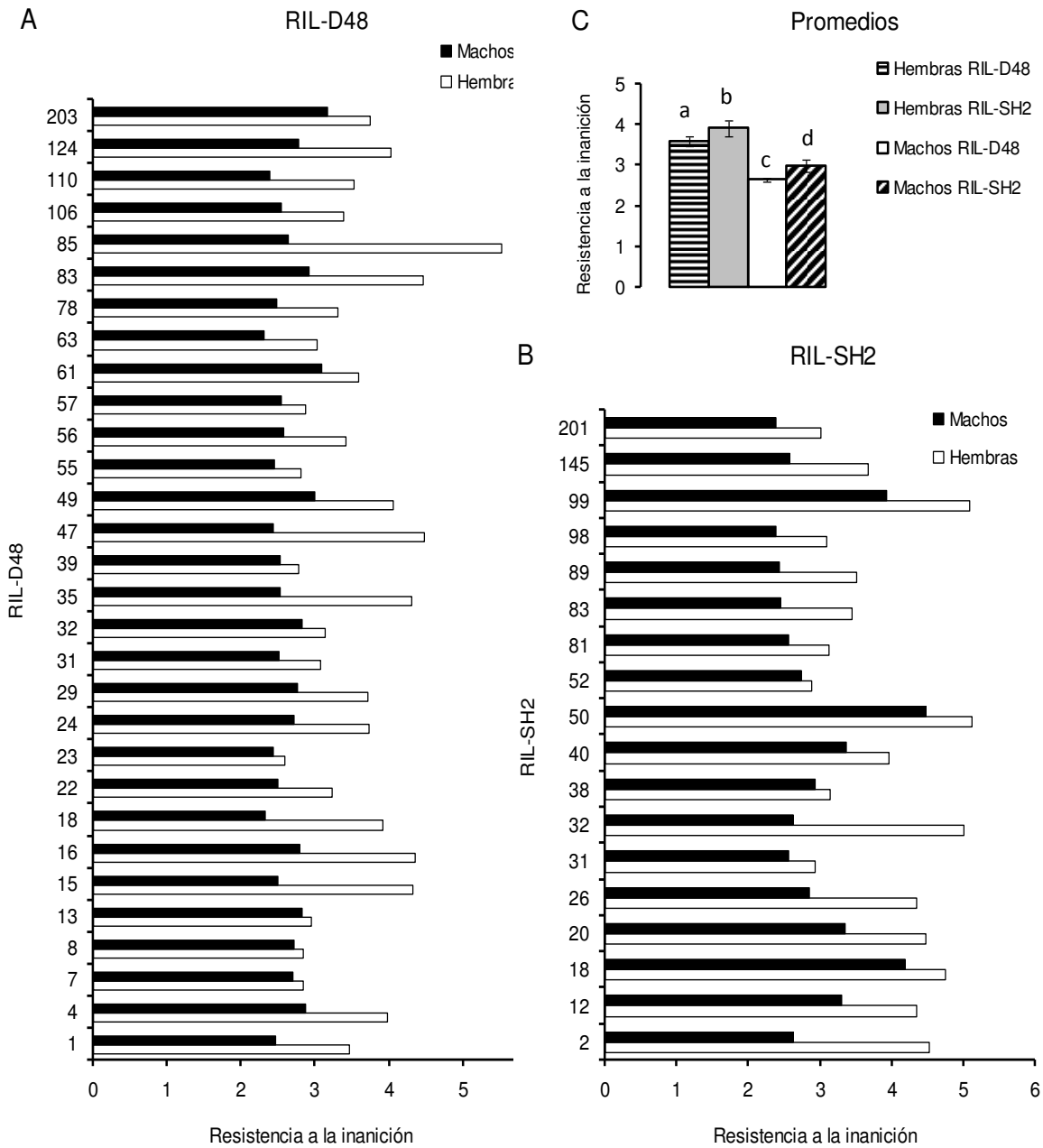


Fig. 3.2 Resistencia a la inanición registrada como la transformación raíz cuadrada de los datos de longevidad media (en días) para cada RIL fenotipada, como así también de los promedios calculados en la totalidad de RIL-D48 y RIL-SH2 para cada sexo. Las barras de error corresponden al error estándar de la media de los valores promediados en cada grupo de RIL.

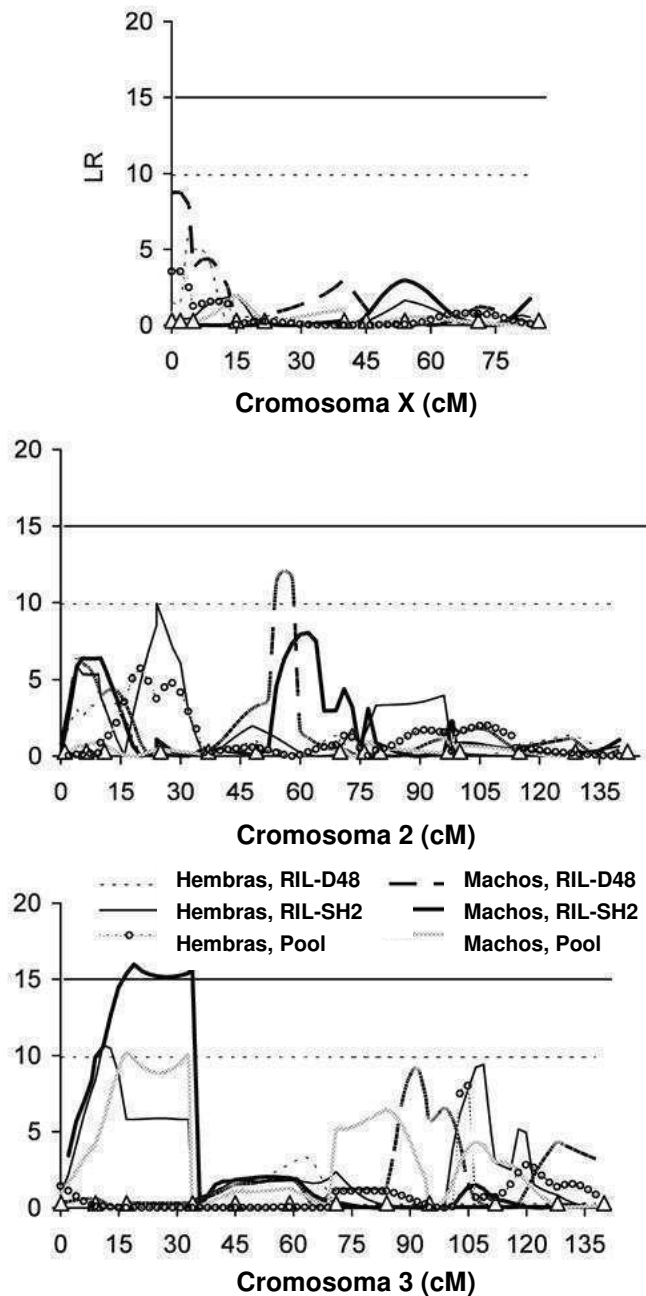


Fig. 3.3 Gráfico de los valores de *likelihood ratio* en función de la posición genética (cM) para el mapeo de intervalo compuesto de resistencia a la inanición en *D. melanogaster* de las poblaciones RIL-D48 y RIL-SH2. Se muestran los resultados para cada grupo de RIL por separado y para ambas poblaciones agrupadas. Los umbrales de significación se determinaron por 1000 permutaciones al azar, y sólo se muestran para los casos en los que un QTL significativo fue hallado: RIL-SH2 (línea horizontal llena); RIL agrupadas (línea horizontal punteada). Los triángulos sobre el eje de abscisas representan la ubicación de los marcadores moleculares utilizados en el mapeo de intervalo compuesto.

Tabla 3.1 QTL identificados por mapeo de intervalo compuesto para resistencia a la inanición en RIL-SH2.

Rango del QTL	<i>a</i>	% Var
64D-66D10-E2	0.53	32.87

Genes candidatos dentro del rango del QTL:

CG32423a (64D1): CG10591b (64D5), CG10592b (64D5), CG5160b (64D5), Txic (64E6-E7), CG13299b (65A10), yip7b (65A3), Jon65Aiiib (65A3), Jon65Aivb (65A3), Jon65Aiib (65A3-A4), Jon65Aib (65A4), CG10472b (65A5), Prat2b (65D2-D3), CG10077c (65D3-D4), CG10078b (65D3-D5), CG14823c (65E3), Dbib (65E4), CG8628b (65E4), CG8560b (65F11), CG8562b (65F11), CG14834b (65F5), CG8543b (66A2); CG32372c (66A3-A4); CG13678b (66C1), CG8012b (66C1), CG18179b (66C3), CG7083c (66C7-C8), CG7112b (66C8); CG32352a (66D7-D8)

Las posiciones citológicas se muestran entre paréntesis; El rango del QTL está basado en los marcadores más cercanos. El efecto aditivo (*a*) está dado en $\sqrt{\text{edad}}$ (edad en días), con valores positivos indicando que el alelo SH2 incrementa la resistencia a la inanición, ya que los genotipos de los marcadores fueron el número de alelos SH2 (0 ó 2) tanto para RIL-D48 como para RIL-SH2 (Norry et al. 2008). Los genes candidatos corresponden a loci sobre-regulados o sub-regulados en estudios de estrés por inanición en microarrays en *D. melanogaster*. (a) Sørensen et al. 2007b (b) Harbison et al. 2005 (c) Zinke et al. 2002. Los loci subrayados son genes que cambiaron su expresión entre líneas seleccionadas por hambre y control en Sørensen et al. (2007). % Var es el porcentaje de la varianza fenotípica total explicada por el QTL.

3.3 Resistencia a la radiación UV

El tratamiento de exposición continua a la radiación UV-C produjo una disminución muy marcada de la longevidad media con respecto al tratamiento de una hora de exposición cada dos días (Figs. 4.1 y 4.2). Estos resultados indican con claridad que los tratamientos de exposición a la radiación UV-C son severos en estos paneles de RIL, y el continuo más aún, como es esperable. Un ANOVA con efectos fijos de tipo de RIL (RIL-D48 vs SH2), sexo y exposición (continua vs cíclica) mostró una interacción significativa entre exposición y línea; ANOVA de tres factores con (1) RIL-D48 vs RIL-SH2, (2) sexo y (3) exposición continua vs exposición cíclica como factores fijos: $F_{1,202} = 213.19^{***}$ para (1); $F_{1,202} = 26.07^{***}$ para (2); $F_{1,202} = 1413.21^{***}$ para (3); $F_{1,202} = 0.009$ para (1) x (2); $F_{1,202} = 122.30^{***}$ para (1) x (3); $F_{1,202} = 0.575$ para (2) x (3); $F_{1,202} = 0.277$ para (1) x (2) x (3); $^{***}p < 0.001$.

Aunque la interacción entre tipo de exposición y tipo de línea resultó significativa, la tendencia fue la misma para ambos tratamientos. ANOVAs de dos factores fijos para cada tratamiento por separado confirman que la resistencia a la radiación fue mayor en RIL-SH2 que en RIL-D48, tanto en machos como en hembras (Fig. 4.2). También es notable que las hembras mostraran mayor resistencia a la radiación que los machos bajo ambos regímenes de exposición. (Fig. 4.2). (ANOVA de dos factores para el tratamiento de exposición continua con (1) RIL-D48 vs RIL-SH2 y (2) sexo como factores fijos: $F_{1,100} = 23.22^{***}$ para (1); $F_{1,100} = 35.01^{***}$ para (2); $F_{1,100} = 0.346$ para (1) x (2); $^{***}p < 0.001$. ANOVA de dos factores para el tratamiento de exposición cíclica con (1) RIL-D48 vs RIL-SH2 y (2) sexo como factores fijos: $F_{1,102} = 192.93^{***}$ para (1); $F_{1,102} = 10.08^{**}$ para (2); $F_{1,102} = 0.113$ para (1) x (2); $^{**}p < 0.005$, $^{***}p < 0.001$).

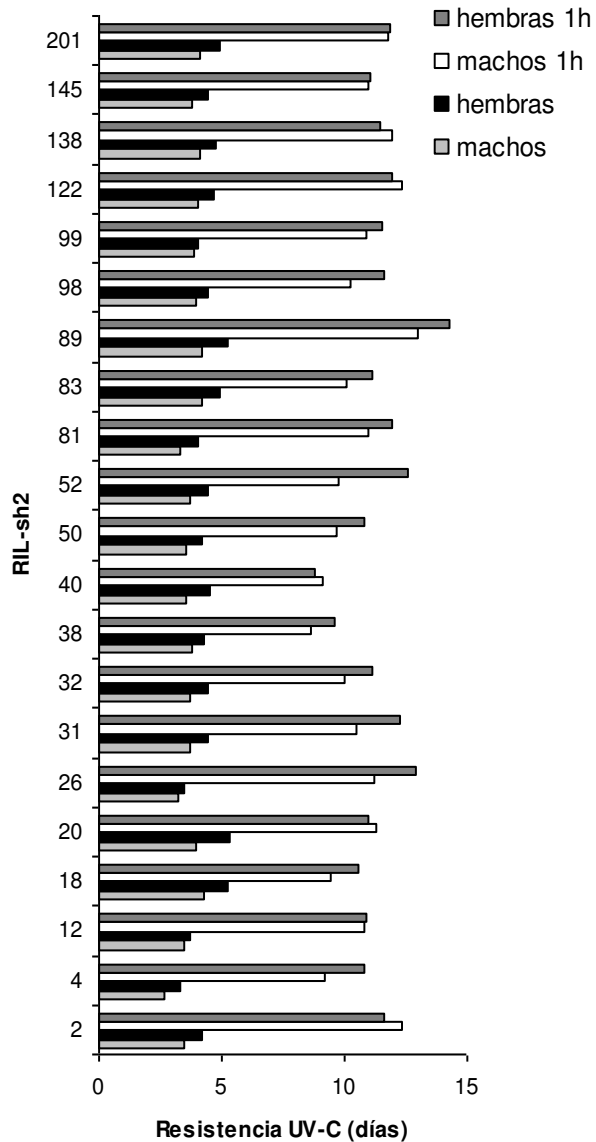
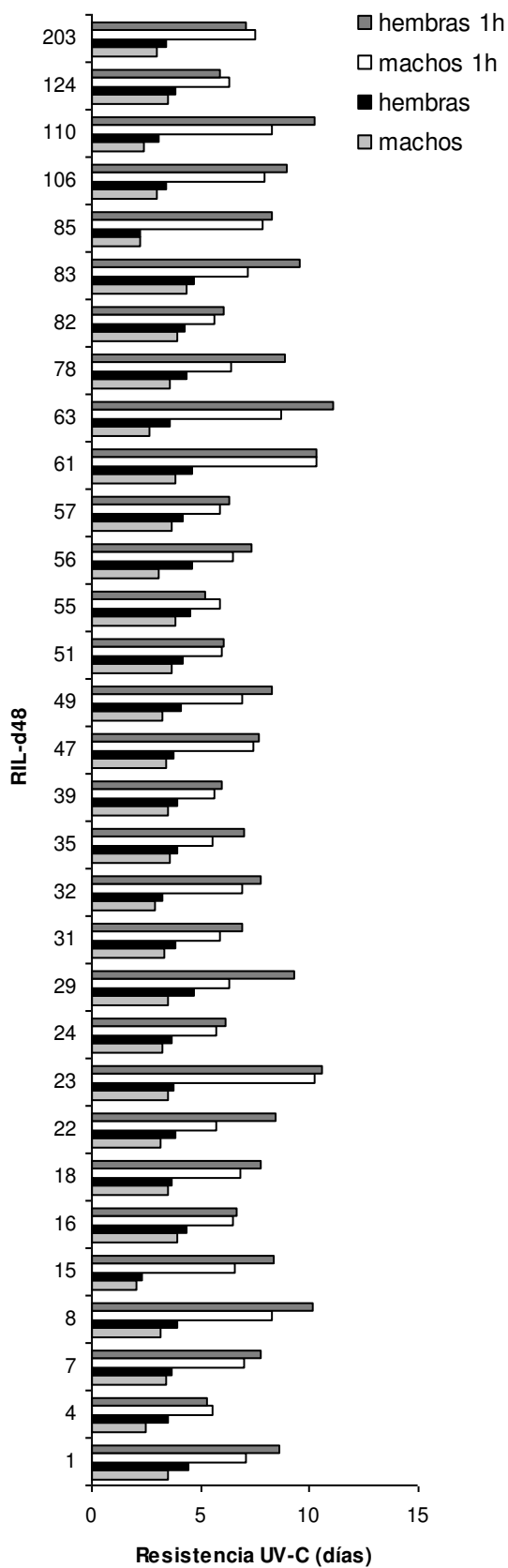


Fig. 4.1 Resistencia a la radiación ultravioleta registrada como la longevidad media (en días) para cada RIL fenotipada. 1h: indica los individuos expuestos al tratamiento más leve de una hora de radiación UV-C cada dos días.

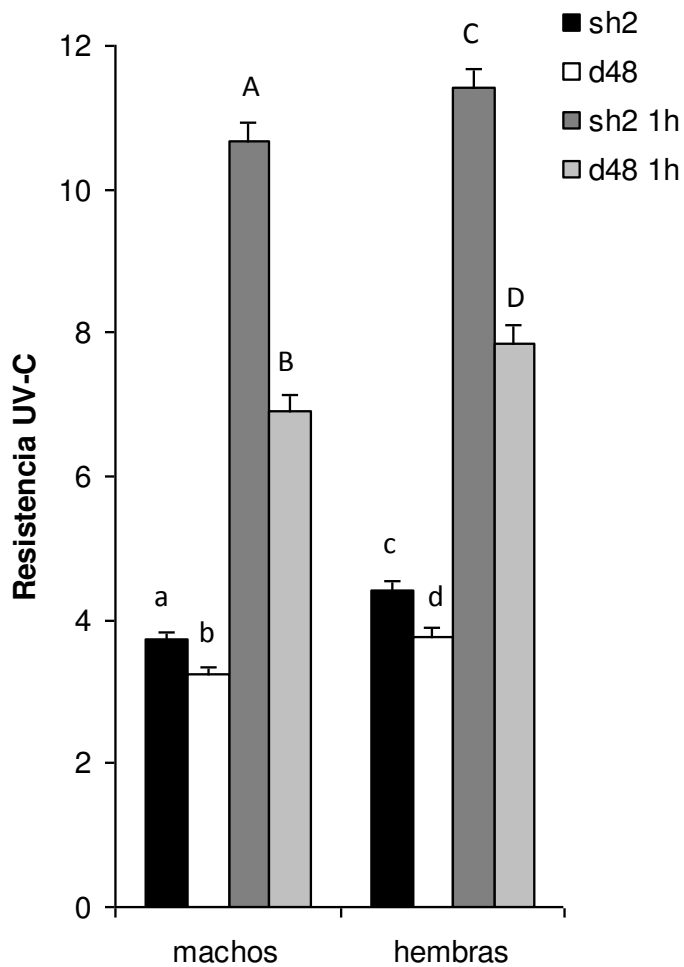


Fig. 4.2 Promedios de la longevidad media (días) calculados sobre la totalidad de RIL-D48 y RIL-SH2, para cada sexo. Las barras de error corresponden al error estándar del promedio de los valores de longevidad media en cada RIL. 1h: indica los individuos expuestos al tratamiento más leve de una hora de radiación UV cada dos días. Letras minúsculas: tratamiento continuo, letras mayúsculas: tratamiento cíclico. Para cada tratamiento, se detectaron diferencias significativas entre tipo de línea y sexo.

El mapeo de intervalo compuesto reveló en individuos expuestos a la radiación UV-C en forma continua un QTL en la zona central del cromosoma 2 en machos RIL-D48 y ninguno en hembras (Fig. 4.3). En individuos expuestos a la radiación UV-C durante una hora cada dos días, el mapeo reveló dos QTL, uno en el cromosoma X y otro en el cromosoma 2 (Fig. 4.4). El mapeo se realizó utilizando todas las líneas fenotipadas (indicadas en la Fig. 4.1).

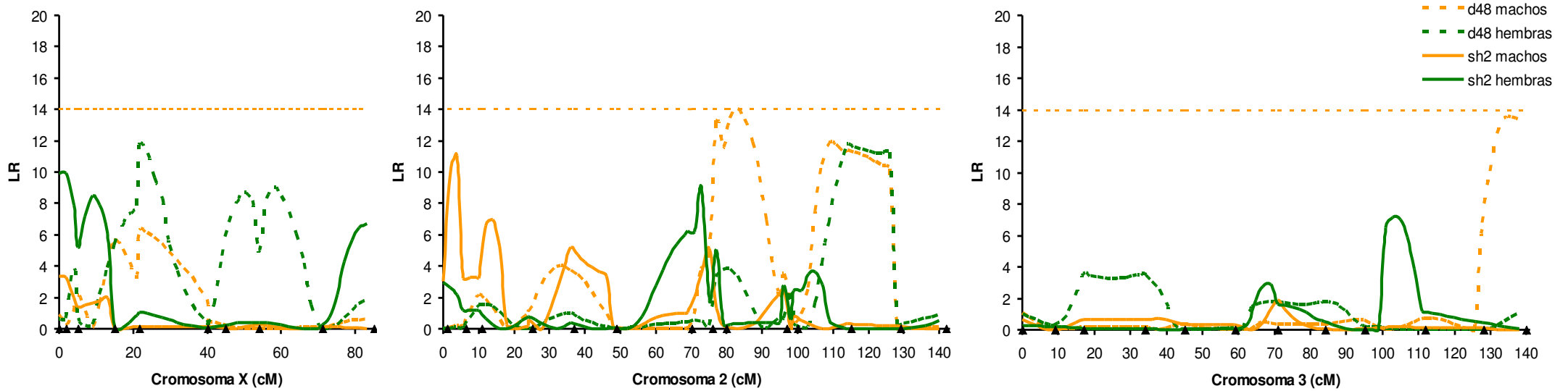


Fig. 4.3 *Likelihood ratio* en función de la posición genética (cM) para el mapeo de intervalo compuesto de resistencia a la radiación UV en las poblaciones RIL-D48 y RIL-SH2 expuestas a radiación continua. El umbral de significación se determinó por 1000 permutaciones al azar. Sólo se detectó un QTL significativo en machos RIL-D48. Los triángulos sobre el eje de abscisas representan la ubicación de los marcadores moleculares.

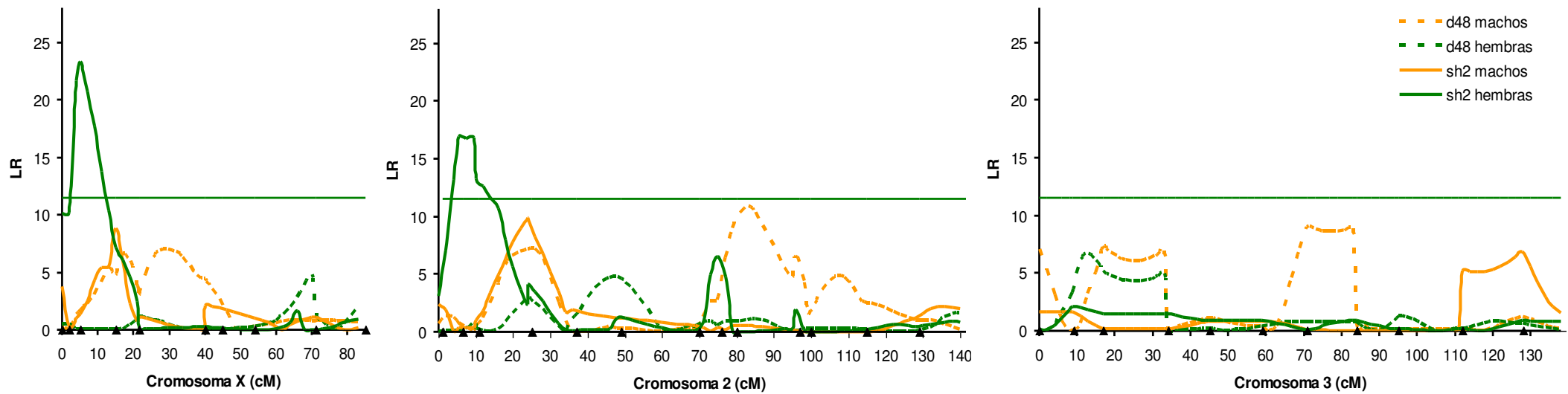


Fig. 4.4 *Likelihood ratio* en función de la posición genética (cM) para el mapeo de intervalo compuesto de resistencia a la radiación UV en las poblaciones RIL-D48 y RIL-SH2 expuestas al tratamiento de irradiación cíclica. El umbral de significación se determinó por 1000 permutaciones al azar. Sólo se detectaron QTL significativos en hembras RIL-SH2. Los triángulos sobre el eje de abscisas representan la ubicación de los marcadores moleculares.

Tabla 4.1 QTL para caracteres de resistencia a la radiación UV-C identificados por mapeo de intervalo compuesto en RIL-D48 y RIL-SH2. El rango citológico se muestra para cada QTL. % Var es el porcentaje de la varianza fenotípica total explicable por el QTL.

Irradiación	RIL	QTL (rango)	<i>a</i>	% Var	QTL
Continua	RIL-D48 machos	42A – 49C	0.09	8	Q1
Cíclica	RIL-SH2 hembras	3A – 4F2	-0.13	23	Q2
Cíclica	RIL-SH2 hembras	21C3 – 26A	0.12	21	Q3

Los rangos de QTL están basados en los marcadores más cercanos. Los efectos de aditividad (*a*) para los caracteres se muestran en $\sqrt{\text{días}}$, y son el efecto aditivo de sustituir un alelo SH2 por un alelo D48 (ya que los genotipos marcadores son el número de alelos SH2, 0 ó 2, tanto para RIL-D48 como para RIL-SH2).

QTL Genes candidatos incluidos dentro del QTL

- Q1 Egm (48E3)⁺, Mlh1 (44B8)†, *phr* (43E18)†, *mus205* (43E17)†, Rad51C (45B1) †, so (43B3-C1)*, CG42382 (45B1)†, whd (47A9-A11)⁺, EcR (42A9-A12), Prx2540 (47A7)⁺
- Q2 *period* (3B1-B2)^{**}, *sgg* (3A8-B1)*, *norpA* (4B6-C1)*, *mei-9* (4B6)†, *period* (3B1-B2)^{**}, *sgg* (3A8-B1)*, *norpA* (4B6-C1)*, *mei-9* (4B6)†,
- Q3 *Rad1* (23A1)†, Rrp (23C3-C4)†, *timeless* (23F6)*, *jetlag* (25B4)*, CG31953 (23D4)†, NLaz (22A1)⁺, Thor (23F6)⁺, Prx6005 (23C1)⁺

*Genes implicados en el proceso biológico: ritmo circadiano. †Genes implicados en el proceso biológico: reparación de ADN. ⁺Genes implicados en el proceso biológico: respuesta al estrés oxidativo.

3.4 Tamaño corporal: largo y ancho del ala

En la Tabla 5.1 se muestran los valores medios de los caracteres medidos del ala para cada temperatura de desarrollo. La temperatura tuvo un gran efecto en todos los caracteres del ala, disminuyendo el tamaño del ala al aumentar la temperatura de desarrollo (ver Tablas 5.1 y 5.2).

Tabla 5.1 Valores medios (en mm \pm ES) para longitud del ala (LA) y ancho del ala (AA) en dos paneles RIL (RIL-D48, RIL-SH2). Se muestran los valores medios de cada carácter en moscas desarrolladas a 25°C y 30°C.

Carácter, sexo	Desarrollo a 25°C		Desarrollo a 30°C	
	RIL-D48	RIL-SH2	RIL-D48	RIL-SH2
LA, hembras	1.855 \pm 0.039	1.860 \pm 0.047	1.710 \pm 0.047	1.709 \pm 0.041
LA, machos	1.610 \pm 0.032	1.613 \pm 0.036	1.491 \pm 0.029	1.489 \pm 0.036
AA, hembras	1.047 \pm 0.030	1.057 \pm 0.028	0.960 \pm 0.027	0.965 \pm 0.021
AA, machos	0.934 \pm 0.021	0.937 \pm 0.023	0.826 \pm 0.021	0.864 \pm 0.021

Tabla 5.2 ANOVAs con efectos fijos de tipo de RIL (RIL-D48 vs SH2), sexo y temperatura de desarrollo (25 °C vs 30 °C); *** p < 0.001.

Rasgo	Fuente de variación	g.l.	C.M.	F
LA	(1) Línea	1	0.000068	0.045
	(2) Sexo	1	2.279258	1513.530***
	(3) Temperatura	1	0.760573	505.054***
	(1) x (2)	1	0.000037	0.025
	(1) x (3)	1	0.000332	0.220
	(2) x (3)	1	0.007388	4.906
	(1) x (2) x (3)	1	0.000001	0.001
	Error	175	0.001506	
AA	(1) Línea	1	0.000959	1.5699
	(2) Sexo	1	0.491588	804.9381***
	(3) Temperatura	1	0.272677	446.4869***
	(1) x (2)	1	0.000318	0.5211
	(1) x (3)	1	0.000130	0.2121
	(2) x (3)	1	0.003233	5.2934*
	(1) x (2) x (3)	1	0.000043	0.0710
	Error	175	0.000611	

Estimé las diferencias para largo y ancho del ala entre los grupos de líneas mediante el índice DZ. DZ representa la diferencia en el valor medio del carácter entre ambos paneles de RIL (Fig. 5.1). La significancia de los valores DZ se puso a prueba, de forma separada para cada temperatura de desarrollo, por medio de ANOVA de dos factores con sexo y RIL como factores fijos. De manera adicional, también estimé un DZ_{TEMP} (Fig. 5.2, ver Materiales y Métodos) entre temperaturas de desarrollo para cada panel de RIL.

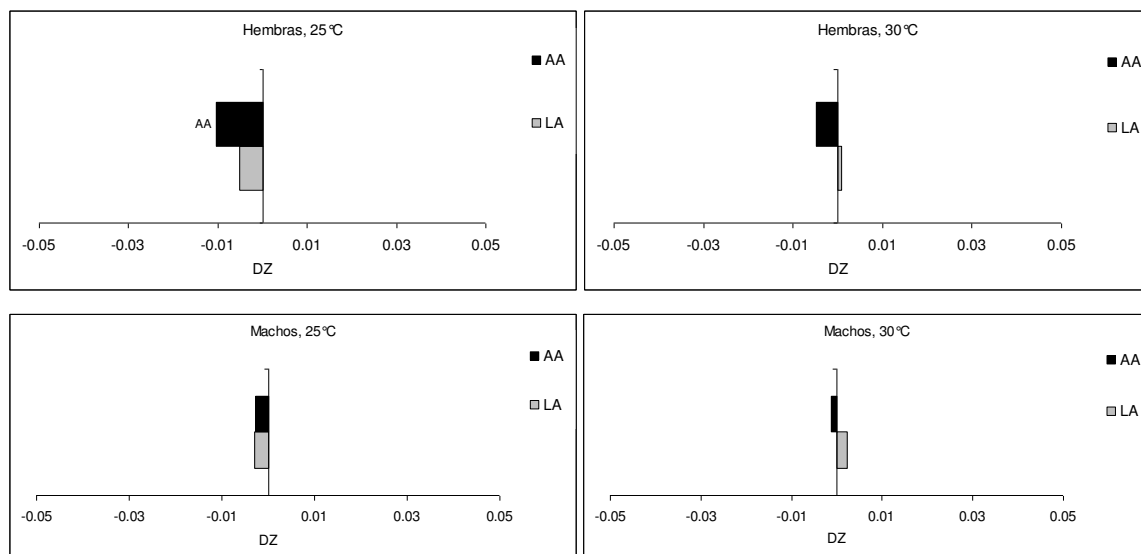


Fig 5.1 Valores de DZ entre RIL-D48 y RIL-SH.

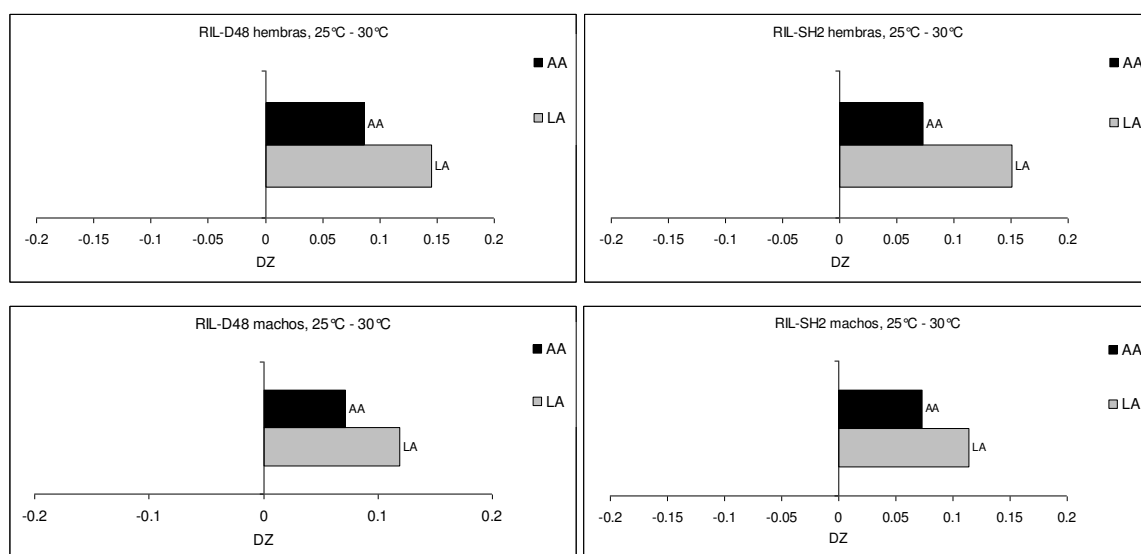


Fig 5.2 Valores de DZ_{TEMP} entre temperaturas de desarrollo.

Los índices DZ_{TEMP} fueron significativos para AA y LA en ambos paneles de RIL y en ambos sexos ($p < 0.05$, Fig. 5.2). Por otro lado, al comparar los paneles D48 y SH2 no se detectaron diferencias importantes en el valor

medio de estos caracteres en ninguna de las dos temperaturas de desarrollo implementadas. Los índices DZ fueron no significativos en estos casos (Fig. 5.1).

Se detectaron diversos QTL para el tamaño del ala en los tres cromosomas mayores de la especie (Figura 5.3, Tablas 5.3 y 5.4), que fueron específicos de la temperatura del desarrollo y del sexo. Los alelos de la línea parental SH2 tuvieron efectos aditivos de signo opuesto entre algunos QTL (ver valores a , Tabla 5.3), lo que sugiere que las líneas parentales utilizadas en la construcción de las RIL pudieron haber sido relativamente similares en el tamaño del ala (Tabla 5.2) a pesar de portar alelos diferentes para los QTL detectados en el presente estudio.

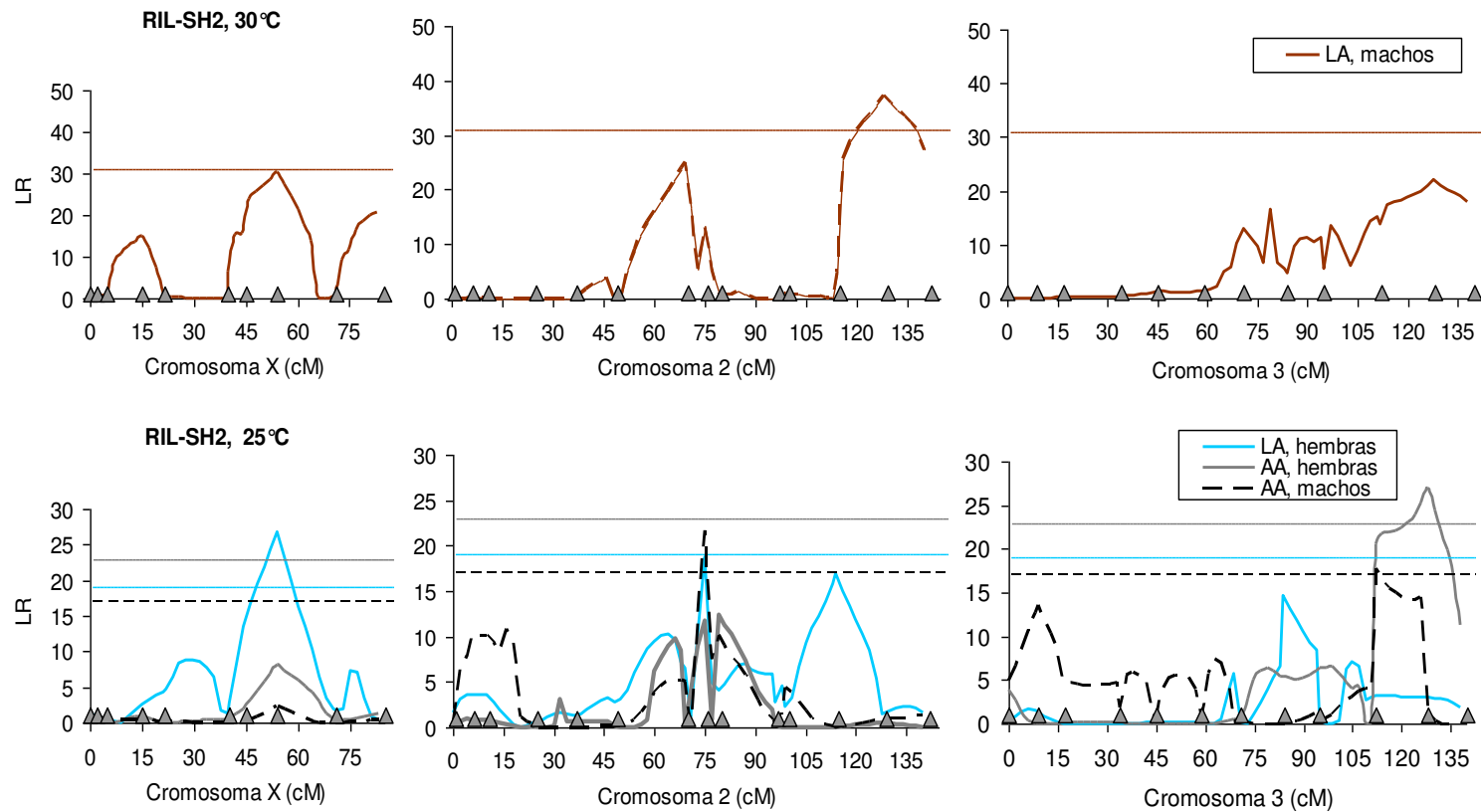


Fig 5.3 Valores de *likelihood ratio* para la longitud (LA) y ancho (AA) del ala. Se muestran sólo los casos en los que se detectaron QTL significativos. Las líneas horizontales indican los umbrales de significación obtenidos por 1000 permutaciones al azar. Los triángulos en cada eje horizontal indican las posiciones de los marcadores moleculares según el mapa disponible en Norry et al. (2008).

Tabla 5.3 QTL para caracteres de tamaño de ala identificados por mapeo de intervalo compuesto en RIL-D48 y RIL-SH2, en moscas desarrolladas a dos temperaturas, 25°C y 30°C. El rango citológico se muestra para cada QTL. Se asigna un único nombre a QTL que comparten el mismo rango. % Var es el porcentaje de la varianza fenotípica total explicable por el QTL. Las abreviaciones para los caracteres son las mismas que en la Tabla 5.1.

Rasgo	Sexo, Temp.	RIL	QTL (rango)	<i>a</i>	% Var	QTL
LA	Hembras, 25°C	RIL-SH2	10C3 – 16F3	-0.03	12	Q1
LA	Machos, 30°C	RIL-SH2	10C3 – 16F3	-0.02	8	Q1
LA	Machos, 30°C	RIL-SH2	54B1 – 56E6	-0.02	9	Q2
AA	Hembras, 25°C	RIL-SH2	97F – 99D6	0.02	50	Q3
AA	Machos, 25°C	RIL-SH2	34C4 – 42A	-0.01	33	Q4
AA	Machos, 25°C	RIL-SH2	95C6 – 97F	0.01	14	Q5

Los rangos de QTL están basados en los marcadores más cercanos. Los efectos de aditividad (*a*) para los caracteres se muestran en mm, y son el efecto aditivo de sustituir un alelo SH2 por un alelo D48 (ya que los genotipos marcadores son el número de alelos SH2, 0 ó 2, tanto para RIL-D48 como para RIL-SH2).

Tabla 5.4 Genes candidatos dentro de cada QTL. Los genes candidatos subrayados son loci para los que el tamaño corporal fue asociado a la abundancia de transcripto en estudios previos (Coffman et al. 2005). Genes cercanamente ligados (aunque por fuera del rango de QTL) con funciones conocidas se indican entre paréntesis como “ligados.”

QTL Genes candidatos incluidos dentro de los QTL

- Q1 Kap3, hop, dlg1, Smr, nod, bif, dy, hep, I(1)G0007, Lsd-2, drd, eag, CycD, baz, Vps4, β -Spec, CG1730
- Q2 ldgf5, Jheh1, Jheh2
- Q3 I(3)mbt, fkh, wdn, Dr, kay
- Q4 Fs(2)Ket, ap, Lim3, Nipped-B
- Q5 AGO1, shot, ttv, khc, Cdk4, ttv, Cdk4
-

3.5 Asimetría fluctuante

Se estimaron las diferencias entre lado derecho y lado izquierdo para largo (LA), ancho (AA) y superficie (SA) del ala mediante el índice de asimetría fluctuante, $AF = |D - I|$, donde para cada línea analizada D corresponde al valor medio del carácter para el ala derecha e I corresponde al valor medio del carácter para el ala izquierda. El índice AF representa el valor absoluto de la desviación en el valor medio del carácter respecto de la simetría bilateral perfecta.

La temperatura durante el desarrollo no tuvo un efecto significativo sobre la asimetría fluctuante, aunque en todos los caracteres del ala pueden notarse tendencias opuestas en cada sexo. Para todos los caracteres estudiados, AF es mayor al aumentar la temperatura de desarrollo en machos, pero disminuye al aumentar la temperatura de desarrollo en hembras (ver Tabla 6.1).

Tabla 6.1 Valores medios en mm (\pm ES) para AF de longitud del ala (LA), ancho del ala (AA) y superficie del ala (SA) en los paneles RIL agrupados. Se muestran los valores medios de cada carácter en moscas desarrolladas a 25 °C y 30 °C.

Carácter, sexo	Desarrollo a 25 °C	Desarrollo a 30 °C
LA, hembras	0.02458 \pm 0.00376	0.01549 \pm 0.00194
LA, machos	0.01840 \pm 0.00222	0.02612 \pm 0.00574
AA, hembras	0.01404 \pm 0.00191	0.00895 \pm 0.00111
AA, machos	0.00851 \pm 0.00126	0.01234 \pm 0.00318
SA, hembras	0.01955 \pm 0.00299	0.00957 \pm 0.00098
SA, machos	0.01134 \pm 0.00137	0.01243 \pm 0.00466

Se realizaron diferentes ANOVAs con sexo (1) y temperatura de desarrollo (2) como factores fijos (Tabla 6.2). Al estudiar los efectos simples en los casos donde hubo interacciones significativas, no se encontraron diferencias para AF en ninguno de los caracteres morfológicos analizados.

Tabla 6.2 ANOVAs con efectos fijos de sexo y temperatura de desarrollo (25 °C vs 30 °C); * p < 0.05.

Rasgo	Fuente de variación	g.l.	C.M.	F
LA	(1) Sexo	1	0.0002250	0.3585
	(2) Temperatura	1	2.125E-05	0.03385
	(1) x (2)	1	0.0031938	0.02530*
	Error	178	0.0006277	
AA	(1) Sexo	1	5.215E-05	0.2818
	(2) Temperatura	1	1.766E-05	0.09545
	(1) x (2)	1	0.0008978	4.851*
	Error	178	0.0001850	
SA	(1) Sexo	1	0.0003225	0.8539
	(2) Temperatura	1	0.0008934	2.365
	(1) x (2)	1	0.001385	3.666
	Error	178	0.0003777	

Se puso a prueba mediante un test de normalidad la posible existencia de simetría direccional o anti-simetría en las poblaciones analizadas. Mediante la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov se determinó que $AF' = D - I$, calculado para cada línea y cada carácter, tiene una distribución normal en la mayoría de los casos estudiados (Tabla 6.3).

Tabla 6.3 Significancia de la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov para el índice $AF' = D - I$, en ambas temperaturas de desarrollo y para cada carácter de morfología del ala.

Carácter, sexo	Desarrollo a 25°C	Desarrollo a 30°C
LA, hembras	n.s.	n.s.
LA, machos	n.s.	n.s.
AA, hembras	n.s.	n.s.
AA, machos	n.s.	p < 0.05
SA, hembras	n.s.	n.s.
SA, machos	n.s.	p < 0.01

Para el análisis de QTL de asimetría fluctuante trabajé con los paneles RIL-D48 y RIL-SH2 en forma agrupada para lograr mayor potencia estadística. El mapeo fue realizado para ambas temperaturas de incubación (25°C y 30°C). Opté por realizar el mapeo agrupando los dos paneles de RIL para lograr mayor poder estadístico, particularmente para este carácter que requiere grandes tamaños de muestra para poder reducir considerablemente la varianza ambiental.

Se detectaron diversos QTL para asimetría fluctuante del ala, que fueron específicos de la temperatura del desarrollo y del sexo (Figs. 6.1, 6.2 y 6.3). Todos los QTL fueron detectados en individuos que se desarrollaron a 30°C.

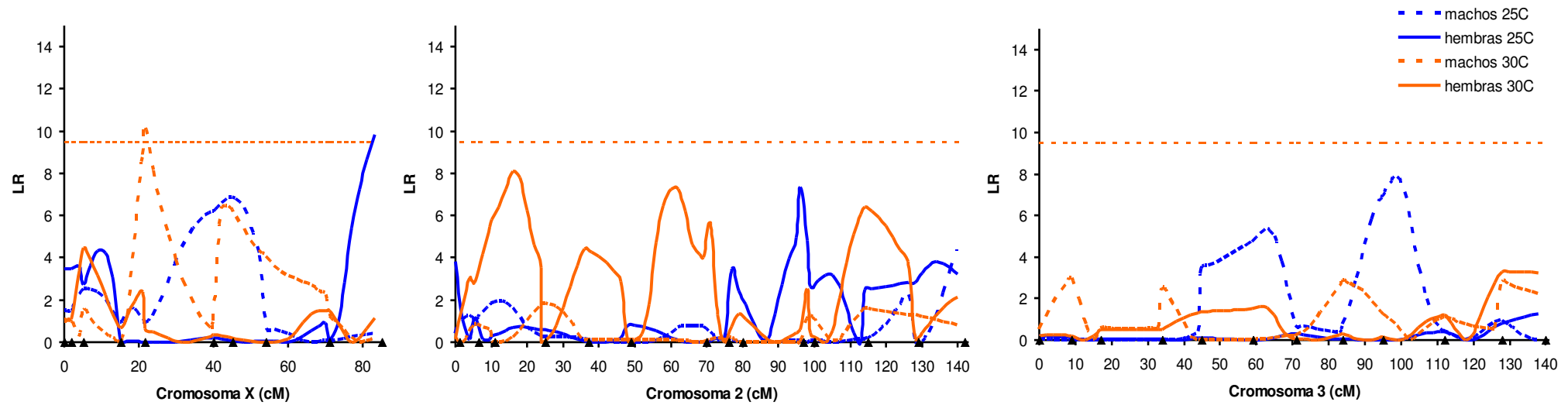


Fig. 6.1 *Likelihood ratio* en función de la posición genética (cM) para el mapeo de intervalo compuesto de asimetría fluctuante para largo del ala. Se detectó un QTL significativo en el cromosoma X de machos desarrollados a 30°C. Los triángulos sobre el eje de abscisas representan la ubicación de los marcadores moleculares.

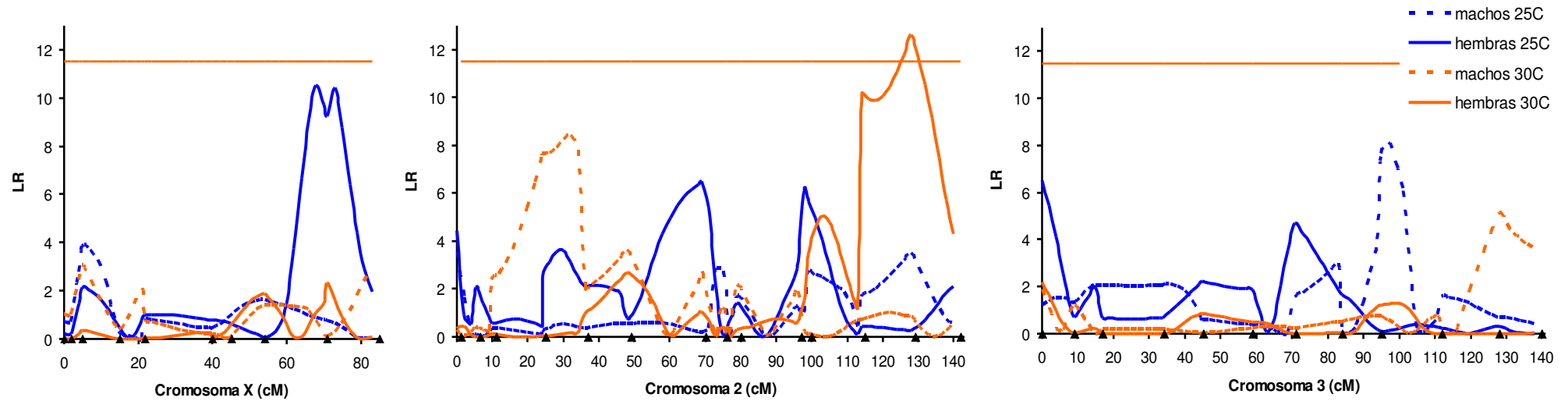


Fig. 6.2 *Likelihood ratio* en función de la posición genética (cM) para el mapeo de intervalo compuesto de asimetría fluctuante para ancho del ala. Se detectó un QTL significativo en el cromosoma 2 de hembras desarrolladas a 30°C. Los triángulos sobre el eje de abscisas representan la ubicación de los marcadores moleculares.

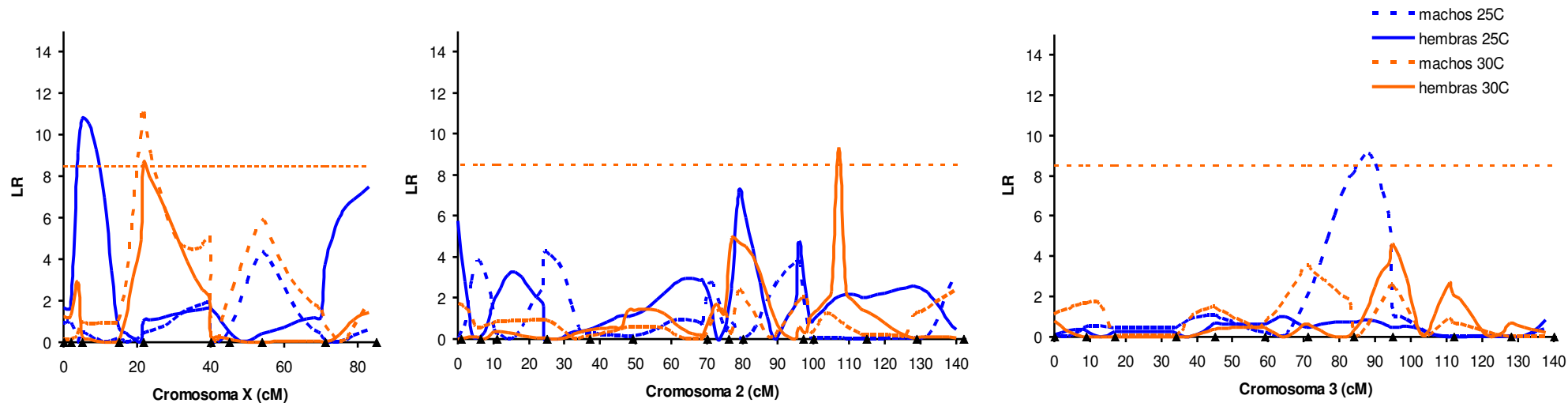


Fig. 6.3 *Likelihood ratio* en función de la posición genética (cM) para el mapeo de intervalo compuesto de asimetría fluctuante para superficie del ala. Se detectó un QTL significativo en el cromosoma X de machos desarrollados a 30°C. Los triángulos sobre el eje de abscisas representan la ubicación de los marcadores moleculares.

Los potenciales genes candidatos para asimetría fluctuante de caracteres morfológicos del ala son los pertenecientes a las familias de factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, hormonas y sus receptores y genes de vías del desarrollo. Este es el primer estudio en el que se realiza un mapeo de QTL para asimetría fluctuante y su base genética es poco conocida.

En este mapeo no se detectó ningún QTL en la región donde mapea *Hsp90*, lo que sugiere que en estas líneas experimentales no segregan alelos funcionalmente variables para este importante gen implicado en el proceso de canalización durante el desarrollo.

Tabla 5.3 QTL para caracteres de asimetría fluctuante del ala identificados por mapeo de intervalo compuesto en RIL-D48 y RIL-SH2 agrupadas. El rango citológico se muestra para cada QTL. % Var es el porcentaje de la varianza fenotípica total explicable por el QTL.

Rasgo	Sexo, Temp.	QTL (rango)	<i>a</i>	% Var	QTL
LA	Machos, 30°C	4F1-7B3	-0.02	4	Q1
AA	Hembras, 30°C	56D11-59A	-0.003	20	Q2
SA	Machos, 30°C	4F1-7B3	-0.02	3	Q1

Los rangos de QTL están basados en los marcadores más cercanos. Los efectos de aditividad (*a*) para los caracteres se muestran en mm para LA y AA, y en mm² para SA, y son el efecto aditivo de sustituir un alelo SH2 por un alelo D48 (ya que los genotipos marcadores son el número de alelos SH2, 0 ó 2, tanto para RIL-D48 como para RIL-SH2).

El QTL para superficie del ala co-localiza con el QTL detectado para largo del ala en machos y tiene efecto aditivo similar, por lo que se les asignó el mismo nombre (Tabla 5.3).

3.6 Termotolerancia

El tratamiento de aclimatación produjo un incremento de RCAT en ambos paneles de RIL, RIL-D48 y RIL-SH2. (Fig. 7.1, Tabla 7.1: ANOVA de tres factores para RCAT con (1) “RIL-D48 vs RIL-SH2”, (2) sexo, y (3) tratamiento de aclimatación: (1) $F_{1, 256} = 24.40^{***}$, (2) $F_{1, 256} = 11.73^{***}$, (3) $F_{1, 256} = 5.70^*$; (1) x (2) $F_{1, 256} = 0.51$, (1) x (3) $F_{1, 256} = 0.53$, (2) x (3) $F_{1, 256} = 0.013$, (1) x (2) x (3) $F_{1, 256} = 0.07$. $*P < 0.05$; $***P < 0.005$). Los machos fueron, en promedio, más resistentes que las hembras al coma inducido por alta temperatura (Tabla 2). Para RCAT, la interacción entre sexo y tratamiento de aclimatación fue no significativa (factor “(2) x (3)” en el ANOVA).

Tabla 7.1 Valores medios en seg. (\pm ES) para resistencia al coma por alta temperatura en los parentales SH2, D48 y RIL. RCAT en moscas NA corresponde a tiempos de *knock-down* en individuos que no recibieron tratamiento de aclimatación al realizarse las mediciones de RCAT. RCAT en moscas A corresponde a tiempos de *knock-down* luego de someter a los individuos a un tratamiento de aclimatación. Los estadísticos para las RIL fueron calculados sobre los valores medios de cada RIL.

Línea	RCAT en moscas NA		RCAT en moscas A	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
D48	105.01 (24.33)	159.91 (17.24)	342.92 (39.44)	214.45 (28.71)
SH2	1600.21 (88.09)	1299.32 (81.04)	1700.14 (89.09)	1990.09 (84.19)
RIL-D48	447.52 (48.71)	319.17 (34.85)	559.90 (60.19)	389.29 (44.76)
RIL-SH2	898.76 (136.09)	601.63 (103.13)	1008.70 (171.09)	772.43 (138.87)

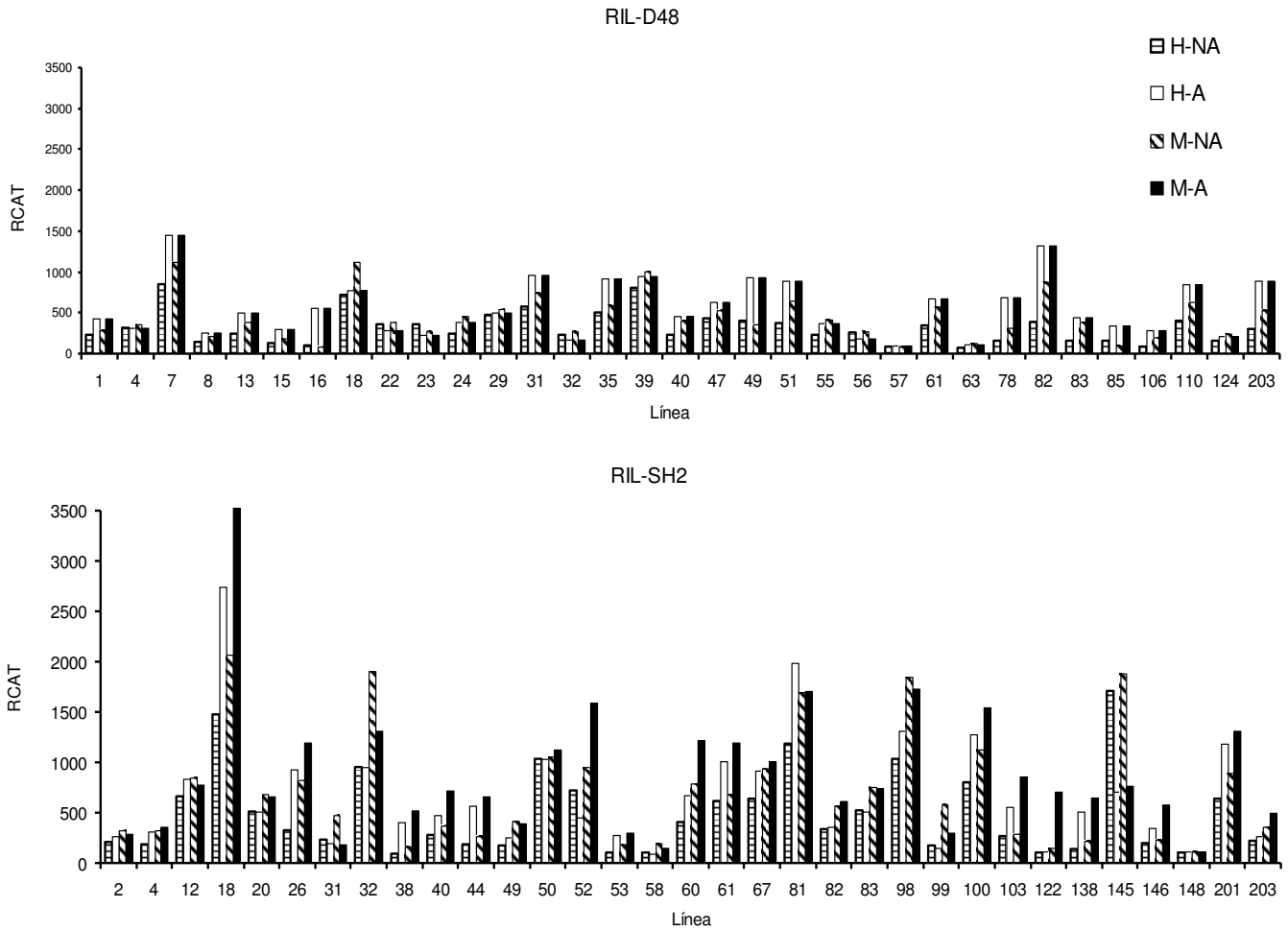


Fig. 7.1 RCAT (en seg) se representa para cada RIL, tanto en individuos aclimatados (A) como no aclimatados (NA), previo al test de *knock-down* por alta temperatura. Los números sobre el eje de abscisas corresponden a etiquetas arbitrarias asignadas a cada RIL.

El mapeo de intervalo compuesto reveló un QTL de efecto aditivo positivo en la región pericentromérica del cromosoma 2 de *D. melanogaster* (dentro del intervalo citológico 34C-42F Fig. 7.2; Tabla 7.2). El efecto aditivo positivo indica que el alelo SH2 produce un incremento en la resistencia al coma por alta temperatura.

Exploramos el efecto de agrupar ambos paneles de RIL (RIL-*pool*) al realizar el mapeo de intervalo compuesto. En promedio, se espera que las moscas RIL-D48 tengan 75% de genes D48, mientras que se espera que las moscas RIL-SH2 tengan 75% de genes SH2. Debido a que la potencia estadística para detectar QTL puede presentar diferencias entre RIL-D48 y RIL-SH2, y como agrupar ambos paneles de RIL resultó en una distribución bimodal del carácter, el análisis de los datos agrupados puede no funcionar del todo bien para detectar QTL de efectos moderados o leves (Lynch & Walsh 1998). Aún así, la región de QTL definida por el intervalo citológico 34C-42F fue significativa para RCAT tanto en moscas aclimatadas y como en moscas no aclimatadas (Fig. 7.2).

El QTL en el panel agrupado explicó el 20, 21, 30 y 35% de la varianza fenotípica total en hembras y machos aclimatados y no aclimatados, respectivamente.

Se buscaron interacciones epistáticas entre todos los pares de marcadores. Antes de corregir para comparaciones múltiples, solamente resultó significativo el efecto epistático entre los marcadores DROTG121 y SU(Z)2 en hembras RIL-D48 aclimatadas ($p = 0.03$). Esta posible interacción involucra a la región de QTL (34C-42F) detectada por mapeo de intervalo compuesto, donde se localizan varios genes candidatos (Tabla 7.2). Luego de corregir para múltiples comparaciones, el número de asociaciones epistáticas significativas no excedió al esperado por azar y esta interacción hipotética no puede considerarse significativa. No se detectaron interacciones entre marcadores en el panel de RIL agrupado ($p > 0.3$, antes de corregir para múltiples comparaciones).

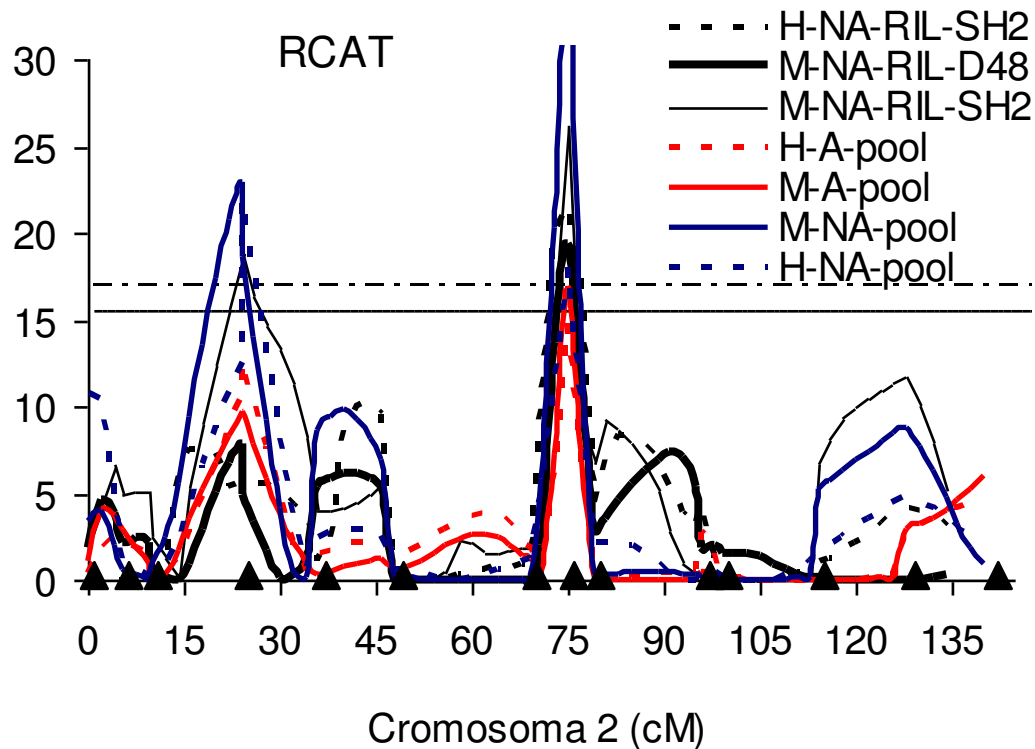


Fig. 7.2 Valores de *likelihood ratio* en función de la posición genética (en cM) obtenidos por mapeo de intervalo compuesto para resistencia al coma por alta temperatura (RCAT) en el cromosoma 2 de *D. melanogaster* para las poblaciones RIL-D48 y RIL-SH2. RCAT fue mapeada en machos (M) y hembras (H) aclimatados (A) y no aclimatados (NA). Para evitar el solapamiento de las líneas correspondientes a los umbrales de significación, sólo se muestran los casos significativos en las RIL no agrupadas. Los casos donde ambas poblaciones de RIL se encuentran agrupadas en un único *set* de datos fueron significativos. Los umbrales de significación (líneas horizontales) se determinaron por 1000 permutaciones al azar y fueron generalmente similares en ambos sexos. Línea punteada: RIL-SH2, línea sólida: RIL-D48 y RIL agrupadas. Los marcadores moleculares utilizados para el mapeo de intervalo compuesto se representan mediante triángulos a lo largo del eje x.

Tabla 7.2 QTL para RCAT identificado por mapeo de intervalo compuesto en RIL-D48 y RIL-SH2, en moscas no aclimatadas (NA) y en moscas aclimatadas (A). Los efectos aditivos (*a*) se muestran en segundos.

Carácter	Sexo	RIL	Rango del QTL	<i>a</i>	% Var
RCAT	Hembras (NA)	RIL SH2	34C – 42F	438	33
RCAT	Machos (NA)	RIL SH2	34C – 42F	442	27
RCAT	Machos (NA)	RIL D48	34C – 42F	189	29

Genes candidatos dentro del rango del QTL:

Adh(35B3), CG6012(36B2)†, CG10383(37A1)†, irk3(37A1)†, CG10383(37A1)†, *Catsup*(37B), *Ddc*(37C), CG13086(37D2)†, CG10026(37E1)†, CG10189(37E4)†, CG10680(38A8)†, CG9259(39A1)†, CG7882(42A1)†, *trap1*(42C), CG3270(42C5)†

La posición citológica de los genes candidatos se muestra entre paréntesis. El rango del QTL está basado en los marcadores moleculares más cercanos. Los genes subrayados fueron sobre-regulados por calor (⁺, †) en estudios de *microarrays* en *D. melanogaster* (⁺Leemans et al. 2000; †Sørensen et al. 2005b). Los genes doblemente subrayados fueron sub-regulados por shock de calor en estudios previos: †Sørensen et al. (2005b). % Var es el porcentaje de la varianza fenotípica total explicada por el QTL.

4. Discusión

4.1 Hormesis en la longevidad

Líneas de selección artificial fueron utilizadas en este estudio para poner a prueba correlaciones entre hormesis inducida por calor, longevidad media y dos caracteres de termotolerancia de gran importancia ecológica en *Drosophila buzzatii*.

Un resultado interesante es que la extensión de la longevidad como resultado de la exposición al calor muestra una fuerte dependencia con respecto al régimen de selección térmica. Más aún, la selección para baja resistencia, tanto al calor como al frío, reduce en gran medida la longevidad. Esto es evidenciado en que las líneas K⁻ y CCR⁻ fueron las que mostraron menor longevidad (Tablas 1 y 2).

Se asume que todas las correlaciones tienen base genética, ya que:

- i) Todos las moscas fueron crecidas en un ambiente común.
- ii) La respuesta directa a la selección fue significativa para ambos caracteres seleccionados por temperatura.

La selección para rápida recuperación al coma por frío no produjo un incremento de la longevidad en *D. buzzatii*. Este resultado es consistente con otros estudios en *D. melanogaster* (Anderson et al. 2005; ver también Norry y Loeschcke, 2002b).

La selección artificial para baja tolerancia al estrés tanto por frío como por calor reduce la longevidad, a la vez que aumenta el nivel de hormesis en la longevidad inducible por el tratamiento de calor. Encontramos un sustancial efecto de hormesis sobre la longevidad en las hembras de las líneas K⁻ y CCR⁻, mientras que no hubo efecto hormético significativo para la longevidad en las hembras de las líneas C, K⁺ y CCR⁺. Más aún, las diferencias significativas de longevidad media entre líneas en hembras no sometidas al tratamiento de calor desaparecen en hembras aclimatadas, precisamente debido a que las hembras K⁻ y CCR⁻ muestran altos niveles de hormesis (Tabla 1, Fig. 3). Esto no ocurre en las otras líneas.

El efecto de hormesis inducido por la aclimatación no fue significativo en machos, y el tratamiento de aclimatación generalmente no produjo incrementos de la longevidad media en los machos de las líneas de

selección. En forma adicional, se encontró una disminución notoria de la longevidad media en los machos de la línea CCR⁺ sometidos al tratamiento de aclimatación. Esta disminución de la longevidad media está acompañada por un incremento significativo de la tasa demográfica de senescencia (Tablas 1 y 2).

Estos resultados indican que el nivel de hormesis inducible por calor puede cambiar por efecto de la selección artificial sobre resistencia al coma por alta temperatura y recuperación al coma por frío. El impacto de la aclimatación sobre la longevidad depende del nivel de termo-tolerancia específico de cada población (Fig. 3). Las correlaciones entre hormesis inducida por calor y la longevidad, como así también entre hormesis inducida por calor y termo-resistencia son de signo negativo (Fig. 3). Los patrones de termo-tolerancia, longevidad y hormesis encontrados en este estudio a nivel intra-específico, pueden ser comparados con patrones de correlación observados en comparaciones inter-específicas (Sambucetti et al. 2005). Scannapieco et al. (2007) mostraron que el tratamiento de shock de calor extiende la longevidad media en *D. buzzatii* pero no en su especie hermana *D. koepferae*. Estos autores encontraron que *D. buzzatii* vive más pero es menos resistente al *knock-down* por alta temperatura que *D. koepferae*. El resultado de nuestro estudio, en combinación con las comparaciones interespecíficas de Scannapieco et al. (2007), indica que las correlaciones entre el nivel de hormesis inducido por calor y la longevidad pueden variar en signo entre especies. Pero las correlaciones entre hormesis inducida por calor y la resistencia al estrés térmico parecen ser negativas tanto dentro como entre especies. Al mismo tiempo, encontramos que dosis repetidas de un tratamiento de aclimatación por calor fuertemente indujo hormesis en la longevidad tanto en moscas seleccionadas para baja resistencia al *knock-down* por alta temperatura como en moscas seleccionadas para baja resistencia al coma por enfriamiento (líneas de lenta recuperación al coma por frío).

Estudios previos en *D. buzzatii* muestran que la longevidad a 25°C disminuye a medida que aumenta la altitud de origen de la población en el Noroeste Argentino. Esta clina es específica de sexo (Norry et al. 2006). Los

patrones de hormesis también son sexo-específicos en éste (tablas 1 y 2) y otros estudios (Sørensen et al. 2007; Le Bourg & Rattan 2008). La base genética detrás de la especificidad de sexo aún no ha sido identificada. Las poblaciones de elevadas altitudes son también menos resistentes al coma por *shock* de calor que las poblaciones de zonas de baja altitud pertenecientes al mismo gradiente altitudinal (Sørensen et al. 2005b).

Este estudio sugiere que tanto la longevidad como el nivel de hormesis que puede inducirse por calor pueden estar fuertemente influenciados por la selección térmica. Sin embargo, no está claro si la evolución del envejecimiento se encuentra influenciada por hormesis en animales salvajes, debido a que la mortalidad en la naturaleza se debe principalmente a causas extrínsecas como frío, calor, falta de alimento, predación y/o desecación. En consecuencia, la intensidad de la selección natural disminuye con la edad (Kirkwood & Austad, 2000).

Nuestros resultados con líneas de selección son consistentes con los patrones observados en los extremos de la clina altitudinal: la resistencia al coma inducido por calor está correlacionada positivamente con la longevidad a temperaturas moderadas (25°C). Estos resultados sugieren que la selección positiva para resistencia al coma inducido por calor, como se espera en poblaciones de zonas bajas de *D. buzzatii* según lo observado por Sørensen et al., no reduce la longevidad a temperaturas benignas pero sí disminuye el nivel de hormesis inducible por calor (Tablas 1 y 2). Hormesis es una respuesta adaptativa a factores de estrés que de otro modo son sólo dañinos (Parsons 2002, Calabrese 2008), y su magnitud puede cambiar evolutivamente en poblaciones dependiendo de las presiones selectivas del ambiente térmico en la naturaleza. En condiciones naturales, la aclimatación por calor puede tener efectos tanto positivos como negativos sobre el *fitness* (Loeschcke & Hoffmann 2007). Los efectos de aclimatación por calor, como la termotolerancia inducida por calor en moscas adultas, están influenciados por un número relativamente pequeño de QTL de efecto chico (Norry et al. 2007b, 2008). Sin embargo, aún no se han identificado QTL para la hormesis inducida por calor en *Drosophila*.

4.2 Resistencia a la inanición

En el presente estudio se utilizó un tratamiento cíclico no agudo de inanición en lugar de uno continuo y agudo (ver Wang et al. 2004). El fenotipo de resistencia a la inanición fue genéticamente variable, con un QTL aparentemente sexo-específico detectado en machos. En forma consistente con muchas observaciones previas en rasgos de resistencia al hambre en *Drosophila* (Matzkin et al. 2008, Scannapieco et al. 2009), las hembras mostraron mayor resistencia que los machos en condiciones de inanición (Fig. 2 A-C).

En condiciones de estrés por hambre, los genes involucrados en los procesos de crecimiento y mantenimiento, biosíntesis de proteínas y actividad hidrolítica tienden a estar sobre-regulados. Esto sugiere que dichas funciones son importantes para la supervivencia bajo estrés nutricional (Harbison et al. 2005). Muchos de estos genes sobre-regulados están incluidos en la región delimitada por el QTL de resistencia a la inanición encontrado en este estudio. Mas aún, algunos de estos genes responden a selección artificial para resistencia a la inanición (Sørensen et al. 2007b), y dos de los genes candidatos asociados al QTL detectado difieren significativamente en sus niveles de expresión entre líneas control y seleccionadas por hambre de *D. melanogaster* (Tabla 3.1). Específicamente, en un grupo de líneas seleccionadas artificialmente para resistencia a la inanición, Sørensen et al. (2007b) realizaron un análisis de expresión génica de genoma completo con el objetivo de identificar genes cuyo nivel de expresión cambiara por selección artificial sobre resistencia al hambre en *D. melanogaster*. En ese estudio, una de las líneas parentales (SH2) utilizadas en la construcción de nuestras RIL fue cruzada con diferentes líneas/poblaciones para establecer una población base sobre la que se aplicó selección artificial para resistencia al hambre. Sin embargo, de los 310 genes que mostraron cambios en los niveles de transcripción por selección sobre resistencia al hambre en Sørensen et al. 2007b, sólo dos (CG32423 y CG32352) están dentro de nuestra región QTL. Los caracteres cuantitativos están determinados por

redes de genes pleiotrópicos (Ayroles et al. 2009, Mackay 2001). Patrones de expresión de genes candidatos combinados, en lugar de los niveles de transcripción de genes candidatos individuales, son mejores predictores de los efectos fenotípicos de regiones de QTL para termotolerancia en nuestras RIL. Dado el gran número de genes candidatos dentro del intervalo de QTL (Tabla 3.1), los efectos de redes de genes son posibles (Norry et al. 2009).

Variaciones regionales en clinas altitudinales y latitudinales para resistencia al hambre sugieren una relación compleja entre la adaptación climática y la resistencia a la inanición, ya que la relación entre resistencia a la inanición y temperatura ambiental puede variar en signo a través de los continentes (Hoffmann & Harshman 1999, Karan et al. 1998, Robinson et al. 2000, Sørensen et al. 2005, Schmidt et al. 2005, Yadav & Singh 2007). La variación presente para la resistencia a la inanición en diferentes zonas climáticas puede ser el resultado de una respuesta correlacionada a la selección para diversos componentes de la tolerancia al frío (Rion & Kawecki 2007, Hallas et al. 2002). Estos resultados indican que la resistencia al hambre es mayor en las moscas SH que en las moscas D48, cuya población de origen es de una región más fría (Fig. 2). El alelo de QTL que incrementa la resistencia a la inanición es el “alelo SH” proveniente de la población de origen australiana, mientras que el alelo que disminuye la resistencia a la inanición es el “alelo D48” proveniente de la población danesa (ver efectos aditivos en la Tabla 1).

La resistencia al hambre puede estar relacionada con múltiples caracteres en forma pleiotrópica, incluyendo diferentes componentes de la tolerancia al frío, supervivencia en bajas temperaturas y desecación (Hoffmann et al. 2005, Ayroles et al. 2009, Hallas et al. 2002, Parkash et al. 2008, Parkash et al. 2009). La resistencia al hambre puede también estar parcialmente correlacionada con algunos sub-componentes de la adaptación al frío (Rion & Kawecki 2007, Robinson et al. 2000, Sørensen et al. 2005, Hoffmann et al. 2005). Se sugiere que la tolerancia al frío está conformada por diferentes componentes que en forma parcial parecen ser fisiológicamente independientes (Rako & Hoffmann 2006, Telonis-Scott et al. 2009). El QTL significativo detectado en este estudio no co-localiza con QTL detectados previamente para recuperación al coma inducido por frío (Norry et

al. 2008), y sólo co-localiza con un QTL de efecto mayor para longevidad a bajas temperaturas identificado previamente (Vieira et al. 2000). En forma adicional, la región de QTL identificada en este estudio no incluye muchos de los genes candidatos para recuperación al coma por frío. Telonis-Scott et al. (2009) utilizaron un escaneo de genoma completo para comparar los patrones de expresión entre líneas seleccionadas para recuperación al coma por frío y líneas control. Solamente dos de los 50 genes sobre-regulados y dos de los 45 loci sub-regulados en las líneas de selección por frío de Telonis-Scott et al. (2009) están incluidos dentro de la región de QTL para resistencia a la inanición identificada en este estudio (CG32364 y CG9641 entre los genes sobre-regulados; *cyp6d2* y CG18180 entre los genes sub-regulados).

En este estudio se identificó una región de QTL que puede ser relevante para la diferenciación de fenotipos de resistencia al hambre en *D. melanogaster* originarias de diferentes regiones geográficas (Stephan & Li 2006). Hallazgos previos sugieren que no hay una relación genética o funcional entre resistencia al hambre y resistencia al estrés por alta temperatura (Wang et al. 2004, Bublik & Loeschcke 2005). El presente resultado, al no haber encontrado similitudes en la localización del QTL detectado y la ubicación de QTL para termotolerancia identificados previamente en el mismo panel de RIL, sustenta la ausencia de una relación pleiotrópica entre la resistencia al estrés por calor y la resistencia al hambre. El alelo del QTL detectado que disminuye la resistencia al hambre es específico de sexo, ya que se detectó en machos solamente, y corresponde a la población proveniente de la zona geográfica más fría. La resistencia al hambre es un carácter complejo con variación específica de sexo.

4.3 QTL para termotolerancia, resistencia a la radiación UV

y tamaño del ala

En general existe una relación positiva entre el nivel de radiación UV-B y la temperatura en ambientes terrestres contemporáneos, siendo ambos factores mayores en verano que en invierno, con una mayor asociación entre ellos en el hemisferio sur. En este contexto, es interesante notar que los QTL detectados para termotolerancia y resistencia a la radiación UV-C parcialmente co-localizaron en la región central y pericentromérica del cromosoma 2 de *D. melanogaster* en el presente estudio. En esta región de QTL mapean varios genes implicados en la termotolerancia, como así también el gen *phr*, implicado en la vía de respuesta al daño producido por la radiación ultravioleta sobre el ADN. Este gen codifica para una fotoliasa del tipo CPD, enzima que interviene en la degradación de los dímeros de pirimidina formados en el ADN y que impiden su correcta replicación. En esta región del cromosoma 2 también se detectó un QTL para el tamaño del ala, que fue específico de la temperatura experimentada durante el desarrollo embrionario. También se detectó un QTL para la resistencia a la radiación UV-C en el cromosoma X, en una región en la que mapean genes claves del ritmo circadiano tales como *period*. Este último QTL para la resistencia a la radiación UV-C fue detectado en los individuos expuestos durante una hora cada dos días, pero no en los individuos que experimentaron una exposición continua a la radiación, y también co-localiza con un QTL de termotolerancia recientemente descubierto por Rand et al. (2010).

Los genes con funciones importantes para el ritmo circadiano pueden estar implicados en la determinación de fenotipos de resistencia al estrés cuando los niveles de estrés varían de acuerdo a un patrón cíclico, como es el caso de la temperatura y la radiación UV. Varios genes que mapean dentro de regiones de QTL en hembras RIL-SH2 en este estudio están implicados en el ritmo circadiano y en la sincronización del reloj circadiano (alineamiento de la fase y período de un sistema fisiológico o de comportamiento endógeno a la fase y período de un ritmo o señal ambiental exógena).

Los productos de los genes *mei-9* y *mus205* están implicados en diferentes pasos del mecanismo NER, y mutantes para el gen *mus205* son deficientes en la reparación de ADN dañado en *D. melanogaster* (Todo & Ryo, 1992).

En general, el tratamiento de aclimatación por calor disminuyó el efecto del QTL para la termotolerancia detectado en el medio del cromosoma 2 en el estudio presente. Este QTL fue recientemente examinado con respecto a niveles de expresión de algunos genes candidatos (Norry et al. 2009). Los genes *Trap1*, *Ddc* y *Catsup* parecen estar involucrados en este importante QTL (Norry et al. 2009). La co-localización con el QTL de resistencia a UV-C detectada en este estudio es de gran interés por cuanto puede representar efectos pleiotrópicos de los mismos genes sobre caracteres de resistencia a la radiación UV-C y a la tolerancia a temperaturas extremas. La etapa siguiente de este trabajo será realizar un mapeo a escala fina para la resistencia a la radiación UV-C con el fin de detectar si los mismos genes están implicados en la variación de ambos caracteres (resistencia a la radiación UV y termotolerancia). El gen *Catsup* codifica para un regulador negativo de la tirosina hidroxilasa, enzima de la etapa limitante en la tasa de síntesis del neurotransmisor “dopamina”, y es un gen pleiotrópico de caracteres cuantitativos (Carbone et al., 2006). Los niveles de expresión génica de *Catsup*, *Ddc* y *Trap1* están combinados en el QTL detectado (Norry et al. 2009). Además, *Catsup* y *Ddc* están involucrados en la vía de catecolamina (Wright 1987), que está implicada en la respuesta a temperaturas extremas y otras formas de estrés ambiental (Baden et al. 1996; Sabban & Kvetnansky 2001). *Trap1* está estrechamente relacionado al nivel de termotolerancia (Norry et al. 2009), y es un gen con funciones relacionadas a las de proteínas de *heat-shock* y también fue implicado en termotolerancia en el estudio por Morgan & Mackay (2006).

Respecto del tamaño del ala (un índice del tamaño corporal), un resultado consistente fue que la temperatura durante el desarrollo embrionario tuvo un gran impacto sobre el tamaño de las alas en la mosca adulta. En ambas temperaturas experimentales (25°C y 30°C), las hembras fueron consistentemente más grandes que los machos, tanto en el largo como en el ancho de las alas.

Las líneas parentales utilizadas para la construcción de las RIL no portaban la inversión *3R-Payne*, que es una inversión cromosómica que afecta en gran medida el tamaño corporal (Caboli et al. 2003; Rako et al. 2006). A pesar de la ausencia de segregación de esta inversión, en el presente estudio se detectaron varios QTL para uno u otro carácter del ala en todos los cromosomas mayores de la especie, incluyendo el cromosoma X. La identificación de QTL en el cromosoma X en el estudio presente es consistente con estudios previos que estimaron contribuciones significativas del cromosoma X a la varianza fenotípica del tamaño del ala (Cowley & Atchely 1990). Este estudio identificó varios genes candidatos para el tamaño del ala que serán de interés para análisis futuros, incluyendo análisis en F₁s (o pruebas de complementación cuantitativa) con líneas de delección o de inserción de elemento P en tales genes (disponibles desde *Bloomington Drosophila Stock Center*; www.flybase.org).

Uno de los QTL del tamaño del ala también co-localizó con el QTL en común de termotolerancia y resistencia a la radiación UV-C en el medio del cromosoma 2. Esta región del cromosoma 2 parece ser clave para diversos caracteres de resistencia al estrés y del tamaño corporal (Fig. 8), en particular existe fuerte evidencia indicando que se trataría de una región clave para el *trade-off* entre la resistencia al calor y la resistencia al frío. Futuros estudios en nuestras líneas RIL intentarán mapear a escala fina esta interesante región del cromosoma 2 para los diversos caracteres afectados, con el fin de identificar si los efectos sobre dichos caracteres se deben a pleiotropía o ligamiento entre genes específicos para cada carácter.

Ninguno de los QTL detectados para termotolerancia, resistencia a UV-C y tamaño del ala co-localizó con el QTL detectado para la resistencia a la inanición en el presente estudio. Este resultado indica que la resistencia a la inanición tiene una base genética muy diferente a la del tamaño del ala y los otros caracteres de resistencia al estrés considerados en el presente trabajo.

El tamaño del ala es un índice del tamaño corporal y responde a la temperatura experimentada durante el desarrollo en muchos insectos incluyendo *Drosophila*, incluso aunque la selección para termotolerancia durante el estadio adulto del ciclo de vida no afecta al tamaño corporal (Sambucetti et al. 2010). Los resultados presentes también enfatizan el

importante aspecto de considerar diferentes ambientes térmicos en el análisis de la base genética del tamaño corporal.

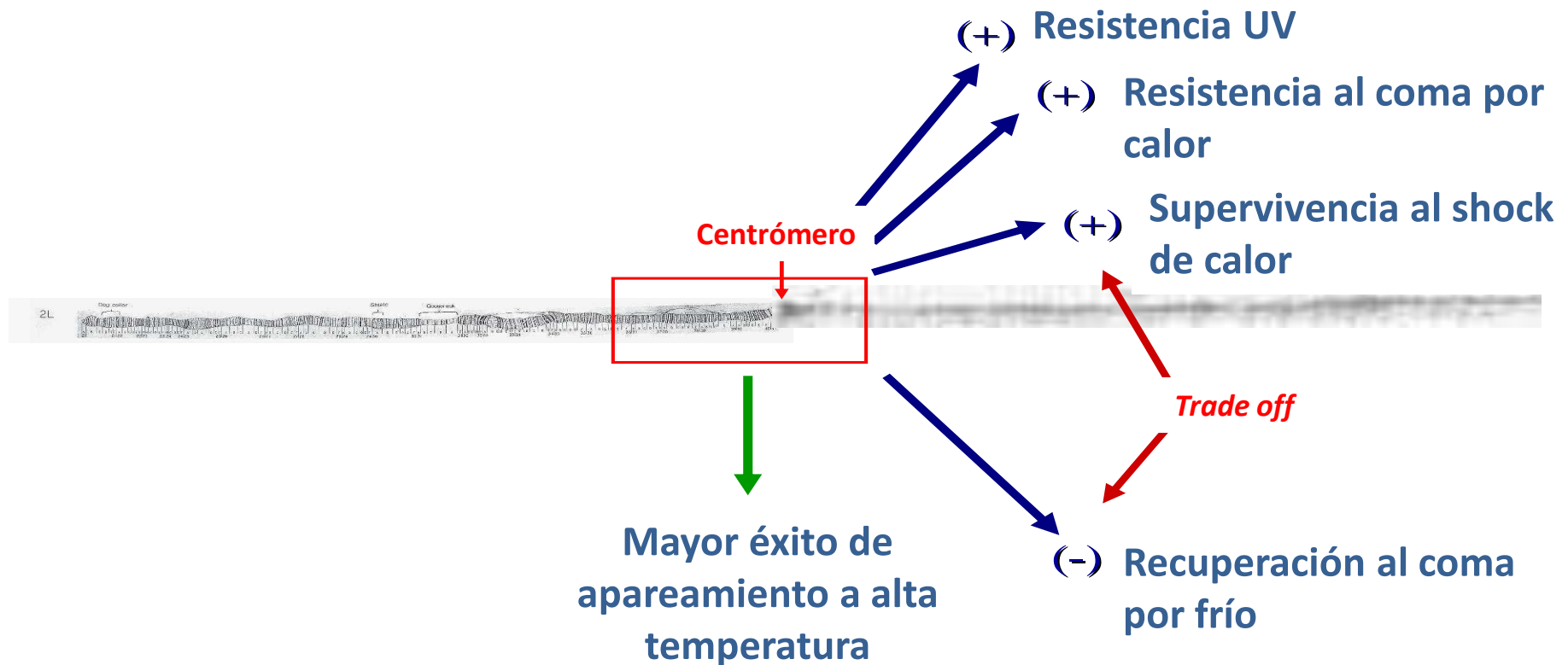


Fig. 8 Cromosoma 2 de *Drosophila melanogaster* mostrando la región de un QTL general para termotolerancia que fue descubierto en diferentes poblaciones de mapeo por Norry et al. (2004, 2007a, 2008) y Morgan & Mackay (2006). Este QTL presenta efectos antagonistas entre la resistencia al calor (*knockdown resistance to heat stress*) y la resistencia al frío (*chill-coma recovery*) en todas las poblaciones de mapeo estudiadas a la fecha por lo que es probable que se trate de un gen o una red génica con efectos pleiotrópicos antagonistas.

4.4 Asimetría fluctuante

La “inestabilidad del desarrollo” refleja la incapacidad del genoma y las vías del desarrollo para suprimir o reducir el “ruido” al azar durante este proceso (Palmer & Strobeck 1986; Zakharov 1992). Por eso, la asimetría fluctuante (AF) es un fuerte candidato de la inestabilidad del desarrollo dado que los dos lados de un organismo con simetría bilateral son producidos por un mismo genoma. Esto debe ser especialmente importante cuando se considera la capacidad de genotipos para resistir determinados niveles de estrés ambiental sin aumentar la inestabilidad del desarrollo (Swaddle & Witter 1998). Aunque los resultados de diversos estudios no siempre revelan respuestas genéticas relacionadas al estrés (Perfectti & Camacho 1999; Andalo et al. 2000), a la fecha no se han realizado estudios de QTL para AF en presencia y en ausencia de estrés en *Drosophila*. Lo esperado es que el número y la magnitud de los posibles QTL para AF sea mayor en condiciones de estrés ambiental (que pueden inducir “ruido” durante el desarrollo) que en condiciones óptimas. Eso es precisamente lo que se observó en el presente estudio en donde el factor de estrés fue la temperatura ambiental. Los presentes resultados indican que la asimetría fluctuante es heredable para caracteres morfológicos en condiciones de estrés por alta temperatura pero no en temperatura benigna en nuestra población de mapeo de *Drosophila melanogaster*. Una revisión reciente sobre los estudios que reportan estimas de heredabilidad para AF (Fuller & Houle 2002) concluyó que la heredabilidad promedio para AF es de 0.026 ± 0.015 ; y que la pregunta de si existe o no una base genética heredable para AF permanece sin respuesta.

En el modelo ratón, Leamy et al. (1997) identificaron varios QTL para la asimetría fluctuante (AF) de caracteres del esqueleto, muchos de los cuales estuvieron ligados a genes de factores de crecimiento, receptores de hormonas y hormonas. En el presente estudio el gen candidato Hsp90 no fue incluido en ningún QTL para AF y los QTL para este carácter incluyeron genes candidatos para genes homeóticos que controlan el crecimiento de discos imaginales. Ninguno de los QTL para AF solapó con QTL para el tamaño del ala.

El resultado más interesante es que ningún QTL para AF fue significativo en la ausencia de estrés térmico. Este resultado sugiere que en condiciones de estrés durante el desarrollo existen QTL que controlan las imperfecciones del desarrollo manteniendo niveles moderados de AF similares a los niveles de AF que existen en la ausencia de estrés. El factor de estrés ambiental elegido para este estudio puede haber sido crucial para el análisis de QTL para AF, dado que la temperatura ambiental experimentada durante el desarrollo es uno de los principales factores ambientales, sino el más importante, que regula el crecimiento y diferenciación de los discos imaginales. Todas las estructuras corporales de la mosca adulta son producidas por los discos imaginales que se encuentra de a pares. Por ejemplo, el par de discos llamados “ala” son los que van a formar las alas y gran parte del tórax de la mosca adulta. Los niveles de expresión de los genes que regulan la proliferación celular dentro de los discos imaginales son muy sensibles a la temperatura. Por ejemplo, la vía de señalización de la insulina es un posible mecanismo para la coordinación del crecimiento de los discos imaginales en insectos holometábolos como *Drosophila* (de Jong & Bochdanovits 2003; Emlen & Allen 2003). Existe evidencia de que los niveles de expresión de genes tales como *wg*, *dpp* y *hh* son sensibles a diversos elementos de la vía de señalización de la insulina (Chen et al. 1996). Sin embargo, algunos de los genes claves de esta vía como ser *InR* (receptor de la insulina), *wg*, *dpp* y *hh* no fueron incluidos en los QTL para AF. Sin embargo, algunos otros genes clave de la vía de la insulina sí fueron incluidos dentro de las regiones de QTL para AF, como ser el factor de crecimiento de disco imaginal 5 (*Idgf5*) localizado en el cromosoma 2.

Un gran número de estudios previos han comparado los niveles de AF en presencia y ausencia de estrés ambiental y el resultado general de tales estudios fue que el estrés no parece aumentar significativamente los niveles de AF (Andalo et al 2000). Los resultados presentes sugieren otro enfoque para el análisis de AF, que se basa en mapeo de QTL. Con el presente mapeo de QTL en *D. melanogaster* se identificaron varios QTL que fueron significativos sólo en la presencia de estrés. Tales QTL pueden contribuir a que no existan diferencias sustanciales en los niveles de AF en presencia versus ausencia de estrés.

En *Drosophila*, diversos estudios sobre AF de caracteres del ala coinciden en indicar que la selección sexual actúa en contra de AF favoreciendo a los machos más simétricos (Norry et al. 1998; Santos 2002). Norry et al. (1998) utilizó moscas salvajes que desarrollaron en temperaturas no controladas en el ambiente natural y detectaron que los machos con alas más simétricas de *D. buzzatii* se aparean más frecuentemente que los machos asimétricos. Klingenberg et al. (1998) sugieren que la selección persistente contra la asimetría actuará en contra de alelos mutantes que aumentan el tamaño del carácter como ser el tamaño del ala. El primordio del ala de *Drosophila* está dividido en el desarrollo temprano en dos porciones distintas originando las células primordiales en el disco imaginal “ala”, cuyos descendientes (policlones) nunca cruzan una cierta línea de demarcación aproximadamente ubicada junto a la cuarta vena longitudinal (Garcia-Bellido & de Celis 1992, Stark et al. 1999). Esta línea representa el límite entre los dos compartimentos del ala, anterior y posterior. Ambos compartimentos del ala contribuyen diferencialmente a la evolución por selección térmica en el tamaño total del ala (Cavicchi et al. 1985, 1991). Por eso, incluso aunque deben existir distintas unidades de selección sobre los componentes anterior y posterior del ala de *Drosophila*, la respuesta final a la selección sobre los diversos componentes del ala y sobre su AF debe estar fuertemente constreñida dentro del programa de desarrollo.

5. Referencias Bibliográficas

- Andalo C, Bazin A, Shykoff JA. Is there a genetic basis for fluctuating asymmetry and does it predict fitness in the plant *Lotus corniculatus* grown in different environmental conditions? *Int J Plant Sci* 2000; 161: 213-220.
- Anderson AA, Hoffmann AA, McKechnie SW. Response to selection for rapid chill-coma recovery in *Drosophila melanogaster*: physiology and life-history traits. *Gen Res* 2005; 85:15-22.
- Arsham AM, Neufeld TP. Thinking globally and acting locally with TOR. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18:589-97.
- Ayroles JF, Carbone MA, Stone EA, Jordan KW, Lyman RF, Magwire MM, et al. Systems genetics of complex traits in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* 2009; 41:299-307.
- Baden HP, Kollias N, Anderson RR, Hopkins T, Raftery L. *Drosophila melanogaster* larvae detect low doses of UVC radiation as manifested by a writhing response. *Arch Ins Biochem and Phys* 1996; 32:187-196.
- Black HS. Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage. *Photochem Photobiol* 1987; 46: 213-221.
- Bubliy OA, Riihimaa A, Norry FM, Loeschcke V. Variation in resistance and acclimation to low-temperature stress among three geographical strains of *Drosophila melanogaster*. *J Thermal Biol* 2002; 27:337-44.
- Bubliy OA, Loeschcke V. Correlated responses to selection for stress resistance and longevity in a laboratory population of *Drosophila melanogaster*. *J Evol Biol* 2005; 18:789-803.
- Caboli F, Kennington W, Partridge L. QTL mapping reveals a striking coincidence in the positions of genomic regions associated with adaptive variation in body size in parallel clines of *Drosophila melanogaster* on different continents. *Evolution* 2003; 57:2653-2658.
- Calabrese EJ, et al. Biological stress response terminology: integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework, *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 222:122-128
- Calabrese EJ. What is hormesis? In: Le Bourg E, Rattan SIS (Eds.), *Mild Stress and Healthy Aging*. Springer, Berlin. 2008.

- Carbone MA, Jordan KW, Lyman RF, Harbison ST, Leips J, Morgan TJ, DeLuca M, Awadalla P, Mackay TFC. Phenotypic variation and natural selection at *catsup*, a pleiotropic quantitative trait gene in *Drosophila*. *Curr Biol* 2006; 16:912-919.
- Cavicchi S, Guerra D, Giorgi G, Pezzoli C. Temperature related divergence in experimental populations of *Drosophila melanogaster*. I. Genetic and developmental basis of wing size and shape variations. *Genetics* 1985;109:665-689.
- Cavicchi S, Giorgi G, Natali V, Guerra D. Temperature-related divergence in experimental populations of *Drosophila melanogaster*. III. Fourier and centroid analysis of wing shape and relationship between shape variation and fitness. *J Evol Biol* 1991; 4:141-159.
- Coffman CJ, Wayne ML, Nuzhdin SV, Higgins LA, McIntyre LM. Identification of co-regulated transcripts affecting male body size in *Drosophila*. *Genome Biol* 2005; 6:R53.
- Colson I, Macdonald SJ, Goldstein DB. Microsatellite markers for interspecific mapping of *Drosophila simulans* and *D. sechellia*. *Mol Ecol* 1999; 8:1951-1955.
- Cowley DE, Atchley WR. Development and quantitative genetics of correlation structure among body parts of *Drosophila melanogaster*. *Am Nat* 1990; 135:242-268.
- De Jong G, Bochdanovits Z. Latitudinal clines in *Drosophila melanogaster*: body size, allozyme frequencies, and the insulin signalling pathway. *J Genet* 2003; 82: 207-223.
- Elandt-Johnson R, Johnson NL. *Survival Models and Data Analysis*. Wiley, New York. 1980.
- Emlen DJ, Allen CE. Genotype to phenotype: physiological control of trait size and scaling in insects. *Integr Comp Biol* 2003; 43: 617-634.
- Falconer DS and Mackay TFC. *Introduction to Quantitative Genetics*. Fourth Edition. Longman Group Ltd 1996.
- FlyBase Consortium. The FlyBase database of the *Drosophila* genome projects and community literature. *Nucleic Acids Research* 2003; 31:172-175. <http://flybase.org>.

- Frazier MR, Harrison JF, Kirkton SD, Roberts SP. Cold rearing improves cold-flight performance in *Drosophila* via changes in wing morphology. *J Exp Biol* 2008; 211:2116-2122.
- Fuller RC, Houle D. Detecting genetic variation in developmental instability by artificial selection on fluctuating asymmetry. *J Evol Biol* 2002; 15:954-960.
- Garcia-Bellido A, de Celis JF. Developmental genetics of the venation pattern of *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 1992; 26:275-304.
- Gilchrist GW, Huey RB. Plastic and genetic variation in wing loading as a function of temperature within and among parallel clines in *Drosophila subobscura*. *Integrative and Comparative Biology* 2004; 44:461-470.
- Gillespie JH, Turelli M. Genotype-environment interactions and the maintenance of polygenic variation. *Genetics* 1989; 121:129-138.
- Gockel J, Kennington WJ, Hoffmann AA, Goldstein DB, Partridge L. Non-clinality of molecular variation implicates selection in maintaining a morphological cline of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 2001; 158:319-323.
- Gockel J, Robinson SJW, Kennington WJ, Goldstein DB, Partridge L. Quantitative genetic analysis of natural variation in body size in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 2002; 89:145-153.
- Hallas R, Schiffer M, Hoffmann AA. Clinal variation in *Drosophila serrata* for stress resistance and body size. *Genet Res (Camb)* 2002; 79:141-8.
- Harbison ST, Chang S, Kamdar KP, Mackay TFC. Quantitative genomics of starvation stress resistance in *Drosophila*. *Genome Biol* 2005; 6:36.
- Harr B, Zangeri B, Brem G, Schlotterer C. Conservation of locus specific microsatellite variability across species: a comparison of two *Drosophila* sibling species *D. melanogaster* and *D. simulans*. *Mol Biol and Evol* 1998; 15:176-184.
- Hercus MJ, Loeschcke V, Rattan SIS. Lifespan extension of *Drosophila melanogaster* through hormesis by repeated mild heat stress. *Biogerontology* 2003; 4:149-156.
- Hoffmann AA, Harshman LG. Desiccation and starvation resistance in *Drosophila*: patterns of variation at the species, population and intrapopulation levels. *Heredity* 1999; 83:637-43.

- Hoffmann AA, Hallas R, Sinclair C, Mitrovski P. Levels of variation in stress resistance in *Drosophila* among strains, local populations, and geographical regions: patterns for desiccation, starvation, cold resistance, and associated traits. *Evolution* 2001; 55:1621-30.
- Hoffmann AA, Anderson A, Hallas R. Opposing clines for high and low temperature resistance in *Drosophila melanogaster*. *Ecol Lett* 2002; 5:614-8.
- Hoffmann AA, Sørensen JG, Loeschcke V. Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *J Ther Biol* 2003; 28:175-216.
- Hoffmann AA, Hallas R, Anderson AR, Telonis-Scott M. Evidence for a robust sex-specific trade-off between cold resistance and starvation resistance in *Drosophila melanogaster*. *J Evol Biol* 2005; 18:804-10.
- Hoffmann AA, Daborn PJ. Towards genetic markers in animal populations as biomonitors for human-induced environmental change. *Ecology Letters* 2007; 10:63-76.
- Hoffmann AA, Willi Y. Detecting genetic responses to environmental change. *Nat Rev Genet* 2008; 9(6):421-32.
- Jurkiewicz BA, Buettner GR. Ultraviolet light-induced free radical formation in skin: an electron paramagnetic resonance study. *Photochem and Photobiol* 1994; 59:1-4.
- Karan D, Dahiya N, Munjal AK, Gibert P, Moreteau B, Parkash R, et al. Desiccation and starvation tolerance of adult *Drosophila*: opposite latitudinal clines in natural populations of three different species. *Evolution* 1998; 52:825-31.
- Kauer M, Zangerl B, Dieringer D, Schlötterer C. Chromosomal Patterns of Microsatellite Variability Contrast Sharply in African and Non-African Populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 2002; 160, 247–256.
- Kauer M, Dieringer D, Schlötterer C. Nonneutral Admixture of Immigrant Genotypes in African *Drosophila melanogaster* populations from Zimbabwe. *Mol Biol and Evol* 2003; 20:1329-1337.
- Kauer MO, Schlötterer C. An analysis of genetic differentiation among assortatively mating *Drosophila melanogaster* in Zimbabwe. *J Evol Biol* 2004; 17:493-500.

- Khazaeli, AA, Tatar M, Pletcher SD, Curtsinger JW. Heat-induced longevity extension in *Drosophila*. I. Heat treatment, mortality and thermo-tolerance. *J Gerontol* 1997; 52:B48-B52.
- Kirkwood TB, Austad SN. Why do we age? *Nature* 2000; 408:233-238.
- Klingenberg CP, McIntyre GS, Zaklan SD. Left–right asymmetry of fly wings and the evolution of body axes. *Proc R Soc Lond Ser. B* 1998; 265: 1255-1259.
- van 't Land J, van Putten P, Zwaan B, Kamping A, van Delden W. Latitudinal variation in wild populations of *Drosophila melanogaster*: heritabilities and reaction norms. *J Evol Biol* 1999; 12:222-232.
- Lander ES, Botstein D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 1989; 121: 185-199.
- Le Bourg E, Valenti P, Lucchetta P, Payre F. Effects of mild heat shocks at young age and longevity in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology* 2001; 2:155-164.
- Le Bourg E, Rattan SIS. *Mild Stress and Healthy Aging*. Springer, Berlin. 2008.
- Leamy LJ, Routman EJ, Cheverud JM. A search for quantitative trait loci affecting asymmetry of mandibular characters in mice. *Evolution* 1997; 51: 957-969.
- Loeschcke V, Bundgaard J, Barker JSF. Reaction norms across and genetic parameters at different temperatures for thorax and wing size traits in *Drosophila aldrichi* and *D. buzzatii*. *J Evol Biol* 1999; 12:605-623
- Loeschcke V, Hoffmann AA. Consequences of heat hardening on a field fitness component in *Drosophila* depend on environmental temperature. *Am Nat* 2007; 169:175-183.
- Mackay TFC. The genetic architecture of quantitative traits. *Ann Rev Genet* 2001; 35:303-39.
- Mackay TFC. The genetic architecture of quantitative traits: lessons from *Drosophila*. *Curr Op Gen Devel* 2004; 14:253-257.
- Matzkin LM, Watts D, Markow TA. Evolution of stress resistance in *Drosophila*: interspecific variation in tolerance to desiccation and starvation. *Func Ecol* 2008; 23:521-7.

- Mezey JG, Houle JD, Nuzhdin SV. Naturally segregating quantitative trait loci affecting wing shape of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 2005; 169:2101-2113.
- Minois N. Longevity and aging: beneficial effect of exposure to mild stress. *Biogerontology* 2000; 1:15-29.
- Morgan TJ, Mackay TFC. Quantitative trait loci for thermotolerance phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 2006; 96:232-242.
- Morimoto RI: Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 1998, 12:3788-3796.
- Norry FM, Vilardi JC, Hasson E. Sexual selection related to developmental stability in *Drosophila buzzatii*. *Hereditas* 1998;128(2):115-9.
- Norry FM, Loeschcke V. Temperature-induced shifts in associations of longevity with body size in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 2002a; 56:299-306.
- Norry FM, Loeschcke V. Longevity and resistance to cold stress in cold stress-selected lines and their controls in *Drosophila melanogaster*. *J Evol Biol* 2002b; 15: 775-783.
- Norry FM, Loeschcke V. Heat-induced expression of a molecular chaperone decreases by selecting for long-lived individuals. *Exp Gerontol* 2003; 38:673-681.
- Norry FM, Dahlgard J, Loeschcke V. Quantitative trait loci affecting knockdown resistance to high temperature in *Drosophila melanogaster*. *Mol Ecol* 2004; 13:3585-94.
- Norry FM, Sambucetti P, Scannapieco AC, Loeschcke V. Altitudinal patterns for longevity, fecundity and senescence in *Drosophila buzzatii*. *Genetica* 2006; 128:81-93.
- Norry FM, Gomez FH, Loeschcke V. Knockdown resistance to heat stress and slow recovery from chill coma are genetically associated in a central region of chromosome 2 in *Drosophila melanogaster*, *Mol Ecol* 2007; 16:3274-3284
- Norry FM, Sambucetti P, Scannapieco AC, Gomez FH, Loeschcke V. X-linked QTL for knockdown resistance to high temperature in *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol Biol* 2007b; 16:509-513.

- Norry FM, Scannapieco AC, Sambucetti P, Bertoli C, Loeschcke V. QTL for the thermotolerance effect of heat hardening, knockdown resistance to heat and chill-coma recovery in an intercontinental set of recombinant inbred lines of *Drosophila melanogaster*. *Mol Ecol* 2008; 17:4570-4581.
- Norry FM, Larsen PF, Liu Y, Loeschcke V. Combined expression patterns of QTL-linked candidate genes best predict thermotolerance in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 2009; 55:1050-7.
- Nuzhdin SV, Pasyukova EG, Mackay TF. Accumulation of transposable elements in laboratory lines of *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 1997; 100(1-3):167--175.
- Nuzhdin SV, Harshman LG, Zhou M, Harmon K. Genome-enabled hitchhiking mapping identifies QTLs for stress resistance in natural *Drosophila*. *Heredity* 2007; 99:313-21.
- Palmer AR & Strobeck C. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Ann Rev Ecol Syst* 1986; 17:391-421.
- Parkash R, Kaira B, Shama V. Changes in cuticular lipids, water loss and desiccation resistance in a tropical drosophilid—Analysis of within population variation. *Fly* 2008; 2:189-97.
- Parkash R, Singh S, Ramniwas S. Seasonal changes in humidity level in the tropics impact body color polymorphism and desiccation resistance in *Drosophila jambulina*—Evidence for melanism-desiccation hypothesis. *J Insect Physiol* 2009; 55:358-68.
- Parsons PA. Fluctuating asymmetry: an epigenetic measure of stress. *Biol. Rev.* 1990a; 65:131-145.
- Parsons PA. Aging: the fitness-stress continuum and genetic variability. *Exp Aging Res* 2002; 28:347-359.
- Partridge L, Piper MDW, Mair W. Dietary restriction in *Drosophila*. *Mech Ageing Dev* 2005; 126:938-50.
- Perfectti F, Camacho JPM. Analysis of genotypic differences in developmental stability in *Annona cherimola*. *Evolution* 1999; 53:1396-1405.
- Pletcher SD. Model fitting and hypothesis testing for age-specific mortality data. *J Evol Biol* 1999; 12:430-439.
- Queitsch C, Sangster TA, Lindquist S: Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature* 2002, 417:618-624.

- Rako L, Anderson AR, Sgrò CM, Stocker AJ, Hoffmann AA. The association between inversion *In(3R)Payne* and clinally varying traits in *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 2006; 128:373-384.
- Rako L, Hoffmann AA. Complexity of the cold acclimation response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* 2006; 52:94-104.
- Rand DM, Weinreich DM, Lerman D, Folk D, Gilchrist GW. Three selections are better than one: clinal variation of thermal QTL from independent selection experiments in *Drosophila*. *Evolution* 2010; 64(10):2921-34.
- Rasband W. ImageJ. A program for image processing and analysis in Java. 2001. URL <http://www.rsb.info.nih.gov/ij/>
- Rion S, Kawecki TJ. Evolutionary biology of starvation resistance: what we have learned from *Drosophila*. *J Evol Biol* 2007; 20:1655-66.
- Robinson SJW, Zwaan B, Partridge L. Starvation resistance and adult body composition in a latitudinal cline of *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 2000; 54:1819-24.
- Rutherford S, Lindquist S: Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 1998, 396:336-342.
- Sabban EL, Kvetnansky R. Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *Trends in Neurosciences* 2001; 24:91-98.
- Sambucetti P, Sørensen JG, Loeschcke V, Norry FM. Variation in senescence and associated traits between sympatric cactophilic sibling species of *Drosophila*. *Evol Ecol Res* 2005; 7:915-930.
- Santos M. Genetics of wing size asymmetry in *Drosophila buzzatii*. *J Evol Biol* 2002; 15:720-734
- Scannapieco AC, Sørensen J, Loeschcke V, Norry FM. Heat-induced hormesis in longevity of two sibling *Drosophila* species. *Biogerontology* 2007; 8:315-325.
- Scannapieco AC, Sambucetti P, Norry FM. Direct and correlated responses to selection for longevity in *Drosophila buzzatii*. *Biol J Linn Soc* 2009; 97:738-48.
- Schmidt PS, Matzkin L, Ippolito M, Eanes WF. Geographic variation in diapause incidence, life-history traits and climatic adaptation in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 2005; 59:1721-32.

- Schlötterer C, Vogl C, Tautz D. Polymorphism and locus-specific effects on polymorphism at microsatellite loci in natural *Drosophila melanogaster* populations. *Genetics* 1997;146:309-329.
- Schug MD, Wetterstrand KA, Gaudette MS, Lim RH, Hutter CM, Aquadro CF. The distribution of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Mol Ecol* 1998; 7:57-70.
- Shindo Y, Witt E, Han D, Packer L. Dose–response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. *J Inv Derm* 1994; 102: 470-475.
- Silver J. Confidence limits for estimates of gene linkage based on analysis of recombinant inbred strains. *Heredity* 1985; 76:436-440.
- Sørensen JG, Nielsen MM, Kruhøffer M, Justesen J, Loeschcke V. Full genome gene expression analysis of the heat stress response in *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress and Chaperones* 2005a; 10:312-328.
- Sørensen JG, Norry FM, Scannapieco AC, Loeschcke V. Altitudinal variation for stress resistance traits and thermal adaptation in adult *Drosophila buzzatii* from the New World. *J Evol Biol* 2005b; 18:829-837.
- Sørensen JG, Kristensen TN, Kristensen KV, Loeschcke V. Sex specific effects of heat induced hormesis in Hsf-deficient *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol* 2007a; 42:1123–1129.
- Sørensen JG, Nielsen MM, Loeschcke V. Gene expression profile analysis of *Drosophila melanogaster* selected for resistance to environmental stressors. *J Evol Biol* 2007b; 20:1624-36.
- Sørensen JG, Sarup P, Kristensen TN, Loeschcke V. Temperature induced hormesis in longevity. In: Le Bourg E, Rattan SIS (Eds). *Mild Stress and Healthy Aging*. Springer, Berlin. 2008.
- Stark J, Bonacum J, Remsen J, DeSalle R. The evolution and development of dipteran wing veins: a systematic approach. *Annu Rev Entomol* 1999; 44:97-129.
- Stephan W, Li H. The recent demographic and adaptive history of *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 2006; 98:65-8.
- Stillwell RC, et al. Geographic variation in body size and sexual size dimorphism of a seed-feeding beetle. *Am Nat* 2007; 170:358-369.

- Swaddle JP, Witter MS. Cluttered habitats reduce wing asymmetry and increase flight performance in European starlings. *Behavioral Ecol and Sociobiol* 1998; 42:281-287.
- Swaddle JP. Fluctuating Asymmetry, Animal Behavior and Evolution. *Advances in the Study of Behavior* 2003; 32:169-205.
- Takahashi et al.: Effects of small Hsp genes on developmental stability and microenvironmental canalization. *BMC Evol Biol* 2010 10:284.
- Tatar M, Gray WG, Carey JR. Altitudinal variation for senescence in *Melanoplus* grasshoppers. *Oecologia* 1997; 111:357–364.
- Tatar M, Bartke A, Antebi A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 2003; 299:1346-51.
- Telonis-Scott M, Hallas R, McKechnie SW, Wee CW, Hoffmann AA. Selection for cold resistance alters gene transcript levels in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 2009; 55:549-55.
- Todo T, Ryo H. Identification of cellular factors that recognize UV-damaged DNA in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res.* 1992 Jan; 273(1):85-93
- Van Valen, L.. A study of fluctuating asymmetry. *Evolution* 1962; 16:125-142.
- Vermeulen CJ, Loeschcke V. Longevity and the stress response in *Drosophila*. *Exp Gerontol* 2007; 42:153–159.
- Vieira C, Pasyukova EG, Zeng ZB, Hackett JB, Lyman RF, Mackay TFC. Genotype-environment interaction for quantitative trait loci affecting life span in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 2000; 164:213-27.
- Waddington CH: Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature* 1942, 150:563-565.
- Wang M-H, Lazebny O, Harshman LG, Nuzhdin SV. Environment-dependent survival of *Drosophila melanogaster*: a quantitative genetic analysis. *Aging Cell* 2004; 3:133-40.
- Wang S, Basten CJ, Zeng Z-B. Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC 2007.
- Wright TRF. The genetics of biogenic amine metabolism, sclerotization, and melanization in *Drosophila melanogaster*. *Adv Genet* 1987; 24:127–222.
- Yadav JP, Singh BN. Evolutionary genetics of *Drosophila ananassae*: evidence for trade-offs among several fitness traits. *Biol J Linn Soc* 2007; 90:669-85.

- Yamamoto K, Fujiwara Y and Shinagawa H. Evidence that the *phr+* gene enhances the ultraviolet resistance of *Escherichia coli* *recA* strains in the dark. *Mol Gen Genet* 1983; 192:282-284.
- Yamamoto K, Satake M and Shinagawa H. A multicopy *phr-* plasmid increases the ultraviolet resistance of a *recA* strain of *Escherichia coli*. *Mutat Res* 1984; 131:11-18.
- Yegorova LA, Levin VL and Kozlova MA. Heritability of UV sensitivity and photoreactivation ability in *Drosophila* embryos. *Mutat Res* 1978; 49:213-218.
- Yeyati PL, Bancewicz RM, Maule J, van Heyningen V: Hsp90 selectively modulates phenotype in vertebrate development. *PLoS Genet* 2007, 3:e43.
- Zakharov VM. Population Phenogenetics: Analysis of Developmental Stability in Natural Populations, *Acta Zool. Fenn.* 1992; 191: 7–30.
- Zeng Z. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 1994; 136:1457–1468.
- Zinke I, Schutz CS, Katzenberger JD, Bauer M, Pankratz MJ. Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar dependent response. *EMBO J* 2002; 21:6162-73.