

Tesis Doctoral

Exploración de la arquitectura genética para la respuesta al frío y al etanol en el modelo *Drosophila*: líneas de selección y mapeo de QTL

Bertoli, Carlos Ignacio

2011

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

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

Cita tipo APA:

Bertoli, Carlos Ignacio. (2011). Exploración de la arquitectura genética para la respuesta al frío y al etanol en el modelo *Drosophila*: líneas de selección y mapeo de QTL. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Bertoli, Carlos Ignacio. "Exploración de la arquitectura genética para la respuesta al frío y al etanol en el modelo *Drosophila*: líneas de selección y mapeo de QTL". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ecología, Genética y Evolución

**Exploración de la arquitectura genética para la
respuesta al frío y al etanol en el modelo *Drosophila*:
Líneas de selección y mapeo de QTL**

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

Lic. Carlos Ignacio Bertoli

Director de Tesis: Dr. Fabián Marcelo Norry
Consejero de estudios: Dr. Juan C. Reboreda

Buenos Aires, Argentina, 2011.



A mis viejos, por mis viejos.

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	6
RECONOCIMIENTO	8
INTRODUCCIÓN	10
BIBLIOGRAFÍA DE LA INTRODUCCIÓN	17
CAPITULO I	20
“RESPUESTAS DIRECTAS Y CORRELACIONADAS A LA SELECCIÓN PARA LA RECUPERACIÓN DEL COMA POR ENFRIAMIENTO EN <i>DROSOPHILA BUZZATII</i> .”	20
RESUMEN	20
INTRODUCCIÓN	21
MATERIALES Y MÉTODOS	23
RESULTADOS	29
DISCUSIÓN	32
BIBLIOGRAFÍA DEL CAPÍTULO I	35
CAPITULO II	40
“ESTUDIO DE QTL PARA LOS EFECTOS DE LA RECUPERACIÓN AL COMA POR ENFRIAMIENTO EN UN PANEL INTERCONTINENTAL DE LÍNEAS RECOMBINANTES ENDOCRINADAS (RIL) DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> .”	40
RESUMEN	40
INTRODUCCIÓN	41
MATERIALES Y MÉTODOS	43
RESULTADOS	47
DISCUSIÓN	52
BIBLIOGRAFÍA DEL CAPÍTULO II	56
CAPITULO III	61
“ANÁLISIS DE LOCI PARA CARACTERES CUANTITATIVOS (QTL) PARA LA RESPUESTA AL ETANOL EN ADULTOS Y LARVAS EN UN PANEL INTERCONTINENTAL DE LÍNEAS RECOMBINANTES ENDOCRINADAS (RIL) DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> ”	61
RESUMEN	61
INTRODUCCIÓN	62
MATERIALES Y MÉTODOS	64
RESULTADOS	69
DISCUSIÓN	78
BIBLIOGRAFÍA DEL CAPÍTULO III	86
CAPITULO IV	93
“CORRELACIÓN ENTRE LA RESISTENCIA AL FRÍO Y LA RESPUESTA AL ETANOL UTILIZANDO LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS MAPEOS DE QTL PARA LA RECUPERACIÓN AL COMA POR ENFRIAMIENTO Y PARA LA RECUPERACIÓN AL COMA POR ETANOL, LA RESISTENCIA A LOS VAPORES DE ETANOL Y LA TOLERANCIA AL ETANOL EN LARVAS, EN LÍNEAS RIL DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> ”	93
RESUMEN	93
INTRODUCCIÓN	94
MATERIALES Y MÉTODOS	97
RESULTADOS	98
DISCUSIÓN	102
BIBLIOGRAFÍA DEL CAPÍTULO IV	105
CONCLUSION	108
BIBLIOGRAFÍA DE LA CONCLUSIÓN	115
ANEXO	119

Exploración de la arquitectura genética para la respuesta al frío y al etanol en el modelo *Drosophila*: Líneas de selección y mapeo de QTL

RESUMEN

Las respuestas de los organismos a los distintos factores de estrés han sido objeto de estudio desde hace varias décadas. El interés que despertó esta área de conocimiento ha llevado a tomar diferentes enfoques para abordar un tema sumamente complejo como es la respuesta de un organismo a un factor de estrés. Tanto aspectos fisiológicos, como moleculares y genéticos entre otros aspectos, han sido considerados en estudios recientes para develar como es que los organismos responden a la presencia de un estresor. En esta tesis colaboramos, desde la genética cuantitativa, en la búsqueda de la base genética que permita entender más acabadamente que factores intervienen en la recuperación de un individuo cuando se lo expone al frío, así como cuales son los factores que permiten la recuperación y la tolerancia cuando son expuestos a altas concentraciones de etanol. También se buscan posibles correlaciones genéticas entre la recuperación al frío y otros caracteres de historia de vida así como de resistencia a distintas formas de estrés. Hemos hecho uso de un organismo experimental ampliamente utilizado en el área de la genética, *Drosophila melanogaster*. Asimismo, algunos experimentos también fueron desarrollados en otra especie del mismo género *Drosophila*, *Drosophila buzzatii*, que es una especie cactófila.

En primer lugar, desarrollamos, mediante selección artificial, líneas para alta y baja velocidad de recuperación al coma por enfriamiento, ambas en *Drosophila buzzatii*. Una vez constatada la heredabilidad del carácter y la diferenciación significativa entre los fenotipos de ambas líneas evaluamos la posible correlación de este régimen selectivo con distintos caracteres adaptativos, como ser el tiempo de desarrollo, resistencia al golpe de calor, tamaño corporal, resistencia a la inanición, resistencia a los vapores de etanol. También desarrollamos un programa que permite mejorar la eficiencia y precisión de la medición. En segundo lugar, realizamos, mediante la utilización de líneas RIL (líneas recombinantes endocriadas) de *Drosophila melanogaster* pertenecientes al laboratorio GERES, un mapeo genético para localizar la posible existencia de QTL (loci de carácter cuantitativo) vinculados con las diferencias fenotípicas para la recuperación al frío presentes en las líneas RIL antes mencionadas. En tercer lugar, utilizando estas mismas líneas de *Drosophila melanogaster* se

mapearon tres caracteres vinculados a la respuesta a la exposición al etanol (recuperación y tolerancia en adultos y supervivencia en larvas). Por último, se comparan los resultados obtenidos en los mapeos para la recuperación al frío con los obtenidos en la respuesta al etanol.

Si bien se pudo constatar que en *Drosophila buzzatii* la heredabilidad de la recuperación al coma por enfriamiento es significativa en un régimen selectivo de múltiples generaciones, no se pudo establecer correlaciones genéticas entre este régimen y otros caracteres medidos (tamaño corporal, tiempo de desarrollo, resistencia al calor o resistencia a la inanición). El único carácter que mostró una correlación con el régimen selectivo fue la tolerancia a la exposición al etanol.

El mapeo de QTL para la recuperación al frío permitió identificar 3 QTL para los cuales fue posible detectar algunos genes candidatos. Algunos de estos QTL solapan con QTL identificados por otros autores para el mismo carácter de resistencia al frío así como también para otros caracteres de resistencia al calor. Para el caso del mapeo de QTL para la exposición al etanol se encontraron 13 QTL, muchos de estos específicos según el carácter analizado. La superposición de los QTL correspondientes a la respuesta al etanol con los QTL encontrados para la recuperación al frío fue casi nula, así como la superposición entre los mismos caracteres vinculados a la respuesta al etanol.

En conjunto, los resultados indican que la arquitectura genética es diferente entre la resistencia al frío y los caracteres mapeados de tolerancia al etanol en el modelo *Drosophila*. Debido a esto es que podemos decir que la correlación detectada en *Drosophila buzzatii* parece ser dependiente de la población, lo que nos lleva a plantear que los vínculos entre la respuesta al frío y la respuesta al etanol son débiles y dependientes de la población en estudio.

Palabras Claves: *Drosophila melanogaster*, *Drosophila buzzatii*, QTL, líneas de selección, “chill-coma”, etanol.

Genetic architecture for the responses to cold and ethanol in *Drosophila*: selection lines and QTL mapping

ABSTRACT

The responses of organisms to different stress factors have been studied for several decades. The interest in this topic has been illustrated from different approaches to address a very complex issue, which is the response of an organism to a stressor. Both physiological and molecular mechanisms, as well as the genetic variation among other issues, have been considered in recent studies to reveal how the organisms respond to the presence of a stressor. In this thesis a quantitative genetic approach is followed to search for the genetic basis of stress resistance to test for factors that are potentially involved in the recovery of an individual when it is exposed to cold stress, and what is the genetic basis for recovery and stress tolerance when exposed to high concentrations of ethanol. This work also test for possible correlations between chill-coma recovery and other adaptive characters, including some life history traits as well as other traits of stress resistance. We made use of an experimental organism widely used in the area of genetics, *Drosophila melanogaster*. Likewise, another species of the same genus *Drosophila* is used in other experiments, the cactophilic species *Drosophila buzzatii*.

Firstly, artificial selection was applied to select for both increased and reduced times of chill-coma recovery in *Drosophila buzzatii*. After constructing divergent lines for chill-coma recovery by artificial selection in *D. buzzatii*, the possible genetic correlations were tested between this trait and other adaptive traits such as development time, resistance to heat stroke, body size, starvation resistance, resistance to ethanol vapors. I also developed a program that improves the efficiency and precision of measurement. Second, recombinant inbred lines (RIL) of *Drosophila melanogaster* were used to identify QTL (quantitative trait loci) for chill-coma recovery. Third, the same RIL were used to also map traits of tolerance to ethanol in adults and larvae. Finally, the results are compared between traits of cold and ethanol tolerance. After applying artificial selection for chill-coma recovery in *Drosophila buzzatii*, replicated lines obtained were divergent for this trait indicating the the trait is heritable.

These divergent lines were used to test for any possible genetic correlations between chill-coma recovery and other adaptive traits such as body size, development

time, heat-stress resistance and starvation resistance. In these experiments with *D. buzzatii*, the only character that showed a correlation with selective regime for chill-coma recovery was tolerance to ethanol.

QTL mapping for the chill-coma recovery allowed to reveal the presence of 3 QTL where some candidate genes are allocated. Some QTL for chill-coma recover overlapped with QTL with QTL regions detected in previous studies with other mapping populations for both chill-coma recovery and heat-stress resistance. In the case of the QTL mapping for ethanol resistance traits, a total of 13 QTL were identified. There was no consistent overlapping between QTL for chill-coma recovery and QTL for ethanol tolerance.

Overall, the results indicate that the genetic architecture of the mapped traits is different between chill-coma recovery and ethanol resistance in the *Drosophila* model. Because of this we can say is that the correlation detected in *Drosophila buzzatii* seems to be dependent on the population, which leads us to propose that the ties between the response to cold and response to ethanol are weak and dependent on the study population.

Key words: *Drosophila melanogaster*, *Drosophila buzzatii*, QTL, selection lines, chill-coma, ethanol.

RECONOCIMIENTO

Este trabajo fue financiado con subsidios de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (AGENCIA)* como así también por subsidios de la Universidad de Buenos Aires, mediante proyectos dirigidos por el Dr. Fabián Norry.

*La AGENCIA es un organismo creado en 1990 como condición necesaria para el desarrollo científico y tecnológico según los especialistas del Banco Interamericano de Desarrollo (BID). Este mismo banco le presta dinero al país en forma ininterrumpida desde la década del 60, el BID prestó a naciones latinoamericanas en el período 1962-1995 unos 1400 mill U\$; en el período 1998-2000 unos 350 mill U\$ y solo entre 2006-9 en un único proyecto desembolsó 280 mill U\$ solo en la Argentina. Cabe destacar que para este programa el Estado Argentino debe contribuir con una contraparte que implica casi la mitad del monto del crédito con la consecuente gravedad de dejar a disposición de los condicionamientos del Banco capital genuino del Estado (Crédito = 280 mill U\$; Capital genuino del Estado = 230 mill U\$; Total del Programa = 510 mill U\$).

En Noviembre del 2010 se dio comienzo con la siguiente tanda de préstamos llamados Programa de Innovación Tecnológica (llevan ya 100 mill U\$ en el 2009 y ahora otros 200 mill U\$ más a desembolsar en los próximos 5 años). El BID nos sigue prestando, pero no sin imponer algunas condiciones.

El BID tiene bien claro que es lo que pretende de los gobiernos a la hora de prestar dinero. Existe un documento sobre las políticas rectoras del Banco en lo que respecta a Ciencia y Técnica (CyT) elaborado en el 2000 por Moura Castro (La ciencia y la tecnología para el desarrollo: una estrategia del BID). En él podemos leer cosas como las siguientes:

“En su diálogo con los países, el Banco acaso *proponga un número limitado de reformas de políticas, ya sea como condiciones de los préstamos o como parte del proceso de ejecución de proyectos, de modo que se pueda contar con todos los elementos necesarios para la innovación tecnológica.*”. Algunas de esas reformas políticas parece que se vienen aplicando, por ejemplo: “Aunque el financiamiento público se justifica claramente, la prestación pública de los servicios correspondientes es más difícil de justificar, porque en muchos casos *las instituciones privadas, con diversos subsidios públicos, pueden prestar el servicio de manera más eficiente que el*

sector público". Por último nos dejan un consejo que tiene reminiscencias a los que daba otra institución de préstamos internacionales –FMI- que no es tan generosa como el BID: "Por lo tanto, *el Banco dará apoyo a las políticas encaminadas a aumentar el libre comercio*, con particular referencia a la liberalización del comercio y a la eliminación de las barreras a la importación de tecnología. El Banco, además, identificará y recomendará otras políticas y reglamentaciones que puedan tener una incidencia positiva sobre la tecnología, incluidas las relacionadas con las políticas tributarias (por ejemplo, los incentivos tributarios para la inversión y para IyD), el tipo de cambio, las políticas sobre la competencia interna (el régimen antimonopólico) y el desarrollo y la supervisión de los mercados de capital, incluido el capital de riesgo."

"El buen gobierno y los incentivos correctos serán condiciones permanentes de los préstamos." Y recientemente nos volvieron a prestar, será que para el BID este es un "buen gobierno".

Somos muchos los que queremos una ciencia libre y nacional pensada para satisfacer las necesidades más urgentes de nuestros compatriotas y exenta de las condiciones impuestas por los organismos de crédito internacionales, ya sea el FMI, el Banco Mundial o el BID.

Lic. Carlos Bertoli

Fuentes:

<http://www.iadb.org/document.cfm?id=364068>

<http://www.iadb.org/document.cfm?id=35424970>

INTRODUCCIÓN

Pensemos en una noche de invierno, mal abrigados y sin calefacción en un lugar donde no queremos estar, pensemos en el viento que se escapa por debajo de cada pequeña grieta que uno intenta desesperadamente tapar, pensemos en esos pies fríos que no nos dejan pegar un ojo, por último y para hacerlo más dramático, pensemos que afuera el ruido de la lluvia helada nos prohíbe salir de esta cárcel improvisada. Ahora bien, revolviendo alacenas ajenas nos encontramos dos valiosos objetos, una botella con agua y otra igual con ginebra, ambas igual de frías que nosotros. La botella de agua la dejamos en su lugar para épocas más calurosas, pero la botellita de ginebra va con nosotros hasta esa silla desvencijada donde pasaremos la noche al abrigo del alcohol.

Ahora ya más tranquilos y con menos frío nos podemos preguntar: ¿Por qué esta relación ancestral entre el frío y el alcohol? ¿Por qué tanto vodka en Rusia? ¿Por qué los nórdicos no suelen emborracharse tan fácilmente como yo? ¿Por qué no habré encontrado limón y hielo para ponerle a la ginebra?

La noche se nos va entre divagues y sueños. Algunos de ellos, tanto los divagues como los sueños, fueron la motivación para las páginas que siguen. Sírvese una ginebra, póngale hielo y limón usted que puede, y dispóngase a leer un rato.

(Nota a parte, el consumo de alcohol no es beneficioso para combatir el frío, pese a que se lo suele relacionar)

La respuesta de un organismo ante la exposición al etanol, al frío, al calor, al hambre entre otras suele tener relación con un conjunto de factores que requieren de estudios complejos. Las respuestas de resistencia al estrés suelen ser caracteres cuantitativos, o sea, caracteres que están “controlados” por gran cantidad de genes que implican una base genética compleja. Estos caracteres están caracterizados por complejas redes de efectos pleiotrópicos¹ que precisan del uso de análisis estadísticos para describir los fenotipos complejos. Los caracteres de resistencia, son extremadamente sensibles a las variaciones ambientales, esto produce un amplio rango de fenotipos distintos para individuos genéticamente iguales expuestos a distintos ambientes. Para entender la arquitectura genética de un carácter de resistencia es necesaria la identificación de todos los genes que contribuyen con el carácter y las

¹ Pleiotropía: Es el fenómeno en el cual un solo gen tiene influencia directa sobre distintos fenotipos o caracteres (Falconer & Mackay 1996)

funciones e interacciones de los mismos, también precisamos determinar cual de estos genes contribuye con la variación fenotípica que ocurre en la naturaleza, así como los polimorfismos responsables de estas variaciones que resultan de sustrato para los cambios evolutivos (Mackay 2001).

Hasta hace pocos años, las posibilidades de realizar estudios que pudieran desentrañar los complejos vínculos y redes de estos caracteres eran sueños imposibles de realizar por la falta de los recursos técnicos necesarios, sobre todo en los campos estadístico y molecular. Sin embargo los recientes avances en la genética cuantitativa y la genómica funcional han acercado la posibilidad concreta de efectuar estos estudios, pero aún es necesario prestar particular atención a los efectos que producen las variaciones ambientales así como el dimorfismo sexual para los fenotipos relacionados con la resistencia, y más importante aún es el control del entorno genético que es ámbito en el que se dan las interacciones genéticas (Anholt & Mackay 2004).

Hace ya muchas décadas que *Drosophila* es un organismo modelo por excelencia en el mundo de la genética en general y de la genética de poblaciones en particular. La especie *Drosophila melanogaster* presenta un excelente modelo para el estudio de la arquitectura genética de caracteres complejos, incluyendo los comportamentales, así como los de resistencia. El genoma de *D. melanogaster* ha sido secuenciado y anotado en su totalidad, es un organismo extremadamente maleable para la manipulación genética y extensas bases de datos de acceso público están disponibles (ej. flybase.org). A esto se suma el hecho que son organismos relativamente sencillos para criar en forma económica, reproducir selectivamente, producen generaciones sucesivas con extrema rapidez y se pueden obtener grandes poblaciones rápidamente a partir de pocos individuos. En particular, de gran importancia para los estudios de resistencia, provee también, la posibilidad de generar gran número de individuos genéticamente idénticos y la cría de estos bajo condiciones ambientales controladas.

Si bien podemos encontrar trabajos donde se describe la importancia de determinados genes en caracteres de resistencia, en general estos mismos fueron producto de técnicas vinculadas con la mutagénesis en estos genes (Dudai *et al.* 1976; Quinn *et al.* 1974; Konopka & Benzer 1971). Sin embargo, los comportamientos y la resistencia están organizados por la interacción compleja entre genes, que contribuyen a la manifestación fenotípica en distintas formas. Los estudios sobre genes de gran efecto sobre comportamientos determinados y resistencias específicas han permitido una aproximación que precisa, para ir completando el rompecabezas, del estudio genómico

funcional y de la genética molecular. Las últimas técnicas han permitido diseñar complejos modelos de estudio que permiten diseccionar y a la vez sintetizar distintos trabajos de manera tal que podamos ir construyendo una idea completa de la arquitectura que subyace en los distintos caracteres.

El punto de partida para cualquier análisis genético sobre la resistencia es comenzar por buscar ensayos que permitan medir caracteres de genética cuantitativa. Si bien estos ensayos suelen ser complejos, es necesario buscar alternativas que nos permitan acceder a una idea general de la arquitectura genética del carácter de resistencia que buscamos mediante un ensayo lo más simple posible. Algunos ensayos sencillos se han logrado llevar adelante para un gran número de individuos y se los ha podido conectar con elementos constitutivos del “*fitness*” de las poblaciones en el hábitat natural (Huey *et al.* 1992; Hoffmann *et al.* 2003; Chen *et al.* 2002; Osborne *et al.* 1997; Greenspan & Ferveur 2000; Moehring & Mackay 2004; Anholt *et al.* 1996; Moore *et al.* 1998; Rothenfluh & Heberlein 2002).

Los caracteres de comportamiento, así como los de resistencia, suelen poder interpretarse de forma modular, por ejemplo, cuando hablamos de cortejo y apareamiento en *Drosophila*, estamos precisando de varios procesos simultáneamente, como ser el reconocimiento, la orientación, la movilidad, la vibración de alas y en última instancia la cópula (Osborne *et al.* 1997; Hall 1994). La variación fenotípica en cualquiera de estos componentes puede afectar el cortejo y el apareamiento en su totalidad. Cada uno de los ensayos que se puedan efectuar sobre el carácter pueden darnos la idea de que está sucediendo a nivel genético con uno o algunos, en el mejor de los casos, de los componentes de un carácter complejo y es por esto que son necesarios diferentes tipos de ensayos cuando se quiere dilucidar la arquitectura de un carácter cuantitativo.

Las diferencias en el fondo genético (“*genetic background*”) pueden afectar profundamente a los fenotipos de resistencia al estrés. Por ejemplo, si introducimos un elemento P² en un definido entorno genético puede causar alteraciones transcripcionales en cantidad de genes que poca relación parecerían tener entre ellos (Anholt *et al.* 2003), indicando que un solo polimorfismo puede afectar profundamente el perfil de transcripción, son estos ejemplos los que marcan la importancia de controlar el entorno genético lo más posible a la hora de avanzar con estudios de genética cuantitativa. Es

² Elemento P: Una familia de elementos transponibles que se usan frecuentemente como herramienta molecular para generar mutaciones y manipular el genoma de *D. melanogaster*.

por esto que una de las herramientas más poderosa hasta el momento para los análisis genéticos de la resistencia bajo entorno genético controlado en *D. melanogaster* son la construcción de líneas genéticamente idénticas, ya sea mediante líneas isogénicas para realizar análisis de mutaciones mediante elementos P, como líneas endogámicas recombinantes (*RIL* – “*recombinant inbreed lines*”) para mapeo de loci de caracteres cuantitativos (*QTL* – “*Quantitative traits loci*”), también existen otros tantos procedimientos utilizando líneas mutantes (mutantes con sistema GAL4-UAS, SNPs y otros).

Los caracteres de resistencia son muy sensibles a las variaciones ambientales, inclusive individuos genéticamente idénticos criados bajo condiciones ambientales controladas pueden presentar variaciones en sus caracteres. Este factor nos obliga a contar con muchos individuos a medir para cada línea así conseguimos la mayor precisión estadística posible para estimar las medias fenotípicas de manera tal que se minimice la varianza ambiental, pensemos que la variación fenotípica presente esta compuesta por dos elementos principales uno es el componente genético y otro el ambiental, en el caso de líneas genéticamente idénticas, en una misma línea las diferencias fenotípicas encontradas solo pueden explicarse por el ambiente, de ahí la importancia de controlar el ambiente de cría y medición así como asegurar un número de individuos réplicas suficientes para minimizar la variación ambiental en la estima de la media fenotípica del genotipo.

Los estudios de genética de caracteres cuantitativos en *Drosophila* típicamente involucran desde cientos a miles de individuos. El diseño de estos laboriosos experimentos requiere de particular atención en los efectos que pueda tener el ambiente sobre la expresión del fenotipo complejo a medir. El concepto de “ambiente común” utilizado en la genética cuantitativa refiere a cualquier condición ambiental que cause fenotipos similares entre los individuos que compartan esta condición respecto de otros individuos que no la compartan (Anholt & Mackay 2004). Por ejemplo, individuos de *Drosophila melanogaster* criados en el mismo tubo comparten un ambiente espacial en común, mientras que aquellos que comparten una misma experiencia en un mismo momento comparten un ambiente temporal común; también diferentes observadores o manipuladores son otra fuente de variación ambiental, tengamos en cuenta que este inconveniente representa uno de los más difíciles componentes de varianza a minimizar en las mediciones, para dar un ejemplo de ello pensemos que en el caso de poder contar con individuos criados en el mismo tubo, bajo idénticas condiciones ambientales

estándar, medidos en el mismo momento por el mismo operador precisaríamos que ambos individuos emerjan en el mismo momento, ya que de no ser así estaríamos contando con dos individuos de distinta edad al medir, y con esto ambos individuos dejarían de tener en común el tiempo de vida hasta el momento de la medición que es un factor ambiental más, si quisiéramos medir a ambos con la misma edad, probablemente no podamos hacerlo en el mismo momento lo que implicaría que dejaran de tener un ambiente temporal común. Puede verse que la situación es compleja y una forma adecuada de minimizar la varianza del ambiente es mediante el uso de muestras de gran tamaño.

Como si la situación no fuera lo suficientemente compleja ya, tenemos que agregar un elemento más a la hora de pensar en la varianza fenotípica, no solo tenemos que tener en cuenta la varianza aportada por la genética y la varianza aportada desde lo ambiental sino que es sumamente importante entender que existe un factor más que es la interacción entre estos dos elementos, o sea, la interacción genotipo-ambiente. Con esto queremos marcar que un mismo genotipo puede presentar distintas respuestas a una misma medición según el ambiente, por ejemplo el genotipo A puede ser muy resistente al calor en ambientes de alta humedad pero al bajar la humedad este mismo genotipo puede presentar menor resistencia, así como puede existir un genotipo B que le ocurra lo contrario (caso c de la Figura 1). Solo en el caso en que la magnitud y el sentido de la desviación de un valor fenotípico sea igual para ambos genotipos podemos decir que no hay interacción genotipo ambiente para esos genotipos y para esos ambientes en particular (caso a de la Figura 1)

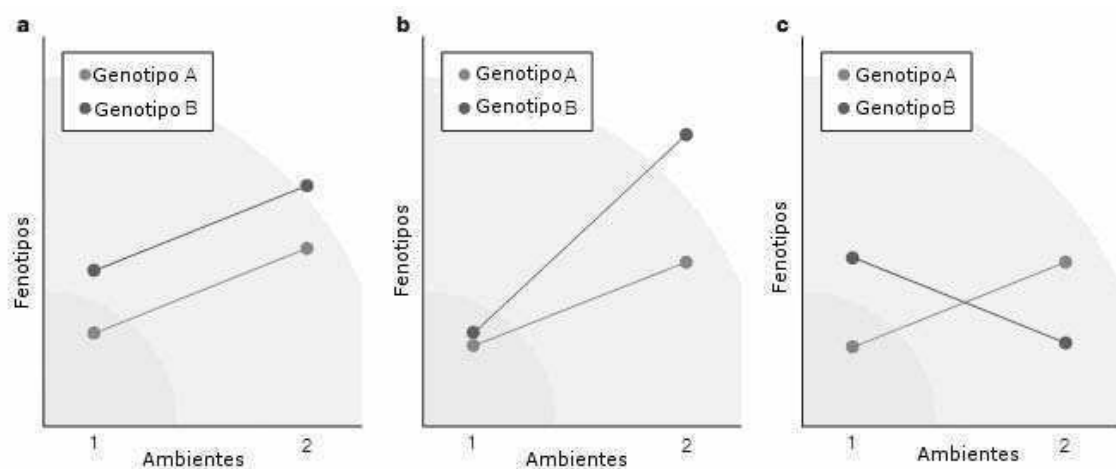


Figura 1. Interacción genotipo ambiente. Si diferentes genotipos difieren en el fenotipo con respecto de los distintos ambientes, eso es considerado interacción entre genotipo y ambiente.

Si bien tenemos que aclarar que varios caracteres de origen cuantitativo pueden presentar robustos resultados que sean reproducibles en diferentes laboratorios, cuando los resultados obtenidos en distintos laboratorios no son consistentes entre sí, esta discrepancia no necesariamente debe hacernos dudar de la validez de alguno de los dos, sino que debe pensarse en la posibilidad de no estar evaluando correctamente la interacción genotipo ambiente.

Una importantísima fuente de variación fenotípica a tener en cuenta en los caracteres de resistencia es el efecto de los distintos sexos. Machos y hembras no suelen separarse en los experimentos de genética cuantitativa excepto cuando se trata de experimentos relacionados al cortejo o a la copula. Las diferencias entre los valores medios fenotípicos de machos y hembras (dimorfismo sexual) para caracteres cuantitativos, incluidos los comportamentales, así como los de resistencia, suelen ser comunes (Anholt *et al.* 1996; Mackay *et al.* 1996; Devaud 2003; Belgacem & Martin 2002; Helfrich-Forster 2000).

Las variaciones fenotípicas producto del dimorfismo sexual pueden ser evaluadas de forma equivalente a la interacción genotipo-sexo como si cada sexo representase un ambiente diferente, y puede estar ocurriendo si una mutación o un QTL afecta a un único sexo (sexo-específico), así como si afecta a ambos sexos en diferente grado o en sentido opuesto (Rice 1992). El último caso es particularmente interesante porque si los distintos sexos afectan de forma opuesta en base al fenotipo producto de una mutación o de un QTL determinado, esta situación ayudaría a mantener la variabilidad genética para ese *loci* en poblaciones naturales. Claramente, una apreciación completa de la arquitectura genética de un carácter cuantitativo requiere que los sexos sean medidos de forma separada.

Una aproximación al estudio de estos caracteres es mediante el análisis de líneas de selección para algunos de los componentes de estos caracteres o para los caracteres en sí mismo. La selección artificial es una técnica de evolución experimental que se utiliza en organismos modelos desde hace tiempo, que sigue siendo utilizada exitosamente para generar fenotipos extremos y evaluar correlaciones genéticas entre caracteres (resumen de trabajos de líneas de selección para la tolerancia térmica en Hoffmann *et al.* 2003). Es mediante estas líneas de selección que pueden establecerse primeramente el tipo de carácter que estamos evaluando, nos permite saber si un carácter es heredable, si es de herencia fuertemente cuantitativa y a la vez nos permite establecer correlaciones fenotípicas que nos permiten avanzar sobre estudios más

complejos para dilucidar las bases genéticas y moleculares de lo observado en estos experimentos.

Una de las técnicas de uso relativamente extendido en la genética cuantitativa es el mapeo de QTL en organismos modelos. Este estudio nos permite tener una mirada sistémica sobre las regiones de un genoma que están implicadas en la conservación de la variación genética natural en los caracteres cuantitativos, o sea, nos permite evaluar la arquitectura genética sin tener que interrumpir funciones o anular genes, podemos analizar parte de la complejidad de la base genética de estos caracteres con un mínimo de manipulación genética. Las regiones genómicas definidas como QTL por estos estudios pueden verse de forma cada vez más detalladas mediante mapeos de alta resolución o por pruebas de complementación. Un diseño completo podría implicar hasta la identificación y validación de genes candidatos encontrados en un mapeo de QTL mediante pruebas de complementación cuantitativa (Mackay 2004).

El emergente de la situación actual de la genética de caracteres cuantitativos es de una dinámica superposición de redes de genes pleiotrópicos (Anholt & Mackay 2004). La actualidad plantea varios desafíos a saber. ¿Cuáles son los alcances de los efectos pleiotrópicos en los genes? ¿Hasta donde pueden extenderse los efectos de un gen y sus interacciones? ¿Cómo las arquitecturas genéticas pueden modificarse en función del ambiente? ¿Qué efecto posee el dimorfismo sexual en estos caracteres? Y por último ¿Cómo es que las arquitecturas genéticas que explican los caracteres cuantitativos evolucionan? Estos desafíos definen futuras y presentes áreas de investigación en la genética cuantitativa, y podrán responderse siendo cuidadosos en la cuantificación de los fenotipos, estando atentos al entorno genético de las líneas con las que trabajamos, los efectos producto del dimorfismo sexual y prestando particular atención a los efectos pleiotrópicos de los genes que intervienen en caracteres cuantitativos.

Bibliografía de la Introducción

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

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

Anholt, R. R. H. & Mackay, T. F. C. (2004). Quantitative genetic analyses of complex behaviours in *Drosophila*. *Nature Reviews Genetics*, 5, 838-849.

Belgacem, Y. H. & Martin, J. R. (2002). Neuroendocrine control of a sexually dimorphic behavior by a few neurons of the pars intercerebralis in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 15154-15158.

Chen, S., Lee, A. Y., Bowens, N. M., Huber, R. & Kravitz, E. A. (2002). Fighting fruit flies: A model system for the study of aggression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 5664-5668.

Devaud, J. M. (2003). Experimental studies of adult *Drosophila* chemosensory behaviour. *Behavioural Processes*, 64, 177-196.

Dudai, Y., Jan, Y. N., Byers, D., Quinn, W. G. & Benzer, S. (1976). *dunce*, a mutant of *Drosophila* deficient in learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73, 1684-1688.

Falconer, D. S. & Mackay, T. F. C. (1996). *Introduction to quantitative genetics*. Essex, U.K: Addison-Wesley Longman.

Greenspan, R. J. & Ferveur, J. F. (2000). Courtship in *Drosophila*. *Annual Review of Genetics*, 34, 205-232.

Hall, J. C. (1994). The mating of a fly. *Science*, 264, 1702-1714.

Helfrich-Forster, C. (2000). Differential Control of Morning and Evening Components in the Activity Rhythm of *Drosophila melanogaster*--Sex-Specific Differences Suggest a Different Quality of Activity. *Journal of Biological Rhythms*, 15, 135-154.

Hoffmann, A. A., Sorensen, J. G. & Loeschcke, V. (2003). Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *Journal of Thermal Biology*, 28, 175-216.

Huey, R. B., Crill, W. D., Kingsolver, J. G. & Weber, K. E. (1992). A Method for Rapid Measurement of Heat Or Cold Resistance of Small Insects. *Functional Ecology*, 6, 489-494.

Konopka, R. J. & Benzer, S. (1971). Clock Mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68, 2112-2116.

Mackay, T. F. C. (2001). The genetic architecture of quantitative traits. *Annual Review of Genetics*, 35, 303-339.

Mackay, T. F. C. (2004). The genetic architecture of quantitative traits: lessons from *Drosophila*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 14, 253-257.

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

Moehring, A. J. & Mackay, T. F. C. (2004). The quantitative genetic basis of male mating behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 167, 1249-1263.

Moore, M. S., DeZazzo, J., Luk, A. Y., Tully, T., Singh, C. M. & Heberlein, U. (1998). Ethanol intoxication in *Drosophila*: Genetic and pharmacological evidence for regulation by the cAMP signaling pathway. *Cell*, 93, 997-1007.

Osborne, K. A., Robichon, A., Burgess, E., Butland, S., Shaw, R. A., Coulthard, A., Pereira, H. S., Greenspan, R. J. & Sokolowski, M. B. (1997). Natural Behavior Polymorphism Due to a cGMP-Dependent Protein Kinase of *Drosophila*. *Science*, 277, 834-836.

Quinn, W. G., Harris, W. A. & Benzer, S. (1974). Conditioned Behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71, 708-712.

Rice, W. R. (1992). Sexually antagonistic genes: experimental evidence. *Science*, 256, 1436-1439.

Rothenfluh, A. & Heberlein, U. (2002). Drugs, flies, and videotape: the effects of ethanol and cocaine on *Drosophila* locomotion. *Current Opinion in Neurobiology*, 12, 639-645.

CAPITULO I

*“Respuestas directas y correlacionadas a la selección para la recuperación del coma por enfriamiento en *Drosophila buzzatii*.”*

Resumen

La recuperación al coma por enfriamiento (*Chill-Coma recovery –CCR-*) es un importante carácter para la adaptación térmica en insectos. Múltiples fenotipos pueden ser afectados por la selección al CCR si este carácter está correlacionado genéticamente con otros caracteres adaptativos. Para evaluar la heredabilidad de la (co-)variación en CCR, examinamos las respuestas directas y correlacionadas a la selección bi-direccional para CCR. Una población autóctona de *Drosophila buzzatii* Patterson & Wheeler (*Diptera: Drosophilidae*) fue artificialmente seleccionada para el aumento y la disminución de los tiempos de recuperación luego de la exposición a 0°C. Luego de 18 generaciones de selección, la respuesta a la misma en CCR fue significativa y asimétrica entre ambos extremos, donde las líneas réplicas seleccionadas para lenta recuperación CCR mostraron la más importante respuesta. Otros caracteres fueron medidos, la resistencia al “*Knockdown*” en altas temperaturas no mostró tener una respuesta correlacionada a la selección para CCR. La resistencia al hambre en moscas adultas no mostró un patrón de respuesta correlacionada a la selección para CCR, tampoco tuvo impacto en el tiempo de desarrollo y el tamaño corporal. En principio, CCR no mostró ningún compromiso (“*trade-offs*”) genético con ninguno de los múltiples caracteres medidos en esta etapa. Este resultado es consistente con estudios recientes de clinas en *D. buzzatii*, en los cuales CCR no mostró correlaciones con el tiempo de desarrollo y el tamaño corporal a través de poblaciones a lo largo de una clina térmica. La adaptación al frío puede ser que se vea afectada por fuerzas evolutivas aumentando la resistencia a las bajas temperaturas independientemente de la resistencia a las altas temperaturas y a otros caracteres adaptativos.

Introducción

La resistencia al estrés por frío es un carácter genéticamente variable en muchas especies de insectos y en otros organismos (Angilletta 2009b; Hoffmann & Parsons 1991). En el género *Drosophila*, cada especie muestra un rango estrecho específico de temperaturas óptimas y un rango mucho más amplio de temperaturas sub-óptimas en las cuales estas especies pueden sobrevivir (revisado en Hoffmann *et al.* 2003). La sensibilidad al frío puede ser un factor importante en el moldeado de los límites climáticos tanto para la distribución como para la abundancia de las especies de insectos (Chown 2001; Gibert & Huey 2001; Hoffmann *et al.* 2004; Kimura 2004). Las respuestas a la selección para los extremos de temperatura han sido más ampliamente estudiadas en *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae) que en cualquier otro organismo ectotérmico (Angilletta 2009a; Angilletta 2009b; David *et al.* 2003; Hoffmann & Parsons 1991; Hollingsworth & Bowler 1966; MacMillan *et al.* 2009; Maynard Smith 1956; Sinclair *et al.* 2007). En adultos de *Drosophila* y en varios otros insectos, la resistencia a las bajas temperaturas puede ser medida como la recuperación del coma por el enfriamiento (CCR). CCR se estima como el tiempo que el individuo experimental demora en recuperar la movilidad una vez que sale del coma producido por el enfriamiento, este registro temporal se efectúa a partir del momento en que se lo expone a una temperatura benigna –en general 25°C- (Anderson *et al.* 2005a; David *et al.* 1998; Gibert *et al.* 2001). La recuperación al coma por enfriamiento es uno de los muchos caracteres fenotípicos que pueden ser medidos para estimar la tolerancia a las bajas temperaturas (ver Angilletta 2009b para otros organismos ectotérmicos; Hoffmann *et al.* 2003). En *Drosophila*, CCR está íntimamente relacionado con relevantes diferencias ecológicas en la ocupación de nichos térmicos por varias de las distintas especies del género, así como en las variaciones geográficas dentro y entre especies de *Drosophila* (Anderson *et al.* 2005a; David *et al.* 2003; Gibert *et al.* 2001; Hoffmann *et al.* 2002; Hoffmann *et al.* 2003; Kimura 2004; Kristensen *et al.* 2008).

De los estudios experimentales evolutivos previos, podemos concluir que CCR como método de medición respecto de la supervivencia al frío presentó la ventaja de permitir la selección para ambas direcciones (lenta y rápida recuperación) con un procedimiento mucho más simple que el necesario en la supervivencia al frío. Sin embargo, el hecho de que CCR fuese o no heredable para ambas direcciones es aún algo muy poco estudiado (Ej. Mori & Kimura 2008). Es curioso resaltar que en los últimos

años, un loci de caracteres cuantitativos (“*Quantitative trait loci*” –*QTL*-) de gran efecto fue detectado afectando de manera antagónica a CCR y al coma por calor en *D.melanogaster* (Morgan & Mackay 2006; Norry *et al.* 2008). Sin embargo, otros QTL encontrados para CCR parecen ser específicos para el carácter, sugiriendo que la resistencia al frío y la resistencia al calor presentan arquitecturas genéticas mayoritariamente independientes (Norry *et al.* 2008). Aún así, respuestas directas y correlacionadas a la selección bi-direccional para CCR deben ser puestas a prueba para evaluar los posibles costos y beneficios (o “*trade-off*” entre los autores angloparlantes) entre la tolerancia al frío y la resistencia al calor (Mori & Kimura 2008).

En los experimentos de selección artificial, las diferentes poblaciones réplica exhiben habitualmente importantes diferencias para los caracteres de termotolerancia seleccionados (Chen & Walker 1994; Chen & Walker 1993; Hoffmann *et al.* 2003; Huey *et al.* 1992; Mori & Kimura 2008). Una de las ventajas de los experimentos de selección artificial es la posibilidad de evaluar no solo las respuestas directas, sino también las respuestas correlacionadas a la selección bi-direccional. En este estudio, pusimos a prueba si la respuesta a la selección para CCR es significativa cuando se selecciona en ambos sentidos posibles. Para evaluar las probables respuestas correlacionadas a la selección bi-direccional sobre CCR consideramos los siguientes caracteres: la resistencia al coma por calor (o “*Knockdown resistance to high temperatura*”, –*KRHT*-), el tiempo de desarrollo (o “*developmental time*” –*DT*-), el tamaño corporal (o “*body size*” –*BS*-), la resistencia al hambre (o “*starvation resistance*” –*SR*-) y la resistencia al etanol (o “*resistance to ethanol vapor*” –*REV*-).

Las relaciones entre los caracteres suelen ser sumamente complejas y los resultados de los estudios difícilmente pueden ser comparados, menos aún cuando estos son realizados sobre distintas especies o distintas poblaciones (Hoffmann *et al.* 2003). Por ejemplo, según algunos trabajos previos la resistencia al calor (KRHT) puede ser afectada por la selección artificial para CCR si existe un fuerte compromiso genético (“*trade-offs*”) entre la resistencia al frío y al calor (Hoffmann *et al.* 2002; Morgan & Mackay 2006; Norry *et al.* 2008; Overgaard & Sorensen 2008). Sin embargo, otros estudios no encontraron una correlación negativa consistente entre la tolerancia al frío y al calor (Anderson *et al.* 2005b; Bublly & Loeschcke 2005; Sorensen *et al.* 2005).

Anderson *et al.* (2005) pudieron observar que la selección para rápida recuperación al coma por enfriamiento no tuvo impacto en la recuperación del coma por calor en una población experimental de *D. melanogaster*. Mori & Kimura (2008) solo

encontraron una relación débil unidireccional y sobre determinadas condiciones experimentales.

El tiempo de desarrollo puede también estar vinculado a interacciones con la adaptación térmica (Mori & Kimura 2008). Por ejemplo, se descubrieron clinas altitudinales para el tiempo de desarrollo, que puede estar relacionadas con la selección por caracteres de termotolerancia en *Drosophila buzzatii* (Sambucetti *et al.* 2006). También, la resistencia al hambre puede estar influenciada indirectamente por el tamaño corporal, donde tamaños corporales mayores permitirían almacenar mayores cantidades de lípidos, generando así clinas térmicas altitudinales para la resistencia al hambre en *D. buzzatii* (Sorensen *et al.* 2005). Por último, la tolerancia al etanol puede estar vinculada a la resistencia al frío según algunos trabajos previos (Fry 2003; Hoffmann *et al.* 2003). En este estudio nosotros probamos las posibles correlaciones de los múltiples caracteres mencionados previamente con la respuesta a la selección bi-direccional sobre CCR.

Objetivos:

- Evaluar si CCR es un **caracter heredable**
- Si es heredable, evaluar si lo es para **ambos extremos** y si se obtienen **respuestas simétricas** a la presión de selección
- Si es heredable, evaluar **posibles correlaciones** con otros caracteres que presentan relación con la respuesta al frío en la bibliografía.

Materiales y Métodos

Para este estudio, nosotros seleccionamos artificialmente en la especie cactofílica *D. buzzatii* tanto para rápida como para lenta recuperación al coma por enfriamiento.

Las moscas fueron seleccionadas desde de una cepa de laboratorio que fue generada a partir de un muestreo en una población natural a mediados de abril de 2003 en la localidad de Chumbicha, Provincia de Catamarca, Republica Argentina (28°52' S, 66°15' O). El tratamiento selectivo para la recuperación al coma por enfriamiento se comenzó a aplicar una vez pasadas 35 generaciones en el laboratorio, dado que este período transcurrido entre la recolección de las moscas y el comienzo del tratamiento selectivo permitió trabajar con individuos ya adaptados a condiciones de laboratorio, de lo contrario, de haber comenzado con el tratamiento selectivo inmediatamente después de la recolección de las moscas no se podría diferenciar la selección del carácter de

interés de la selección producto de las condiciones de laboratorio, condición que para las moscas recolectadas representa un tratamiento selectivo (Sgro & Partridge 2000). La selección se llevó a cabo de la siguiente manera: se separó a la población base en nueve subpoblaciones independientes, tres de ellas fueron seleccionadas para lenta recuperación al coma por enfriamiento (“*slow chill-coma recovery*” – *SCCR*), otras tres para rápida recuperación al coma por enfriamiento (“*rapid chill-coma recovery*” – *RCCR*) y las últimas tres no se seleccionaron en ningún sentido y fueron utilizadas como controles. Ambos tratamientos selectivos fueron aplicados durante siete generaciones de forma consecutiva, luego se aplicó el mismo tratamiento generación de por medio durante otras 21 generaciones (la última generación obtenida luego del tratamiento fue la generación 28 (G28) contando desde el comienzo de la selección, en este punto el total de generaciones acumuladas de selección fue 18). Para evitar cualquier posible variación circadiana, tanto los procesos de selección como todas las mediciones de respuesta a distintos estrés (CCR, KRHT y REV) se realizaron entre las 11:30 h y 15:30 horas, ya que se conocen caracteres que varían su respuesta luego del atardecer, incluso en moscas criadas en laboratorio (Sorensen & Loeschcke 2002).

Los tratamientos selectivos se hicieron de la siguiente manera. Moscas de 4 días de edad adulta (o sea, 4 días luego de la eclosión) fueron ubicadas en tubos vacíos y colocadas durante 20 horas dentro de un recipiente térmico que contenía hielo molido (0°C), este recipiente fue colocado a su vez en una habitación refrigerada (4°C). Luego de las 20 horas, las moscas fueron puestas nuevamente a 25°C.

Para cada línea réplica de *SCCR*, en cada generación de selección, aproximadamente el 30% de los individuos que mostraron los valores más lentos de recuperación al coma por enfriamiento fueron seleccionados como progenitores para la siguiente generación, luego de la selección quedaron en promedio 350 moscas por línea réplica para fundar la siguiente generación. Para *RCCR*, se utilizaron como progenitores de la siguiente generación el 30% de las moscas que presentaron los valores más veloces de recuperación al coma por enfriamiento, también se utilizaron en promedio 350 individuos para fundar la generación siguiente a la selección. Por último, las líneas Control fueron mantenidas simultáneamente junto con el proceso selectivo de las líneas *SCCR* y *RCCR* en condiciones estándar de laboratorio a 25°C.

Todas las líneas fueron mantenidas en 5 botellas estándar, con un promedio de 70 individuos adultos por botella. Las botellas estándar en este estudio fueron botellas de 125 ml que contenían aproximadamente 30 ml de medio de cultivo (de aquí en más

nos referiremos a este medio como botellas estándar de cultivo). Como medio de cultivo para *Drosophila* utilizamos durante el experimento puré instantáneo de papas, agua y levadura viva disecada.

La respuesta a la selección para CCR fue medida en las generaciones G8, G15 y G28 respecto del inicio del tratamiento selectivo (generaciones 7, 11 y 18 de selección respectivamente) en moscas de 4-5 días de edad. Para medir CCR, las moscas fueron sexadas usando un tratamiento de frío a 0°C durante 5 minutos (las moscas quedan inmóviles a esta temperatura). Las moscas una vez sexadas fueron transferidas inmediatamente a tubos vacíos y colocados durante 20 horas en un recipiente térmico con hielo granizado (0°C) que a su vez fue depositado en una habitación refrigerada (4°C). Luego de las 20 horas a 0°C, volvimos a poner a las moscas a 25°C. Consideramos al tiempo de recuperación desde el coma por enfriamiento (CCR) como el tiempo que le llevó a cada individuo incorporarse sobre sus patas medido en segundos (Norry *et al.* 2008)

Una vez que se completó esta etapa de selección (G28), varios caracteres fueron medidos en todas las líneas réplicas para poner a prueba posibles repuestas correlacionadas a la selección para CCR. En primer lugar, medimos KRHT para alrededor de 30 moscas de 4-5 días de edad por línea y por sexo. Las moscas de ambos sexos fueron liberadas simultáneamente en una columna para knockdown estabilizada a $37,5 \pm 0,5$ °C (ver figura 1)

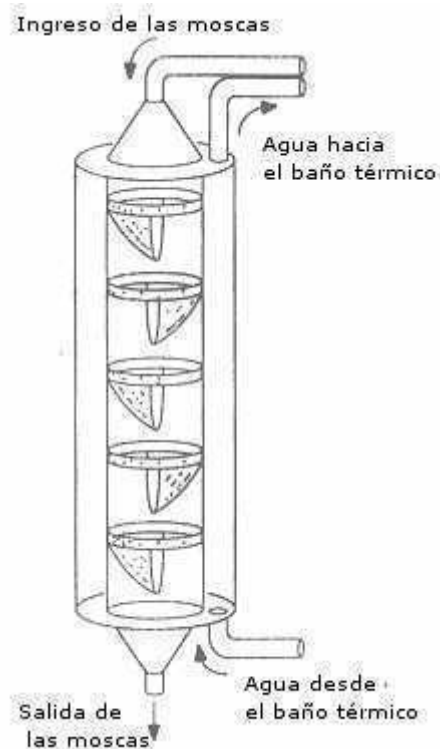


Figura 1. Columna de *knockdown* utilizada para medir KHRT. Mediante un baño térmico y una bomba de circulación se logra una temperatura interior estable en la columna de $37,5 \pm 0,5$ °C. La columna tiene una dimensión de 5 cm de diámetro por 62,5 cm de alto.

La resistencia al coma por alta temperatura se midió colectando mediante un tubo puesto en la salida inferior de la columna las moscas que fueron cayendo producto del estrés térmico que les obliga a perder el control postural. Se colectaron las moscas que iban cayendo en los tubos que fueron reemplazándose cada 30 seg comenzando a partir del momento de introducir las moscas en la columna hasta que la última de ellas abandonó la misma por su parte inferior. Se tomó el registro de los tiempos para cada individuo y se realizó el análisis para cada sexo por separado.

La resistencia al hambre (“*starvation resistance*” – *SR* -) fue medida utilizando entre 5 o 6 tubos réplica para cada línea, en cada uno de ellos se colocaron 10 machos junto con 10 hembras de 2 o 3 días de edad. Estos tubos (2 x 11 cm) contenían 5 ml de solución de agar-agua. Los tubos fueron conservados durante toda la medición a 25°C y la mortalidad fue registrada tres veces por día (8 – 14 – 20 horas) hasta que la última mosca murió.

El tiempo de desarrollo y el tamaño corporal (“*developmental time*” – *DT* – y “*thorax length*” – *TL* -, este último como índice del tamaño corporal: “*body size*” – *BS* -) fueron medidos en individuos criados a una densidad larvaria estandarizada (100

huevos para cada botella de 250 ml con 30 ml de medio de cultivo) en dos botellas réplicas por línea. Para medir el tiempo de desarrollo se registro durante tres veces al día (8 – 14 – 20 horas) la cantidad de individuos eclosionados. La temperatura durante todo el experimento fue de 25°C. Por último, en esta etapa, se midió el tamaño del tórax como índice del tamaño corporal en las moscas eclosionadas en el experimento de tiempo de desarrollo. Para esto se tomó la distancia entre el margen anterior del tórax y la protuberancia posterior del *scutellum* usando un ocular con micrómetro con un aumento de 40×.

Luego de 27 generaciones de descanso consecutivas, en donde no se seleccionó ni se midió ningún caracter se volvieron a retomar estas líneas para efectuar unos últimos experimentos con las mismas. Para ello se montó un tratamiento selectivo como el ya descrito anteriormente durante 6 generaciones (3 de selección y 3 de descanso intercaladas) con el objetivo de minimizar los efectos de la deriva génica y la acumulación de mutaciones producto de la falta de selección artificial durante un tiempo prolongado.

Una vez terminado con este pequeño tratamiento selectivo se procedió a medir tanto el caracter seleccionado nuevamente como un nuevo caracter que posiblemente estuviese correlacionado con el tratamiento selectivo.

Todos los individuos experimentales de cada línea fueron criados bajo condiciones estandarizadas a 25°C bajo un ciclo de 12-horas de oscuridad/12-horas de luz manteniendo las condiciones hasta aquí utilizadas para la cría de los individuos experimentales en todos los experimentos.

Para cada una de las líneas réplicas y para cada sexo, 5 mediciones réplicas de aproximadamente 20 moscas cada una, fueron registradas para CCR como se describió anteriormente. En esta oportunidad se contó con un programa desarrollado por el autor de esta tesis especialmente diseñado para llevar adelante este tipo de registro que permitió medir una mayor cantidad de individuos en menor tiempo aumentando considerablemente la precisión y eficiencia del método (*ver ANEXO D*). El análisis estadístico efectuado en esta oportunidad fue distinto del realizado en la G28 debido a que en ese momento no contábamos con una cantidad suficiente de individuos y réplicas, en esta oportunidad utilizamos el tiempo de recuperación media (MRT), entendido como el momento en que el 50% de las moscas en una muestra se había recuperado, este valor fue estimado para cada muestra con el programa SigmaPlot (SPSS Inc., Chicago, IL) (para más detalles sobre el método estadístico ver Berger *et al.*

2004). Los valores de MRT de las 5 repeticiones se promediaron para obtener una estimación de CCR para cada línea réplica y cada sexo. También se realizó el análisis con las medias de cada muestra en lugar del MRT buscando ver si los métodos estadísticos utilizados en las distintas etapas eran significativamente distintos.

En esta misma generación (G34 de selección, 28 iniciales más las 6 de esta última etapa) se midió la resistencia al vapor de etanol (“*resistance to ethanol vapor*” – REV -) para analizar la posible correlación de este carácter con el tratamiento selectivo. REV se midió como la proporción de individuos que se mantienen activos en tubos de vidrio (11cm de largo y 2,5 cm de diámetro). Para separar a ambos sexos se utilizó tratamiento de anestesia con CO₂ por lo menos 48 horas antes del ensayo, se colocaron en cada tubo 20 a 25 moscas de 5 días de edad de cada sexo de cada línea réplica. Utilizamos 5 muestras réplicas para cada una de las líneas y para cada sexo. Todas las medidas se realizaron a 25 ° C.

Para el tratamiento de estrés, las moscas fueron expuestas 10 min en un tubo invertido con tapón de algodón embebido en una solución de etanol/agua (70:30) cubierto por un tul (figura 2). Después de 10 min se anotó la proporción de individuos que fue capaz de sostenerse sobre sus piernas en cada uno de los tubos (para ver un método similar ver Hoffmann & Parsons 1993). El valor medio de las proporciones para los 5 viales, multiplicado por 1000, se utilizó para obtener la estimación final de REV para cada línea.

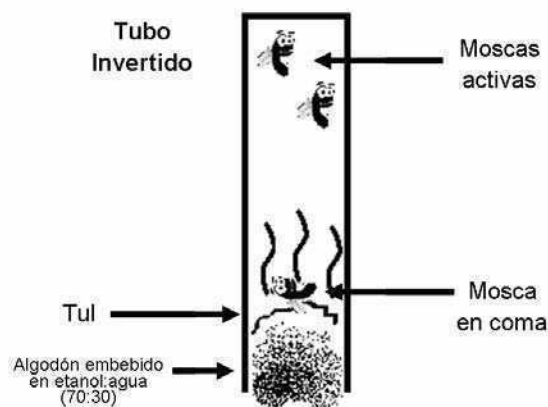


Figura 2. Diagrama de tubo invertido utilizado para la medición de la resistencia a los vapores de etanol (REV).

Resultados

Las líneas respondieron de forma significativa a la selección para CCR. La diferencia entre los tratamientos RCCR y SCCR fue marginalmente significativa para la G8 y altamente significativa tanto para la G15 como para la G28 (Figura 3; Tabla 1).

Tabla 1. Prueba de ANOVA realizado para evaluar las posibles diferencias en los valores medios de CCR en *Drosophila buzzatii* entre las líneas seleccionadas y las controles para la G8, G15 y G28 desde el comienzo del experimento de la selección.

Fuente de variación	G8			G15			G28		
	d.f.	MS	F	d.f.	MS	F	d.f.	MS	F
(1) Selección para CCR	2	10 121 417	4.64	2	511 847 273	5.52*	2	59 750 691	21.43**
(2) Réplicas dentro de (1)	6	2 351 734	3.26	6	93 607 355	6.59*	6	28 537 658	4.55*
(3) Sexo	1	860 391	1.18	1	23 250 313	1.64	1	288 684	0.46
(1)*(3)	2	657 300	0.90	2	8 866 725	0.62	2	355 482	0.57
(2)*(3)	6	720 892	0.93	6	14 191 372	2.30*	6	626 727	1.64
Dentro	529	771 070		750	6 144 338		1 465	380 734	

*P<0.05; **P<0.01.

MS, cuadrados medios; d.f., grados de libertad

De cualquier manera la respuesta a la selección fue asimétrica, con una mayor respuesta para SCCR que para RCCR (la prueba de contraste *a posteriori* Tukey-Kramer: P<0.05; Figura 3). La selección para CCR no presentó dimorfismo sexual para ninguna generación experimental medida en el ensayo (Tabla 1).

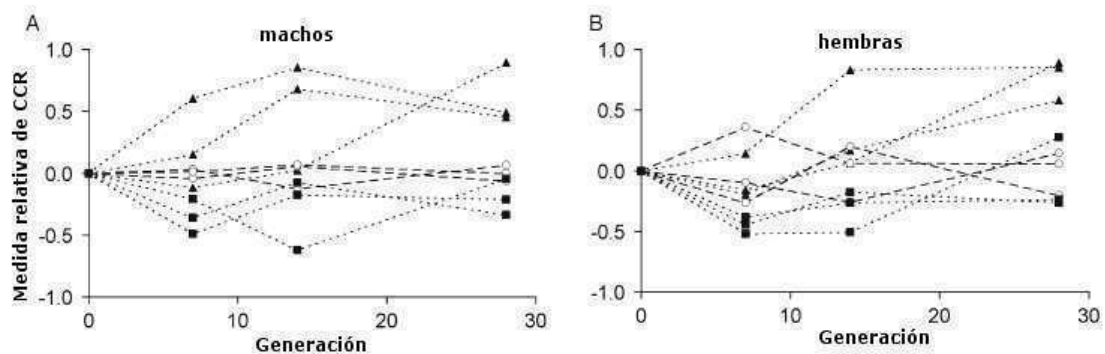


Figura 3. CCR en las líneas réplicas para los machos (A) y para las hembras (B) de *Drosophila buzzatii* seleccionadas para SCCR (triángulos) y para RCCR (cuadrados). Las líneas control (círculos vacíos) no fueron seleccionadas para ningún carácter. CCR fue medido luego de la exposición a 0°C en las generaciones G8, G15 y G28. En esta figura los valores de CCR se presentan como el valor medio para cada línea dividido el promedio de los controles de esa generación [$X_i' = (X_i - C_m)/C_m$], donde X_i es el valor medio de CCR en la línea “i” y C_m es el valor medio de CCR para las tres líneas control en esa generación.

Los resultados para KRHT indicaron que este caracter no se vio afectado por la selección para CCR en la población en estudio (Figura 4B; Tabla 2). El resultado para SR presentó efectos significativos para el efecto línea así como para el efecto sexo [ANOVA con efectos fijos “Selección para CCR” (1) y “Sexo” (2), y efecto aleatorio “réplicas dentro de (1)” (3); (1) $F_{2,6} = 14.90$, $P < 0.01$; (2) $F_{1,6} = 31.15$, $P < 0.001$; (3) $F_{6,6} = 9.95$, $P < 0.01$; las interacciones entre los factores fueron no significativas: (1)x(2) $F_{2,6} = 2.60$, $P > 0.05$; (2)x(3) $F_{6,1030} = 1.30$, $P > 0.05$]. Sin embargo, la prueba de contraste a posteriori de Tukey-Kramer indicó que la respuesta del caracter SR respecto de la selección para CCR no es sencilla, las líneas C fueron menos resistentes para SR que SCCR y que RCCR ($P < 0.05$ y 0.01 , respectivamente; Figura 4D).

Tabla 2. Prueba de ANOVA para las diferencias entre las líneas de selección de CCR y las líneas control de *Drosophila buzzatii* para los siguientes caracteres: KRHT, DT y TL en la generación G28.

Fuente de variación	KRHT			DT			TL		
	d.f.	MS	F	d.f.	MS	F	d.f.	MS	F
(1) Selección para CCR	2	8 656 634	1.41	2	11 908	1.04	2	0.351167	4.43
(2) Réplicas dentro de (1)	6	6 446 364	4.72*	6	12 001	15.5**	6	0.079277	8.65**
(3) Sexo	1	10 817 260	8.27*	1	8 979	11.9*	1	4.480889	488***
(1)*(3)	2	2 221 598	1.67	2	443	0.59	2	0.002055	0.22
(2)*(3)	6	1 365 163	2.03	6	775	2.43*	6	0.009167	0.39
Dentro	1 434	672 298		799	319		162	0.02358	

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

MS, cuadrados medios; d.f., grados de libertad

Los caracteres DT y TL no parecen ser afectados por la selección para CCR (Figura 4A,C; Tabla 2). Es interesante mencionar que todos los caracteres antes mencionados a excepción de CCR presentaron diferencias significativas entre los sexos mientras que no se encontró interacción entre sexo y la selección para CCR que fuese significativa.

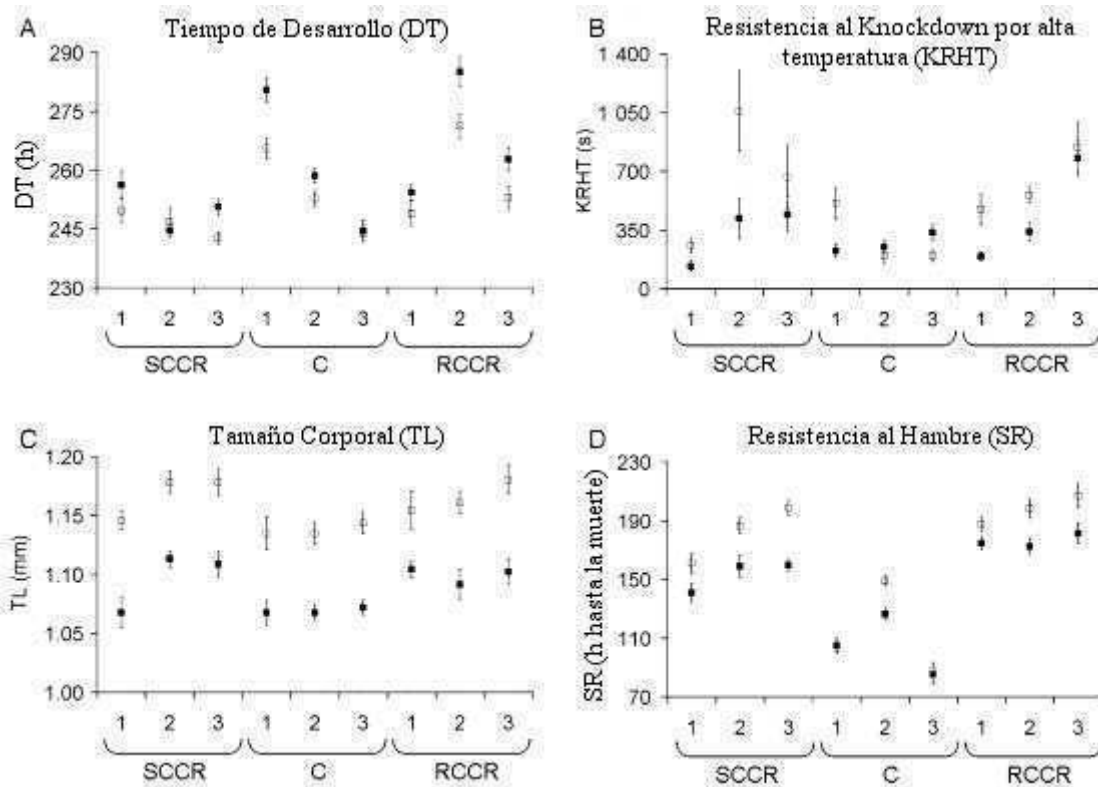


Figura 4. Valores medios de cada línea (\pm Error estándar) para cada caracter medido en *Drosophila buzzatii* en la G28. SCCR corresponde a las líneas réplicas seleccionadas para lenta CCR, RCCR corresponde a las seleccionadas para rápida CCR y C corresponde a las líneas control (no seleccionadas). Símbolos rellenos y vacíos corresponden a machos y hembras respectivamente.

Por último, la medición de CCR efectuada en la G34, luego de la selección durante 3 generaciones más, fue analizada tanto para las medias, de la misma forma que para las generaciones anteriores, como para el análisis estadístico propuesto por Berger et al. (2004). Para ambos casos se puede observar diferencias altamente significativas para el efecto del tratamiento selectivo, mientras que el efecto sexo, consistentemente con lo visto en las mediciones efectuadas en generaciones previas, no mostró diferencias significativas, así como tampoco se observaron valores significativos para las interacciones entre los efectos. Cuando realizamos el contraste a posteriori de Tukey-Kramer vemos que para esta medición la línea RCCR difiere significativamente de SCCR y C, no así estas dos últimas que no mostraron diferencias entre ellas (Tabla 3). La medición de REV reveló un interesante resultado, el efecto tratamiento fue significativo, al realizar los contrastes, RCCR volvió a mostrar diferencias significativas respecto a SCCR y C, no así estas dos últimas cuando se las comparó entre ellas. El efecto sexo no fue significativo para este caracter (Tabla 3). El resultado de REV fue

similar al obtenido para CCR en esta última generación sugiriendo que existe una posible correlación genética entre ambos caracteres.

Tabla 3. Prueba de ANOVA para las diferencias entre las líneas de selección de CCR y las líneas control de *Drosophila buzzatii* para CCR, también para el mismo carácter analizado por el estadístico MRT -CCR(MRT)- según Berger et al. 2004 y por último para REV en la generación G34.

Fuente de variación	CCR			CCR (MRT)			REV		
	d.f.	MS	F	d.f.	MS	F	d.f.	MS	F
(1) Selección para CCR	2	164518667	22.67**	2	11294459	17.73**	2	5204	24.27**
(2) Réplicas dentro de (1)	6	7405641	3.87	6	636864	5.92*	6	214	0.18
(3) Sexo	1	1854915	0.99	1	89590	0.83	1	288	0.25
(1)*(3)	2	1188090	0.63	2	104655	0.97	2	89	0.08
(2)*(3)	6	1913646	3.47**	6	107408	0.76	6	1159	3.99**
Dentro	1386	551205		72	140512		72	290	

*P<0.05; **P<0.01

MS, cuadrados medios; d.f., grados de libertad

Discusión

La recuperación al coma por enfriamiento (CCR) respondió significativamente a la selección artificial, así es como SCCR divergió sustancialmente de RCCR. Las diferencias en CCR fueron mayores entre SCCR y C en la G28 que en la G15, mientras que las diferencias entre RCCR y C fueron aproximadamente las mismas entre G28 y G15 (Figura 3; Tabla 1). La relación entre la línea control y las líneas seleccionadas se invirtió en la G34. Estos resultados, en principio, indican que CCR es un carácter heredable en *D. buzzatii*, como recientemente se evidenció en otras especies de *Drosophila* (Anderson et al. 2005a; Mori & Kimura 2008), pero, en principio la respuesta a la selección mostró ser mayor para SCCR que para RCCR. Este patrón asimétrico de respuesta también fue encontrado en *D.melanogaster* (Mori & Kimura 2008) y permite suponer que o bien la población base se encontraba parcialmente adaptada al frío o bien CCR es un carácter bajo la presión de la selección natural sin fuertes compromisos o “trade-offs” (Anderson et al. 2005a; Mori & Kimura 2008). *Drosophila buzzatii* es una especie expuesta a bajas temperaturas durante el invierno en el sitio de origen de la población base (Norry et al. 2006; Sorensen et al. 2005). Por lo tanto, alelos que confieran mayor rapidez para CCR pueden encontrarse en mayores frecuencias en la población base que aquellos alelos que retardan la CCR, resultando esto en un patrón asimétrico de respuesta a la selección bi-direccional como se observa

en este estudio. Una vez relajada la presión de selección, y transcurrida una cantidad importante de generaciones antes de la última medición de CCR es de esperar que mutaciones se acumulen en las poblaciones y que los efectos de la deriva se hagan más evidentes en las mismas, es por eso que nos vimos obligados a retomar la selección durante unas tres generaciones para disminuir los efectos de las mutaciones y la deriva. Durante este proceso las líneas C no fueron modificadas. La inversión del patrón respecto de la respuesta a la selección para la G34, donde RCCR mostró las mayores diferencias respecto a C se puede explicar debido a la acumulación de mutaciones y el efecto de la deriva producto de la numerosa cantidad de generaciones que pasaron hasta retomar el trabajo con estas líneas selectivas (Falconer & Mackay 1996).

Respuestas correlacionadas para líneas seleccionadas en caracteres relacionados con el estrés térmico suelen ser frecuentes (revisado en Hoffmann *et al.* 2003). De cualquier manera, las correlaciones entre caracteres no siempre son consistentes entre las distintas especies (Hoffmann *et al.* 2003; Mori & Kimura 2008). Sin embargo, la selección para CCR en este estudio con *D.buzzatii* no tuvo ningún impacto en KRHT, lo que no solo es consistente con estudios de selección en *D.melanogaster* (Anderson *et al.* 2005a; Mori & Kimura 2008) sino también con la ausencia de clinas altitudinales opuestas para la resistencia a la baja y alta temperatura estudiadas recientemente en *D.buzzatii* (Sorensen *et al.* 2005). Este patrón consistente entre distintas especies de *Drosophila* para la respuesta a la selección y la correlación soportan aún más la hipótesis que los límites para la resistencia a las bajas temperaturas pueden evolucionar incrementando esta resistencia independientemente de los límites para la resistencia a las altas temperaturas (Anderson *et al.* 2005a).

Nosotros no encontramos evidencias de compromisos “*trade-offs*” genéticos entre CCR y los caracteres como DT, tamaño corporal –TL- y SR a 25°C (Figura 4). Sin embargo, encontramos, en la G34, evidencias de una posible correlación genética entre el régimen selectivo para CCR y REV. Esto se hace particularmente evidente para RCCR que es la línea selectiva que presenta las diferencias significativas incrementando la velocidad para CCR y mejorando la resistencia para REV respecto de C y de SCCR. Es en este contexto que podemos decir que para nuestra población de *D.buzzatii* incrementar significativamente la respuesta al frío mediante la selección artificial de CCR acarrea el incremento a la tolerancia a los vapores de etanol. Esta correlación tiene antecedentes anteriores en *D. melanogaster* y suele presentarse en estudios con roedores (Alkana *et al.* 1987; Phillips 2006). Esta correlación puede estar explicada por la

importancia del metabolismo de lípidos tanto para la resistencia al frío como para la resistencia al etanol (Grieve *et al.* 1979; Heberlein *et al.* 2006; Ohtsu *et al.* 1998)

Bibliografía del Capítulo I

Alkana, R. L., Bejanian, M., Syapin, P. J. & Finn, D. A. (1987). Chronic Functional Ethanol Tolerance in Mice Influenced by Body-Temperature During Acquisition. *Life Sciences*, 41, 413-420.

Anderson, A. R., Hoffmann, A. A. & McKechnie, S. W. (2005a). Response to selection for rapid chill-coma recovery in *Drosophila melanogaster*: physiology and life-history traits. *Genetical Research*, 85, 15-22.

Anderson, A. R., Hoffmann, A. A., McKechnie, S. W., Umina, P. A. & Weeks, A. R. (2005b). The latitudinal cline in the In(3R)Payne inversion polymorphism has shifted in the last 20 years in Australian *Drosophila melanogaster* populations. *Molecular Ecology*, 14, 851-858.

Angilletta, M. J. (2009a). Looking for answers to questions about heat stress: researchers are getting warmer. *Functional Ecology*, 23, 231-232.

Angilletta, M. J. (2009b). *Thermal Adaptation: A Theoretical and Empirical Synthesis*. Oxford: Oxford University Press.

Berger, K. H., Heberlein, U. & Moore, M. S. (2004). Rapid and chronic: Two distinct forms of ethanol tolerance in *Drosophila*. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research*, 28, 1469-1480.

Bubliy, O. A. & Loeschke, V. (2005). Variation of life-history and morphometrical traits in *Drosophila buzzatii* and *Drosophila simulans* collected along an altitudinal gradient from a Canary island. *Biological Journal of the Linnean Society*, 84, 119-136.

Chen, C. P. & Walker, V. K. (1994). Cold-Shock and Chilling Tolerance in *Drosophila*. *Journal of Insect Physiology*, 40, 661-669.

Chen, C. P. & Walker, V. K. (1993). Increase in Cold-Shock Tolerance by Selection of Cold Resistant Lines in *Drosophila-Melanogaster*. *Ecological Entomology*, 18, 184-190.

Chown, S. L. (2001). Physiological variation in insects: hierarchical levels and implications. *Journal of Insect Physiology*, 47, 649-660.

David, J. R., Gibert, P., Moreteau, B., Gilchrist, G. W. & Huey, R. B. (2003). The fly that came in from the cold: geographic variation of recovery time from low-temperature exposure in *Drosophila subobscura*. *Functional Ecology*, 17, 425-430.

David, R. J., Gibert, P., Pla, E., Petavy, G., Karan, D. & Moreteau, B. (1998). Cold stress tolerance in *Drosophila*: Analysis of chill coma recovery in *D-melanogaster*. *Journal of Thermal Biology*, 23, 291-299.

Falconer, D. S. & Mackay, T. F. C. (1996). *Introduction to quantitative genetics*. Essex, U.K: Addison-Wesley Longman.

Fry, J. D. (2003). Detecting ecological trade-offs using selection experiments. *Ecology*, 84, 1672-1678.

Gibert, P. & Huey, R. B. (2001). Chill-coma temperature in *Drosophila*: Effects of developmental temperature, latitude, and phylogeny. *Physiological and Biochemical Zoology*, 74, 429-434.

Gibert, P., Moreteau, B., Petavy, G., Karan, D. & David, J. R. (2001). Chill-coma tolerance, a major climatic adaptation among *Drosophila* species. *Evolution*, 55, 1063-1068.

Grieve, S. J., Littleton, J. M., Jones, P. & John, G. R. (1979). Functional Tolerance to Ethanol in Mice - Relationship to Lipid-Metabolism. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 31, 737-742.

Heberlein, U., Scholz, H., Kong, E., Lee, S. & Berger, K. H. (2006). Mechanisms of ethanol tolerance in *Drosophila*. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research*, 30, 269A.

Hoffmann, A. A., Anderson, A. & Hallas, R. (2002). Opposing clines for high and low temperature resistance in *Drosophila melanogaster*. *Ecology Letters*, 5, 614-618.

Hoffmann, A. A. & Parsons, A. (1991). *Evolutionary Genetics and Environmental Stress*. Oxford: Oxford University Press.

- Hoffmann, A. A. & Parsons, P. A. (1993). Selection for Adult Desiccation Resistance in *Drosophila-Melanogaster* - Fitness Components, Larval Resistance and Stress Correlations. *Biological Journal of the Linnean Society*, 48, 43-54.
- Hoffmann, A. A., Sgro, C. M. & Weeks, A. R. (2004). Chromosomal inversion polymorphisms and adaptation. *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 482-488.
- Hoffmann, A. A., Sorensen, J. G. & Loeschcke, V. (2003). Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *Journal of Thermal Biology*, 28, 175-216.
- Hollingsworth, M. J. & Bowler, K. (1966). The decline in ability to withstand high temperature with increase in age in *Drosophila subobscura*. *Experimental Gerontology*, 1, 251-257.
- Huey, R. B., Crill, W. D., Kingsolver, J. G. & Weber, K. E. (1992). A Method for Rapid Measurement of Heat Or Cold Resistance of Small Insects. *Functional Ecology*, 6, 489-494.
- Kimura, M. T. (2004). Cold and heat tolerance of drosophilid flies with reference to their latitudinal distributions. *Oecologia*, 140, 442-449.
- Kristensen, T. N., Hoffmann, A. A., Overgaard, J., Sorensen, J. G., Hallas, R. & Loeschcke, V. (2008). Costs and benefits of cold acclimation in field-released *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 216-221.
- MacMillan, H., Walsh, J. & Sinclair, B. (2009). The effects of selection for cold tolerance on cross-tolerance to other environmental stressors in *Drosophila melanogaster*. *Insect Science*, 16, 263-276.
- Maynard Smith, J. (1956). Temperature tolerance and acclimatization in *Drosophila subobscura*. *Journal of Experimental Biology*, 34, 85-96.
- Morgan, T. J. & Mackay, T. F. C. (2006). Quantitative trait loci for thermotolerance phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 96, 232-242.

- Mori, N. & Kimura, M. T. (2008). Selection for rapid and slow recovery from chill- and heat-coma in *Drosophila melanogaster*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 95, 72-80.
- Norry, F. M., Sambucetti, P., Scannapieco, A. C. & Loeschcke, V. (2006). Altitudinal patterns for longevity, fecundity and senescence in *Drosophila buzzatii*. *Genetica*, 128, 81-93.
- Norry, F. M., Scannapieco, A. C., Sambucetti, P., Bertoli, C. I. & Loeschcke, V. (2008). QTL for the thermotolerance effect of heat hardening, knockdown resistance to heat and chill-coma recovery in an intercontinental set of recombinant inbred lines of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology*, 17, 4570-4581.
- Ohtsu, T., Kimura, M. T. & Katagiri, C. (1998). How *Drosophila* species acquire cold tolerance - Qualitative changes of phospholipids. *European Journal of Biochemistry*, 252, 608-611.
- Overgaard, J. & Sorensen, J. G. (2008). Rapid thermal adaptation during field temperature variations in *Drosophila melanogaster*. *Cryobiology*, 56, 159-162.
- Phillips, K. (2006). Ethanol tolerance in temperate *Drosophila*. *Journal of Experimental Biology*, 209, iii.
- Sambucetti, P., Loeschcke, V. & Norry, F. M. (2006). Developmental time and size-related traits in *Drosophila buzzatii* along an altitudinal gradient from Argentina. *Hereditas*, 143, 77-83.
- Sgro, C. M. & Partridge, L. (2000). Evolutionary responses of the life history of wild-caught *Drosophila melanogaster* to two standard methods of laboratory culture. *American Naturalist*, 156, 341-353.
- Sinclair, B. J., Nelson, S., Nilson, T. L., Roberts, S. P. & Gibbs, A. G. (2007). The effect of selection for desiccation resistance on cold tolerance of *Drosophila melanogaster*. *Physiological Entomology*, 32, 322-327.

Sorensen, J. G. & Loeschcke, V. (2002). Natural adaptation to environmental stress via physiological clock-regulation of stress resistance in *Drosophila*. *Ecology Letters*, 5, 16-19.

Sorensen, J. G., Norry, F. M., Scannapieco, A. C. & Loeschcke, V. (2005). Altitudinal variation for stress resistance traits and thermal adaptation in adult *Drosophila buzzatii* from the New World. *Journal of Evolutionary Biology*, 18, 829-837.

CAPITULO II

*“Estudio de QTL para los efectos de la recuperación al coma por enfriamiento en un panel intercontinental de líneas recombinantes endocriadas (RIL) de *Drosophila melanogaster*.”*

Resumen

La tolerancia térmica, en particular la recuperación al coma por enfriamiento es un importante fenotipo para la adaptación térmica en insectos y otros organismos. *Drosophila melanogaster* es una especie cosmopolita de *Drosophila*, habita regiones del globo con muy variadas temperaturas y con diferentes amplitudes térmicas. Siendo que la temperatura es uno de los más importantes factores que moldea la distribución y los alcances de las diferentes poblaciones y especies encontramos relevante el estudio de la arquitectura genética correspondiente a caracteres relacionados con la recuperación al frío. Es reconocida la pertinencia de utilizar a *Drosophila* como modelo de estudio, son muchos los trabajos de investigación realizados en este género que versan sobre la resistencia o la recuperación al frío. Mediante el uso de técnicas desarrolladas recientemente se ha logrado avanzar en el conocimiento de la arquitectura genética de la respuesta a la exposición al frío, pese a esto son pocos aún los trabajos que profundizan en el conocimiento de las bases genéticas de este carácter. Para comenzar a entender e identificar los genes que controlan la respuesta al frío, se utilizó una población de líneas recombinantes endocriadas (RIL) disponibles en el laboratorio GERES para mapear loci de caracteres cuantitativos (QTL) que afecten la variación en la recuperación al frío en adultos. La población mapeada deriva del cruzamiento entre dos líneas de *D.melanogaster*, una de Australia y otra de Dinamarca, denominadas SH2 y D48 respectivamente, que fueron originalmente seleccionadas para fenotipos relacionados con la tolerancia a las altas temperaturas. Al realizar un mapeo de intervalos compuestos se identificaron 3 QTL en uno de los paneles y solo en las hembras. Un QTL encontrado en el cromosoma 2 explica el 18% de la varianza fenotípica. Algunos de los genes potencialmente candidatos incluidos dentro de las regiones de los QTL que hemos encontrado fueron identificados y discutidos. Los QTL de mayor efecto fueron

consistentes entre el presente estudio y otros estudios previos que fueron basados en muy diferentes poblaciones de mapeo.

Introducción

Los animales salvajes dependen para la adaptación a las condiciones de cambio climático y temperaturas extremas no solo de los fenotipos para los caracteres de herencia simple, sino también de los fenotipos de caracteres cuantitativos que afectan la tolerancia térmica (Hoffmann & Parsons 1991; Hoffmann *et al.* 2003; Hoffmann & Daborn 2007). En insectos, la recuperación al coma por enfriamiento representa un fenotipo ecológicamente relevante para la adaptación térmica a la baja temperatura en la etapa adulta del ciclo de vida (Gibert *et al.* 2001; Hoffmann *et al.* 2002; Hoffmann *et al.* 2003; David *et al.* 2003; Morgan & Mackay 2006; Mori & Kimura 2008).

La especie *Drosophila melanogaster* es encontrada en amplias regiones geográficas, desde áreas tropicales hasta regiones templadas en casi todos los continentes. Usualmente la tolerancia al frío, como caracter ecológicamente relevante, suele ser medido como el tiempo de recuperación al coma por enfriamiento (CCR, entendido como el tiempo que tarda el individuo en recuperar la movilidad desde el coma una vez que este es vuelto a colocar en una temperatura no estresante), en trabajos anteriores no se encontraron efectos de aclimatación al frío relacionados con CCR (Rako & Hoffmann 2006). En las poblaciones salvajes de *Drosophila*, se encontró que CCR es genéticamente variable, mostrando variaciones clinales atribuibles a la adaptación térmica de las mismás (Hoffmann *et al.* 2002; Sorensen *et al.* 2005).

El mapeo para loci de caracteres cuantitativos (QTL – “*Quantitative traits loci*”) permite identificar regiones del genoma en las cuales pueden encontrarse genes relevantes para los cambios en la tolerancia térmica (Norry *et al.* 2004; Norry *et al.* 2007b; Norry *et al.* 2007a; Morgan & Mackay 2006). Las líneas recombinantes endocriadas (RIL) son una herramienta importante para el análisis genético de los fenotipos relacionados con la tolerancia térmica, el mapeo de QTL en líneas RIL puede ser efectuado para varios caracteres relacionados al estrés térmico. Si bien existen trabajos que apuntan a las proteínas del estrés por calor (“*heat-shock proteins*” o simplemente *Hsps*) como responsable de la variabilidad para la respuesta al estrés por calor en particular y al estrés ambiental en general (Feder & Krebs 1998; Feder & Hofmann 1999; Bettencourt *et al.* 2002). De cualquier modo, no está claro el origen de

la variabilidad existente en cuanto a las distintas respuestas a los factores de estrés y cuales de las HSP puedan estar influenciando la variabilidad fenotípica para CCR (Qin *et al.* 2005).

Para los tres cromosomas mayores de *D.melanogaster* existen QTL con efectos de aditividad estricta así como variados efectos de dominancia para caracteres relacionados con la tolerancia térmica (Norry *et al.* 2004; Norry *et al.* 2007a; Norry *et al.* 2007b; Morgan & Mackay 2006). Es de suma importancia poder constatar la arquitectura genética de CCR a través de distintas poblaciones mapeadas para abarcar la dinámica evolutiva de este carácter mediante la comparación de las regiones que presentan QTL (Mackay 2001; Mackay 2004), especialmente para estudios sobre la base genética de la adaptación al calentamiento global y el cambio climático (Hoffmann & Daborn 2007).

En este trabajo se presenta un mapeo de QTL para CCR en un panel de RIL que fueron construidas con anterioridad a este trabajo a partir de líneas seleccionadas para KRHT a partir de dos poblaciones de distintos continentes. La población de baja KRHT deriva de una muestra de moscas salvajes colectadas en Dinamarca y subsecuentemente seleccionadas para baja KRHT; la población de alta resistencia derivó de una muestra de moscas salvajes colectadas en Melbourne (Australia) que fue posteriormente seleccionada artificialmente por McColl *et al.* (1996) y Norry *et al.* (2004) para aumentar KRHT. Luego con estas líneas ampliamente divergentes respecto a KRHT se construyeron las líneas RIL (Norry *et al.* 2008) Varios objetivos nos impulsaron a llevar adelante este trabajo. En primer lugar, buscamos interpretar la complejidad fenotípica y genotípica del carácter en estudio a través del análisis del conjunto de datos fenotípicos obtenidos de la medición de CCR en las RIL. En segundo lugar, buscamos comprender un poco más de la arquitectura genética de CCR mediante el mapeo de QTL utilizando las líneas RIL. En tercer lugar, con ánimo de explorar la dinámica evolutiva de las regiones de QTL, examinamos y comparamos la distribución de los QTL para CCR respecto de trabajos basados en diferentes paneles de RIL (Morgan & Mackay 2006).

Por último, se identificarán posibles genes candidatos que, según la región del genoma abarcada por cada QTL, podrían estar determinando la variabilidad fenotípica encontrada para CCR.

Objetivos:

- Interpretar la **complejidad fenotípica y genotípica de CCR** a través del análisis del conjunto de datos fenotípicos obtenidos.

- Comprender la **arquitectura genética de CCR** mediante el **mapeo de QTL** utilizando las líneas RIL.
- Identificar posibles **genes candidatos** que podrían estar determinando la variabilidad fenotípica encontrada **para CCR**.

Materiales y métodos

Líneas recombinantes endocriadas (RIL)

Anteriormente al comienzo de esta tesis, otros investigadores construyeron a partir de dos líneas prácticamente homocigotas y altamente divergentes para KRHT las líneas RIL que se utilizaron en el presente trabajo (ver Norry et al 2008, para información detallada). Las líneas parentales están descritas como SH2 y D48 para las provenientes de Australia y Dinamarca respectivamente, en Norry et al. (2004). Estas líneas fueron obtenidas originalmente por selección artificial para la resistencia al coma por alta temperatura (KRHT) y posterior endocría. Sobre la base de un número importante de marcadores moleculares que brindaron información así como teniendo en cuenta los valores fenotípicos de KRHT (para mayor información ver Norry *et al.* 2004), la línea endocriada SH2 fue seleccionada de un total de 23 líneas endocriadas que presentaron una mayor resistencia al calor (el stock SH2 fue creado a partir de la endocría de líneas réplicas que fueron seleccionadas para mayor KRHT desde una población natural de Melbourne, Australia por McColl *et al.* 1996; Norry *et al.* 2004, con y sin aclimatación para el calor como pretratamiento, respectivamente). La línea D48 fue elegida de un total de 42 líneas endocriadas, obtenidas por Norry et al. (2004), todas las cuales fueron de baja resistencia al calor, y que fueron seleccionadas para baja KRHT a partir de la generación 10 de laboratorio derivada de una muestra de una población natural del Este de Jutlandia (Dinamarca).

Para la construcción de las líneas RIL el procedimiento utilizado por los trabajadores que realizaron la tarea fue el siguiente. Cuatro hembras –F1- (progenie del cruce de D48 × SH2) fueron cruzadas con 7 machos de D48, y a la progenie se les permitió aparearse al azar durante dos generaciones. Luego de estas dos generaciones, se apartaron parejas para que se apareen y la progenie de cada una de las parejas se utilizó como parental de cada línea RIL producto de endocría mediante el apareamiento de hermanos completos durante 15 generaciones, así es como se obtuvo el panel de líneas denominado “RIL-D48”. De forma similar, cuatro hembras –F1- (progenie del

cruce de D48 × SH2) fueron cruzadas con 7 machos de SH2 y siguiendo el procedimiento anterior se obtuvo el stock de líneas denominado “RIL-SH2”. En el presente trabajo se utilizaron 32 RIL-D48 y 21 RIL-SH2 que fueron genotipadas para una serie de marcadores moleculares.

Los marcadores moleculares que se utilizaron para el genotipado de las RIL son los loci microsatélites que se indican en la Tabla 1. A partir de la extracción de ADN de 4 machos y 4 hembras de cada línea se realizaron los genotipados. La totalidad del genotipado o tipificación de ambos paneles RIL así como también la obtención del mapa genético (Tabla 1) fue realizada por Fabián M. Norry en colaboración con Volver Loeschcke del *Aarhus Centre for Environmental Stress* (Dinamarca). Las condiciones para las PCR fueron las mismas que las descritas en Norry et al. (2004). Para más detalles técnicos ver Norry *et al.* (2008).

Tabla 1. Loci microsatélites utilizados por Norry *et al.* (2008) como marcadores moleculares en las líneas RIL (RIL-D48 y RIL-SH2) de *D. melanogaster*. Las posiciones genéticas corresponden al mapa genético estimado por Norry *et al.* (2008).

Marker	Cytological location	Genetic location
AFO47180	1B8	1-0
X2297267gt	3A	1-2
DS06577	3C1-C6	1-5
DMU56661	4F1-F2	1-15
DMU96440	7B3	1-21.7
DROSEV	10A1-A2	1-40
AC010705	12D-E	1-54
DMTROPINI	16F3-F6	1-71
AF017777	19F3-F6	1-85
DROEXPAND	21C3	2-1
DROYANETSB	22C	2-6.44
AC009392	23A-E	2-10.98
DROGPDHA	25F5-26A	2-25
DRONINAC	28A1-A3	2-37
AC005889	30A3-A6	2-49
AC006302	34C4-D2	2-70
AC004759	38E1-E9	2-76
DROTG121	42 A	2-80
SU(Z)2	49C	2-97
DMMASTER	50C	2-100
DS00361	54B1-B2	2-115
AC004307	56D11-E6	2-129
DS08011	59A1-A2	2-142
DMRHOb	62A	3-0.1
AC004658	63D2-F1	3-9
3L5235154gt	64D	3-17
AC008198	66D10-E2	3-34
3L9222187ca	67A	3-45
DM22F11T	73A1-B7	3-59
DROPROSA	86E3	3-71
DMEHAB	90B1-B2	3-84
DRONANOS	90E-F	3-95
DMTF125	95C6-C8	3-112
3R23156893gt	97F	3-128
DMU43090	99D6-D9	3-140

Medición de CCR en las RIL

Todos los individuos experimentales de cada línea RIL fueron criados en condiciones estándar a 25°C (80 larvas de primer estadio por botella de 125ml, con 30ml de medio de cría estándar a base de puré de papa, con un régimen de 12h de luz y 12h de oscuridad). Para medir CCR (David *et al.* 1998) en las líneas RIL, se usaron moscas experimentales de 3 días de edad que fueron sexadas mediante un tratamiento de frío a 0°C durante 10min (las moscas permanecen inmóviles a esta temperatura) en el momento antes de comenzar con el estrés, de manera tal que una vez sexados los individuos fueron transferidos inmediatamente a tubos vacíos, sin permitirles que se recuperen y sin cambiar la temperatura que los rodea (0°C). Para cada uno de los sexos

y para cada RIL se colocaron 30 individuos en un tubo vacío y se ubico el mismo durante 20h dentro de una caja térmica con hielo molido (0°C) que a su vez fue depositada en una cámara refrigerada a 4°C. Luego de las 20h de estrés, los individuos fueron vueltos a depositar a temperatura no estresante (25°C). El tiempo de CCR fue registrado en segundos, midiendo el tiempo transcurrido para cada individuo entre el momento en que se lo devolvía a 25°C y el momento en que el mismo lograba pararse sobre sus patas. La medición de CCR fue realizada en dos oportunidades para cada línea RIL y para cada sexo en diferentes días y el promedio de ambas se utilizo para cada RIL. Para evitar los posibles efectos de variaciones producto del ritmo circadiano las mediciones fueron realizadas entre las 11h y las 15h.

Análisis estadístico

Para determinar si existe variación fenotípica significativa entre los paneles RIL para el caracter CCR realizamos análisis de varianza (ANOVA) dos vías, utilizamos el efecto fijo panel, el efecto fijo sexo y su interacción.

Luego realizamos una serie de pruebas estadísticas para explorar las características genéticas y fenotípicas de las RIL. Entre ellas destacamos las siguientes.

Dentro de cada panel (RIL-D48 y RIL-SH2) evaluamos para cada sexo por separado, los componentes de la varianza a través de un ANOVA de una vía para lo que es necesario que el efecto (línea) sea considerado aleatorio. A partir de este resultado, calculamos la heredabilidad en sentido estricto (h^2) mediante el cociente entre el componente de varianza aportado por el efecto aleatorio línea (V_L) y la suma de este último con el componente de varianza dentro de las líneas (V_E). El siguiente grupo de análisis consiste en ANOVA de dos vías para cada panel (RIL-D48 y RIL-SH2) por separado donde un factor evaluado es el factor aleatorio línea (L), el Sexo (S) es el segundo factor (factor fijo) y se analiza la interacción entre ambos (LxS) que nos permite identificar la interacción genotipo-por-sexo (GSI). Entre los diferentes paneles (RIL-D48 y RIL-SH2) para evaluar la importancia del componente de varianza aportado por el factor aleatorio línea (V_L) respecto de la media correspondiente calculamos el coeficiente de varianza (CV_L) como el cociente entre la raíz cuadrada de V_L y la media para cada sexo en cada panel (Para más detalles de todos los análisis estadísticos ver Morgan & Mackay 2006). Todos los análisis fueron efectuados usando el STATISTICA (data analysis software system), version 6, StatSoft, Inc. (2001).

Análisis de QTL

Los genotipos para los marcadores moleculares fueron numerados en función de la cantidad de alelos de SH2 (0 o 2) tanto para RIL-D48 como para RIL-SH2. El mapeo de intervalo compuesto (Zeng 1994) fue utilizado para evaluar la hipótesis de que un intervalo flanqueado por dos marcadores adyacentes contenga un QTL. Para identificar QTL hemos utilizado el modelo de mapeo de intervalo compuesto del software QTL Cartographer (Wang *et al.* 2010), con el diseño Ri2 (para líneas RIL, de apareamiento de hermanos completos), inicialmente utilizamos cinco marcadores control y un tamaño de ventana de 10cM.

Exploramos los efectos de alterar la combinación de los parámetros usados inicialmente. La posición de los QTL encontrados usando 10cM como ventana y cinco marcadores control, fue la más consistente dentro un amplio rango de combinaciones puestas a prueba. El umbral de significación fue determinado mediante 1000 permutaciones al azar (para más detalles ver Hughes & Leips 2006). Los efectos de la aditividad fueron calculados mediante el software en el mapeo de QTL. Evaluamos también las posibles interacciones epistáticas entre los pares de marcadores moleculares utilizados usando el modelo lineal $y = m_x + m_y + m_x m_y + e$; siendo m_x y m_y los genotipos de los marcadores moleculares x y y (Morgan & Mackay 2006; Fedorowicz *et al.* 1998) Donde m_x es un factor de dos niveles (cantidad de alelos de SH2: 0 o 2) y m_y es otro factor de otros dos niveles (cantidad de alelos de SH2: 0 o 2) evaluamos con prueba de ANOVA de dos factores prestando particular atención a la significación de la interacción entre los factores m_x y m_y .

Para la selección de los genes candidatos en los varios caracteres evaluados se realizó la búsqueda dentro de cada región de los QTL detectados entre los genes de función conocida que estuvieran relacionados con los parámetros de búsqueda: resistencia al frío, recuperación desde la exposición al frío y sensibilidad al frío en la base de datos *FlyBase Gene database* (FlyBase *et al.* 2004)

Resultados

Fenotipos de los paneles RIL para CCR

El resumen de medias con sus errores estándar para los paneles RIL-D48 y RIL-SH2 puede verse en la Tabla 2. Cuando se comparan las medias de los paneles entre sí, se puede ver que difieren significativamente para el carácter estudiado. Por otro lado,

todas las pruebas de ANOVA para los paneles (Tabla 3) dieron diferencias significativas en el factor aleatorio línea.

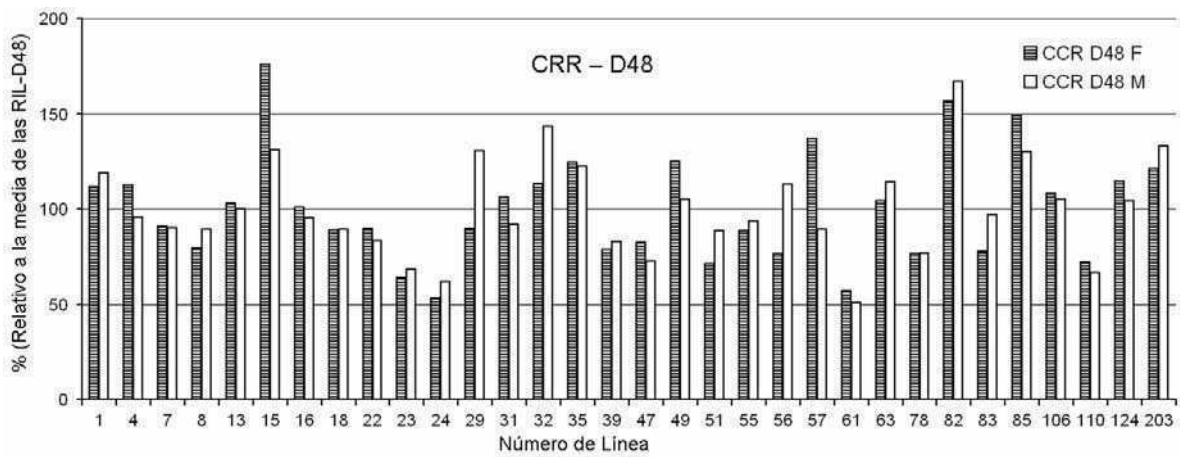


Figura 1. Se muestra CCR para ambos sexos de las RIL-D48 en unidades porcentuales respecto del valor medio para cada sexo (para ver lo valores medios de cada sexo utilizados ver Tabla 2). Los números en el eje x corresponden a la numeración arbitraria que recibieron cada una de las líneas RIL.

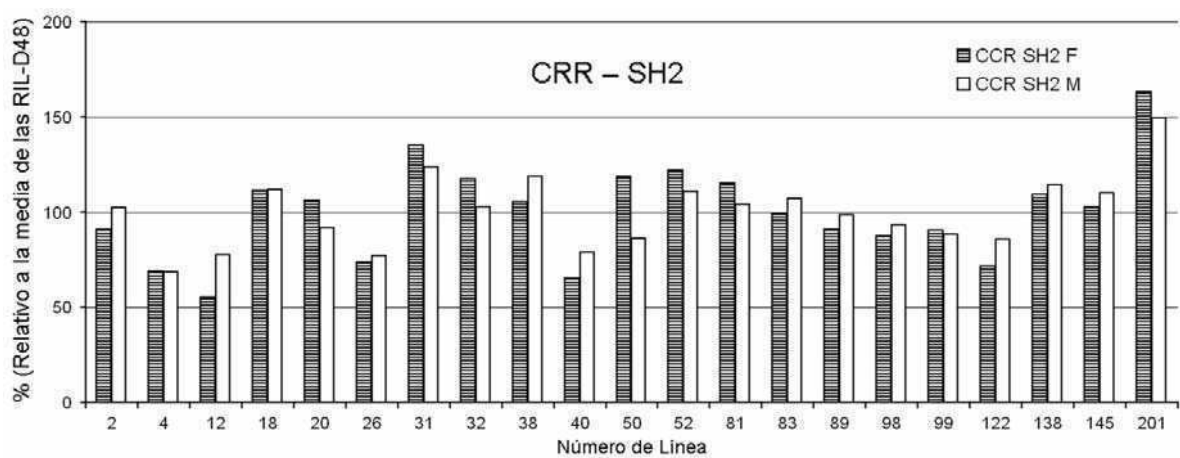


Figura 2. Se muestra CCR para ambos sexos de las RIL-SH2 en unidades porcentuales respecto del valor medio para cada sexo (para ver lo valores medios de cada sexo utilizados ver Tabla 2). Los números en el eje x corresponden a la numeración arbitraria que recibieron cada una de las líneas RIL.

En las Figuras 1 y 2 pueden observarse las medias de cada una de las líneas de cada panel (RIL-D48 y RIL-SH2) para cada sexo; las medias generales de cada retrocruza pueden verse en la Tabla 2. El panel RIL-D48 tiene una media general mayor que el panel RIL-SH2 (Tabla 2). Es posible que haya existido segregación transgressiva

en CCR para ambas retrocruzas (Figuras 1 y 2, Tabla 2), lo cual fue aparente en comparaciones con las líneas parentales hechas en Norry et al (2008).

Tabla 2. Valores fenotípicos medios para los paneles RIL-D48 y RIL-SH2 en CCR. Entre paréntesis están los correspondientes valores de error estándar. Los estadísticos para las líneas RIL fueron computados promediando los valores medios de todas las RIL.

Línea	Machos	Hembras
RIL-D48	3682,12 (135,39)	3657,32 (141,45)
RIL-SH2	3122,61 (134,66)	3096,77 (162,05)

Análisis estadísticos entre las líneas de cada panel para sexos separados

Los ANOVA realizados dentro de cada panel y cada sexo mostró resultados altamente significativos ($P < 0.0001$) para el factor aleatorio línea (L) (Tabla 3). Pese a los altos valores de significación del factor línea, los valores estimados de heredabilidad en sentido estricto (h^2) son relativamente bajos para CCR en ambos paneles ($0.178 \leq h^2 \leq 0.263$). Es importante recordar que la h^2 tiene sentido solo para estos paneles y para los ambientes donde se han realizado los experimentos no pudiendo extrapolarse estos resultados a otros ambientes u otras líneas.

El coeficiente de varianza (CV_L) expresa una relación entre la varianza explicada por diferencia entre las líneas y la media del carácter para cada panel dentro de cada sexo. CCR presenta resultados homogéneos para CV_L en ambos paneles y ambos sexos ($16.12 \leq CV_L \leq 24.45$).

Tabla 3. Resultados del ANOVA para CCR entre las líneas RIL dentro de cada panel y de cada sexo por separado; seguido se presentan los valores para la heredabilidad en sentido estricto (h^2) y el coeficiente de variación (CV_L).

Retrocruza	Sexo	Media (ES)	Varianza	V_L	V_E	h^2	CV_L
RIL-D48	M	3682,12 (135,39)	2857123	689318****	2167805	0,241	22,76
	F	3657,32 (141,45)	3004963	791191****	2213772	0,263	24,45
RIL-SH2	M	3122,61 (134,66)	1357501	242220****	1115281	0,178	16,12
	F	3096,77 (162,05)	2023453	503941****	1519512	0,249	23,35

NS, not significant, $P > 0.05$; * $0.05 > P > 0.01$; ** $0.01 > P > 0.001$; *** $0.001 > P > 0.0001$; **** $0.0001 > P$.

Análisis estadísticos para la interacción Genotipo-por-Sexo (GSI)

Para CCR evaluamos la interacción entre genotipo y sexo. Dos ANOVA de modelo mixto (factor aleatorio línea (L); factor fijo sexo (S) y su interacción (LxS)) se realizaron separadamente para cada panel (Tabla 4). El efecto aleatorio línea resultó ser altamente significativo en ambos casos, explicando un porcentaje de la varianza fenotípica total que varía entre 20.6% para RIL-D48 y 18.1% para RIL-SH2. El efecto fijo sexo no fue significativo para ninguna de los dos paneles (Tabla 4).

La interacción entre ambos factores (LxS) fue estadísticamente significativa en ambos casos. De la varianza fenotípica total, LxS explica porcentajes menores y similares en ambos paneles, 4.8% para RIL-D48 y 3.5% para RIL-SH2 (Tabla 4)

Por último, evaluamos la correlación entre ambos sexos para cada panel por separado (resultados no presentados). En todos los casos la estima de correlación fue estadísticamente significativa y están entre los siguientes valores $0.76 \leq r \leq 0.86$, lo cual es consistente con la hipótesis de que la arquitectura genética de CCR puede ser similar entre los sexos, más allá de que algunos QTL fueron significativos en solo uno de los sexos.

Tabla 4. Resultados para el ANOVA entre las líneas RIL dentro de cada panel por separado. Entre paréntesis esta presentado: primero, el error estándar de la media, en los casos restantes, representa el porcentaje de varianza explicada por el factor aleatorio línea (V_L) o por la interacción entre de este factor con el factor fijo sexo ($V_{L \times S}$) o el porcentaje de varianza explicada por el error dentro (V_E).

Retrocruza	Media (ES)	Sex (S)	V_L (%)	$V_{L \times S}$ (%)	V_E (%)
RIL-D48	3608,76 (150,71)	NS	606549 (20,6)****	142396 (4,8)****	2192277 (74,5)
RIL-SH2	3044,18 (115,14)	NS	308933 (18,1)****	60312 (3,5)****	1334864 (78,3)

NS, not significant, $P > 0.05$; * $0.05 > P > 0.01$; ** $0.01 > P > 0.001$; *** $0.001 > P > 0.0001$; **** $0.0001 > P$.

Mapeo de QTL

Utilizamos el mapeo de intervalo compuesto de QTL y obtuvimos los siguientes resultados (Tabla 5). Para CCR se encontraron cuatro QTL, todos ellos en el panel RIL-SH2 (uno de ellos es marginalmente significativo). En RIL-SH2 tres de los cuatro QTL se encontraron en hembras (1: Cromosoma 2 (C2), QTL range: 34C-42F; 2: C3, QTL range: 73A-90B; 3: C3, QTL range: 90E-95C); el QTL restante, que es marginalmente significativo, se encontró en machos (C2, QTL range: 34C-42F) (Tabla 5; Figura 3)

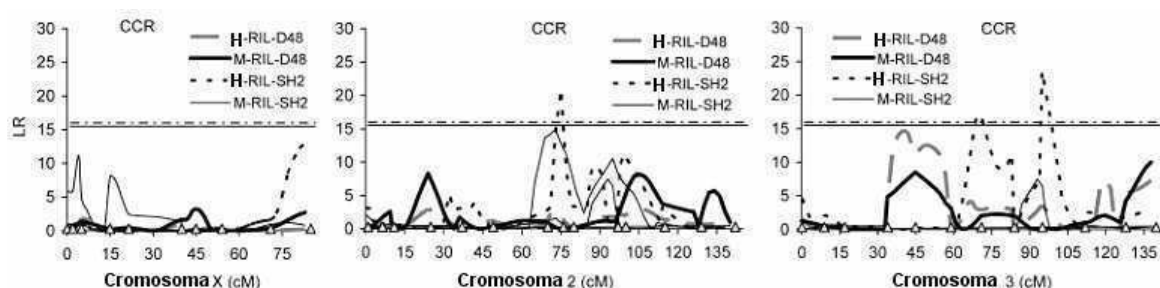


Figura 3. Grafico de los valores para la tasa de probabilidad (LR) en función de la posición del mapa (en cM) para el mapeo de intervalo compuesto para CCR en *D.melanogaster* tanto para RIL-D48 como para RIL-SH2 en ambos sexos. Los umbrales de significación fueron determinados mediante 1000 permutaciones al azar (líneas horizontales). Los triángulos sobre el eje x corresponden a la posición de los marcadores moleculares utilizados en el mapeo de intervalo compuesto.

Solo un QTL solapó para ambos sexos en el mismo panel (C2, QTL range: 34C-42F) (Tabla 5, Figura 3)

El solapamiento entre los QTL de distinto sexo sugiere una arquitectura genética similar, aunque no necesariamente idéntica, para ambos sexos.

Tabla 5. QTL para CCR en cada sexo y en cada panel junto con su correspondiente efecto aditivo (a), el porcentaje de variación fenotípica explicada (% Var) y posibles genes candidatos.

Sexo	RIL	Rango del QTL	a	% Var	Genes candidatos (posición citológica)
Hembra	SH2	34C-42F	391	18	<i>Hsp60D (34C1)</i> , <i>ppk (35B1)</i> , <i>rl (h41)</i> , <i>Trap1 (42B2)</i>
Macho *	SH2	34C-42F	-	-	
Hembra	SH2	73A-90B	-780	35	<i>CG7130 (79B2)</i> , <i>CG14650(82B1)</i> , <i>CG11035(84E9)</i> , <i>Fst(85E2)</i> , <i>Hsp70Aa(87A2)</i> , <i>Hsp70Ab(87A3)</i> , <i>Hsp70Ba(87B12)</i> , <i>Hsp70Bb(87B14)</i> , <i>Hsp70Bc(87B14-B15)</i> , <i>Hsp70Bbb(87B14)</i> , <i>Hsc70-2(87D10)</i> , <i>Droj2(87E8)</i>
Hembra	SH2	90E-95C	694	11	<i>ort(92A13)</i> , <i>TotA(93A2)</i> , <i>Atpa(93A4)</i> , <i>Hsrw(93D4)</i> , <i>InR(93E4-E9)</i>

*QTL marginalmente significativo

Efectos de los QTL

Evaluamos los efectos epistáticos entre todos los posibles pares de marcadores usados en nuestro análisis para todos los caracteres medidos, y no detectamos ningún efecto epistático significativo (luego de la corrección para múltiples comparaciones).

Luego estimamos el efecto de la aditividad (a) para los picos de QTL identificados, también calculamos el porcentaje de variación fenotípica total (% Var)

explicada por cada QTL (Tabla 5). Todos los QTL encontrados son específicos del panel RIL-SH2. Los porcentajes de variación fenotípica explicada para cada QTL se sitúan entre un 11% y un 35% de la variación fenotípica.

Los QTL que explican los menores porcentajes de variación fenotípica (11 y 18%) muestran valores positivos de efectos aditivos (a), esto nos indica que el alelo proveniente de la línea parental SH2 incrementaría el tiempo de recuperación para el coma por enfriamiento (CCR). El QTL que explica el mayor porcentaje de variación fenotípica (35%) presenta valores negativos de “a”, indicando que el alelo de SH2 para este QTL disminuye los tiempos necesarios para lograr la recuperación del individuo.

Esto implica que los alelos provenientes de la línea parental SH2 estarían teniendo efectos negativos, a través de los QTL de menor efecto, al aumentar los tiempos de recuperación. Asimismo, el QTL de mayor efecto revertiría el efecto de los primeros, explicando así la presencia de segregación transgresiva luego de la construcción de las líneas recombinantes. Este resultado, se condice con los valores medios que presentan el panel RIL-SH2 respecto del panel RIL-D48 (Tabla 2) y los valores extremos observados para algunas RIL en las Figuras 1 y 2.

Discusión

A pesar de que la base genética de la recuperación al frío ha sido ampliamente estudiada, aún es poco lo que se conoce de la arquitectura genética de este carácter (Hoffmann *et al.* 2003; Norry *et al.* 2008; Morgan & Mackay 2006). Con este estudio hemos tratado de ampliar los conocimientos sobre la arquitectura genética de la recuperación al congelamiento en *Drosophila melanogaster*. Nosotros estimamos parámetros de genética cuantitativa y con ellos hemos logrado localizar QTL que afectan la variación en los tiempos de recuperación en adultos en una población de líneas RIL. Hemos encontrado varianza genética significativa entre las líneas utilizadas en el mapeo y nos fue posible detectar 3 QTL relacionados con la exposición al frío, hemos encontrado QTL de gran efecto en ambos cromosomas mayores autosómicos pero no en el cromosoma X. La mayoría de estos QTL resultaron específicos para la recuperación al frío, existiendo muy poca superposición con QTL para la resistencia al calor mapeados en las mismas líneas (Norry *et al.* 2008). Este resultado es consistente con trabajos previos en distintas líneas RIL (Morgan & Mackay 2006). Esta falta de superposición entre la mayoría de los QTL de estos caracteres parece representar una

característica prominente en lo que respecta a la base genética de la resistencia a los extremos de temperatura.

Ambos sexos parecerían compartir una única respuesta para la recuperación al frío, el estudio de mapeo de QTL no permite ahondar demasiado en la superposición de QTL detectados para cada sexo, de cualquier modo cabe destacar que el único QTL que se encontró en machos (marginamente significativo) solapa con uno de los tres QTL que fueron encontrados en hembras. Los QTL detectados explican una porción variable de la varianza fenotípica total (11 – 35 %). Los bajos valores de heredabilidad en sentido estricto, pese a no ser un método particularmente robusto para el cálculo de heredabilidad, nos sugieren prestar particular atención a la posible debilidad de los QTL detectados pese a los altos valores de porcentaje de varianza explicada por cada QTL.

La estima de lo efectos de aditividad para los QTL es consistente con la dirección de divergencia entre las medias de RIL-D48 y RIL-SH2 donde el efecto de aditividad muestra valores negativos para el QTL de mayor efecto compensando así el efecto de los otros dos QTL que presentan valores positivos en las mismas RIL.

Este estudio es un primer paso para reconocer la arquitectura genética de este carácter. A pesar de esto, nosotros no avanzamos más allá de este mapeo de QTL, queda pendiente poder realizar experimentos de complementación de deficiencias o mapeos de QTL de alta resolución para poder diseccionar más aún la arquitectura genética de estos caracteres (Anholt & Mackay 2004).

Hemos identificado varios genes candidatos basados en el efecto de alguno de sus fenotipos mutantes y del efecto sobre caracteres de termotolerancia (Tweedie *et al.* 2009)

Dentro de los QTL detectados podemos agrupar algunos genes candidatos según la función biológica conocida. Un primer grupo de genes candidatos están relacionados con genes del grupo de las proteínas de “Heat-shock” (*Hsps* – “Heat shock proteins”) que intervienen en el acople con proteínas mal plegadas. Las HSP están involucradas en la respuesta a muchos factores diferentes de estrés (Feder & Hofmann 1999). El gen *Hsp60D*, así como los *CG7130*, *CG14650*, *CG11035*, *Hsc70-2*, *Trap1* y el gen *Droj2* son genes que presentan alteraciones en la respuesta al calor de los individuos para los diferentes alelos de cada uno de ellos, todos estos genes se ven involucrados en el proceso de plegamiento de proteínas (Tweedie *et al.* 2009). También encontramos varios genes candidatos en un mismo QTL que pertenecen a la familia de HSP y están

involucrados la respuesta al calor (*Hsp70Aa*, *Hsp70Ab*, *Hsp70Ba*, *Hsp70Bb*, *Hsp70Bbb*, *Hsp70Bc*).

Otro gen, el *InR* (93E4-93E9), fue mapeado y reconocido dentro de un QTL detectado. Este gen, que tiene relación con la respuesta a la cocaína (Willard *et al.* 2006) y que posee actividad de receptor de insulina en *Drosophila* (Petruzzelli *et al.* 1985), tiene una gran cantidad de efectos pleiotrópicos y reconocida influencia en la respuesta a diferentes factores de estrés (Tweedie *et al.* 2009).

Otros genes candidatos que se encontraron en los QTL detectados en este trabajo presentan distinto grado de relación con la resistencia al frío. Es así que *ppk* esta vinculado con el comportamiento dependiente de la temperatura (Kim *et al.* 2002). Otro gen candidato, el *rl*, presenta gran cantidad de efectos pleiotrópicos (Tweedie *et al.* 2009), de los que se destaca el acople con proteínas en cuanto a su función molecular (Kim *et al.* 2006) y la respuesta comportamental al etanol como factor de estrés (Corl *et al.* 2009). También se destaca el gen *ort*, que presenta alteraciones en la respuesta al éter cuando se estudian fenotipos mutantes (Iovchev *et al.* 2002) así como alteraciones para la termotaxis (comportamiento dependiente de la temperatura) (Hong *et al.* 2006).

Dos genes que están vinculados a la respuesta al calor como factor de estrés son el *TotA*, que a partir de fenotipos mutantes evidenció sensibilidad a los factores de estrés (Ekengren *et al.* 2001), particularmente en respuesta al calor (Agaisse & Perrimon 2004) y el gen *Atp α* , que si bien posee efectos epistáticos sobre cantidad de caracteres, se ha reconocido por fenotipos mutantes, modificaciones en la respuesta ante un estrés térmico (Palladino *et al.* 2003; Feng *et al.* 1997).

En estudios previos se encontró que la disminución de la resistencia para el frío y el aumento de la resistencia para el calor se vieron asociados con un alelo del gen que pertenece a las *heat-shock*, *hsr-omega* (Rako *et al.* 2007; Anderson *et al.* 2003) El QTL encontrado para CCR en el brazo derecho del cromosoma 3 (QTL3) incluye la región donde mapea el gen *hsr-omega* (Tabla 5). Este resultado confirma que esta región define un QTL asociado a la tolerancia térmica.

Por último, hemos detectado la presencia del gen *Fst* (“*frost*”: *heladas*). Este gen mostró diferencias en su patrón de expresión cuando se expone a los individuos a golpes de bajas temperaturas (Goto 2001) lo que sugiere que es un robusto gen candidato.

Finalmente, dos de los QTL encontrados en este estudio para CCR (QTL1 y QTL2) colocalizaron con regiones de QTL de trabajos previos (Morgan & Mackay

2006). La segregación transgresiva resulta, típicamente, de la recombinación entre las líneas parentales que poseen dos QTL con efectos antagónicos para un carácter (por ejemplo, aquí podría explicarse por la presencia en SH2 de dos QTL, uno que incrementa la velocidad –QTL2- y otro que la disminuye –QTL1-; la recombinación de ambos en las RIL podría explicar los fenotipos extremos para algunas de estas).

La línea D48 utilizada en este estudio derivó de una población más adaptada al frío, proveniente de Dinamarca, pero los alelos respectivos de esta línea aumentan los tiempos de recuperación en dos de los tres QTL (QTL1 y QTL3) cuando se los compara con los alelos de SH2. La hibridización intercontinental de este estudio puede ser el factor que haya generado los fenotipos extremos vistos en algunas líneas RIL.

Bibliografía del Capítulo II

Agaisse, H. & Perrimon, N. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunological Reviews* 198, 72-82. 2004.

Ref Type: Generic

Anderson, A. R., Collinge, J. E., Hoffmann, A. A., Kellett, M. & McKechnie, S. W. (2003). Thermal tolerance trade-offs associated with the right arm of chromosome 3 and marked by the *hsr-omega* gene in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 90, 195-202.

Anholt, R. R. H. & Mackay, T. F. C. (2004). Quantitative genetic analyses of complex behaviours in *Drosophila*. *Nature Reviews Genetics*, 5, 838-849.

Bettencourt, B. R., Kim, I., Hoffmann, A. A. & Feder, M. E. (2002). Response to natural and laboratory selection at the *Drosophila hsp70* genes. *Evolution*, 56, 1796-1801.

Corl, A. B., Berger, K. H., Ophir-Shohat, G., Gesch, J., Simms, J. A., Bartlett, S. E. & Heberlein, U. (2009). Happyhour, a Ste20 family kinase, implicates EGFR signaling in ethanol-induced behaviors. *Cell*, 137, 949-960.

David, J. R., Gibert, P., Moreteau, B., Gilchrist, G. W. & Huey, R. B. (2003). The fly that came in from the cold: geographic variation of recovery time from low-temperature exposure in *Drosophila subobscura*. *Functional Ecology*, 17, 425-430.

David, R. J., Gibert, P., Pla, E., Petavy, G., Karan, D. & Moreteau, B. (1998). Cold stress tolerance in *Drosophila*: Analysis of chill coma recovery in *D-melanogaster*. *Journal of Thermal Biology*, 23, 291-299.

Ekengren, S., Tryselius, Y., Dushay, M. S., Liu, G., Steiner, H. & Hultmark, D. (2001). A humoral stress response in *Drosophila*. *Current Biology*, 11, 714-718.

Feder, M. E. & Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61, 243-282.

- Feder, M. E. & Krebs, R. A. (1998). Natural and genetic engineering of the heat-shock protein hsp70 in *Drosophila melanogaster*: Consequences for thermotolerance. *American Zoologist*, 38, 503-517.
- Fedorowicz, G. M., Fry, J. D., Anholt, R. R. H. & Mackay, T. F. C. (1998). Epistatic interactions between smell-impaired loci in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 148, 1885-1891.
- Feng, Y., Huynh, L., Takeyasu, K. & Fambrough, D. M. (1997). The *Drosophila* Na,K-ATPase α -subunit gene: gene structure, promoter function and analysis of a cold-sensitive recessive-lethal mutation. *Genes and Function*, 1, 99-117.
- FlyBase, C., Swiss-Prot, P. M. & InterPro, P. M. Gene Ontology annotation in FlyBase through association of InterPro records with GO terms. 2004. Ref Type: Internet Communication
- Gibert, P., Moreteau, B., Petavy, G., Karan, D. & David, J. R. (2001). Chill-coma tolerance, a major climatic adaptation among *Drosophila* species. *Evolution*, 55, 1063-1068.
- Goto, S. G. (2001). A novel gene that is up-regulated during recovery from cold shock in *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 270, 259-264.
- Hoffmann, A. A., Anderson, A. & Hallas, R. (2002). Opposing clines for high and low temperature resistance in *Drosophila melanogaster*. *Ecology Letters*, 5, 614-618.
- Hoffmann, A. A. & Daborn, P. J. (2007). Towards genetic markers in animal populations as biomonitors for human-induced environmental change. *Ecology Letters*, 10, 63-76.
- Hoffmann, A. A. & Parsons, A. (1991). *Evolutionary Genetics and Environmental Stress*. Oxford: Oxford University Press.
- Hoffmann, A. A., Sorensen, J. G. & Loeschcke, V. (2003). Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *Journal of Thermal Biology*, 28, 175-216.

- Hong, S. T., Bang, S., Paik, D., Kang, J., Hwang, S., Jeon, K., Chun, B., Hyun, S., Lee, Y. & Kim, J. (2006). Histamine and its receptors modulate temperature-preference behaviors in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, 26, 7245-7256.
- Hughes, K. A. & Leips, J. (2006). Quantitative trait locus analysis of male mating success and sperm competition in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 60, 1427-1434.
- Iovchev, M., Kodrov, P., Wolstenholme, A. J., Pak, W. L. & Semenov, E. P. (2002). Altered drug resistance and recovery from paralysis in *Drosophila melanogaster* with a deficient histamine-gated chloride channel. *Journal of Neurogenetics*, 16, 249-261.
- Kim, M., Lee, J. H., Koh, H., Lee, S. Y., Jang, C., Chung, C. J., Sung, J. H., Blenis, J. & Chung, J. (2006). Inhibition of ERK-MAP kinase signaling by RSK during *Drosophila* development. *The EMBO Journal*, 25, 3056-3067.
- Kim, M. J., Zinkevich, N., Israel, P., Pettus, J., Ainsley, J., Bosenko, D., Latusick, K., Solly, L., Liu, L., Welsh, M. & Johnson, W. A. Molecular mechanisms of thermosensory signal transduction. Program and Abstracts.43rd Annual *Drosophila* Research Conference, San Diego, 2002 , 784A. 2002.
Ref Type: Abstract
- Mackay, T. F. C. (2001). The genetic architecture of quantitative traits. *Annual Review of Genetics*, 35, 303-339.
- Mackay, T. F. C. (2004). The genetic architecture of quantitative traits: lessons from *Drosophila*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 14, 253-257.
- McColl, G., Hoffmann, A. A. & McKechnie, S. W. (1996). Response of two heat shock genes to selection for knockdown heat resistance in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 143, 1615-1627.
- Morgan, T. J. & Mackay, T. F. C. (2006). Quantitative trait loci for thermotolerance phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 96, 232-242.
- Mori, N. & Kimura, M. T. (2008). Selection for rapid and slow recovery from chill- and heat-coma in *Drosophila melanogaster*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 95, 72-80.

Norry, F. M., Dahlgaard, J. & Loeschcke, V. (2004). Quantitative trait loci affecting knockdown resistance to high temperature in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology*, 13, 3585-3594.

Norry, F. M., Gomez, F. H. & Loeschcke, V. (2007a). Knockdown resistance to heat stress and slow recovery from chill coma are genetically associated in a quantitative trait locus region of chromosome 2 in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology*, 16, 3274-3284.

Norry, F. M., Sambucetti, P., Scannapieco, A. C., Gomez, F. H. & Loeschcke, V. (2007b). X-linked QTL for knockdown resistance to high temperature in *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology*, 16, 509-513.

Norry, F. M., Scannapieco, A. C., Sambucetti, P., Bertoli, C. I. & Loeschcke, V. (2008). QTL for the thermotolerance effect of heat hardening, knockdown resistance to heat and chill-coma recovery in an intercontinental set of recombinant inbred lines of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology*, 17, 4570-4581.

Palladino, M. J., Bower, J. E., Kreber, R. & Ganetzky, B. (2003). Neural dysfunction and neurodegeneration in *Drosophila* Na⁺/K⁺ ATPase α subunit mutants. *Journal of Neuroscience*, 23, 1276-1286.

Petruzzelli, L., Herrera, R., Garcia-Arenas, R. & Rosen, O. M. (1985). Acquisition of insulin-dependent protein tyrosine kinase activity during *Drosophila* embryogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 260, 16072-16075.

Qin, W., Neal, S. J., Robertson, R. M., Westwood, J. T. & Walker, V. K. (2005). Cold hardening and transcriptional change in *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology*, 14, 607-613.

Rako, L., Blacket, M. J., McKechnie, S. W. & Hoffmann, A. A. (2007). Candidate genes and thermal phenotypes: identifying ecologically important genetic variation for thermotolerance in the Australian *Drosophila melanogaster* cline. *Molecular Ecology*, 16, 2948-2957.

Rako, L. & Hoffmann, A. A. (2006). Complexity of the cold acclimation response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 52, 94-104.

Sorensen, J. G., Norry, F. M., Scannapieco, A. C. & Loeschcke, V. (2005). Altitudinal variation for stress resistance traits and thermal adaptation in adult *Drosophila buzzatii* from the New World. *Journal of Evolutionary Biology*, 18, 829-837.

Tweedie, S., Ashburner, M., Falls, K., Leyland, P., McQuilton, P., Marygold, S., Millburn, G., Osumi-Sutherland, D., Schroeder, A., Seal, R., Zhang, H. & The FlyBase Consortium (2009). FlyBase: enhancing *Drosophila* Gene Ontology annotations. *Nucleic Acids Res.*, 37, D555-D559.

Wang, S., Basten, C. J. & Zeng, Z. B. (2010). *Windows QTL Cartographer 2.5*.

Willard, S., Koss, C. M. & Cronmiller, C. (2006). Chronic cocaine exposure in *Drosophila*: life, cell death and oogenesis. *Developmental Biology*, 296, 150-163.

Zeng, Z. B. (1994). Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, 136, 1457-1468.

CAPITULO III

*“Análisis de loci para caracteres cuantitativos (QTL) para la respuesta al etanol en adultos y larvas en un panel intercontinental de líneas recombinantes endocriadas (RIL) de *Drosophila melanogaster*”*

Resumen

(Aclaración: Cuando en este capítulo figure la primera persona del plural, estará haciendo referencia a la Lic. Raquel Defays y al autor de esta tesis)

El alcohol etílico es una de las drogas más ampliamente utilizada en el mundo. A pesar de que beber en exceso puede conducir a serios problemas de salud, como ataques cerebro vasculares, alta presión sanguínea, cirrosis y cáncer; y que el 30% de los accidentes fatales de tránsito involucran el consumo de alcohol por alguna de las partes, la base genética de la respuesta al etanol es aún poco conocida. En su ambiente natural, rico en materiales orgánicos en proceso de fermentación, la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, encuentra niveles relativamente altos de etanol. El efecto del etanol y sus metabolitos en *Drosophila* es objeto de estudio desde hace décadas, como un excelente modelo para evaluar la adaptación. A pesar de que muchos trabajos han hecho hincapié en documentar patrones de variación genética, bastante menos se conoce sobre las regiones génicas o los genes que podrían estar explicando la variación genética para la respuesta al etanol. Para comenzar a entender e identificar los genes que controlan la respuesta al etanol, nosotros utilizamos una población de líneas recombinantes endocriadas (RIL) para mapear loci de caracteres cuantitativos (QTL) que afecten la variación en la resistencia y en la recuperación en adultos y la tolerancia en larvas. La población mapeada deriva del cruce entre dos líneas de *D.melanogaster*, una de Australia y otra de Dinamarca, denominadas SH2 y D48 respectivamente, que fueron seleccionadas para fenotipos relacionados con la tolerancia térmica. Nosotros mapeamos en los tres cromosomas 14 QTL que afectaron la respuesta al etanol. Siete de ellos mapearon para la resistencia al etanol en adultos, dos para la recuperación y cinco más para la tolerancia en larvas. La mayoría de los QTL fueron específicos para cada carácter, sugiriendo cierta superposición pero generalmente pudimos ver una única

arquitectura genética subyacente para cada carácter. Cada QTL explica en promedio un 16.8% de la variación fenotípica entre las líneas. Algunos de los genes potencialmente candidatos incluidos dentro de las regiones de los QTL que hemos encontrado fueron identificados y comentados.

Introducción

El alcohol es una de las drogas más ampliamente utilizada en el mundo. A pesar del hecho de que el exceso en su consumo puede producir serios problemas de salud, como ataques cerebro vasculares, alta presión sanguínea, cirrosis y cáncer; y que el 30% de los accidentes fatales de tránsito involucran el consumo de alcohol en al menos una de las partes involucradas (Cowmeadow *et al.* 2005) y que el 8.7% de las muertes en los hombres y el 1.7% en las mujeres para todas las Américas en el 2002 fueron atribuibles directamente al consumo de alcohol (OPS/OMS, Alcohol, género, cultura y daños en las Américas: reporte final del multicéntrico OPS. Washington, USA. 2007), aún nuestra comprensión sobre los mecanismos que regulan las funciones del sistema nervioso y el comportamiento asociados al consumo de alcohol es rudimentario. Algunas de las dificultades para entender los mecanismos de acción del etanol en los organismos derivan del hecho, a diferencia de abusos para otras drogas (así como nicotina, cocaína y heroína), que el etanol parece tener un espectro de objetivos moleculares en el sistema nervioso mucho más amplio (Heberlein *et al.* 2004). Se argumenta que los efectos del etanol en el sistema nervioso son causados primariamente por alteraciones no específicas de las propiedades de las membranas de las neuronas (Wood *et al.* 1991). De cualquier modo, hoy aumenta la evidencia de que ciertas proteínas estarían implicadas – en su mayoría proteínas de membrana- como dianas directas del etanol en el sistema nervioso (Peoples *et al.* 1996; Heberlein *et al.* 2004; Heberlein *et al.* 2006).

El alcoholismo es un complejo desorden determinado por interacciones entre los factores de riesgo de origen genético y ambiental. En su ambiente natural, habitualmente rico en materiales de origen orgánico en descomposición, la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, esta expuesta a altos niveles de etanol. Los efectos del etanol y sus metabolitos en *Drosophila* han sido ampliamente estudiados por décadas como un buen modelo de adaptación al medio ambiente (Fry 2003).

Últimamente, *Drosophila* empezó a ser utilizada como un modelo de estudio para las bases moleculares de los caracteres relacionados al etanol. *Drosophila*

representa un poderoso sistema modelo para diseccionar la arquitectura genética de la sensibilidad al etanol, dando ventajas como la posibilidad de criar grandes números de individuos con relativa facilidad, con un determinado entorno genético y bajo controladas condiciones ambientales (Hoffmann *et al.* 2003). Más aún, reforzando la importancia de *Drosophila* como modelo, las moscas expuestas al etanol presentan cambios fisiológicos y comportamentales similares a los que presenta un humano en condiciones de intoxicación con etanol, incluyendo la pérdida de control postural, sedación, desarrollo de tolerancia y muerte (Morozova *et al.* 2007; Scholz *et al.* 2000).

La probabilidad de identificar genes que expliquen los diferentes efectos que produce el etanol se vio incrementada a partir de un número creciente de procedimientos que se desarrollaron recientemente. Uno de estos enfoques consiste en evaluar la probabilidad para todos los genes involucrados en una repuesta en particular de forma funcional, sin diseccionar al individuo o su genoma (Crawshaw *et al.* 2001). Nosotros utilizamos este tipo de enfoque, empleando una herramienta estadística para asociar la repuesta fenotípica con una serie de marcadores moleculares para identificar loci para caracteres cuantitativos (QTL).

La esencia de la genética cuantitativa es comprender la base genética y la arquitectura de la variación de los caracteres cuantitativos dentro y entre las poblaciones. La arquitectura genética de los caracteres cuantitativos conecta los genotipos con los fenotipos: esta consiste básicamente en el número, la posición genómica, la frecuencia y los efectos de los loci para caracteres cuantitativos (QTL), así como la interacción de los alelos de un gen (dominancia) y entre genes (epístasis), los posibles efectos pleiotrópicos de cada QTL y la interacción de los QTL con el ambiente, entre varios de los factores a evaluar de mayor importancia (Falconer & Mackay 1996, Zeng *et al.* 1999).

En este estudio, nosotros presentamos los resultados de un mapeo geonómico para QTL que afectan la variación fenotípica de tres distintos caracteres: la resistencia al vapor de etanol en adultos (REV – “*resistance to ethanol vapor*”); la recuperación al coma por consumo de etanol en adultos (REC – “*recovery to ethanol-coma*”) y la supervivencia de larvas en medios de cultivo con etanol (SME – “*survival in medium with ethanol*”). Utilizamos un diseño de RIL a partir de retrocruzas recíprocas y de mapeo de intervalo compuesto con dos poblaciones de líneas recombinantes endocriadas (RIL) derivadas de líneas endogámicas seleccionadas para la resistencia al estrés térmico provenientes de Australia y de Dinamarca, denominadas SH2 y D48,

respectivamente (Norry *et al.* 2004). A pesar de que SH2 y D48 no fueron seleccionadas para la resistencia o la recuperación al etanol, las líneas RIL mostraron fenotipos con gran variación fenotípica para los tres caracteres estudiados.

Usando este diseño de mapeo de QTL nos planteamos responder las siguientes preguntas: ¿Existe en estas líneas varianza genética para los caracteres medidos? ¿Cuál es la relación entre los diferentes caracteres medidos en adultos y en larvas? ¿Qué regiones del genoma de *Drosophila melanogaster* influyen a los fenotipos de los caracteres medidos? ¿Existe superposición (colocalización) o no en las arquitecturas genéticas de estos tres diferentes caracteres? ¿Y entre los sexos?

Objetivos:

- Interpretar la **complejidad fenotípica y genotípica de la respuesta al etanol** a través del análisis del conjunto de datos fenotípicos obtenidos en los tres caracteres.
- Comprender la **arquitectura genética de la respuesta al etanol** mediante el **mapeo de QTL** utilizando las líneas RIL en los tres caracteres.
- Evaluar la posible **superposición en las arquitecturas genéticas** de estos tres diferentes caracteres y entre los sexos.
- Identificar posibles **genes candidatos** que podrían estar determinando la variabilidad fenotípica encontrada **para la respuesta al etanol**.

Materiales y métodos

Líneas endocriadas recombinantes (RIL)

Las moscas parentales para obtener líneas RIL derivaron de una línea australiana y una danesa, rotuladas SH2 y D48 respectivamente, como se describe en Norry *et al.* (2004). Estas líneas fueron obtenidas por selección artificial para la resistencia al coma por alta temperatura (KRHT) y, posteriormente endocriadas. La construcción de las líneas RIL se detalla en Norry *et al.* (2008) y se describe brevemente en Materiales y Métodos del Capítulo II. *Loci* microsatélites se utilizaron como marcadores moleculares (Tabla 1 del Capítulo II). La descripción de la extracción de ADN, la técnica de PCR y el genotipado están descritos en Norry *et al.* (2008).

Ensayo de resistencia al vapor de etanol (REV)

Todos los individuos experimentales de cada una de las RIL fueron criados bajo condiciones estandarizadas a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ bajo un ciclo de 12-horas oscuridad/12-horas luz. REV se midió como la proporción de individuos que se mantienen activos en tubos de vidrio (11cm de largo y 2,5 cm de diámetro). Para evitar cualquier posible variación circadiana, todas las mediciones REV se realizaron entre las 11:30 h y 15:30 h, ya que se conocen caracteres que varían su respuesta luego del atardecer, incluso en las moscas criadas en laboratorio (por ejemplo Sorensen & Loeschcke 2002). Para separar a ambos sexos se utilizó anestesia con CO_2 por lo menos 48 horas antes del ensayo. Veinte a 25 moscas de cada sexo de cada RIL de 5 días de edad se probaron en cada tubo. Utilizamos 5 réplicas para cada una de las RIL y para cada sexo. Todas las medidas se realizaron a 25°C .

Para el tratamiento del estrés, las moscas fueron expuestas 10 min en tubos de vidrio invertidos con tapón de algodón embebidos en una solución de etanol/agua (70:30) cubierto por un tul (ver figura 2 del Capítulo I). Después de 10 min. se anotó la proporción de individuos que fue capaz de sostenerse sobre sus patas en cada uno de los tubos (para ver un método similar ver Hoffmann & Parsons 1993) El valor medio de las proporciones para los 5 tubos, multiplicado por 1000, se utilizó para obtener la estima final de REV para cada RIL.

Ensayo de recuperación al coma por exposición al etanol (REC)

Todos los individuos experimentales de cada una de las RIL fueron criados bajo condiciones estandarizadas a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ bajo un ciclo de 12-horas de oscuridad/12-horas de luz. Todas las medidas se realizaron a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. REC se midió, prácticamente, casi de la misma forma que la descrita en trabajos previos (Berger *et al.* 2004).

Para cada una de las RIL y para cada sexo, 5 réplicas de aproximadamente 20 moscas cada una, fueron colocadas en tubos de 15 ml Falcon cónico con pequeñas perforaciones y un gorro de tul para permitir el flujo de vapor. Unos 30 tubos Falcon fueron colocados en una caja hermética con 300 ml de una solución de etanol:agua (70:30); Berger *et al.* (2004) utilizaron en esta etapa tubos Falcon de 50 ml e intoxicaron las moscas mediante el uso de un evaporador. Para lograr el coma por intoxicación con etanol en las moscas y la recuperación de las mismas, las exposiciones al vapor de etanol se realizaron durante 30 min. Tras la exposición al etanol, la mayoría o todas las moscas habían perdido el control postural y en general estaban inmóviles en

el fondo de los tubos. A continuación, los 30 tubos fueron retirados de la caja con solución de etanol y las moscas de cada tubo fueron transferidas a otro tubo Falcon vacío de 50 ml cónico con pequeñas perforaciones para permitir el flujo de aire en donde se observó la recuperación de los individuos; aquí, Berger *et al.* (2004), hacen uso de otro tipo de tubo para la recuperación. A medida que los individuos se recuperaban de la intoxicación, volvían a tener control de los movimientos e intentaban trepar por las paredes del tubo producto de la geotaxis negativa propia de las moscas adultas. El momento en que la mosca logró subir a las paredes laterales de los tubos hasta la marca de 20 ml en el tubo cónico de 50 ml Falcon fue tenido en cuenta como el tiempo de recuperación para cada individuo, en el trabajo de Berger *et al.* (2004) se muestreo cada minuto las moscas restantes en cada tubo, considerando recuperada cualquier mosca que estuviese parada en la pared del tubo. Para tomar el registro de los tiempos en segundos se utilizó el mismo programa desarrollado por el tesista que fue utilizado en el capítulo I para la medición de CCR en la G34 descrito en el ANEXO I. El porcentaje de recuperación ($(\text{número de moscas recuperadas} / \text{número de moscas totales}) \times 100\%$) se grafica en función del tiempo. El tiempo de recuperación media (MRT- "*mean recovery time*"), es el tiempo para el cual el 50% de las moscas presentes en el tubo de una muestra se había recuperado y fue calculado como en Berger *et al.* (2004) con el programa SigmaPlot (SPSS Inc., Chicago, IL). Una vez transcurrido una hora del comienzo del ensayo de recuperación, las moscas que no subieron por las paredes de los tubos se consideraron como muertas ("muerte"). Se promediaron los valores de MRT de las 5 repeticiones para obtener una estima de REC para cada RIL y cada sexo. Para mejorar la comprensión de los datos, efectuamos la siguiente transformación de la variable REC. Usamos un valor arbitrario (3000) al que le restamos el MRT promedio obtenido de cada línea. De esta manera aquellas líneas que presentan mayor velocidad de recuperación (menor MRT) poseen los valores más altos de REC y viceversa. De manera tal de asociar los valores más altos de la variable a las mayores velocidades de recuperación.

Determinación de la supervivencia de las larvas en un medio con etanol (SME)

Todos los individuos experimentales de cada línea RIL fueron criados bajo condiciones estandarizadas, 25°C de temperatura y bajo un ciclo de 12h luz /12h oscuridad, como para todo el resto de los ensayos con RIL. Todas las mediciones se

realizaron a 25°C. La medición de SME se efectuó de forma muy similar a la realizada en trabajos anteriores (Fry 2001).

La supervivencia, tanto de larva a pupa como de larva a adultos, de cada RIL se midió en dos medios diferentes: medio control (medio con 0% de etanol) y medio con etanol (medio con 3% de etanol v/v). Para cada una de las RIL y para cada medio se realizaron 5 mediciones réplicas. Las larvas fueron recogidas luego de permitir a las moscas adultas poner huevos en pequeñas cucharas con Agar y levadura. En cada tubo, se colocaron 20 moscas adultas con una cucharita plástica que tenía Agar y levadura. A las moscas se les permitió poner huevos durante 48 horas. Después de este tiempo, las moscas fueron retiradas y larvas del primer estadio fueron recogidas de las cucharitas. Para cada tubo con el medio control o medio con etanol se colocaron 20 larvas. Entre los días 11-20 posteriores a la construcción de los tubos experimentales, se contaron las pupas y los emergidos en cada tubo. Las moscas emergidas fueron retiradas al menos una vez cada dos días. La media del porcentaje de pupas para el medio de etanol ($(\text{Número de pupas} / \text{Número de larvas por tubo (20)}) \times 100\% = (P_{ET})$), fue dividida por la media del porcentaje de pupas para el medio control ($(\text{Número de pupas} / \text{Número de larvas por tubo (20)}) \times 100\% = (P_{control})$) para cada una de las líneas RIL. Este mismo algoritmo se utilizó para el caso de la supervivencia desde larva a adulto. Esto previene que la tasa de supervivencia intrínseca de cada línea tenga influencia en el análisis de la tolerancia al etanol propiamente dicha. Para mejorar la distribución de la variable y obtener una distribución normal de los datos, sumamos uno al cociente y aplicamos el logaritmo natural. Esta nueva variable [P-SME - supervivencia desde larva a pupa en un medio con etanol = $\ln ((P_{ET} / P_{control}) + 1)$] se calculó para obtener la estima final de la supervivencia desde larva a pupa en un medio con etanol (3%) para cada RIL. Para estimar la supervivencia desde larva a adultos (A-SME - supervivencia desde larva a adulto en un medio con etanol) se utilizó el número de adultos que emergió en lugar del número de pupas, tanto en medio de control como en el medio con etanol.

Análisis estadístico

Para los caracteres REV, REC, P-SME y A-SME realizamos análisis de varianza (ANOVA) de una (para P-SME y A-SME) y dos vías (para REV Y REC), en este último caso utilizamos el efecto fijo de “tipo de línea” (RIL-SH2 versus RIL-D48), el efecto fijo sexo y su interacción.

Luego realizamos una serie de pruebas estadísticas para explorar, en los cuatro caracteres, las características genéticas y fenotípicas de las RIL. Entre ellas destacamos las siguientes. Dentro de cada conjunto de líneas RIL (RIL-D48 y RIL-SH2) evaluamos para cada sexo por separado, los componentes de la varianza a través de un ANOVA de una vía para lo que es necesario que el efecto (línea) sea considerado aleatorio. A partir de este resultado, calculamos la heredabilidad en sentido estricto (h^2) mediante el cociente entre el componente de varianza aportado por el efecto aleatorio línea (V_L) y la suma de este último con el componente de varianza dentro de las líneas (V_E). Hemos utilizado la heredabilidad en sentido estricto ($Var_{Aditividad} / Var_{Fenotípica}$ siendo que $Var_{Genética} = Var_{Aditividad} + Var_{Dominancia} + Var_{Epístasis}$) en lugar de la heredabilidad en sentido amplio ($Var_{Genética} / Var_{Fenotípica}$) debido a lo siguiente: Si bien el uso de líneas RIL permite suponer que no existe varianza producto de los efectos de dominancia debido a la homocigosis de las líneas y habiendo realizado el análisis de epístasis, preferimos, pese a que pueden existir efectos propios de la epístasis que no han sido detectados por la prueba de epístasis, utilizar la heredabilidad en sentido estricto sabiendo que podemos estar sobrevalorando el valor de la misma. Asimismo realizamos pruebas de estima de la correlación de Pearson (r) para cada sexo por separado entre los siguientes caracteres REC, REV y P-SME (no se informa el resultado con A-SME ya que los resultados son prácticamente idénticos a P-SME) El siguiente grupo de análisis consiste en ANOVA de dos vías para cada RIL derivada de cada retrocruza (RIL-D48 y RIL-SH2) por separado donde un factor evaluado es el factor aleatorio línea (L), el Sexo (S) es el segundo factor (factor fijo) y se analiza la interacción entre ambos (L x S) que nos permite identificar la interacción genotipo-por-sexo (GSI), para esto último también evaluamos la estima de correlación (r) en la respuesta para cada carácter entre los sexos. Por último para comparar entre los distintos caracteres (REV, REC, P-SME y A-SME) y entre las diferentes RIL derivadas de retrocruzas (RIL-D48 y RIL-SH2) la importancia del componente de varianza aportado por el factor aleatorio línea (V_L) respecto de la media correspondiente calculamos el coeficiente de varianza (CV_L) como el cociente entre la raíz cuadrada de V_L y la media para cada sexo dentro de cada carácter y cada RIL derivada de retrocruzas (para más detalles de todos los análisis estadísticos ver Morgan & Mackay 2006). Todos los análisis fueron efectuados usando el STATISTICA (*data analysis software system*), version 6, StatSoft, Inc. (2001).

Análisis de QTL

Los genotipos para los marcadores moleculares fueron numerados en función de la cantidad de alelos de SH2 (0 o 2) tanto para RIL-D48 como para RIL-SH2. El mapeo de intervalo compuesto (Zeng 1994) fue utilizado para evaluar la hipótesis de que un intervalo flanqueado por dos marcadores adyacentes contenga un QTL. Para identificar QTL hemos utilizado el modelo de mapeo de intervalo compuesto del programa QTL-Cartographer (Wang *et al.* 2010), con el diseño Ri2 (para líneas RIL, de apareamiento de hermanos completos), inicialmente utilizamos cinco marcadores control y un tamaño de ventana de 10cM.

Exploramos los efectos de alterar la combinación de los parámetros usados inicialmente. La posición de los QTL encontrados usando 10 cM como ventana y cinco marcadores control, fue la más consistente dentro un amplio rango de combinaciones puestas a prueba. El umbral de significación fue determinado mediante 1000 permutaciones al azar (para más detalles ver Hughes & Leips 2006). Los efectos de la aditividad fueron calculados utilizando el programa QTL-Cartographer. Las interacciones epistáticas fueron evaluadas usando el modelo lineal (ver Capítulo II) de a pares de marcadores moleculares (Morgan & Mackay 2006; Norry *et al.* 2008).

Para la selección de los genes candidatos en los varios caracteres evaluados se realizó una búsqueda dentro de cada región de los QTL detectados entre los genes de función conocida que estuvieran relacionados con los parámetros de búsqueda o palabras claves como ser resistencia al etanol/alcohol, recuperación desde la exposición al etanol/alcohol y sensibilidad al etanol/alcohol en la base de datos *FlyBase Gene database* (FlyBase *et al.* 2004) www.flybase.org.

Resultados

Fenotipos de los paneles RIL para REC, REV y SME

El resumen de medias con sus errores estándar para los paneles RIL (RIL-D48 y RIL-SH2) puede verse en la Tabla 1. Todas las pruebas de ANOVA para las RIL derivadas de retrocruzadas (excepto en RIL-D48 para REV cuando se evaluaron los machos, P-SME y A-SME, ver Tabla 2) dieron diferencias significativas en el factor aleatorio línea, vale recordar que, aunque en general se utilizan líneas parentales que difieren para los caracteres a evaluar, no es necesario que así sea; dos líneas parentales con medias fenotípicas que no difieren entre si pueden estar ocultando varianza genética

que se evidencia en los efectos sobre el fenotipo de las RIL derivadas de retrocruzas (por segregación transgresiva) obteniendo líneas con fenotipos significativamente mayores y/o menores a los fenotipos parentales (Mackay 2001)

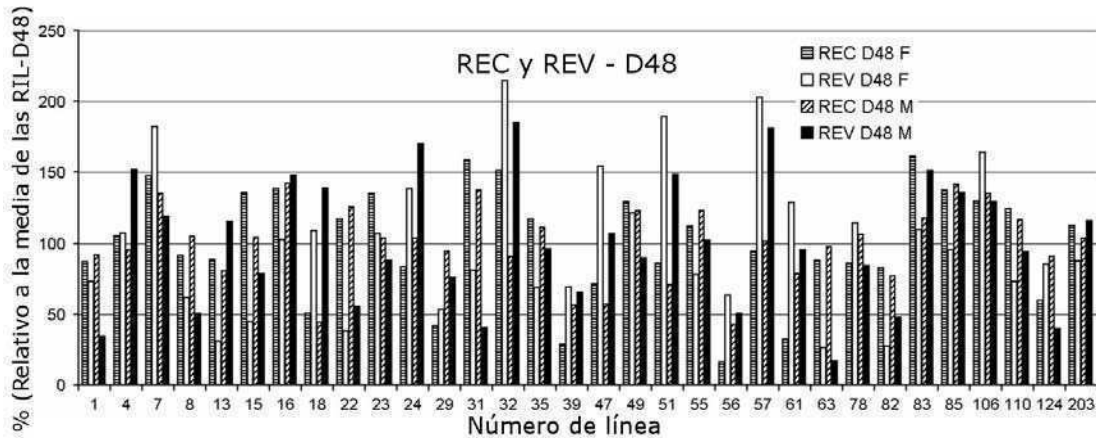


Figura 1. Se muestran REC y REV de cada línea para las RIL-D48 en unidades porcentuales respecto del valor medio para cada sexo y para cada caracter. Los números en el eje x corresponden a la numeración arbitraria que recibieron cada una de las líneas RIL.

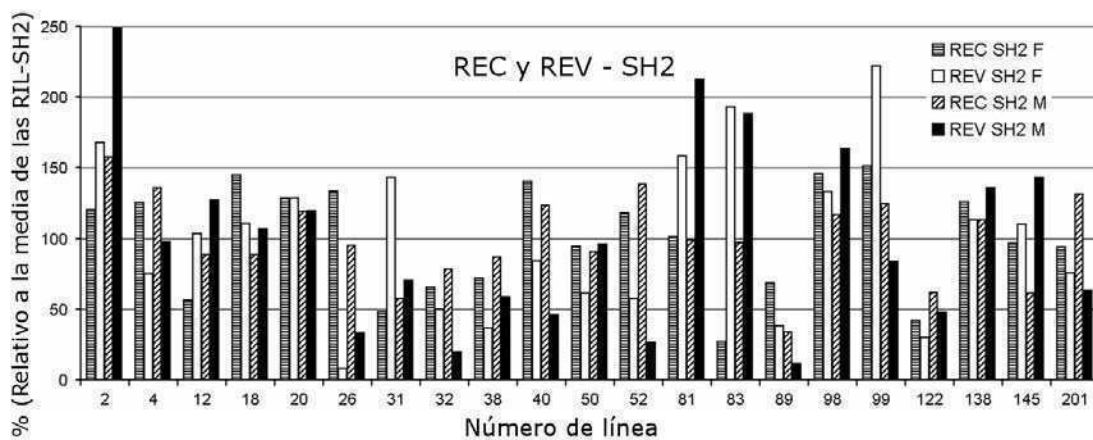


Figura 2. Se muestran REC y REV de cada línea para las RIL-SH2 en unidades porcentuales respecto del valor medio para cada sexo y para cada caracter. Los números en el eje x corresponden a la numeración arbitraria que recibieron cada una de las líneas RIL.

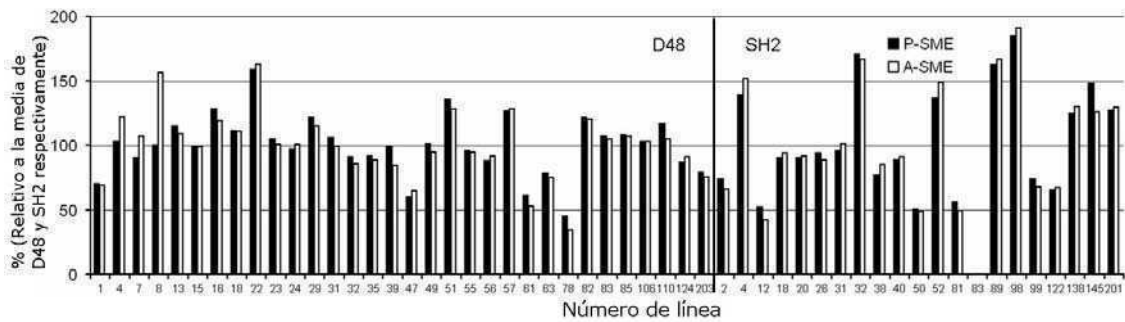


Figura 3. Se muestran P-SME y A-SME de cada línea para las RIL-D48 y seguido para las RIL-SH2, en unidades porcentuales respecto del valor medio para cada carácter correspondiente a cada RIL derivada de retrocruza. Los números en el eje x corresponden a la numeración arbitraria que recibieron cada una de las líneas RIL. Aquí puede verse que los valores para P-SME y para A-SME son muy similares. Consecuentemente, se utilizara SME para hablar de cualquiera de los dos caracteres ya que son prácticamente equivalentes.

En las figuras 1, 2 y 3 pueden observarse las medias de cada una de las líneas de cada retrocruza (RIL-D48 y RIL-SH2) para cada uno de los caracteres; las medias generales de cada RIL derivada de retrocruza pueden verse en la Tabla 2.

Tabla 1. Valores fenotípicos medios para los paneles RIL-D48 y RIL-SH2 en todos los caracteres medidos (REV, REC y SME). Entre paréntesis están los correspondientes valores de error estándar de la media. Los estadísticos para las líneas RIL fueron computados promediando los valores medios de todas las RIL.

Línea	REV		REC		SME	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras	P-SME (Pupas)	A-SME (Adultos)
RIL-D48	304.40 (24.52)	286.06 (25.86)	1737.59 (83.23)	1471.09 (101.76)	0.548 (0.022)	0.567 (0.026)
RIL-SH2	221.81 (31.56)	259.72 (32.13)	1573.09 (106.38)	1364.76 (112.86)	0.390 (0.039)	0.395 (0.042)

Análisis estadísticos entre las líneas de cada RIL derivada de retrocruza para sexos separados

Los ANOVA realizados dentro de cada RIL derivada de retrocruza y cada sexo mostró resultados altamente significativos ($P < 0.0001$) para el factor aleatorio línea (L) excepto en REV-M, P-SME y A-SME en la RIL derivada de retrocruza RIL-D48 donde el factor línea fue estadísticamente no significativo (NS) y en REV-F de RIL-D48, P-SME y A-SME de RIL-SH2 donde el factor línea no fue extremadamente significativo

($0.05 > P > 0.001$) (Tabla 2). En consonancia con esto último, los valores de heredabilidad en sentido estricto (h^2) son altos para REC en ambas RIL derivadas de retrocruzas ($0.325 \leq h^2 \leq 0.518$) siendo mayores aún para REV en RIL-SH2 ($0.624 \leq h^2 \leq 0.646$). Para REV-F de RIL-D48, P-SME y A-SME de RIL-SH2 donde el factor línea fue moderadamente significativo la h^2 fue menor ($0.122 \leq h^2 \leq 0.168$). Menor aún para aquellos que el factor línea dio resultados no significativos ($0.058 \leq h^2 \leq 0.074$). Es importante recordar que la h^2 tiene sentido solo para estas RIL derivadas de retrocruzas y para los ambientes donde se han realizado los experimentos no pudiendo extrapolarse estos resultados a otros ambientes u otras líneas. El coeficiente de varianza (CV_L) expresa una relación entre la varianza explicada por diferencia entre las líneas y la media del carácter para cada RIL derivadas de retrocruza dentro de cada sexo. REC presenta resultados homogéneos para CV_L en ambas RIL derivadas de retrocruzas y ambos sexos ($17.83 \leq CV_L \leq 23.45$) no así REV ($22.04 \leq CV_L \leq 61.59$) ni SME ($13.93 \leq CV_L \leq 36.05$) que presentaron valores de CV_L muy heterogéneos entre las RIL derivadas de retrocruzas y entre los sexos.

Por último se evaluó, dentro de cada RIL derivada de retrocruza, la correlación entre los distintos caracteres para cada uno de los sexos por separado. Si bien las estimas de correlación (r) variaron entre -0.353 y 0.350 ninguna de estas fueron significativamente distintas de cero. Esto nos indica que puede estar existiendo, para esta población, una única arquitectura genética para cada carácter independientemente (Tabla 2)

Tabla 2. Resultados del ANOVA para los caracteres REC, REV y SME entre las líneas RIL dentro de cada retrocruza y de cada sexo por separado; seguido se presentan los valores para la heredabilidad en sentido estricto (h^2) y el coeficiente de variación (CV_L). También se muestran los coeficientes de correlación (r) entre cada par evaluado, ninguno de estos pares fue estadísticamente significativo para la correlación.

Retrocruza	Caracter	Sexo	Varianza	V_L	V_E	h^2	CV_L	r
RIL-D48	REC	M	263695	101195****	162500	0.384	18.31	REC M/REV M = 0.113
		F	229612	119025****	110586	0.518	23.45	REC F/REV F = 0.211
	REV	M	78281	4502 ^{NS}	73778	0.058	22.04	REV M/P-SME = 0.200
		F	70716	8620*	62097	0.122	32.46	REV F/P-SME = -0.103
	SME	P	0.0895	0.0066 ^{NS}	0.0829	0.074	14.85	P-SME/REC M = 0.213
		A	0.0950	0.0062 ^{NS}	0.0888	0.066	13.93	P-SME/REC F = 0.226
RIL-SH2	REC	M	242150	78673****	163477	0.325	17.83	REC M/REV M = 0.350
		F	250011	89695****	160316	0.359	21.94	REC F/REV F = 0.148
	REV	M	29929	18665****	11264	0.624	61.59	REV M/P-SME = -0.353
		F	30233	19536****	10696	0.646	53.82	REV F/P-SME = -0.342
	SME	P	0.1212	0.0180*	0.1032	0.149	34.45	P-SME/REC M = -0.048
		A	0.1208	0.0203**	0.1005	0.168	36.05	P-SME/REC F = 0.305

NS, no significativo, $P > 0.05$; * $0.05 > P > 0.01$; ** $0.01 > P > 0.001$; *** $0.001 > P > 0.0001$; **** $0.0001 > P$.

Análisis estadísticos para la interacción Genotipo-por-Sexo (GSI)

Para los caracteres REC y REV evaluamos la interacción entre genotipo y sexo. Cuatro ANOVA de modelo mixto (factor aleatorio línea (L); factor fijo sexo (S) y su interacción (L x S)) se realizaron separadamente para cada RIL derivada de retrocruza y cada caracter (Tabla 3). El efecto aleatorio línea resultó ser altamente significativo en todos los casos, explicando, en el caso de REC, un porcentaje de la varianza fenotípica total que varía entre 36.6% para RIL-D48 y 28.4% para RIL-SH2; en el caso de REV, los porcentajes presentan mayor dispersión, siendo 17.8% para RIL-D48 y 50.2% para RIL-SH2. El efecto fijo sexo fue solo significativo para el caracter REC en ambas RIL derivadas de retrocruzas, no así para el caracter REV (Tabla 3).

La interacción entre ambos factores (L x S) fue estadísticamente significativa para REC en RIL-D48 y más ampliamente significativa para REV en RIL-SH2. De la varianza fenotípica total, L x S explica porcentajes moderados y similares para REC (8% para RIL-D48 y 5.8% para RIL-SH2) y, nuevamente, una mayor dispersión para REV (0% para RIL-D48 y 13.3% para RIL-SH2) (Tabla 3)

Por último, evaluamos la correlación para cada caracter entre ambos sexos para cada retrocruza por separado. En todos los casos la estima de correlación fue estadísticamente significativa y están entre los siguientes valores ($0.610 \leq r \leq 0.796$) sugiriendo que la arquitectura genética de ambos sexos es similar para cada uno de los caracteres en ambas paneles de líneas RIL (Tabla 3)

Tabla 3. Resultados para el ANOVA en los caracteres REC y REV entre las líneas RIL dentro de cada retrocruza por separado. Entre paréntesis esta presentado: primero, el error estándar de la media, en los casos restantes, representa el porcentaje de varianza explicada por el factor aleatorio línea (V_L) o por la interacción entre de este factor con el factor fijo sexo ($V_{L \times S}$) o el porcentaje de varianza explicada por el error dentro (V_E). También se presentan los coeficientes de correlación (r) entre los sexos con sus respectivos valores de significación estadística para ambos caracteres en ambas RIL derivadas de retrocruzas.

Retrocruza	Caracter	Media (ES)	Sexo (S)	V_L (%)	$V_{L \times S}$ (%)	V_E (%)	r
RIL-D48	REC	1663.26 (27.92)	*	90347 (36.6)****	19613 (8.0)*	136645 (55.4)	0.796***
	REV	295.25 (15.37)	NS	14696 (17.8)****	-8208 (0.0) ^{NS}	67938 (82.2)	0.723***
RIL-SH2	REC	1515.21 (34.87)	**	69996 (28.4)**	14188 (5.8) ^{NS}	161896 (65.8)	0.610**
	REV	240.77 (11.87)	NS	15091 (50.2)***	4009 (13.3)***	10980 (36.5)	0.709***

NS, no significativo, $P > 0.05$; * $0.05 > P > 0.01$; ** $0.01 > P > 0.001$; *** $0.001 > P > 0.0001$; **** $0.0001 > P$.

Mapeo de QTL

Utilizamos el mapeo de intervalo compuesto de QTL y obtuvimos los siguientes resultados (Tabla 4). Para REV se encontraron ocho QTL, seis de ellos en la retrocruza RIL-SH2 y los dos restantes en RIL-D48 (uno de ellos es marginalmente significativo). En RIL-D48 uno de los QTL se encontró para hembras (Cromosoma 1 (C1), QTL range: 16F3-F6) y otro para machos (Cromosoma 3 (C3), QTL range: 97F-99D). En RIL-SH2 los seis QTL se encontraron solo en hembras (1: Cromosoma 2 (C2), QTL range: 38E1-E9; 2: C2, QTL range: 50C-54B; 3: C2, QTL range: 56D-59A; 4: C3, QTL range: 73A-86E; 5: C3, QTL range: 86E-90B; 6: C3, QTL range: 97F-99D) (Tabla 4; Figura 4)

Para REC se encontraron tres QTL, todos ellos en RIL-D48, dos de ellos en hembras (1: C1, QTL range: 4F-10A; 2: C3, QTL range: 64D-66E) y un tercero en machos (C1, QTL range: 4F-10A) (Tabla 4; Figura 4)

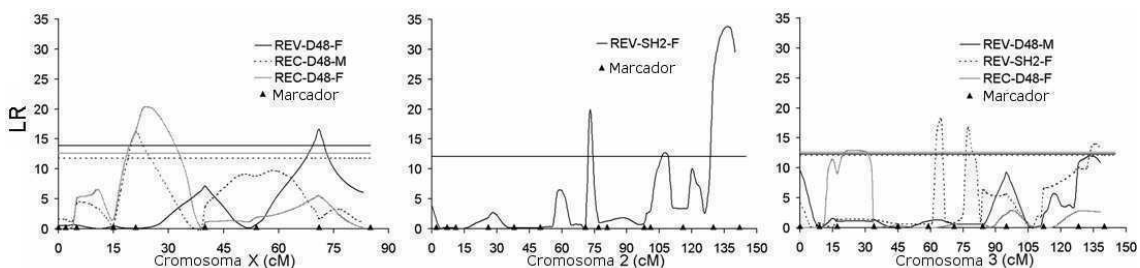


Figura 4. Grafico de los valores para la tasa de probabilidad (LR) en función de la posición del mapa (en cM) para el mapeo de intervalo compuesto para REV y REC (solo aquellos que

presentaron al menos un QTL) en *D.melanogaster* tanto para RIL-D48 como para RIL-SH2 en ambos sexos. Los umbrales de significación fueron determinados mediante 1000 permutaciones al azar (líneas horizontales). Los triángulos sobre el eje x corresponden a la posición de los marcadores moleculares utilizados en el mapeo de intervalo compuesto.

Para SME se encontraron siete QTL para P-SME y tres QTL para A-SME. Cinco QTL para P-SME se detectaron en RIL-D48 (1: C1, QTL range: 4F-10A; 2: C1, QTL range: 10A-12E; 3: C1, QTL range: 12E-16F; 4: C2, QTL range: 30A-34D; 5: C3, QTL range: 90E-95C), otros dos se detectaron en RIL-SH2 (1: C1, QTL range: 4F-7B; 2: C1, QTL range: 10A-12E). Para A-SME, dos QTL fueron detectados en RIL-SH2 (1: C1, QTL range: 4F-7B; 2: C1, QTL range: 10A-12E) y uno más en RIL-D48 (C1, QTL range: 4F-7B) (Tabla 4, Figura 5)

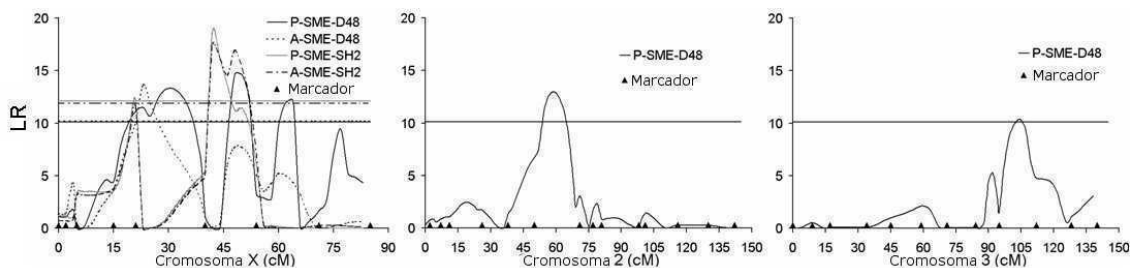


Figura 5. Grafico de los valores para la tasa de probabilidad (LR) en función de la posición del mapa (en cM) para el mapeo de intervalo compuesto para P-SME y A-SME (solo se presentan aquellos gráficos en los que se encuentre al menos un QTL) en *D.melanogaster* tanto para RIL-D48 como para RIL-SH2. Los umbrales de significación fueron determinados mediante 1000 permutaciones al azar (líneas horizontales). Los triángulos sobre el eje x corresponden a la posición de los marcadores moleculares utilizados en el mapeo de intervalo compuesto.

Solo un QTL solapó para ambos sexos en la misma RIL derivada de retrocruza y fue solo para REC (C1, QTL range: 4F-10A). Un QTL más solapo para los distintos sexos pero fueron los machos de RIL-D48 con las hembras de RIL-SH2 para REV (C3, QTL range: 97F-99D) (Tabla 4, Figura 4)

Entre ambas retrocruzas solapan dos QTL para P-SME, uno parcialmente y otro completamente (1: C1, QTL range: 4F-7B; 2: C1, QTL range: 10A-12E) y un QTL para A-SME (C1, QTL range: 4F-7B) (Tabla 4, Figura 5)

Entre REC y REV no solapan ningún QTL. Mientras que los tres QTL encontrados para A-SME se solapan con QTL encontrados para P-SME. Por último, se

encontró un único QTL (C1, QTL range: 4F-10A) que solapa entre caracteres, estos caracteres son REC de RIL-D48 (en ambos sexos) con P-SME de RIL-D48 (y parcialmente con P-SME de RIL-SH2 y A-SME de ambas retrocruzas) (Tabla 4, Figura 4 y 5)

El solapamiento entre los QTL de distinto sexo sugiere una arquitectura genética similar, no idéntica, para ambos sexos en lo que respecta a REC y REV. Por otro lado, la falta de solapamiento entre los QTL de los distintos caracteres sugiere que la arquitectura genética sería independiente para cada uno de ellos.

Tabla 4. QTL para los tres caracteres medidos (REV, REC y SME) en cada sexo y en cada RIL derivada de retrocruza junto con su correspondiente efecto de aditividad (a), el porcentaje de variación fenotípica explicada (% Var) y los genes candidatos.

Caracter	Sexo	RIL	Rango del QTL	a	% Var	Genes candidatos (posición)
REV	Hembras	D48	16F3-F6	127	11.7	<i>Sh</i> (16F3-5)
REV*	Machos	D48	97F-99D	80	16.8	<i>Pglym78</i> (98F12-13)
REV	Hembras	SH2	38E1-E9	140	1.3	-
REV	Hembras	SH2	50C-54B	92	6.3	<i>Hsc70-5</i> (50E6)
REV	Hembras	SH2	56D-59A	146	13.2	<i>Egfr</i> (57E9-F1)
REV	Hembras	SH2	73A-86E	-146	0.2	<i>gk</i> (75B11-12), <i>cyc</i> (76C6), <i>elm</i> (83B8), <i>Fdh</i> (86C7)
REV	Hembras	SH2	86E-90B	98	0.5	<i>desat1</i> (87B10-11), <i>CG7362</i> (88D2)
REV	Hembras	SH2	97F-99D	110	10.2	<i>Pglym78</i> (98F12-13)
REC	Machos	D48	4F-10A	-324	8.2	<i>nob</i> (4F7-11), <i>Fum</i> (5C1-6C11), <i>iav</i> (6D3), <i>Tbh</i> (7D2)
REC	Hembras	D48	4F-10A	-490	6.4	
REC	Hembras	D48	64D-66E	-497	5.1	<i>Clk</i> (66A12), <i>Idh</i> (66C8)
P-SME	-	D48	4F-10A	-0.126	8.7	<i>nob</i> (4F7-11), <i>Fum</i> (5C1-6C11), <i>iav</i> (6D3), <i>Tbh</i> (7D2)
P-SME	-	D48	10A-12E	0.117	1.4	<i>cex</i> (11A7-B9), <i>agn</i> (11A8)
P-SME	-	D48	12E-16F	0.117	1.7	<i>rut</i> (12F4), <i>vap</i> (14A5-6), <i>hang</i> (14C4), <i>Sh</i> (16F3-5)
P-SME	-	D48	30A-34D	-0.097	4.2	<i>Aldh</i> (30B1), <i>Pka-C1</i> (30C5), <i>Mdh1</i> (31B1-F2)
P-SME	-	D48	90E-95C	-0.094	6.1	<i>InR</i> (93R4-9)
P-SME*	-	SH2	4F-7B	0.165	1.3	<i>nob</i> (4F7-11), <i>Fum</i> (5C1-6C11), <i>iav</i> (6D3)
P-SME	-	SH2	10A-12E	-0.218	9.1	<i>cex</i> (11A7-B9), <i>agn</i> (11A8)
A-SME	-	D48	4F-7B	-0.116	13.5	<i>nob</i> (4F7-11), <i>Fum</i> (5C1-6C11), <i>iav</i> (6D3)
A-SME	-	SH2	4F-7B	0.175	0.9	
A-SME	-	SH2	10A-12E	-0.242	7.9	<i>cex</i> (11A7-B9), <i>agn</i> (11A8)

*QTL marginalmente significativo

Efectos de los QTL

Evaluamos los efectos epistáticos entre todos los posibles pares de marcadores usados en nuestro análisis para todos los caracteres medidos, y no detectamos ningún efecto epistático significativo (luego de la corrección para múltiples pruebas). Luego estimamos el efecto de la aditividad (a) para los picos de QTL identificados, también calculamos el porcentaje de variación fenotípica total (% Var) explicada por cada QTL (Tabla 4). Casi todos los QTL encontrados son específicos para cada carácter y para cada RIL derivada de retrocruza. Los porcentajes de variación fenotípica explicada para cada QTL muestran que una gran parte de los QTL que se encontraron en la RIL derivada de retrocruza RIL-D48 explican un porcentaje mayor que los QTL encontrados en RIL-SH2. En promedio, cada QTL encontrado en este mapeo, explica un 6.5% de la variación fenotípica del correspondiente carácter.

Para el caso de REV, los QTL que explican los mayores porcentajes de variación fenotípica ($16.8\% > \% \text{ Var} > 6.3\%$) muestran valores positivos de a , esto nos indica que el alelo proveniente de la línea parental SH2 incrementaría la resistencia a los vapores de etanol (REV); aquellos QTL que explican los pequeños porcentajes de variación fenotípica ($1.3\% > \% \text{ Var} > 0.2\%$) poseen tanto valores positivos como negativos de a .

Para REC, los únicos tres QTL encontrados, todos en las RIL-D48, explican valores moderados de variación fenotípica ($8.2\% > \% \text{ Var} > 5.1\%$), asimismo todos poseen valores negativos de a , consecuentemente con los valores medios de las RIL derivadas de retrocruzas (Tabla 1) donde el panel RIL-SH2 muestra valores menores que el panel RIL-D48.

Para SME, todos los QTL encontrados de mayor efecto ($4.2\% > \% \text{ Var} > 13.5\%$) poseen valores negativos de a , mientras que todos los QTL encontrados de menor efecto ($1.7\% > \% \text{ Var} > 0.9\%$) poseen valores positivos. Esto implica que los alelos provenientes de la línea parental SH2 estarían teniendo efectos negativos, a través de los QTL de mayor efecto, en el carácter SME. Este resultado, se condice con los valores medios que presentan las RIL derivadas de retrocruzas RIL-SH2 respecto de las RIL derivadas de retrocruzas RIL-D48 (Tabla 1).

Discusión

A pesar de que las respectivas bases genéticas de la resistencia y la recuperación al etanol han sido ampliamente estudiadas, aún es poco lo que se conoce de la arquitectura genética de estos caracteres (Chakir *et al.* 1996; Fry 2003; Heberlein *et al.* 2006). Con este estudio hemos tratado de ampliar los conocimientos sobre la arquitectura genética de los tres caracteres estudiados que están íntimamente relacionados con la exposición, la resistencia y la recuperación al etanol en *Drosophila melanogaster*. Nosotros estimamos parámetros de genética cuantitativa y con ellos hemos logrado localizar QTL que afectan la variación en los tiempos de recuperación en adultos y en la resistencia tanto en adultos como en larvas en una población de líneas RIL. Hemos encontrado varianza genética significativa para los tres caracteres estudiados entre las líneas utilizadas en el mapeo y nos fue posible detectar 13 QTL relacionados con la exposición al etanol. Se han encontrado QTL para distintas regiones en los tres cromosomas mayores de *D.melanogaster*, y estos han mostrado

relativamente poca colocación entre los caracteres, sugiriendo que, si bien puede haber un mínimo solapamiento, estaríamos en presencia de arquitecturas genéticas independientes para cada carácter. Sin embargo, ambos sexos parecerían compartir una única arquitectura genética para REV y otra para REC siendo que para cada uno de los caracteres la superposición entre los QTL detectados para cada sexo es completa, de cualquier modo cabe destacar que solo un QTL se encontró para REV y otro para REC en machos, mientras que siete QTL para REV y dos para REC fueron encontrados en hembras. Los QTL detectados explican una porción variable según el carácter, la línea o el sexo de la varianza fenotípica total (8.2 – 31.7 %). Para casi todos los caracteres el porcentaje de varianza fenotípica explicado por los QTL resultó menor que las heredabilidades en sentido estricto calculadas (Tabla 2), pero REV-M y SME en D48 presentaron valores de heredabilidad en sentido estricto menores que el porcentaje de variación fenotípica explicada por los QTL, consistente con esto, estos caracteres fueron los únicos que no mostraron efectos estadísticamente significativos cuando se evaluó mediante ANOVA el efecto de las líneas (V_L). Esta situación nos fuerza a prestar particular atención a la posible debilidad de los QTL detectados para estos caracteres. La estima de los efectos de aditividad para los QTL es consistente con la dirección de divergencia entre las medias de RIL-D48 y RIL-SH2 excepto por REV donde los efectos de aditividad muestran valores positivos para los QTL de mayor efecto mientras que RIL-SH2 presenta medias menores que RIL-D48 para ese carácter.

Este estudio es un primer paso para reconocer la arquitectura genética de estos caracteres relacionados con el etanol. A pesar de esto, nosotros no avanzamos más allá de este mapeo de QTL, queda pendiente poder realizar experimentos de complementación de deficiencias o mapeos de QTL de alta resolución para poder diseccionar más aún la arquitectura genética de estos caracteres (Anholt & Mackay 2004).

Hemos identificado varios genes candidatos basados en el efecto de alguno de sus fenotipos mutantes o de la función molecular si esta estaba relacionada con el metabolismo del etanol (Tweedie *et al.* 2009). Algunos de estos genes candidatos están implicados directamente en procesos relacionados con el sistema nervioso. Por ejemplo, *nob* (4F-4F11), que mapeo para REC en la línea RIL-D48 y para SME en ambas retrocruzas. Si bien su función molecular es desconocida, *nob* es fundamental para la formación del complejo central del sistema nervioso de *Drosophila* (Fleischmann *et al.* 1995). La mutación de este gen causa defectos estructurales en el complejo central del

sistema nervioso central de adultos y produce alteraciones al comportamiento en las larvas, algunos mutantes de *nob* muestran reducida su movilidad en medios con levadura (longitud de los trayectos de forrajeo más cortos que en las larvas no mutantes) cuando se los compara con controles (Varnam & Sokolowski 1995). También se vio que afecta el caminar en adultos (Strauss 2002). En este sentido, también hemos encontrado al gen *cex* (11A7-11B9) como posible candidato en QTL para SME en ambas retrocruzas. La mutación de este gen también produce defectos estructurales en el complejo central, alterando el comportamiento locomotor de las larvas (Varnam & Sokolowski 1995). Es más, el mutante *cex*¹ mostró disminuida la capacidad de desarrollar tolerancia al etanol en trabajos previos (Scholz *et al.* 2000).

Otro gen candidato relacionado con el sistema nervioso es *Tbh* (7D2), este gen está involucrado en la actividad beta-monooxigenasa de la dopamina (Monastirioti *et al.* 1996). Algunos fenotipos mutantes de *Tbh* presentan defectos en el comportamiento locomotor tanto en adultos como en larvas (Certel *et al.* 2007; Fox *et al.* 2006; Hardie *et al.* 2007). Inclusive, el mutante *TβH*^{M18} presenta disminuida la capacidad de desarrollar tolerancia al etanol (Scholz *et al.* 2000). También relacionado al sistema nervioso y presente en el mismo QTL para SME encontramos el gen *iav* (6D3) asociado también a la octopamina al igual que *Tbh* (O'Dell 1993). La función molecular de *iav* se predice por estructura que estaría vinculada con la actividad de canal de calcio en membrana (Tweedie *et al.* 2009) y algunos mutantes de este gen presentan inconvenientes a la hora de desarrollar sensibilidad a la cocaína (McClung & Hirsh 1999), es necesario entender que existen vinculaciones fuertes entre los procesos relacionados con la repuesta a la cocaína y los procesos relacionados con la respuesta al etanol (Rothenfluh & Heberlein 2002; Abarca *et al.* 2003). El último de los genes candidatos encontrado que esta vinculado directamente con el sistema nervioso es *Sh* (16F3-16F5). Este gen, que posee actividad de canal de cationes sensible al cambio de voltaje, tiene importantes efectos pleiotrópicos reconocidos, entre ellos se destaca la sensibilidad al éter en fenotipos mutantes (Sokolowski 2001). El gen *Sh* fue encontrado en solo un QTL para REV en hembras de RIL-D48 y son necesarios otros estudios para confirmar la importancia de este gen como candidato para la respuesta al etanol.

Muchos de los genes candidatos están relacionados con el metabolismo del cAMP. Por ejemplo, *agn* (11A8) que se encontró en la región de un QTL para SME en ambas retrocruzas. Algunos mutantes de este gen muestran dañado el metabolismo de cAMP y la actividad locomotora disminuida (Savvateeva *et al.* 1991), también

encontramos a *Pka-R1* (banda 77E8) y *AcCoAS* (bandas 78C3-78C4) ambos involucrados en el metabolismo del cAMP pero con poca relación con la respuesta al etanol y encontrados solo para REV en hembras de RIL-SH2. De cualquier modo, encontramos dos genes candidatos más relacionados al metabolismo del cAMP y con importante influencia en la respuesta al etanol. Uno de estos es *rut* (banda 12F4), que posee actividad adenilato ciclasa y actividad adenilato ciclasa dependiente de calcio y calmodulina (Heisenberg 2003); algunos fenotipos mutantes presentan sensibilidad al etanol en adultos (Wolf *et al.* 2002), este gen fue localizado para un QTL de SME en la retrocruza RIL-D48 pero no para REC o REV que son los dos caracteres medidos en adultos. En este sentido es importante destacar el hecho que *rut* posee cantidad de efectos pleiotrópicos. El otro gen candidato relacionado con el cAMP es *Pka-C1* (30C5) que también se encontró en un QTL para SME en RIL-D48, *Pka-C1* cumple un rol fundamental en la cascada de cAMP en el *corpora pedunculata* del sistema nervioso de *Drosophila* mediando los procesos de aprendizaje y memoria (Skoulakis *et al.* 1993) y mutantes fenotípicos de este gen tienen incrementada la sensibilidad al etanol en adultos (Moore *et al.* 1998; Sokolowski 2001; Rothenfluh & Heberlein 2002).

Otro grupo de genes candidatos está relacionado con el metabolismo de carbohidratos. Particularmente, estos genes están involucrados en procesos como la glicólisis y el ciclo de Krebs. Uno de los caminos de desintoxicación metabólica del etanol tiene como intermediario al Acetil-CoA que juega un rol crucial en el ciclo de Krebs (Figura 6). Este es el porque este grupo de genes fue considerado de importancia para explicar la respuesta de caracteres relacionados con el etanol.

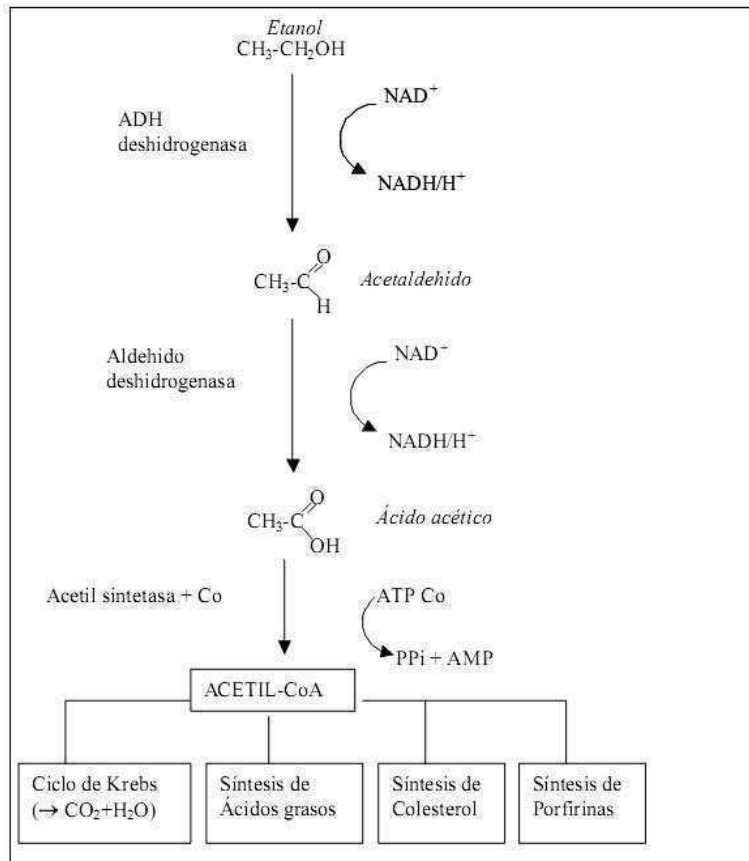


Figura 6. Ruta metabólica del etanol y su relación con procesos vinculados al metabolismo de carbohidratos.

Los genes candidatos relacionados a este proceso metabólico son: *Mdh1* (31B1-31F2) que está localizado en un QTL detectado para SME en RIL-D48. Este gen es particularmente interesante debido a que recientemente (Eanes *et al.* 2009) se encontró que el fenotipo de un mutante para *Mdh1* disminuía la tolerancia al etanol, este gen tiene actividad L-Malato deshidrogenasa, enzima importante en el ciclo de Krebs. También encontramos el gen *CG7362* (88D2) que posee actividad piruvato quinasa y está involucrado en la glicólisis (Tweedie *et al.* 2009). Este gen está localizado dentro de la región de un QTL encontrado para REV en hembras de RIL-SH2. Otro gen vinculado a la glicólisis, pero de menor importancia para este estudio, y que colocaliza con QTL encontrados para REV en hembras de RIL-SH2 y para REV en machos de RIL-D48, es *Pglym78* (98F12-98F13) que tiene actividad fosfoglicerato mutasa (Tweedie *et al.* 2009). Finalmente, encontramos varios genes más que podrían ser candidatos para la respuesta al etanol y están vinculados a la glicólisis – *CG7311* (34D1); *Pglym87* (87B3); *CG7998* (90F8-90F9); *PyK* (94A6); *CG7069* (94A6); *CG7059* (94A11) -.

El Acetil-CoA es también un importante intermediario en la síntesis de lípidos (Figura 6) y es por eso que incluimos un par de genes candidatos para la respuesta al etanol que están vinculados con la síntesis de lípidos. El gen *Fum* (5C1-6C11), que posee actividad fumarato hidratasa esta relacionado con la repuesta al etanol en larvas (Geer *et al.* 1983) y esta localizado en un QTL para SME en ambas retrocruzas y también para REC en ambos sexos de la retrocruza RIL-D48. El gen *Idh* (66C8) localizado en el un QTL de REC para hembras de RIL-D48 esta involucrado en la atomización de lípidos así como el gen *desat1* (87B10-87B11) que localiza con un QTL de REV en hembras de RIL-SH2 (Beller *et al.* 2006).

Otro grupo de genes candidatos está relacionado con genes del grupo de las proteínas de “Heat-shock” (HSP – “Heat shock proteins”) que intervienen en el acople con proteínas mal plegadas. A pesar de que parecería que las HSP tuviesen poca relación con la repuesta al etanol, las HSP están involucradas en la respuesta a muchos factores diferentes de estrés (Feder & Hofmann 1999). El gen *Hsc70-5* (50E6), que esta en la región de un QTL para REV en hembras de RIL-SH2 y posee función de HSP (Tweedie *et al.* 2009) y también esta implicado en la atomización de lípidos (Beller *et al.* 2006). También encontramos varios genes candidatos en un mismo QTL (86E-90B) que pertenecen a la familia de HSP y están involucrados la respuesta al calor (*Hsp70Aa*, *Hsp70Ab*, *Hsp70Ba*, *Hsp70Bb*, *Hsp70Bbb*, *Hsp70Bc*).

El gen *Clk* (66A12), que localiza con un QTL para REC en hembras de RIL-D48, es un muy interesante gen candidato debido a que esta involucrado en diferentes procesos. Este tiene un importantísimo rol en la regulación circadiana de la expresión de los distintos genes (Hung *et al.* 2007), también es necesario para la sensibilidad a la cocaína (Rothenfluh & Heberlein 2002) y tengamos presente la vinculación entre la respuesta a la cocaína y al etanol antes citada, lo que sugiere que la respuesta a las drogas puede estar bajo efectos de la regulación circadiana. Consistentemente con esto, *cyc* (76C6), también implicado en la regulación circadiana de la expresión génica, esta íntimamente ligado a *Clk* ya que ambos son los componentes de un complejo (*Clk.cyc*) que es parte del “reloj central” (Blau 2001). El gen *cyc* también esta involucrado en la respuesta a la cocaína (Rothenfluh & Heberlein 2002) y en la resistencia al hambre (Xu *et al.* 2008). Este gen colocaliza con un QTL para REV en hembras de RIL-SH2. Ambos genes (*Clk* y *cyc*) resultan muy interesantes debido a lo poco que se sabe de la relación entre el ritmo circadiano y la respuesta al etanol (Spanagel *et al.* 2004; Spanagel *et al.* 2005).

Otro gen más, el *InR* (93E4-93E9), fue mapeado y reconocido dentro de un QTL para REC en machos de RIL-D48 y en otro para REC en hembras de RIL-SH2 que tiene relación con la respuesta a la cocaína (Willard *et al.* 2006) y que posee actividad de receptor de insulina (Petruzzelli *et al.* 1985).

Por último, encontramos un conjunto grande de genes candidatos que tienen vinculación con la respuesta al etanol confirmada en trabajos anteriores. Uno de ellos es el gen *vap* (14A5-14A6), este está localizado dentro de un QTL para SME en RIL-D48. El gen *vap* está implicado en el desarrollo del *corpora pedunculata* y fenotipos mutantes presentan mayor sensibilidad al etanol (Scholz *et al.* 2000). Otro gen candidato es *hang* (14C4) que localiza en el mismo QTL que *vap* y fenotipos mutantes tienen alteraciones en la respuesta comportamental frente al etanol (Scholz *et al.* 2005). Otro gen más que recientemente fue asociado a la respuesta comportamental al etanol (LaFerriere *et al.* 2008) localizado dentro de la región de un QTL para REV en hembras de RIL-SH2, es el gen *elm* (83B8). Este gen está aparentemente asociado con órganos olfativos. Relacionado con este último, encontramos un gen candidato, *gk* (75B11-75B12) que también está implicado en el comportamiento asociado a los órganos olfativos. Este gen localiza en el mismo QTL que *elm*, tiene importancia en el comportamiento olfativo de *Drosophila*, fenotipos mutantes resultaron más sensitivos al etanol que los individuos controles (Shiraiwa *et al.* 2000). Otro importante gen candidato es *Egfr* (57E9-57F1). Este gen localiza dentro de un QTL para REV en hembras de RIL-SH2, siendo que este último posee cantidad de efectos pleiotrópicos cabe destacar uno de estos efectos que está vinculado con la respuesta comportamental frente al etanol (Corl *et al.* 2009).

Finalmente, encontramos dos genes candidatos más que poseen importantes roles dentro del metabolismo del etanol. El primero, *Fdh* (86C7), localiza en un QTL para REV en hembras de RIL-SH2, posee actividad alcohol deshidrogenasa y está involucrada en el metabolismo del etanol y en la oxidación del mismo (Dánielsson *et al.* 1994; Tweedie *et al.* 2009). El último gen candidato presentado es *Aldh* (30B1) que localiza en un QTL para SME en RIL-D48. Este gen posee actividad acetaldehído deshidrogenasa (Leal & Barbancho 1992), la función molecular de este gen es importante para la desintoxicación del etanol debido a que la enzima transforma acetaldehído en acetato en la ruta entre el etanol y el acetil-CoA (Fry & Saweikis 2006). Curiosamente, nosotros encontramos este gen en el mapeo para el carácter relacionado

con la etapa larvaria pero no en los caracteres medidos en adultos, este resultado es el opuesto al esperado según trabajos anteriores (Heinstra *et al.* 1989).

Para este estudio, nosotros hemos llevado a cabo un primer acercamiento al mapeo del genoma en búsqueda de QTL que influyeran la respuesta al etanol en *D. melanogaster*. Nuestros resultados han entregado siete QTL para REV, dos para REC y cinco para SME en los tres cromosomas mayores. La mayoría de los QTL identificados exhiben efectos específicos para cada carácter, sugiriendo que pese a que encontramos en la bibliografía respuestas fisiológicas compartidas en la respuesta al etanol para diferentes caracteres, la resistencia al etanol (REV), la recuperación al etanol (REC) y la tolerancia al etanol en larvas (SME) presentados en este estudio poseen una arquitectura genética única para cada uno de los caracteres. Sin bien nosotros identificamos catorce QTL en este estudio, debemos reconocer que los QTL identificados en esta población de mapeo seguramente representen una porción de todos los loci implicado en la respuesta al etanol. Inclusive, las RIL utilizadas en este estudio fueron elegidas por razones prácticas, siendo que los genotipos de los marcadores moleculares habían sido previamente determinados y otros caracteres relacionados con la tolerancia térmica habían sido medidos. Futuros análisis deben llevarse a cabo en base a poblaciones con alta divergencia natural derivada de fenotipos extremos para mayor y menor sensibilidad al etanol. Por último, deberíamos realizar un mapeo de fina escala para los QTL encontrados que permitan diseccionar cada uno de ellos.

Bibliografía del Capítulo III

Abarca, C., Sanchis, C., Albrecht, U. & Spanagel, R. (2003). The involvement of per genes in cocaine and alcohol addiction. *Behavioural Pharmacology*, 14, S8.

Anholt, R. R. H. & Mackay, T. F. C. (2004). Quantitative genetic analyses of complex behaviours in *Drosophila*. *Nature Reviews Genetics*, 5, 838-849.

Beller, M., Riedel, D., Jansch, L., Dieterich, G., Wehland, J., Jäckle, H. & Kühnlein, R. P. (2006). Supplemental data for characterization of the *Drosophila* lipid droplet subproteome. *Molecular and Cellular Proteomics*, 5.

Berger, K. H., Heberlein, U. & Moore, M. S. (2004). Rapid and chronic: Two distinct forms of ethanol tolerance in *Drosophila*. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research*, 28, 1469-1480.

Blau, J. (2001). The *Drosophila* circadian clock: what we know and what we don't know. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 12, 287-293.

Certel, S. J., Savella, M. G., Schlegel, D. C. F. & Kravitz, E. A. (2007). Modulation of *Drosophila* male behavioral choice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 4706-4711.

Chakir, M., Capy, P., Genermont, J., Pla, E. & David, J. R. (1996). Adaptation to fermenting resources in *Drosophila melanogaster*: Ethanol and acetic acid tolerances share a common genetic basis. *Evolution*, 50, 767-776.

Corl, A. B., Berger, K. H., Ophir-Shohat, G., Gesch, J., Simms, J. A., Bartlett, S. E. & Heberlein, U. (2009). Happyhour, a Ste20 family kinase, implicates EGFR signaling in ethanol-induced behaviors. *Cell*, 137, 949-960.

Cowmeadow, R. B., Krishnan, H. R. & Atkinson, N. S. (2005). The slowpoke gene is necessary for rapid ethanol tolerance in *Drosophila*. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research*, 29, 1777-1786.

- Crawshaw, L. I., Wallace, H. L., Christensen, R. & Crabbe, J. C. (2001). Influence of ethanol on thermoregulation: mapping quantitative trait loci. *Physiol Genomics*, 7, 159-169.
- Dánielsson, O., Atrian, S., Luque, T., Hjelmqvist, L., Gonzalez-Duarte, R. & Jornvall, H. (1994). Fundamental molecular differences between alcohol dehydrogenase classes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 4980-4984.
- Eanes, W. F., Merritt, T. J., Flowers, J. M., Kumagai, S. & Zhu, C. T. (2009). Direct Evidence That Genetic Variation in Glycerol-3-Phosphate and Malate Dehydrogenase Genes (Gpdh and Mdh1) Affects Adult Ethanol Tolerance in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 181, 607-614.
- Falconer, D. S. & Mackay, T. F. C. (1996). *Introduction to quantitative genetics*. Essex, U.K: Addison-Wesley Longman.
- Feder, M. E. & Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61, 243-282.
- Fleischmann, I., Dauwalder, B., Chapman, T., Cotton, B. & Kubli, E. (1995). Analysing the sex-peptide reaction-cascade in *Drosophila melanogaster* using brain mutants. *Journal of Neurogenetics*, 10, 26-27.
- FlyBase, C., Swiss-Prot, P. M. & InterPro, P. M. Gene Ontology annotation in FlyBase through association of InterPro records with GO terms. 2004. Ref Type: Internet Communication
- Fox, L. E., Soll, D. R. & Wu, C. F. (2006). Coordination and modulation of locomotion pattern generators in *Drosophila* larvae: effects of altered biogenic amine levels by the tyramine beta hydroxlyase mutation. *Journal of Neuroscience*, 26, 1486-1498.
- Fry, J. D. (2003). Evolutionary and ecological genetics of ethanol tolerance in *Drosophila*. *Integrative and Comparative Biology*, 43, 891.

- Fry, J. D. (2001). Direct and correlated responses to selection for larval ethanol tolerance in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology*, 14, 296-309.
- Fry, J. D. & Saweikis, M. (2006). Aldehyde dehydrogenase is essential for both adult and larval ethanol resistance in *Drosophila melanogaster*. *Genetical Research*, 87, 87-92.
- Geer, B. W., McKechnie, S. W. & Langevin, M. L. (1983). Regulation of sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Drosophila melanogaster* larvae by dietary ethanol and sucrose. *Journal of Nutrition*, 113, 1632-1642.
- Hardie, S. L., Zhang, J. X. & Hirsh, J. (2007). Trace amines differentially regulate adult locomotor activity, cocaine sensitivity, and female fertility in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Neurobiology*, 67, 1396-1405.
- Heberlein, U., Scholz, H., Kong, E., Lee, S. & Berger, K. H. (2006). Mechanisms of ethanol tolerance in *Drosophila*. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research*, 30, 269A.
- Heberlein, U., Wolf, F. W., Rothenfluh, A. & Guarnieri, D. J. (2004). Molecular genetic analysis of ethanol intoxication in *Drosophila melanogaster*. *Integrative and Comparative Biology*, 44, 269-274.
- Heinstra, P. W. H., Geer, B. W., Seykens, D. & Langevin, M. (1989). The metabolism of ethanol-derived acetaldehyde by alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in *Drosophila melanogaster* larvae. *The Biochemical Journal*, 259, 791-797.
- Heisenberg, M. (2003). Mushroom body memoir: from maps to models. *Nature Reviews Neuroscience*, 4, 266-275.
- Hoffmann, A. A., Sorensen, J. G. & Loeschcke, V. (2003). Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *Journal of Thermal Biology*, 28, 175-216.
- Hoffmann, A. A. & Parsons, P. A. (1993). Selection for Adult Desiccation Resistance in *Drosophila-Melanogaster* - Fitness Components, Larval Resistance and Stress Correlations. *Biological Journal of the Linnean Society*, 48, 43-54.

- Hughes, K. A. & Leips, J. (2006). Quantitative trait locus analysis of male mating success and sperm competition in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 60, 1427-1434.
- Hung, H. C., Maurer, C., Kay, S. A. & Weber, F. (2007). Circadian transcription depends on limiting amounts of the transcription co-activator nejdre/CBP. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 31349-31357.
- LaFerriere, H., Guarnieri, D. J., Sitaraman, D., Diegelmatin, S., Heberlein, U. & Zars, T. (2008). Genetic dissociation of ethanol sensitivity and memory formation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 178, 1895-1902.
- Leal, J. F. M. & Barbancho, M. (1992). Acetaldehyde detoxification mechanisms in *Drosophila melanogaster* adults involving aldehyde dehydrogenase (ALDH) and alcohol dehydrogenase (ADH) enzymes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22, 885-892.
- Mackay, T. F. C. (2001). Quantitative trait loci in *Drosophila*. *Nature Reviews Genetics*, 2, 11-20.
- McClung, C. & Hirsh, J. (1999). The trace amine tyramine is essential for sensitization to cocaine in *Drosophila*. *Current Biology*, 9, 853-860.
- Monastirioti, M., Linn, C. E. & White, K. (1996). Characterization of *Drosophila* Tyramine -hydroxylase gene and isolation of mutant flies lacking octopamine. *Journal of Neuroscience*, 16, 3900-3911.
- Moore, M. S., DeZazzo, J., Luk, A. Y., Tully, T., Singh, C. M. & Heberlein, U. (1998). Ethanol intoxication in *Drosophila*: Genetic and pharmacological evidence for regulation by the cAMP signaling pathway. *Cell*, 93, 997-1007.
- Morgan, T. J. & Mackay, T. F. C. (2006). Quantitative trait loci for thermotolerance phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 96, 232-242.
- Morozova, T. V., Anholt, R. R. & Mackay, T. F. (2007). Phenotypic and transcriptional response to selection for alcohol sensitivity in *Drosophila melanogaster*. *Genome Biology*, 8.

- Norry, F. M., Dahlgaard, J. & Loeschcke, V. (2004). Quantitative trait loci affecting knockdown resistance to high temperature in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology*, 13, 3585-3594.
- Norry, F. M., Scannapieco, A. C., Sambucetti, P., Bertoli, C. I. & Loeschcke, V. (2008). QTL for the thermotolerance effect of heat hardening, knockdown resistance to heat and chill-coma recovery in an intercontinental set of recombinant inbred lines of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology*, 17, 4570-4581.
- Nuzhdin, S. V., Pasyukova, E. G., Dilda, C. L., Zeng, Z. B. & Mackay, T. F. C. (1997). Sex-specific quantitative trait loci affecting longevity in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 9734-9739.
- O'Dell, K. M. C. (1993). Abnormal behavioural phenotype associated with mutants exhibiting an octopamine deficiency. *Journal of Neurogenetics*, 8, 241.
- Peoples, R. W., Li, C. Y. & Weight, F. F. (1996). Lipid vs protein theories of alcohol action in the nervous system. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 36, 185-201.
- Petruzzelli, L., Herrera, R., Garcia-Arenas, R. & Rosen, O. M. (1985). Acquisition of insulin-dependent protein tyrosine kinase activity during *Drosophila* embryogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 260, 16072-16075.
- Rothenfluh, A. & Heberlein, U. (2002). Drugs, flies, and videotape: the effects of ethanol and cocaine on *Drosophila* locomotion. *Current Opinion in Neurobiology*, 12, 639-645.
- Savvateeva, E. V., Peresleny, I. V. & Peresleny, A. (1991). Temperature-sensitive mutations affecting cAMP metabolism in study of learning in *Drosophila*. *Journal of Neurogenetics*, 6, 145.
- Scholz, H., Franz, M. & Heberlein, U. (2005). The hangover gene defines a stress pathway required for ethanol tolerance development. *Nature*, 436, 845-847.

- Scholz, H., Ramond, J., Singh, C. M. & Heberlein, U. (2000). Functional ethanol tolerance in *Drosophila*. *Neuron*, 28, 261-271.
- Shiraiwa, T., Nitasaka, E. & Yamazaki, T. (2000). Geko, a novel gene involved in olfaction in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neurogenetics*, 14, 145-164.
- Skoulakis, E. M. C., Kalderon, D. & Davis, R. L. (1993). Preferential expression in mushroom bodies of the catalytic subunit of protein kinase A and its role in learning and memory. *Neuron*, 11, 197-208.
- Sokolowski, M. B. (2001). *Drosophila*: genetics meets behaviour. *Nature Reviews Genetics*, 2, 879-890.
- Sorensen, J. G. & Loeschcke, V. (2002). Natural adaptation to environmental stress via physiological clock-regulation of stress resistance in *Drosophila*. *Ecology Letters*, 5, 16-19.
- Spanagel, R., Abarca, C., Zghoul, T., Sanchis-Segura, C., Schumann, G. & Albrecht, U. (2004). Interaction of ethanol and clock genes. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research*, 28, 60A.
- Spanagel, R., Rosenwasser, A. M., Schumann, G. & Sarkar, D. K. (2005). Alcohol consumption and the body's biological clock. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research*, 29, 1550-1557.
- Strauss, R. (2002). The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour. *Current Opinion in Neurobiology*, 12, 633-638.
- Tweedie, S., Ashburner, M., Falls, K., Leyland, P., McQuilton, P., Marygold, S., Millburn, G., Osumi-Sutherland, D., Schroeder, A., Seal, R., Zhang, H. & The FlyBase Consortium (2009). FlyBase: enhancing *Drosophila* Gene Ontology annotations. *Nucleic Acids Res.*, 37, D555-D559.
- Varnam, C. J. & Sokolowski, M. (1995). Larval locomotion in central complex mutants. *Journal of Neurogenetics*, 10, 61.
- Wang, S., Basten, C. J. & Zeng, Z. B. (2010). *Windows QTL Cartographer 2.5*.

- Willard, S., Koss, C. M. & Cronmiller, C. (2006). Chronic cocaine exposure in *Drosophila*: life, cell death and oogenesis. *Developmental Biology*, 296, 150-163.
- Wolf, F. W., Rodán, A. R., Tsai, L. T. Y. & Heberlein, U. (2002). High-resolution analysis of ethanol-induced locomotor stimulation in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, 22, 11035-11044.
- Wood, W. G., Schroeder, F. & Rao, A. M. (1991). Significance of ethanol-induced changes in membrane lipid domains. *Alcohol Alcohol Suppl*, 1, 221-225.
- Xu, K., Zheng, X. & Sehgal, A. (2008). Regulation of feeding and metabolism by neuronal and peripheral clocks in *Drosophila*. *Cell Metabolism*, 8, 289-300.
- Zeng, Z. B. (1994). Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, 136, 1457-1468.
- Zeng, Z. B., Kao, C. H. & Basten, C. J. (1999). Estimating the genetic architecture of quantitative traits. *Genetical Research*, 74, 279-289.

CAPITULO IV

“Correlación entre la resistencia al frío y la respuesta al etanol utilizando los resultados obtenidos en los mapeos de QTL para la recuperación al coma por enfriamiento y para la recuperación al coma por etanol, la resistencia a los vapores de etanol y la tolerancia al etanol en larvas, en líneas RIL de *Drosophila melanogaster*”

(Aclaración: Cuando en este capítulo figure la primera persona del plural, estará haciendo referencia a la Lic. Raquel Defays y al autor de esta tesis)

Resumen

En los capítulos anteriores hemos intentado avanzar en el conocimiento de las arquitecturas genéticas de los caracteres en las líneas RIL de *Drosophila melanogaster* que utilizamos para los experimentos. Hemos trabajado independientemente el mapeo para la recuperación al coma por enfriamiento (“*Chill-coma recovery*” –CCR-) respecto de los caracteres asociados al etanol, recuperación al coma por etanol (“*Recovery to ethanol coma*” –REC-), resistencia a los vapores de etanol (“*resistance to ethanol vapor*” –REV-) y tolerancia al etanol en larvas (“*Survivance in medium with ethanol*” –SME-). En este capítulo intentaremos desentrañar la relación existente entre la resistencia al frío y la respuesta al etanol. La relación entre las altas latitudes y el mayor consumo de etanol en humanos registra antecedentes históricos, pero no solo en humanos se encuentra esta relación que bien podría tener un origen sociológico tanto más que genético, sino que también en *Drosophila* se han descrito clinas altitudinales en relación al aumento de la resistencia al etanol. Nosotros evaluamos las posibles correlaciones entre los fenotipos de las distintas líneas en las dos RIL derivadas de retrocruzas utilizadas. Así como no se han presentado correlaciones significativas entre los caracteres relacionados con la respuesta al etanol tampoco se encontró ninguna correlación significativa entre la resistencia al frío y ninguno de los caracteres medidos para la tolerancia al etanol. Curiosamente todos los caracteres evaluados (excepto SME porque no pudo ser medidos para los sexos por separados) presentaron correlación

positiva significativa entre los sexos. Esto nos lleva a pensar que los caracteres presentan arquitecturas genéticas independientes, si bien cada caracter comparte una única arquitectura genética entre los sexos. También evaluamos la superposición de QTL para los mapeos de los caracteres. Encontramos muy poca superposición, siendo que de los tres QTL encontrados para CCR solo dos colocalizan con QTL relacionados con la respuesta al etanol, y este vínculo es sumamente débil. Este resultado junto con el obtenido en las correlaciones nos lleva a pensar que en esta población de RIL la respuesta al frío y la respuesta al etanol se producen independientemente en lo que respecta a la arquitectura genética.

Introducción

El etanol es un estresor ambiental para las especies de *Drosophila* presente en las frutas en descomposición, y las adaptaciones que posean para la utilización o desintoxicación de esta sustancia puede permitir la expansión del nicho, inclusive en *D.melanogaster* (McKenzie & McKechnie 1979). La tolerancia al etanol covaria de forma positiva con la latitud en *D.melanogaster* en los distintos continentes (David *et al.* 1986). Mientras estas clinas parecen estar claramente sostenidas debido a la selección natural (Berry & Kreitman 1993), los mecanismos ecológicos, fisiológicos y genéticos que subyacen siguen sin ser del todo claros. Si bien se ha hecho hincapié en que las clinas de tolerancia al etanol podrían estar íntimamente asociadas a clinas en las frecuencias poblacionales de los alelos de mayor actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa (Adh) (Berry & Kreitman 1993; David *et al.* 1986) no está claro que los cambios adaptativos relacionados a la tolerancia al alcohol se manifiesten siempre como un cambio genotípico en el locus de Adh o loci relacionados a esta enzima. Así como encontramos trabajos de selección que vinculan el aumento de la tolerancia al etanol con el aumento del alelo de mayor actividad de Adh (Chakir *et al.* 1996), en otros casos, la adaptación a distintos ambientes con etanol no presentan efectos consistentes sobre las frecuencias de los alelos de Adh (Gibson *et al.* 1979). La falta de consistencia en la respuesta a la selección sugiere que el “background” o fondo genético puede alterar la relación entre los alelos de Adh y la tolerancia al etanol, haciendo la interpretación de esta última un asunto mucho más complejo que excede la explicación mediante la influencia de un único gen dando lugar a interpretaciones más sistémicas del genoma que llevan a pensarlo como un todo y su relación con el ambiente para poder explicar

respuestas de resistencia que involucran cantidad de sistemas y órganos. La supervivencia a un estrés producido por una toxina requiere de un complejo proceso fisiológico, del cual el metabolismo de la toxina es solo uno de los componentes. Por ejemplo, la fluidez de la membrana celular y la composición de fosfolípidos pueden estar potencialmente relacionadas con la tolerancia al etanol (Montooth *et al.* 2006). El etanol se inserta en la membrana bi lipídica, aumenta su fluidez e modifica la función de las proteínas transmembrana (Geer *et al.* 1993). El etanol también modifica la composición de la membrana lipídica en mamíferos como en moscas a través de la interacción con la señalización de enzimas vinculadas con lípidos, fosfolipasa C y D por ejemplo (Baker & Kramer 1999). Los cambios adaptativos que aumentan el orden de la membrana o median en la interacción con la señalización de lípidos pueden ser otro de los tantos mecanismos que podemos encontrar alterando los efectos tóxicos del etanol.

Este último caso tiene particular importancia para nosotros, ya que los organismos ectotérmicos regulan la fluidez de su membrana en respuesta a los cambios de temperatura que se producen en el ambiente, y esta adaptación es comúnmente llevada a cabo por alteraciones en la composición de lípidos de la membrana (Hochachka & Somero 2002). Las membranas celulares de *Drosophila* están compuestas por principalmente por fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (Jones *et al.* 1992). Cuando los niveles de fosfatidiletanolamina están bajos, las proteínas de asociación (“*binding*”) con elementos regulatorios esteroides de *Drosophila* (dSREBP) aumentan la transcripción de genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos y de fosfatidiletanolamina, incluyendo AcCoAS (Dobrosotskaya *et al.* 2002; Rawson 2003). De aquí que es posible presumir que el control de transcripción de AcCoAS resulte esencial para la síntesis de ácidos grasos. Este complejo mecanismo someramente explicado aquí nos sirve para ejemplificar a nivel fisiológico la interacción entre la tolerancia al etanol y la tolerancia al frío. Veamos, la regulación de la síntesis de ácidos grasos puede estar actuando simultáneamente sobre la tolerancia al etanol como resultado del rol dual que estaría cumpliendo AcCoAS debido a su participación en el catabolismo del etanol (Figura 1).

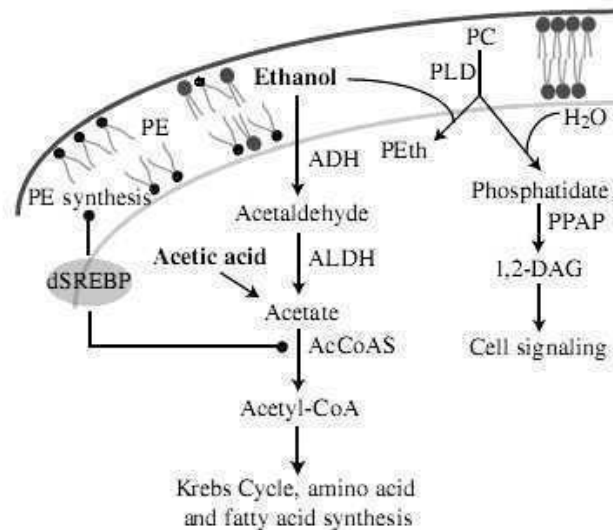


Figura 1. Sistemas de genes/enzimas que explican someramente el metabolismo del etanol y las rutas de señalización de derivados de lípidos, mediante los efectos regulatorios de dSREBP. Las dos líneas curvas representan los límites de la membrana plasmática. AcCoAS, acetil-CoA sintetasa; ADH, alcohol deshidrogenasa; ALDH, acetaldehído deshidrogenasa; DAG, diacilglicerol; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PEth, fosfatidiletanol; PLD, fosfolipasa D (El gráfico y la explicación del proceso en Montooth *et al.* 2006)

La tolerancia al etanol puede estar influenciada por la ruta fisiológica que lleva a la modificación del estado lipídico de la membrana. La dependencia térmica de la fluidez de la membrana en ectodermos puede hacer que mediante la importancia de esta ruta fisiológica, genes candidatos para la tolerancia al etanol modifiquen su frecuencia manteniendo clinas de tolerancia al etanol o escondiendo posibles genes candidatos, debido a los efectos pleiotrópicos de muchos de los genes. Aquí queda claro que la complejidad de los caracteres de origen cuantitativo no puede reducirse a un análisis atomizado, ni limitarse a explicaciones reduccionistas sino que solo a través de estudios diversos podremos comprender mejor la dinámica de interacciones entre caracteres de herencia cuantitativa.

Para este capítulo hemos intentado por un lado, establecer la relación de los fenotipos de las distintas líneas RIL utilizadas en los capítulos anteriores para el carácter de tolerancia al frío con los tres caracteres de tolerancia al etanol; en segundo lugar, comprobamos si existía y, en el caso de ser así, cual era la relación entre los mapeos de QTL, analizando que genes candidatos se encontraban presente en aquellos QTL compartidos y que posible explicación encontrábamos a este fenómeno.

Objetivos:

- Evaluar la posible **correlación y superposición en las arquitecturas genéticas** entre los tres diferentes caracteres **de respuesta al etanol y CCR** como respuesta al frío.

Materiales y métodos

Líneas endocriadas recombinantes (RIL) y mapeo de QTL

Las líneas RIL utilizadas fueron las mismas que en los capítulos II y III, así como los mapeos de QTL son los que se describen en los capítulos anteriores. Para ver detalles de la construcción de las líneas y de las condiciones del mapeo ver materiales y métodos de cualquiera de los dos capítulos anteriores. Para ver los fenotipos de las líneas y los resultados del mapeo véase resultados de ambos capítulos previos.

Para evaluar la superposición de los distintos mapeos tomamos en cuenta las regiones citológicas determinadas en cada mapeo para los distintos QTL y evaluamos cuales de ellas eran solapantes entre CCR y cualquiera de los otros tres caracteres (Tabla 3)

Medición de los caracteres

Para este capítulo se tomaron los datos obtenidos para los caracteres: recuperación al coma por enfriamiento (CCR), para ver el detalle de cómo se midió ver materiales y métodos del capítulo II; resistencia al vapor de etanol (REV), recuperación al coma por etanol (REC) y tolerancia al etanol en larvas (SME) para la descripción detallada de los métodos utilizado para las distintas mediciones véase materiales y métodos del capítulo III.

Análisis estadístico

Para evaluar la relación entre CCR y los tres caracteres relacionados con la tolerancia al etanol utilizamos el software Statistica 6.0. Realizamos matrices de correlaciones entre todos los distintos caracteres separando cada uno de los sexos y para cada RIL derivada de retrocruza por separado (RIL-D48 y RIL-SH2) (Ver los resultados en Tabla 1 y 2). Luego presentamos los gráficos de correlación para cada uno de los tres caracteres relacionados con el etanol (REV, REC y SME) vs CCR para cada sexo y para cada retrocruza.

Resultados

Se evaluó, dentro de cada RIL derivada de retrocruza, la correlación entre los distintos caracteres para cada uno de los sexos por separado, así como la correlación entre todas las posibles combinaciones entre caracteres y sexos. Si bien, las estimas de correlación (r) para el caso en el que se evaluaron los distintos caracteres dentro del mismo sexo, variaron entre -0.353 y 0.350, ninguna de estas fueron significativamente distintas de cero. Esto nos indica que puede estar existiendo, para esta población, una única arquitectura genética para cada caracter independientemente (Tabla 1 y 2; Figura 2 y 3)

Tabla 1. Se presentan los resultados de las pruebas de correlación entre todos los caracteres para cada sexo en RIL-D48. Los valores para machos están bajo el símbolo M, los valores de hembras bajo el símbolo F y SME solo se evaluó en pupas (P) debido a que los resultados para adultos (SME A) son casi idénticos. En cada casilla esta arriba el valor de r , donde puede apreciarse el signo de la correlación y debajo el valor de p que nos dice si la correlación es o no estadísticamente significativa.

	REC M	REC F	REV M	REV F	SME P	CCR M	CCR F
REC M	1.0000 p= ---						
REC F	0.7960 p=0.000	1.0000 p= ---					
REV M	0.1134 p=0.537	0.3024 p=0.093	1.0000 p= ---				
REV F	0.0533 p=0.772	0.2105 p=0.248	0.7230 p=0.000	1.0000 p= ---			
SME P	0.2125 p=0.243	0.2263 p=0.213	0.2004 p=0.271	-0.1026 p=0.576	1.0000 p= ---		
CCR M	0.0155 p=0.933	0.1491 p=0.415	-0.1687 p=0.356	-0.2570 p=0.156	0.0779 p=0.672	1.0000 p= ---	
CCR F	0.1665 p=0.362	0.2770 p=0.125	-0.0725 p=0.693	-0.1621 p=0.376	0.1719 p=0.347	0.7398 p=0.000	1.0000 p= ---

Tabla 2. Se presentan los resultados de las pruebas de correlación entre todos los caracteres para cada sexo en RIL-SH2. Los valores para machos están bajo el símbolo M, los valores de hembras bajo el símbolo F y SME solo se evaluó en pupas (P) debido a que los resultados para adultos (SME A) son casi idénticos. En cada casilla esta arriba el valor de r, donde puede apreciarse el signo de la correlación y debajo el valor de p que nos dice si la correlación es o no estadísticamente significativa.

	REC M	REC F	REV M	REV F	SME P	CCR M	CCR F
REC M	1.0000 p= ---						
REC F	0.6095 p=0.003	1.0000 p= ---					
REV M	0.3496 p=0.120	0.1004 p=0.665	1.0000 p= ---				
REV F	0.3229 p=0.153	0.1478 p=0.523	0.7087 p=0.000	1.0000 p= ---			
SME P	-0.0476 p=0.837	0.3053 p=0.178	-0.3528 p=0.117	-0.3422 p=0.129	1.0000 p= ---		
CCR M	-0.0901 p=0.698	-0.3514 p=0.118	0.1408 p=0.543	0.1703 p=0.460	0.0402 p=0.863	1.0000 p= ---	
CCR F	-0.0487 p=0.834	-0.1706 p=0.460	-0.0291 p=0.900	0.1076 p=0.642	0.1222 p=0.598	0.8500 p=0.000	1.0000 p= ---

También evaluamos la correlación para cada caracter entre ambos sexos para cada retrocruza por separado. En todos los casos la estima de la correlación fue estadísticamente significativa, con un rango de valores entre $0.610 \leq r \leq 0.850$, sugiriendo que la arquitectura genética de ambos sexos es generalmente similar para cada uno de los caracteres en ambas RIL derivadas de retrocruzas (Tabla 1 y 2)

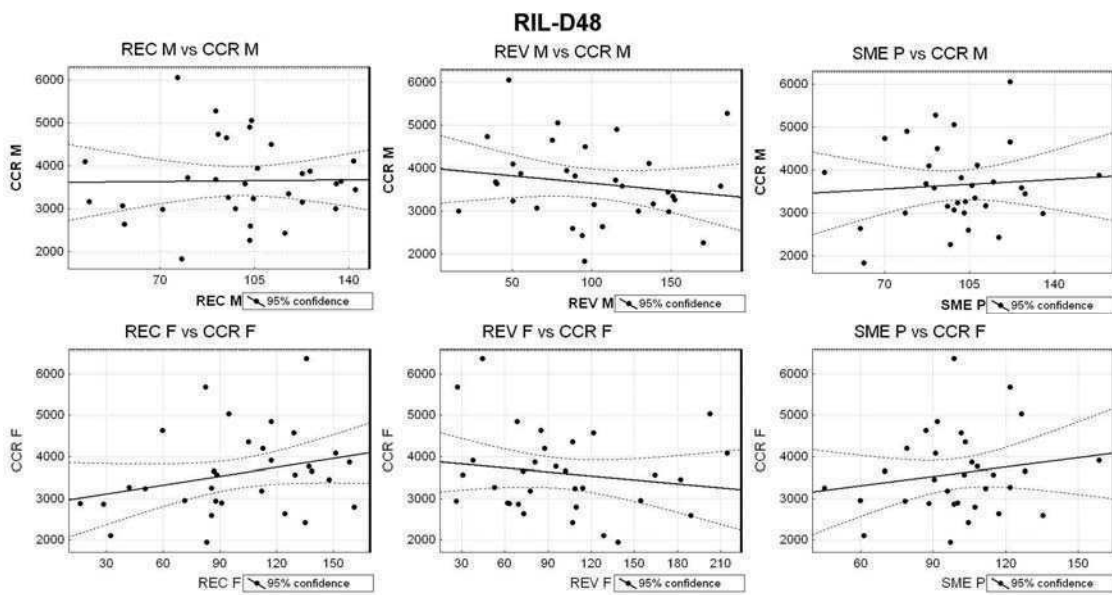


Figura 2. Gráficos de correlación para cada uno de los caracteres relacionados a la tolerancia con el etanol (REC, REV y SME) versus CCR en cada sexo por separado solo para la retrocruza RIL-D48.

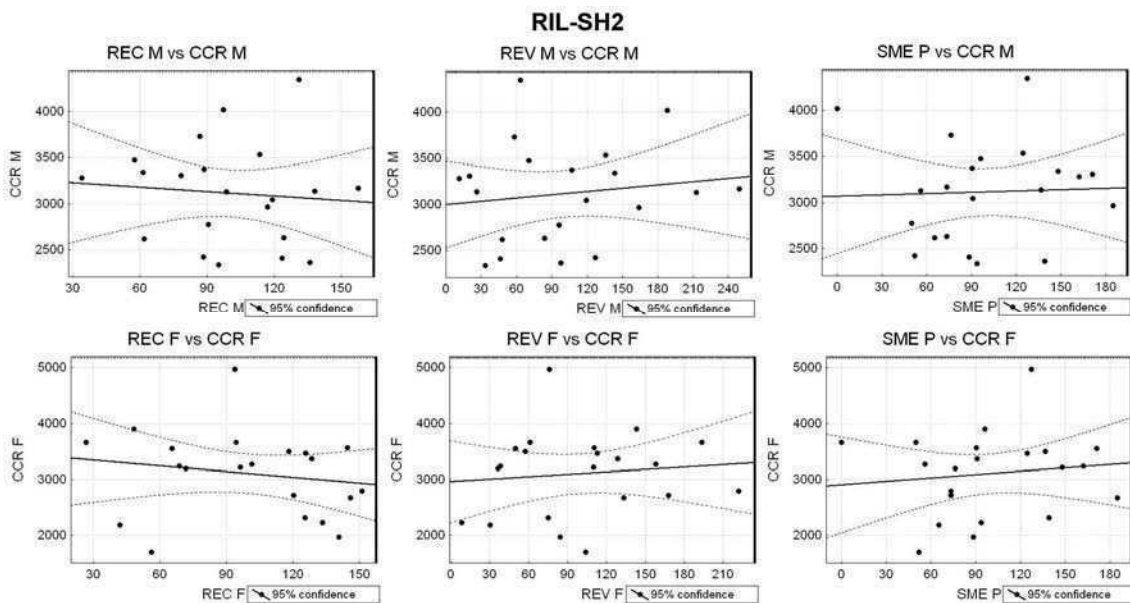


Figura 3. Gráficos de correlación para cada uno de los caracteres relacionados a la tolerancia con el etanol (REC, REV y SME) versus CCR en cada sexo por separado solo para la retrocruza RIL-SH2.

Por último evaluamos la superposición (o colocación) de QTL entre el mapeo para CCR y los mapeos para los tres caracteres relacionados con la tolerancia al

etanol (Tabla 3). Se encontraron dos QTL de los tres mapeados para CCR con superposiciones con otros caracteres.

Tabla 3. QTL para los tres caracteres medidos (REV, REC y SME) en cada sexo y en cada RIL derivada de retrocruza, seguido están los QTL para CCR. Todos ellos junto con su correspondiente efecto de aditividad (a) y el porcentaje de variación fenotípica explicada (%Var). Las letras A y B marcan los QTL con superposición entre CCR y cualquier otro caracter.

Caracter	Sexo	RIL	Rango del QTL	a	% Var
REV	Hembras	D48	16F3-F6	127	11.7
REV	Machos	D48	97F-99D	80	16.8
REV	Hembras	SH2	38E1-E9	140	1.3
REV	Hembras	SH2	50C-54B	92	6.3
REV	Hembras	SH2	56D-59A	146	13.2
REV	Hembras	SH2	73A-86E	-146	0.2
REV	Hembras	SH2	86E-90B	98	0.5
REV	Hembras	SH2	97F-99D	110	10.2
REC	Machos	D48	4F-10A	-324	8.2
REC	Hembras	D48	4F-10A	-490	6.4
REC	Hembras	D48	64D-66E	-497	5.1
P-SME	-	D48	4F-10A	-0.126	8.7
P-SME	-	D48	10A-12E	0.117	1.4
P-SME	-	D48	12E-16F	0.117	1.7
P-SME	-	D48	30A-34D	-0.097	4.2
P-SME	-	D48	90E-95C	-0.094	6.1
P-SME	-	SH2	4F-7B	0.165	1.3
P-SME	-	SH2	10A-12E	-0.218	9.1
A-SME	-	D48	4F-7B	-0.116	13.5
A-SME	-	SH2	4F-7B	0.175	0.9
A-SME	-	SH2	10A-12E	-0.242	7.9
CCR	Hembras	SH2	34C-42F	391	18
CCR	Hembras	SH2	73A-90B	-780	35
CCR	Hembras	SH2	90E-95C	694	11

La superposición A, que se produce con dos QTL detectados para REV en hembras de RIL-SH2 (considerar que todos los QTL detectados lo fueron justamente en hembras de RIL-SH2), es un único QTL de CCR que posee efecto de aditividad

negativo, o sea que el alelo SH2 aumenta la velocidad de recuperación al frío, mientras que se superpone con dos QTL de REV uno con aditividad negativa y otro con aditividad positiva, ambos explican muy poco de la variación fenotípica total (0.2 y 0.5%) mientras que el QTL de CCR explica el 35% de la variación fenotípica. Esto nos lleva a pensar en lo espurio de este vínculo. La otra superposición, simbolizada como B, se produce entre un QTL de CCR que posee efecto de aditividad positivo (menor velocidad de recuperación explicado por el alelo de SH2) que explica el 11% de la variación fenotípica con un QTL de SME P de RIL-D48 que explica el 6.1% de la variación fenotípica y que posee efecto de aditividad negativa, siendo que en este caso tanto el efecto de aditividad como la variación explicada en ambos QTL resultan ser bastante similares (recordar que la aditividad para CCR resulta en el mejoramiento de la respuesta al caracter cuando el valor de aditividad es negativo)

Discusión

Ambos mapeos de QTL, tanto para la resistencia al frío como para los caracteres vinculados con la tolerancia al etanol, entregaron resultados sumamente interesantes, siendo que en ambos estudios pudieron evaluarse las respuestas fenotípicas, mostrando para todos los casos variabilidad presente en las líneas evaluadas. Cada uno de los caracteres por separados permitió un análisis de mapeo de QTL detallado, para todos los caracteres estudiados hemos encontrado, al menos, tres QTL y varios genes candidatos vinculados en cada uno de ellos. Hemos podido avanzar en conclusiones respecto a la arquitectura genética de cada caracter entendiendo que, según nuestros resultados, existe una arquitectura genética compartida entre los sexos en todos los caracteres evaluados. También nos hemos visto sorprendidos al no encontrar correlaciones significativas entre los tres caracteres estudiados para la resistencia al etanol. Esto nos llevó a pensar que los mecanismos implicados en la resistencia a la exposición de vapores de etanol involucran procesos fisiológicos distintos a los que están implicados en la desintoxicación que permite la recuperación al coma por exposición al etanol. Por último, la falta de correlación de estos dos caracteres antedichos con la tolerancia al etanol en larvas puede verse explicada por la ya consabida poca relación entre los genes activos en el período larvario y los activos en el período adulto (Fry & Saweikis 2006), si bien podemos en todos los casos encontrar la superposición de algunos QTL entre distintos caracteres (Ver capítulo III).

Para este capítulo nos propusimos evaluar en las líneas RIL de *D. melanogaster* utilizadas en los capítulos anteriores, la relación entre la resistencia al frío y los caracteres vinculados al etanol, siendo esta relación anteriormente registrada por otros autores en otras poblaciones y en otros organismos (Alkana *et al.* 1987; Phillips 2006; Montooth *et al.* 2006).

Curiosamente, no encontramos ninguna respuesta correlacionada entre ninguno de los caracteres mapeados en respuesta al etanol con el carácter mapeado en respuesta al frío. Este resultado no conduce a interpretaciones confusas ya que se puede apreciar la falta de correlación entre los distintos caracteres con mucha claridad (Figura 2 y 3). Más aún, la falta de superposición de QTL, y lo espurio de la relación de una de las dos superposiciones encontradas, nos lleva a pensar en una total independencia de las arquitecturas genéticas de estos dos caracteres. Tenemos que tener presente que los caracteres aquí estudiados son caracteres complejos y en general de resistencia, que implica una labor compleja para poder explicar la base genética de los mismos (Mackay & Anholt 2006; Anholt & Mackay 2004). Muchos de los genes candidatos encontrados en los distintos caracteres poseen efectos pleiotrópicos que complejizan la interpretación de los resultados. Muchos de estos están implicados en procesos fisiológicos sumamente amplios que afectan mucho más que el carácter evaluado (Glicólisis, síntesis de lípidos, cAMP, etc.)

Lo que nosotros hemos encontrado en esta población, recordemos la importancia de resaltar que los resultados solo sirven en el contexto de esta población y para los caracteres medidos en las condiciones ambientales en que se efectuaron las mediciones, es una independencia de arquitecturas genéticas que pueden deberse al origen selectivo de la población, siendo las líneas RIL derivadas de líneas de selección para la alta temperatura. Si bien, esta documentada la relación entre el frío y la resistencia al etanol el vínculo entre ambos no parece ser consistente para cualquier población (Crabbe *et al.* 1994; Crawshaw *et al.* 2001). Más aún, la complejidad de la respuesta genética para los caracteres de estrés relacionados con el etanol es tal que involucra distintos procesos fisiológicos según como se mida la respuesta (Berger *et al.* 2004; Fry 2001; Berger *et al.* 2008)

Este estudio permite avanzar sobre la respuesta correlacionada entre la resistencia al frío y al etanol, dejando en claro la necesidad que existe de avanzar con más estudios sobre otras poblaciones que posean distintos orígenes y que permitan evaluar en otros genomas cual es el vínculo entre estos caracteres. Mientras estos

estudios no se lleven a cabo la información que poseemos nos permite decir que el vínculo que existe es dependiente de la población de origen utilizada y de los métodos de medición con los que se evaluaron los diferentes estreses.

Bibliografía del Capítulo IV

Alkana, R. L., Bejanian, M., Syapin, P. J. & Finn, D. A. (1987). Chronic Functional Ethanol Tolerance in Mice Influenced by Body-Temperature During Acquisition. *Life Sciences*, 41, 413-420.

Anholt, R. R. H. & Mackay, T. F. C. (2004). Quantitative genetic analyses of complex behaviours in *Drosophila*. *Nature Reviews Genetics*, 5, 838-849.

Baker, R. C. & Kramer, R. E. (1999). Cytotoxicity of short-chain alcohols. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39, 127-150.

Berger, K. H., Heberlein, U. & Moore, M. S. (2004). Rapid and chronic: Two distinct forms of ethanol tolerance in *Drosophila*. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research*, 28, 1469-1480.

Berger, K. H., Kong, E. C., Dubnau, J., Tully, T., Moore, M. S. & Heberlein, U. (2008). Ethanol sensitivity and tolerance in long-term memory mutants of *Drosophila melanogaster*. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research*, 32, 895-908.

Berry, A. & Kreitman, M. (1993). Molecular Analysis of an Allozyme Cline: Alcohol Dehydrogenase in *Drosophila melanogaster* on the East Coast of North America. *Genetics*, 134, 869-893.

Chakir, M., Capy, P., Genermont, J., Pla, E. & David, J. R. (1996). Adaptation to fermenting resources in *Drosophila melanogaster*: Ethanol and acetic acid tolerances share a common genetic basis. *Evolution*, 50, 767-776.

Crabbe, J. C., Belknap, J. K., Mitchell, S. R. & Crawshaw, L. I. (1994). Quantitative trait loci mapping of genes that influence the sensitivity and tolerance to ethanol-induced hypothermia in BXD recombinant inbred mice. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 269, 184-192.

Crawshaw, L. I., Wallace, H. L., Christensen, R. & Crabbe, J. C. (2001). Influence of ethanol on thermoregulation: mapping quantitative trait loci. *Physiol Genomics*, 7, 159-169.

- David, J., MERÁOT, H., Capy, P., McEVEY, S. & HERREWEGE, J., V (1986). Alcohol tolerance and Adh gene frequencies in European and African populations of *Drosophila melanogaster*. *Genet.Sel.Evol.*, 18, 405-416.
- Dobrosotskaya, I. Y., Seegmiller, A. C., Brown, M. S., Goldstein, J. L. & Rawson, R. B. (2002). Regulation of SREBP Processing and Membrane Lipid Production by Phospholipids in *Drosophila*. *Science*, 296, 879-883.
- Fry, J. D. (2001). Direct and correlated responses to selection for larval ethanol tolerance in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology*, 14, 296-309.
- Fry, J. D. & Saweikis, M. (2006). Aldehyde dehydrogenase is essential for both adult and larval ethanol resistance in *Drosophila melanogaster*. *Genetical Research*, 87, 87-92.
- Geer, B. W., Heinstra, P. W. H. & McKechnie, S. W. (1993). The Biological Basis of Ethanol Tolerance in *Drosophila*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 105, 203-229.
- Gibson, J. B., Lewis, N., Adena, M. A. & Wilson, S. R. (1979). Selection for Ethanol Tolerance in 2 Populations of *Drosophila-Melanogaster* Segregating Alcohol-Dehydrogenase Allozymes. *Australian Journal of Biological Sciences*, 32, 387-398.
- Hochachka, P. W. & Somero, G. N. (2002). *Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution*. Oxford: Oxford University Press.
- Jones, H., Harwood, J., Bowen, I. & Griffiths, G. (1992). Lipid composition of subcellular membranes from larvae and prepupae of *Drosophila melanogaster*. *Lipids*, 27, 984-987.
- Mackay, T. E. C. & Anholt, R. R. H. (2006). Of flies and man: *Drosophila* as a model for human complex traits. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 7, 339-367.
- McKenzie, J. A. & McKechnie, S. W. (1979). Comparative-Study of Resource Utilization in Natural-Populations of *Drosophila-Melanogaster* and D-Simulans. *Oecologia*, 40, 299-309.

Montooth, K. L., Siebenthal, K. T. & Clark, A. G. (2006). Membrane lipid physiology and toxin catabolism underlie ethanol and acetic acid tolerance in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 209, 3837-3850.

Phillips, K. (2006). Ethanol tolerance in temperate *Drosophila*. *Journal of Experimental Biology*, 209, iii.

Rawson, R. B. (2003). The SREBP pathway [mdash] insights from insigs and insects. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 631-640.

CONCLUSION

“Yo era un hombre bien, tenia perro y mujer y un día encontré una botella de escocés” Pappo Napolitano

(Aclaración: Cuando en este capítulo figure la primera persona del plural, en lo referido a la recuperación del coma por etanol, estará haciendo referencia a la Lic. Raquel Defays y al autor de esta tesis)

En este apartado intentaremos arribar a un conjunto de conclusiones generales respecto del trabajo en su totalidad. Así como planteamos en la introducción general, el análisis genético para caracteres cuantitativos es sumamente complejo y tiene distintas formas de ser abordado. En nuestro caso realizamos un estudio clásico de selección artificial en *Drosophila buzzatii*, con la innovación respecto a los estudios anteriores en resistencia al frío de haber podido seleccionar tanto para mayor resistencia como para menor resistencia respecto al control. Este estudio nos permitió también corroborar la posible existencia de correlaciones entre el régimen selectivo y otros caracteres, tanto de historia de vida como de resistencia a diferentes tipos de estrés. Avanzamos en el análisis para dos caracteres cuantitativos, uno es el caracter seleccionado, la recuperación al frío, el otro es la respuesta al etanol. Para estudiar estos dos caracteres es que decidimos, a partir de la disponibilidad en el laboratorio de líneas RIL en *Drosophila melanogaster*, realizar estudios de QTL para el caracter seleccionado en *D. buzzatii*, recuperación desde el coma por enfriamiento, y para diferentes caracteres relacionados con la respuesta al etanol (resistencia en adultos y en larvas y la recuperación en adultos).

En lo siguiente intentaremos resumir las conclusiones más importantes de cada capítulo para cerrar la tesis con un conjunto de conclusiones generales.

En primer lugar, del capítulo primero, podemos decir que la recuperación al coma por enfriamiento (CCR) respondió significativamente a la selección artificial. Estos resultados, en principio, indican que CCR es un caracter heredable en *Drosophila buzzatii*, como recientemente se evidenció en otras especies de *Drosophila* (Anderson *et al.* 2005; Mori & Kimura 2008). El patrón asimétrico de respuesta que encontramos en las distintas generaciones evaluadas también fue encontrado en *D. melanogaster* (Mori

& Kimura 2008) y permite suponer que o bien la población base se encontraba parcialmente adaptada al frío o bien CCR es un carácter bajo la presión de la selección natural sin fuertes “*trade-offs*” entre caracteres (Mori & Kimura 2008; Anderson *et al.* 2005). *Drosophila buzzatii* es una especie expuesta a bajas temperaturas durante el invierno el sitio de origen de la población base (Sorensen *et al.* 2005; Norry *et al.* 2006). La inversión del patrón respecto de la respuesta se puede explicar debido a la acumulación de mutaciones y el efecto de la deriva producto de la numerosa cantidad de generaciones que pasaron hasta retomar el trabajo con estas líneas selectivas (Falconer & Mackay 1996).

La selección para CCR en este estudio con *D.buzzatii* no tuvo ningún impacto en la resistencia al calor, lo que no solo es consistente con estudios de selección en *D.melanogaster* (Anderson *et al.* 2005; Mori & Kimura 2008) sino también con la ausencia de clinas altitudinales opuestas para la resistencia a la baja y alta temperatura estudiadas recientemente en *D.buzzatii* (Sorensen *et al.* 2005). Este patrón consistente entre distintas especies de *Drosophila* para la respuesta a la selección y la correlación sustentan aún más la hipótesis de que los límites para la resistencia a la baja temperatura pueden evolucionar incrementando esta resistencia independientemente de los límites para la resistencia a las altas temperaturas (Anderson *et al.* 2005).

Nosotros no encontramos evidencias de “*trade-offs*” genéticos entre CCR y otros caracteres como ser el tiempo de desarrollo, tamaño corporal y resistencia al hambre.

Sin embargo, encontramos evidencias de una posible correlación genética entre el régimen selectivo para CCR y la resistencia a los vapores de etanol. Es en este contexto que podemos decir que para nuestra población de *D.buzzatii* incrementar significativamente la respuesta al frío mediante la selección artificial de CCR acarrea el incremento a la tolerancia a los vapores de etanol. Esta correlación tiene antecedentes anteriores en *D.melanogaster* y suele ser de sumo interés para estudios con roedores (Alkana *et al.* 1987; Phillips 2006). Finalmente, esta correlación puede estar explicada por la importancia del metabolismo de lípidos tanto para la resistencia al frío como para la resistencia al etanol (Grieve *et al.* 1979; Heberlein *et al.* 2006; Ohtsu *et al.* 1998).

Por otro lado, Se decidió avanzar con el mapeo de QTL para la resistencia al frío que nos permitiría conocer regiones del genoma de *D.melanogaster* que estuvieran implicadas en la recuperación al frío.

Para la recuperación al coma por enfriamiento, hemos encontrado QTL de gran efecto en ambos cromosomas mayores autosómicos pero no en el cromosoma X.

A pesar que el poder estadístico en este estudio fue limitado debido a la escasa densidad de marcadores y al bajo número de RIL, nuevos QTL fueron encontrados para el carácter. Un mapeo de fina escala permitiría identificar mejor aquellos genes que presentan variabilidad e importancia para el carácter en estudio.

En dos de los QTL encontrados en este estudio para CCR (QTL1 y QTL2) colocalizaron con regiones de QTL de trabajos previos (Morgan & Mackay 2006). La segregación transgresiva resulta, típicamente, de la recombinación entre las líneas parentales que poseen dos QTL con efectos antagónicos para un carácter; es importante que destaquemos el origen de estas líneas, donde ninguna de las dos, ni SH2 ni D48 fueron seleccionadas para la recuperación al frío sino para la resistencia al calor.

La línea D48 utilizada en este estudio derivó de una población más adaptada al frío, la población salvaje proveniente de Dinamarca pero los alelos respectivos de esta línea reducen la velocidad de recuperación en dos de los tres QTL (QTL1 y QTL3) cuando se los compara con los alelos de SH2. La hibridización intercontinental de las líneas utilizadas en este estudio puede ser el factor que haya generado los fenotipos extremos vistos en algunas líneas RIL.

Habiendo encontrado QTL para la recuperación al frío avanzamos en el mapeo de QTL para la respuesta al etanol, medimos el carácter que correlacionó en *D.buzzatii*, así como dos caracteres más relacionados con la respuesta al etanol para abarcar distintos aspectos de la este carácter.

Nosotros estimamos parámetros de genética cuantitativa y con ellos hemos logrado localizar QTL que afectan la variación en los tiempos de recuperación en adultos y en la resistencia tanto en adultos como en larvas en una población de líneas RIL. Hemos encontrado varianza genética significativa para todos los tres caracteres estudiados entre las líneas utilizadas en el mapeo y nos fue posible detectar 13 QTL relacionados con la exposición al etanol. Se han encontrado QTL para distintas regiones en los tres cromosomas mayores de *D.melanogaster*, y estos han mostrado relativamente poca colocalización entre los caracteres, sugiriendo que, si bien puede haber un mínimo solapamiento, estaríamos en presencia de arquitecturas genéticas independientes para cada carácter. Sin embargo, ambos sexos parecerían compartir una única arquitectura genética para REV y otra para REC siendo que para cada uno de los caracteres la superposición entre los QTL detectados para cada sexo es completa.

La estima de lo efectos de aditividad para los QTL es consistente con la dirección de divergencia entre las medias de RIL-D48 y RIL-SH2 excepto por REV

donde los efectos de aditividad muestran valores positivos para los QTL de mayor efecto mientras que RIL-SH2 presenta medias menores que RIL-D48 para ese carácter.

Este estudio es un primer paso para reconocer la arquitectura genética de estos caracteres relacionados con el etanol. A pesar de esto, nosotros no avanzamos más allá de este mapeo de QTL, queda pendiente poder realizar experimentos de complementación de deficiencias o mapeos de QTL de alta resolución para poder diseccionar más aún la arquitectura genética de estos caracteres (Anholt & Mackay 2004).

Hemos identificado varios genes candidatos en la base de datos, basados en el efecto de alguno de sus fenotipos mutantes o de la función molecular si esta estaba relacionada con el metabolismo del etanol (FlyBase *et al.* 2004).

Algunos de estos genes candidatos están implicados directamente en procesos relacionados con el sistema nervioso (*nob* (4F-4F11), *cex* (11A7-11B9), *Tbh* (7D2), etc.). Muchos de los genes candidatos están relacionados con el metabolismo del cAMP (*agn* (11A8), *Pka-R1* (77E8), *AcCoAS* (78C3-78C4), *rut* (12F4), etc.). Otro grupo de genes candidatos están relacionados con el metabolismo de carbohidratos. Particularmente, estos genes están involucrados en procesos como la glicólisis y el ciclo de Krebs. Uno de los caminos de desintoxicación metabólica del etanol tiene como intermediario al Acetil-CoA que juega un rol crucial en el ciclo de Krebs. Este es el por qué este grupo de genes fue considerado de importancia para explicar la respuesta de caracteres relacionados con el etanol (*Mdh1* (31B1-31F2), *Pglym78* (98F12-98F13), etc.). El Acetil-CoA es también un importante intermediario en la síntesis de lípidos es por eso que incluimos un par de genes candidatos para la respuesta al etanol que están vinculados con la síntesis de lípidos (*Fum* (5C1-6C11), *Idh* (66C8), *desat1* (87B10-87B11)). Otro grupo de genes candidatos están relacionados con genes del grupo de las proteínas de “Heat-shock” (Hsp – “*Heat shock proteins*”) que intervienen en el acople con proteínas mal plegadas. A pesar de que parecería que las Hsp tuviesen poca relación con la repuesta al etanol, las Hsp están involucradas en la respuesta a muchos factores diferentes de estrés (Feder & Hofmann 1999). Algunos genes con rol en la regulación circadiana de la expresión de los distintos genes y relacionados con la respuesta a la cocaína (*Clk* (66A12), *cyc* (76C6)). Ambos genes (*Clk* y *cyc*) resultan muy interesantes debido a lo poco que se sabe de la relación entre el ritmo circadiano y la respuesta al etanol (Spanagel *et al.* 2005; Spanagel *et al.* 2004). Otro gen, el *InR* (93E4-93E9), fue mapeado que tiene relación con la respuesta a la cocaína (Willard *et al.* 2006) y que

posee actividad de receptor de insulina (Petruzzelli *et al.* 1985). Por último, encontré un conjunto grande de genes candidatos que tienen vinculación con la respuesta al etanol confirmada en trabajos anteriores (*vap* (14A5-14A6), *hang* (14C4), *elm* (83B8), *gk* (75B11-75B12), *Egfr* (57E9-57F1)). Finalmente, encontramos dos genes candidatos más que poseen importantes roles dentro del metabolismo del etanol. El primero, *Fdh* (86C7), posee actividad alcohol deshidrogenasa y esta involucrada en el metabolismo del etanol y en la oxidación del mismo (Danielsson *et al.* 1994; FlyBase *et al.* 2004). El otro es *Aldh* (30B1), posee actividad acetaldehído deshidrogenasa (Leal & Barbancho 1992), la función molecular de este gen es importante para la desintoxicación del etanol debido a que la enzima transforma acetaldehído en acetato en la ruta entre el etanol y el acetil-CoA (Fry & Saweikis 2006). Curiosamente, nosotros encontramos este gen en el mapeo para el carácter relacionado con la etapa larvaria pero no en los caracteres medidos en adultos, este resultado es el opuesto al esperado según trabajos anteriores (Heinstra *et al.* 1989).

Sin bien nosotros identificamos catorce QTL en este estudio, debemos reconocer que los QTL identificados en esta población de mapeo seguramente representen una porción de todos los loci implicado en la respuesta al etanol. Inclusive, las RIL utilizadas en este estudio fueron elegidas por razones prácticas, siendo que los genotipos de los marcadores moleculares habían sido previamente determinados y otros caracteres relacionados con la tolerancia térmica habían sido medidos. Futuros análisis deben llevarse a cabo en base a poblaciones con alta divergencia natural derivada de fenotipos extremos para mayor y menor sensibilidad al etanol. Por último, deberíamos realizar un mapeo de fina escala en un futuro para los QTL encontrados que permitan diseccionar cada uno de ellos.

Ambos mapeos de QTL, tanto para la resistencia al frío como para los caracteres vinculados con la respuesta al etanol, resultaron sumamente interesantes, siendo que en ambos estudios pudieron evaluarse las respuestas fenotípicas, mostrando para todos los casos variabilidad presente en las líneas evaluadas. Cada uno de los caracteres por separados permitió un análisis de mapeo de QTL detallado, para todos los caracteres estudiados hemos encontrado, al menos, tres QTL y varios genes candidatos vinculados en cada uno de ellos. Hemos podido avanzar en conclusiones respecto a la arquitectura genética de cada carácter entendiendo que, según nuestros resultados, existe una arquitectura genética compartida entre los sexos en todos los caracteres evaluados. También nos hemos visto sorprendidos al no encontrar correlaciones significativas entre

los tres caracteres estudiados para la resistencia al etanol. Esto nos llevó a pensar que los mecanismos implicados en la resistencia a la exposición de vapores de etanol involucran procesos fisiológicos distintos a los que están implicados en la desintoxicación que permite la recuperación al coma por exposición al etanol.

Curiosamente, no encontramos ninguna respuesta correlacionada entre ninguno de los caracteres mapeados en respuesta al etanol con el carácter mapeado en respuesta al frío. Tenemos que tener presente que los caracteres aquí estudiados son caracteres complejos y en general de resistencia, que implica una labor compleja para poder explicar la base genética de los mismos (Anholt & Mackay 2004; Mackay & Anholt 2006). Muchos de los genes candidatos encontrados en los distintos caracteres poseen efectos pleiotrópicos que complejizan la interpretación de los resultados. Muchos de estos están implicados en procesos fisiológicos sumamente amplios que afectan mucho más que el carácter evaluado (Glicólisis, síntesis de lípidos, cAMP, etc.)

Lo que nosotros hemos encontrado en esta población, recordemos la importancia de resaltar que los resultados solo sirven en el contexto de esta población y para los caracteres medidos en las condiciones ambientales en que se efectuaron las mediciones, es una independencia de arquitecturas genéticas que pueden deberse al origen selectivo de la población, siendo las líneas RIL derivadas de líneas de selección para la alta temperatura. Si bien, esta documentada la relación entre el frío y la resistencia al etanol el vínculo entre ambos no parece ser consistente para cualquier población (Crabbe *et al.* 1994; Crawshaw *et al.* 2001).

Hasta aquí un breve resumen de las conclusiones de los capítulos previos, resaltando los puntos más importantes de cada una de ellos.

Es destacable los resultados que se obtuvieron al trabajar con una población natural colectada recientemente (*D. buzzatii*) y los que se obtuvieron con líneas que llevan mucho más tiempo de cría en laboratorio y particularmente de endocría. También debemos recordar que se estuvo trabajando con dos especies diferentes, particularmente con una típicamente de climas templados como es *Drosophila buzzatii*. Por último, hacemos hincapié que los diseños experimentales utilizados en ambas especies fueron sustancialmente diferentes. Es por todo esto principalmente que podemos no extrañarnos de no haber encontrado en *D.melanogaster* la correlación entre la recuperación al frío y la respuesta al etanol que encontramos en *D.buzzatii*.

Una de las razones que podemos suponer explica este resultado esta vinculado con una de las limitaciones propias del diseño de QTL en líneas RIL. Si recordamos

brevemente como se construyen las líneas RIL es mediante cruzamientos durante muchas generaciones de hermanos completos, de esa forma obtenemos un individuo experimental que posee un genoma casi plenamente homocigoto, si bien esto es fundamental para poder efectuar el mapeo que hicimos, también tenemos que destacar que en el proceso de construcción de las RIL la gran parte de las parejas iniciales se perdieron en el transcurso de la endocria. En general esto se debe a la homocigosis en alelos que resultan deletéreos, estos suelen estar presentes en genes sumamente pleiotrópicos que producen fallos en varios procesos y terminan por hacer inviable al individuo o su descendencia (Gromko 1995; Rose 1982; Falconer & Mackay 1996). Sin embargo estos mismos alelos en heterocigosis pueden mantenerse en la población sin afectar la aptitud. Curiosamente, los procesos que hasta aquí se han descrito que vinculan a la respuesta al frío con la respuesta al etanol suelen involucrar a varios genes de efectos pleiotrópicos amplios (Scholz *et al.* 2000; Heberlein *et al.* 2006; Montooth *et al.* 2006). También es importante hacer hincapié en que las líneas parentales de las RIL no fueron seleccionadas ni para CCR ni para la respuesta al etanol, lo que implica que muchos genes de efectos pleiotrópicos tengan presente en ambas parentales alelos de similar efecto debido a la falta de selección para estos caracteres. Las líneas de selección, si bien, producto de estar en el laboratorio y manejar un número limitado de individuos, pueden ser algo endogámicas, suelen presentar una heterocigosis muchísimo mayor que las líneas RIL, y en esta situación pueden reflejarse los efectos de alelos que no podríamos encontrar en las líneas RIL.

Este estudio permite avanzar sobre la respuesta correlacionada entre la respuesta al frío y al etanol, dejando en claro la necesidad que existe de avanzar con más estudios sobre otras poblaciones que posean distintos orígenes y que permitan evaluar en otros genomas cual es el vinculo entre estos caracteres. Uno de estos estudios podría ser el mapeo en líneas generadas a partir del cruzamiento de algunas líneas RIL seleccionadas por sus fenotipos con otras líneas RIL de distinto origen para evaluar los efectos de dominancia en un entorno de plena heterocigosis. Mientras estudios como este u otros similares no se lleven a cabo la información que poseemos nos permite decir que el vinculo que existe entre la respuesta al frío y al etanol es dependiente de la población de origen utilizada y de los métodos de medición con los que se evaluaron las diferentes respuestas.

Bibliografía de la Conclusión

Alkana, R. L., Bejanian, M., Syapin, P. J. & Finn, D. A. (1987). Chronic Functional Ethanol Tolerance in Mice Influenced by Body-Temperature During Acquisition. *Life Sciences*, 41, 413-420.

Anderson, A. R., Hoffmann, A. A. & McKechnie, S. W. (2005). Response to selection for rapid chill-coma recovery in *Drosophila melanogaster*: physiology and life-history traits. *Genetical Research*, 85, 15-22.

Anholt, R. R. H. & Mackay, T. F. C. (2004). Quantitative genetic analyses of complex behaviours in *Drosophila*. *Nature Reviews Genetics*, 5, 838-849.

Crabbe, J. C., Belknap, J. K., Mitchell, S. R. & Crawshaw, L. I. (1994). Quantitative trait loci mapping of genes that influence the sensitivity and tolerance to ethanol-induced hypothermia in BXD recombinant inbred mice. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 269, 184-192.

Crawshaw, L. I., Wallace, H. L., Christensen, R. & Crabbe, J. C. (2001). Influence of ethanol on thermoregulation: mapping quantitative trait loci. *Physiol Genomics*, 7, 159-169.

Dánielsson, O., Atrian, S., Luque, T., Hjelmqvist, L., Gonzalez-Duarte, R. & Jornvall, H. (1994). Fundamental molecular differences between alcohol dehydrogenase classes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 4980-4984.

Falconer, D. S. & Mackay, T. F. C. (1996). *Introduction to quantitative genetics*. Essex, U.K: Addison-Wesley Longman.

Feder, M. E. & Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61, 243-282.

FlyBase, C., Swiss-Prot, P. M. & InterPro, P. M. Gene Ontology annotation in FlyBase through association of InterPro records with GO terms. 2004.
Ref Type: Internet Communication

Fry, J. D. & Saweikis, M. (2006). Aldehyde dehydrogenase is essential for both adult and larval ethanol resistance in *Drosophila melanogaster*. *Genetical Research*, 87, 87-92.

Grieve, S. J., Littleton, J. M., Jones, P. & John, G. R. (1979). Functional Tolerance to Ethanol in Mice - Relationship to Lipid-Metabolism. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 31, 737-742.

Gromko, M. H. (1995). Unpredictability of Correlated Response to Selection - Pleiotropy and Sampling Interact. *Evolution*, 49, 685-693.

Heberlein, U., Scholz, H., Kong, E., Lee, S. & Berger, K. H. (2006). Mechanisms of ethanol tolerance in *Drosophila*. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research*, 30, 269A.

Heinstra, P. W. H., Geer, B. W., Seykens, D. & Langevin, M. (1989). The metabolism of ethanol-derived acetaldehyde by alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in *Drosophila melanogaster* larvae. *The Biochemical Journal*, 259, 791-797.

Leal, J. F. M. & Barbancho, M. (1992). Acetaldehyde detoxification mechanisms in *Drosophila melanogaster* adults involving aldehyde dehydrogenase (ALDH) and alcohol dehydrogenase (ADH) enzymes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22, 885-892.

Mackay, T. E. C. & Anholt, R. R. H. (2006). Of flies and man: *Drosophila* as a model for human complex traits. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 7, 339-367.

Montooth, K. L., Siebenthall, K. T. & Clark, A. G. (2006). Membrane lipid physiology and toxin catabolism underlie ethanol and acetic acid tolerance in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 209, 3837-3850.

- Morgan, T. J. & Mackay, T. F. C. (2006). Quantitative trait loci for thermotolerance phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 96, 232-242.
- Mori, N. & Kimura, M. T. (2008). Selection for rapid and slow recovery from chill- and heat-coma in *Drosophila melanogaster*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 95, 72-80.
- Norry, F. M., Sambucetti, P., Scannapieco, A. C. & Loeschcke, V. (2006). Altitudinal patterns for longevity, fecundity and senescence in *Drosophila buzzatii*. *Genetica*, 128, 81-93.
- Ohtsu, T., Kimura, M. T. & Katagiri, C. (1998). How *Drosophila* species acquire cold tolerance - Qualitative changes of phospholipids. *European Journal of Biochemistry*, 252, 608-611.
- Petruzzelli, L., Herrera, R., Garcia-Arenas, R. & Rosen, O. M. (1985). Acquisition of insulin-dependent protein tyrosine kinase activity during *Drosophila* embryogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 260, 16072-16075.
- Phillips, K. (2006). Ethanol tolerance in temperate *Drosophila*. *Journal of Experimental Biology*, 209, iii.
- Rose, M. R. (1982). Antagonistic Pleiotropy, Dominance, and Genetic-Variation. *Heredity*, 48, 63-78.
- Scholz, H., Ramond, J., Singh, C. M. & Heberlein, U. (2000). Functional ethanol tolerance in *Drosophila*. *Neuron*, 28, 261-271.
- Sorensen, J. G., Norry, F. M., Scannapieco, A. C. & Loeschcke, V. (2005). Altitudinal variation for stress resistance traits and thermal adaptation in adult *Drosophila buzzatii* from the New World. *Journal of Evolutionary Biology*, 18, 829-837.
- Spanagel, R., Abarca, C., Zghoul, T., Sanchis-Segura, C., Schumann, G. & Albrecht, U. (2004). Interaction of ethanol and clock genes. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research*, 28, 60A.

Spanagel, R., Rosenwasser, A. M., Schumann, G. & Sarkar, D. K. (2005). Alcohol consumption and the body's biological clock. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research*, 29, 1550-1557.

Willard, S., Koss, C. M. & Cronmiller, C. (2006). Chronic cocaine exposure in *Drosophila*: life, cell death and oogenesis. *Developmental Biology*, 296, 150-163.

ANEXO

Software para registrar tiempos

Aclaración: el diseño, desarrollo y utilización del programa aquí descrito es de autoría exclusiva del autor de esta tesis, no contó con la autorización ni el apoyo del director de la misma.

El programa desarrollado en Visual Basic 6.0 permitió medir de forma más precisa y eficiente los caracteres REC (recuperación al coma por etanol) y CCR (recuperación al coma por enfriamiento). Mediante el uso de este programa se logró medir simultáneamente por un único operador 15 líneas. No solo permitió realizar las mediciones mejorando su eficiencia y precisión sino que también hizo extremadamente sencillo y veloz pasar los datos del formato crudo a una planilla Excel con el formato necesario para poder utilizar tanto el Statistica 6.0 como el SigmaPlot 11.0, ambos programas de estadística fueron los utilizados en esta tesis.

Posee pantalla única para su ejecución (Figura 1) a través del ingreso por el archivo “Registro.exe”; una vez ingresado el nombre de la línea en el casillero justo encima de cada columna, pudiendo especificar el sexo, se procede a presionar el botón “Activar” de la columna correspondiente en el momento en que se da comienzo al experimento con esa línea. Desde ese momento comienza a funcionar el cronómetro para esa columna, cuando se quiere tomar un registro de la línea se precisa presionar el número (o letra) correspondiente a la columna especificados sobre cada una de ellas, de esa forma se ingresa automáticamente el registro del tiempo, si se ingresa algún dato por error puede eliminarse presionando el botón “Borrar último”. Una vez terminado el registro se ingresan aquellos individuos que se consideraron muertos presionando el botón “Muerto”; luego se procede a desactivar la columna “clickeando” sobre “Activar” y acto siguiente se presiona el botón “Borrar y generar” que limpia la columna y envía los datos a un archivo Excel ya abierto por el programa que va agregando los datos que se envían de cada línea una debajo de la otra. Para cada dato enviado se especifica en cada fila los siguientes parámetros en la hoja Excel: “Tiempo” es el registro absoluto de tiempo de cada individuo; “Frec acumulada” es la frecuencia acumulada en porcentaje del total de individuos que se van recuperando respecto del total registrado de la línea;

“línea” es el código de línea que se introdujo inicialmente y “Sexo” el sexo seleccionado. De esta manera queda codificado cada uno de los individuos registrados, por último también se imprime en la planilla Excel el día y la hora del experimento (Figura 2). Cualquiera que quiera acceder al programa no tiene más que solicitarlo al correo cib1979@hotmail.com ya que es de acceso gratuito y libre, junto con el mismo se encuentra un archivo pdf que posee el código de programación.

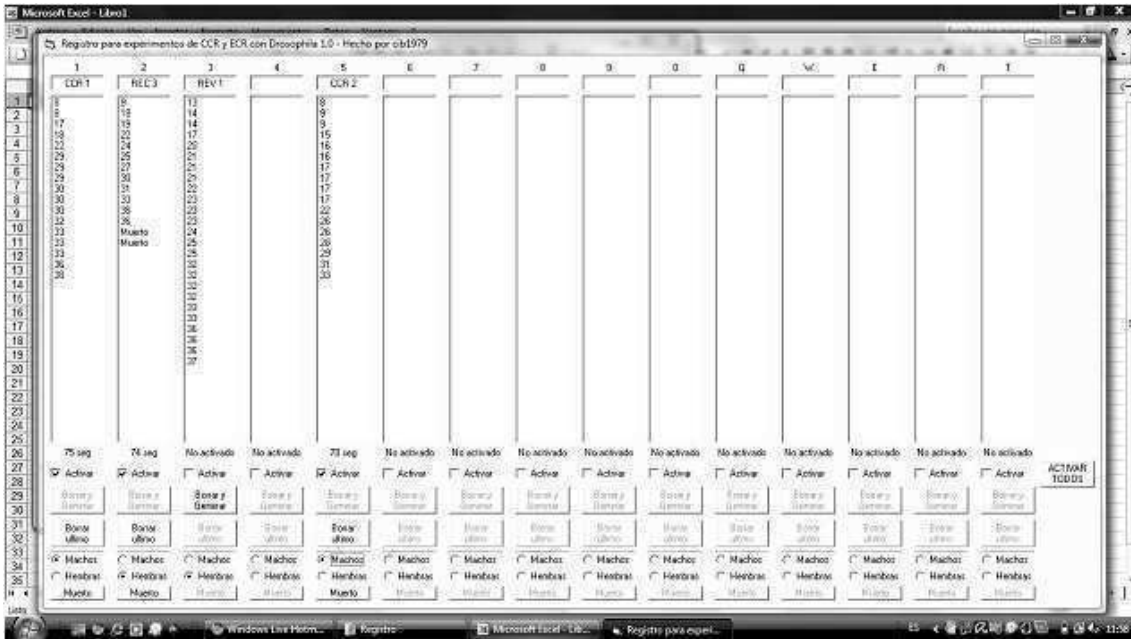


Figura 1. Ejemplo del programa en funcionamiento. Pueden verse las columnas correspondientes a cada línea con sus respectivos nombres en el casillero superior y el número correspondiente de código para ingresar los registros (1, 2, 3 y 5 ocupados en el ejemplo). En la parte inferior se observan los cronómetros en funcionamiento, la casilla de “Activar”, los botones “Borrar y generar”, “Borrar último”, las casillas para seleccionar el sexo y el botón “Muerto” respectivamente.

The screenshot shows a Microsoft Excel spreadsheet with the following data:

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Tiempo	Frec. Act.	Linea	Sexo	2/10/2009, 1:18:15 PM							
2	183		5 26c	M								
3	358		10 26c	M								
4	408		15 26c	M								
5	542		20 26c	M								
6	555		25 26c	M								
7	587		30 26c	M								
8	603		35 26c	M								
9	716		26c	M								
10	716		45 26c	M								
11	745		50 26c	M								
12	1072		55 26c	M								
13	1273		60 26c	M								
14	1488		65 26c	M								
15	1502		70 26c	M								
16	1576		75 26c	M								
17	1740		80 26c	M								
18	2204		26c	M								
19	2204		90 26c	M								
20	Muerto		26c	M								
21	Muerto		100 26c	M								
22	221	5,88235294	99d	M								
23	324		99d	M								
24	324	17,6470588	99d	M								
25	527	23,5294118	99d	M								

Figura 2. Ejemplo de planilla Excel generada por el programa donde se aprecian las cuatro columnas y el formato adecuado para el uso en los programas de estadística (Statistica 6.0 y SigmaPlot 11.0 entre otros)