



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

QTL para termotolerancia en el ambiente térmico natural, y resistencia al estrés térmico en el modelo *Drosophila*.

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

Lic. Miguel Ángel Borda

**Director de Tesis: Dr. Fabián M. Norry
Consejero de Estudios: Prof. Arturo Romano**

Buenos Aires, 14 de diciembre de 2018

QTL para termotolerancia en el ambiente térmico natural, y resistencia al estrés térmico en el modelo *Drosophila*.

RESUMEN

La temperatura ambiental afecta significativamente la distribución, abundancia y evolución de los organismos. En condiciones de estrés por alta temperatura, la supervivencia en cada estadio del ciclo de vida es importante para la adaptación de poblaciones en un escenario de calentamiento global. En este estudio se utilizó *Drosophila melanogaster* como un organismo modelo para investigar la base genética de la tolerancia al calor en estadios del ciclo de vida que en la literatura fueron poco estudiados con respecto a la termotolerancia. Se realizaron mapeos del intervalo compuesto para identificar loci de un carácter cuantitativo (QTL) que determinan la variabilidad en la supervivencia al estrés por calor en huevos y en larvas. Para ello se utilizaron líneas endogámicas recombinantes (RIL) que segregan variación extrema en la resistencia al coma por calor. Los QTLs identificados en este estudio se compararon con QTLs de termotolerancia previamente identificados en moscas adultas en condiciones estandarizadas de laboratorio. El mapeo de QTLs en larvas se realizó en un ambiente térmico natural en verano, con el objeto de evaluar la magnitud del efecto de cada QTL y su co-localización con QTLs previamente identificados en el laboratorio. La razón para ello es que el ambiente natural puede diferir ampliamente del correspondiente a estudios de laboratorio. Se realizó una prueba de complementación cuantitativa con líneas que portan deficiencias para el QTL que mostró el mayor efecto en el experimento a campo.

Asimismo, se investigó una asociación clinal entre la resistencia al coma por calor en moscas adultas y la altitud de la población de origen en la especie cactófila *Drosophila buzzatii*, en el Noroeste de Argentina,

Todos los QTLs identificados para la supervivencia de larvas a adultos en el ambiente térmico natural, solaparon con los QTL de termotolerancia ya conocidos en moscas adultas en condiciones de laboratorio. El QTL de mayor efecto fue detectado en el cromosoma X, y colocaliza con un QTL de termotolerancia ya identificado en la banda 10X en moscas adultas en el laboratorio.

El análisis supervivencia al estrés por calor en huevos reveló que los individuos en este estadio inmóvil del ciclo de vida son mucho más tolerantes que en los estadios móviles del ciclo de vida (larvas y moscas adultas). Por otra parte, la base genética de la tolerancia al calor en huevos fue diferente a la conocida en moscas adultas y larvas, ya que los QTL de termotolerancia al calor en huevos no coincidieron en posición con los conocidos en larvas y adultos. Además, las líneas RIL de alta termotolerancia al calor en adultos (RIL-SH2) tuvieron, en huevos, menor termotolerancia que el panel de línea RIL de baja resistencia al calor en adultos (RIL-D48).

Respecto de la clina altitudinal estudiada para la resistencia al coma por calor en moscas adultas, los resultados indican que las moscas de más altas elevaciones son menos resistentes al coma por calor, pero muestran igual o incluso mayor supervivencia al estrés por elevada temperatura que las poblaciones de bajas elevaciones o de altitud cercana al nivel del mar.

Los resultados de este estudio demuestran que la base genética de la tolerancia al calor en el estadio de huevo difiere ampliamente con respecto a larvas y adultos. En cuanto al estadio larvario, se observó una alta co-localización de QTLs con respecto al estadio adulto, previamente estudiado. Estos resultados no resultan sorprendentes si se considera que el estadio de “huevo” está controlado por un programa de desarrollo muy diferente al de larvas en insectos Dípteros. Estos resultados son muy importantes porque demuestran por vez primera que la base genética de la resistencia al calor difiere ampliamente en el estadio de huevos respecto al resto de los estadios del ciclo de vida de un insecto. Asimismo, el estudio presente demuestra que la termotolerancia en huevos y larvas también es genéticamente variable. El mapeo de QTL en un ambiente térmico natural desarrollado en larvas,

llena un vacío existente en nuestro conocimiento sobre la base genética de termotolerancia en el laboratorio y su correlato en la naturaleza.

Finalmente, el análisis clinal de termotolerancia en moscas adultas de *D. buzzatii* muestra que diferentes caracteres de termotolerancia pueden diferir ampliamente en cuanto a la selección térmica experimentada en la naturaleza. En particular, la resistencia al coma por calor disminuye con la altitud de origen de la población mientras que la supervivencia al estrés por calor muestra un patrón un diferente de variación altitudinal.

Palabras claves: Adaptación Térmica, Coma por Calor; Estrés por Alta Temperatura; Líneas Endogámicas Recombinantes; Loci de Carácter Cuantitativo (QTL); Prueba de Complementación Cuantitativa; Supervivencia al Estrés por Calor; Termotolerancia; Variación en el Ciclo de Vida.

QTL for thermotolerance in the natural thermal environment, and resistance to thermal stress in the *Drosophila* model.

ABSTRACT

Environmental temperature significantly affects the distribution, abundance and evolution of organisms in contemporary terrestrial environments. Under heat-stress conditions, survival at each stage of the life cycle is important for adaptation and survival of populations under a global warming scenario. In this study *Drosophila melanogaster* was used as model organism to investigate the genetic basis of tolerance to heat in life cycle stages that were rather poorly studied with regard to thermotolerance in the past. Composite interval mapping was implemented to identify quantitative trait loci (QTL) influencing heat-stress survival in both larvae and adults. In QTL-mapping, a set of recombinant inbred lines (RIL) segregating extreme variation in heat knockdown were used. Identified QTLs in eggs and larvae were compared to previously identified QTLs of thermotolerance in adult flies in the lab. In the case of QTL-mapping in larvae, it was performed in a natural thermal environment, in addition to laboratory controls, with the aim to estimate the magnitude of each QTL and its co-localization with QTLs identified in the lab in previous studies. The rationale for it, was that laboratory studies can not always represent the effects of thermal variation in natural environments. A test of quantitative complementation was performed using deficiency lines on the QTL showing the larger effect in the field.

Additionally, a clinal association was assessed between heat knockdown in adult flies and the altitude of origin of population in the cactophilic species *Drosophila buzzatii*, in the Argentina North-western.

All identified QTLs for heat-stress survival from larvae to adults in the natural thermal environment overlapped with thermotolerance-QTLs identified in previous studies under lab conditions. The large effect QTL was detected on the X chromosome, and this QTL co-localized with a thermotolerance-QTL previously identified in band 10 of this sex chromosome in the lab.

Survival analysis in eggs under heat stress revealed that individuals in the immobile stage of the life cycle (egg) are largely more tolerant to heat stress than in mobile stages of the life cycle (larvae and adults). On the other hand, the genetic basis of heat tolerance in eggs was different to the previously studied in larvae and adults, as thermotolerance QTLs in eggs did not overlapped in either position or effect with larvae and adult thermotolerance QTLs. In addition, RIL lines with high levels of heat-stress thermotolerance in adults (RIL-SH2) were, in eggs, associated to lower levels of heat resistance that in the RIL panel of low heat resistance in adults (RIL-D48).

Regarding the altitudinal cline studied for heat knockdown in adult flies, the results revealed that flies from high elevations are less resistant to heat knockdown but show similar or even higher heat-stress survival than flies from low altitude populations.

The above summarized results in this study show that the genetic basis of heat-stress resistance in the egg stage dramatically differ from larvae and adults. Regarding to the larvae stage, also studies in this thesis, it showed high co-localization of QTLs with regard to the previously studied adult stage. The lack of QTL-co-localization between eggs and larvae (and adults) does not result difficult to understand if we consider that eggs and larvae are controlled by very different development programs. These results are very important because demonstrate for the first time that the genetic basis of the resistance to heat stress widely differs in the egg stage with regard to the rest of stages of the life cycle of an insect. Likewise, the present study demonstrates that thermotolerance is genetically variable both in larvae and adults. The QTL-mapping in a natural

thermal environment in larvae fills a gap in our knowledge about the genetic basis of thermotolerance in the lab and its correlate in the wild.

Finally, the clinal analysis of thermotolerance in adult flies of *D. buzzatii* shows as different traits of thermotolerance can dramatically differ with regard to the thermal selection experienced in nature. Specifically, knockdown resistance to heat stress decreases with altitude of origin of population whereas heat-stress survival can show an opposite pattern of altitudinal variation.

Key words: Thermal adaptation, heat knockdown; high-temperature stress; Recombinant Inbred Lines; Quantitative Trait Loci; Quantitative Complementation Test; Heat-Stress Survival; Thermotolerance; Life cycle.

Agradecimientos

Al CONICET, a la ANPCyT y a la FCEyN (UBA) por brindarme el apoyo necesario para desarrollar este trabajo.

Agradezco al Dr. Fabián Norry por recibirme en su laboratorio y ayudarme a crecer y mejorar como científico y persona.

Al Dr. Arturo Romano por aconsejarme en mis estudios académicos durante el desarrollo de este trabajo.

A todo el personal, Docente y No Docente, de la FCEyN (UBA) por darme herramientas indispensables para desarrollar mis tareas en este trabajo.

A todos los integrantes del Laboratorio GERES, mis “nuevos” Amigos.

Agradezco a mi Familia y a mis “viejos” Amigos.

A los Jurados de esta Tesis, por tomarse el trabajo de leer y evaluar el presente trabajo.

Índice

RESUMEN.....	2
ABSTRACT	5
Agradecimientos.....	8
Índice	9
1. Introducción	11
1.1 Termotolerancia	12
1.2 El organismo modelo	17
1.3 Termotolerancia desde larva a la adultez en un ambiente térmico natural	18
1.4 Termotolerancia al calor en huevos de <i>Drosophila</i>	22
1.5 Clina térmica altitudinal	24
1.5.1 Análisis de una clina altitudinal del noroeste argentino para la supervivencia al estrés por calor en individuos adultos de <i>Drosophila buzzatii</i>	24
1.6 Genética cuantitativa	26
1.7 Locus de Carácter cuantitativo (QTL)	30
1.8 Líneas Recombinantes Endocriadas (RIL)	32
1.9 Marcadores moleculares y genotipado	34
1.10 Análisis de complementación cuantitativa.....	37
2. Materiales y métodos.....	39
2.1 Termotolerancia desde larva a la adultez en un ambiente térmico natural	40
2.1.1 Líneas Recombinantes Endocriadas	40
2.1.2 Fenotipos de termotolerancia en etapa huevo-adulto en el campo.....	40
2.1.3 Análisis de QTL.....	41
2.2 Termotolerancia al calor en huevos de <i>Drosophila</i>	43
2.2.1 Líneas Recombinantes endocriadas	Error! Bookmark not defined.
2.2.2 Fenotipo de termotolerancia al calor en huevos de <i>D. melanogaster</i>	43
2.2.3 Análisis de QTL.....	43
2.3 Clina térmica altitudinal	45
2.3.1 Origen de las líneas.....	45
2.3.2 Fenotipos de termotolerancia.....	46
2.3.3 Análisis estadístico.....	47
2.4 Análisis de complementación cuantitativa.....	49
3. Resultados	50

3.1 Termotolerancia desde larva a la adultez en un ambiente térmico natural.....	51
3.1.1 Supervivencia Huevo-a-Adulto bajo condiciones de estrés por calor en el campo	51
3.1.2 Análisis de QTL.....	55
3.2 Análisis de complementación cuantitativa.....	59
3.3 Termotolerancia al calor en huevos de <i>Drosophila</i>	61
3.3.1 Fenotipo de Termotolerancia al calor en huevos de <i>Drosophila</i>	61
3.4 Clina térmica altitudinal	74
3.4.1 Fenotipos de termotolerancia.....	74
4.Discusión.....	80
4.1 Termotolerancia desde larva a la adultez en un ambiente térmico natural	81
4.2 Prueba de complementación cuantitativa.	86
4.3 QTLs para termotolerancia de los huevos de <i>Drosophila melanogaster</i>	87
4.4 Clina altitudinal para termotolerancia en <i>Drosophila buzzatii</i>	90
4.5 Conclusiones generales.	93
5. Referencias Bibliográficas.....	95

1. Introducción

1.1 Termotolerancia

En insectos, la capacidad de sobrevivir desde huevo a la adultez es un importante componente de la aptitud (o “*fitness*”), especialmente bajo condiciones ambientales severas en un escenario de calentamiento global (Kingsolver *et al.*, 2011; Franks & Hoffmann, 2012). La adaptación a ambientes de estrés térmico es posible solo si los fenotipos de termotolerancia son genéticamente variables en todos los estadios del ciclo de vida (Hoffmann *et al.*, 2003; Hoffmann & Willi, 2008; Levy *et al.*, 2015).

Por estrés ambiental se considera cualquier condición del ambiente que perturbe el normal funcionamiento de sistemas biológicos, y es una condición que puede disminuir la aptitud (Hoffmann & Parsons, 1991; Hoffmann *et al.*, 2003). El estrés térmico es una de las formas de estrés más comunes en ambientes terrestres contemporáneos. Si un organismo es expuesto a temperaturas elevadas, puede responder al estrés de diferentes maneras. Primero, mediante cambios en su comportamiento puede ejecutar un mecanismo de escape. Si el mecanismo de escape comportamental falla o no puede ser ejecutado, la respuesta se evidencia mediante cambios metabólicos y fisiológicos. Tales cambios incluyen fundamentalmente la inducción de la expresión de las “*heat-shock proteins*” (Hsp en forma abreviada). Las Hsp están presentes en todos los organismos vivos, y son un grupo de proteínas altamente conservadas en el reino animal, que cumplen funciones específicas en respuesta al estrés. La mayoría de las Hsp funcionan como chaperones moleculares ayudando al organismo a hacer frente al estrés (Lindquist, 1986; Sørensen *et al.*, 2003). Están involucradas en funciones de limpieza de la célula, transporte, plegamiento y desplegamiento, ensamblaje y desensamblaje de múltiples unidades estructuradas, y en la degradación de proteínas desnaturalizadas o agregadas. El significado evolutivo y ecológico de estas proteínas es y ha sido de gran interés, ya que pueden estar directamente relacionadas con la adaptación al estrés térmico y otras formas de estrés (revisado en Sørensen *et al.*, 2003). Son

funcionalmente importantes en la protección celular durante y/o después de la exposición al estrés, ya que son relevantes en la recuperación y la supervivencia luego de la exposición (Lindquist 1986; Sørensen *et al.*, 2003). Tanto las altas como las bajas temperaturas pueden inducir la expresión de Hsp, aunque existe una especificidad para ambos extremos de temperatura (Burton *et al.*, 1988).

La mayoría de las Hsp se encuentran en niveles basales muy bajos en ausencia de estrés. Con el estrés ambiental las proteínas que no son Hsp pueden perder su conformación funcional debido a daños causados por el estrés. Las proteínas dañadas son reconocidas por el “*Heat-shock factor*” (HSF) que es el regulador positivo de la expresión de los genes de las Hsp. Al interactuar con proteínas dañadas HSF cambia su conformación y se une a los promotores de los genes de Hsp, aumentando drásticamente la expresión de genes Hsp (Figura 1).

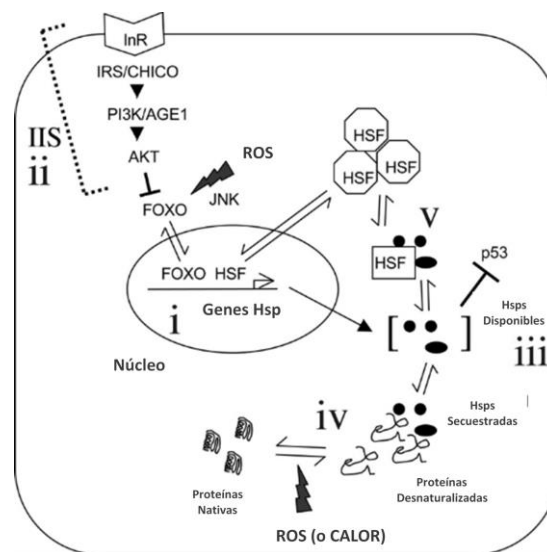


Figura 1. Regulación de genes Hsp por HSF y FOXO. Tres vías de señalización (HSF, IIS y JNK) convergen sobre los factores de transcripción FOXO y HSF para activar la expresión de genes Hsp. Las Hsps se unen a una gran variedad de “clientes”, de modo que diversos tipos de estrés como los causados por el estrés oxidativo o por el calor, pueden afectar coordinadamente una variedad de vías apartando a las Hsp de su red de “clientes” (reproducido de Tower, 2008).

Las Hsp tienen una gran importancia funcional en la protección de la célula y del organismo durante y/o después de la exposición al estrés por calor, ya que son relevantes en la recuperación y supervivencia luego de la exposición (Lindquist, 1986; Feder y Hoffmann, 1999; Sørensen *et al.*, 2003). También pueden ser inducidas por otro tipo de estrés, como la exposición a metales pesados, etanol, hipoxia, radiación UV, desecación y envejecimiento (Schlesinger *et al.*, 1982; Marx, 1983; Sørensen *et al.*, 2003). En estudios previos de laboratorio se observó que los aumentos en el nivel de Hsp pueden afectar múltiples caracteres de historia de vida tales como tasa de desarrollo, resistencia al estrés, longevidad y fecundidad (Rutherford & Lindquist, 1998; Sørensen & Loeschcke, 2001; Queitsch *et al.*, 2002; Sørensen *et al.*, 2003).

Los “heat shock genes”, genes que codifican a las Hsp están altamente conservados y muestran una baja variación entre las especies en las regiones codificantes. Se agrupan en familias formadas por varios genes relacionados, con distintas funciones.

Generalmente las temperaturas mayores que un umbral máximo causan una rápida muerte. Por lo tanto, una característica de gran relevancia implica la evaluación frente a la exposición a temperaturas elevadas pero subletales. Usualmente, la exposición a elevadas temperaturas puede conducir a un coma reversible en insectos y otros organismos. De esta manera, el estrés térmico durante el mediodía y tarde en verano puede regular de manera rutinaria a los niveles de actividad de los insectos bajo condiciones de calor en muchos ambientes naturales. La capacidad para resistir a dicho coma inducido por el calor es adaptativa. Esto se debe a que los individuos que logran permanecer activos y por lo tanto pueden tener acceso a la reproducción tendrán una ventaja demográfica respecto a otros individuos que permanecen en estado de coma durante condiciones de calor extremo en poblaciones naturales (Huey *et al.*, 1992; Loeschcke y Hoffmann, 2007).

La termotolerancia es un carácter altamente variable tanto por factores genéticos como también por factores ambientales que afecta la distribución, abundancia y supervivencia de las

especies, y es un tema de gran importancia en la biología evolutiva, sobre todo bajo la perspectiva de un creciente calentamiento global (Hoffmann & Parsons, 1997; Hoffmann & Merila, 1999; Dahlgard *et al.*, 2000; Hoffmann & Hercus, 2000; Norry *et al.*, 2004; Sørensen *et al.*, 2005a; Hoffmann & Weeks, 2007; Hoffmann & Daborn, 2007). Un gran número de experimentos demuestran que las Hsp son componentes claves de la termotolerancia (Lindquist, 1986).

Los genes candidatos para termotolerancia no solo incluyen genes de Hsp sino también un gran número de otros genes con múltiples funciones que cambian sus niveles de expresión como resultado de exponer al organismo a temperaturas de estrés tanto en todos los estadios del ciclo de vida (Leemans *et al.*, 2000; Sørensen *et al.*, 2005, 2007, 2017).

La termotolerancia puede ser tanto basal como inducida, la basal corresponde a la respuesta propia del organismo frente a la exposición de un estrés, mientras que la inducida es el aumento de la resistencia por la exposición previa al estrés.

La mayor termotolerancia de los individuos puede inducirse mediante tratamientos de aclimatación o bien de templado (o “heat-hardening”). En la aclimatación se utilizan exposiciones de largo plazo, mientras que en el templado (“heat hardening”) la duración de la exposición al estrés es mucho más corta y el efecto del aumento en la termotolerancia es de menor duración que en la aclimatación. Tanto en la aclimatación como en el templado (o “hardening”), se produce un aumento en la resistencia térmica mediante la exposición previa a un estrés térmico, la duración y severidad del mismo es lo que diferencia a estos tratamientos. Ambos tratamientos describen los cambios en un organismo causado por las condiciones ambientales externas (Loeschcke & Sørensen, 2005).

Los fenómenos de aclimatación y templado son ejemplos de plasticidad fenotípica, es decir, la expresión fenotípica variable que puede tener un carácter bajo diferentes condiciones

ambientales (Stearns, 1989). La aclimatación induce cambios fisiológicos y modificaciones en los niveles de expresión de ciertos genes (ej., Sørensen *et al.*, 2005).

1.2 El organismo modelo

El género *Drosophila* incluye más de 1500 especies, de una amplia distribución geográfica y climática encontrándose en zonas templadas y tropicales y en diferentes altitudes, aunque principalmente se la encuentra en zonas selváticas (Throckmorton, 1975; 1982).

Drosophila es un sistema modelo para el análisis de las respuestas evolutivas a las temperaturas extremas (ej., Maynard-Smith, 1956; Hollingsworth & Bowler, 1966; David *et al.*, 1983; Hoffman & Parsons, 1991; Norry *et al.*, 1994). Por su corto ciclo de vida, fácil manejo y cría económica permite fácilmente analizar de manera experimental diferentes caracteres asociados a la aptitud facilitando la comprensión de su adaptación a diferentes ambientes.

En el presente trabajo se utilizó como modelo de estudio a las especies *D. melanogaster* y *D. buzzatii*.

D. melanogaster es una especie cosmopolita que ha colonizado exitosamente casi todos los continentes en una amplia variedad de climas, ocupando extensas regiones, desde zonas tropicales a templados frías. Posee un complemento cromosómico pequeño formado por cuatro pares de cromosomas fácilmente observables dada su estructura politénica presente en las glándulas salivales. El genoma de esta especie ha sido secuenciado y anotado hace casi dos décadas (Adams *et al.*, 2000).

D. buzzatii es una especie cactófila que habita principalmente zonas áridas y semiáridas en diferentes altitudes en Argentina (ej., Fontdevila *et al.*, 1988; Hasson *et al.*, 1992; Fanara *et al.*, 1999) y se encuentra asociada a cactus del género *Opuntia*. Su conocida ecología y patrón de reproducción proporciona una gran oportunidad para el estudio de distintos aspectos evolutivos de la adaptación al ambiente y su relación con la termotolerancia (Etges, 1990; Hasson *et al.*, 1992, 1995; Fanara *et al.*, 1996, 1999; Powell, 1997; Sorensen *et al.*, 2005; Norry *et al.*, 2006).

1.3 Termotolerancia desde larva a la adultez en un ambiente térmico natural

En insectos, la capacidad de sobrevivir desde la etapa de larva a la adultez es un componente importante del *fitness*, especialmente en condiciones ambientales severas, como en el caso de temperaturas elevadas observadas en un escenario de calentamiento global (Kingsolver *et al.*, 2011; Franks & Hoffmann, 2012).

La adaptación a ambientes térmicamente estresantes es posible si los fenotipos termotolerantes son genéticamente variables en todos los estados del ciclo de vida (Hoffmann *et al.*, 2003; Hoffmann & Willi, 2008; Levy *et al.*, 2015; Lommen *et al.*, 2017). Los experimentos en el laboratorio han permitido identificar varios Loci de Carácter Cuantitativo (QTL) para la resistencia al estrés por calor en adultos de *D. melanogaster* (ej., Norry *et al.*, 2004; Morgan & Mackay, 2006; Norry *et al.*, 2007; Rand *et al.*, 2010). Un QTL es un segmento de cromosómico que contiene al menos un gen que afecta al carácter bajo estudio (Falconer & Mackay, 1996; Lynch & Walsh, 1998; ver). En este insecto modelo, la selección artificial para termotolerancia al calor, modificó el nivel de expresión de muchos genes y del proteoma constitutivo en moscas adultas en el laboratorio (ej., Sørensen *et al.*, 2007, 2017). También se identificaron QTL para la supervivencia larvaria al estrés por alta temperatura en condiciones estandarizadas de laboratorio (Sambucetti *et al.*, 2013). Sin embargo, los estudios de termotolerancia realizados bajo condiciones de laboratorio no reflejan necesariamente la termotolerancia en ambientes naturales donde la temperatura puede variar ampliamente no solo a lo largo del día sino también entre días consecutivos (ej., Loeschcke & Hoffmann, 2007; Kristensen *et al.*, 2007).

D. melanogaster se encuentra en ambientes terrestres naturales de amplias áreas geográficas, desde templadas a tropicales en todos los continentes excepto Antártida. En estudios de laboratorio, se observó un alto grado de co-localización de QTLs de termotolerancia identificados en

poblaciones de diverso origen geográfico (Morgan & Mackay, 2006; Norry *et al.*, 2004, 2007, 2008; Rand *et al.*, 2010). Aunque los QTLs usualmente abarcan grandes porciones del genoma (dependiendo tanto de la densidad de los marcadores como de la cantidad de recombinación), es interesante poner a prueba que QTL (o genotipo de QTLs) muestran efectos significativos bajo condiciones naturales, ya que la gran variación ambiental podría enmascarar cualquier efecto de diferencias genéticas de termotolerancia entre individuos.

Mediante un ensayo de campo diseñado bajo el modelo de liberación-recaptura, realizado en moscas adultas, se puso a prueba un QTL de gran efecto ubicado en el cromosoma 2 (Loeschcke *et al.*, 2011). Las moscas adultas portadoras del genotipo de QTL para la alta tolerancia al calor se desempeñaron mejor a la hora de localizar recursos en el campo en condiciones de alta temperatura. En el estadio pre-adulto del ciclo de vida también se identificaron QTLs de termotolerancia, pero aún no fueron puestos a prueba en el campo (Sambucetti *et al.*, 2013).

En esta tesis se realizó un análisis de QTL para la supervivencia en la etapa desde huevo a adulto en *D. melanogaster*, bajo condiciones naturales de estrés por calor, en Líneas Recombinantes Endocriadas (RIL) cultivadas en verano desde huevos y larvas de primer estadio en un sustrato natural (bananas en descomposición) en el campo. Para poder realizar una comparación con estudios previos realizados en el laboratorio se utilizaron dos conjuntos de RIL, RIL-D48 y RIL-SH2, descritas originalmente por Norry *et al.* (2008) para el mapeo de QTLs en el laboratorio. Estas líneas permitieron la identificación de QTLs para diversos rasgos asociados a la termotolerancia en moscas adultas en el laboratorio (Norry *et al.*, 2008; Arias *et al.*, 2012), así como en la supervivencia en condiciones de estrés por calor en el estadio pre-adulto (desde huevo a adulto) en el laboratorio (Sambucetti *et al.*, 2013). Además, las líneas RIL son recursos útiles para el mapeo de QTLs de resistencia al estrés por calor tanto en ensayos de laboratorio como de campo debido a que pueden ser examinadas en múltiples ambientes. Las líneas RIL utilizadas en este

estudio muestran una muy alta variación en relación a la termotolerancia pues una de sus líneas parentales fue derivada de una muestra de moscas salvajes colectadas en Dinamarca (una población perteneciente a un clima relativamente frío), y subsecuentemente seleccionadas para una resistencia reducida al estrés por calor en moscas adultas. La otra línea parental deriva de una población de Melbourne, Australia, que fue seleccionada artificialmente para mayor resistencia al coma por calor. En este contexto se abordan cuatro preguntas principales. Primero, ¿es posible hallar QTLs de gran efecto para la supervivencia en la etapa pre-adulta bajo condiciones de estrés por calor en el campo? Si fuera así, nos preguntamos si las localizaciones cromosómicas de los QTL de termotolerancia pre-adulta en el campo coinciden (co-localizan) con aquellas halladas previamente en la misma etapa del desarrollo embrionario en el laboratorio (Sambucetti *et al.*, 2013) Tercero, ¿son los QTL de termotolerancia pre-adulta en el campo coincidentes con aquellos hallados en estudios previos en moscas adultas en el laboratorio? Aunque la co-localización de QTL en este estudio pueda resultar tanto de efectos pleiotrópicos como de ligamiento, la falta total de co-localización indicará que la termotolerancia pre-adulta difiere de la termotolerancia adulta en lo que respecta a su respectiva base genética, de modo que los caracteres estarán influenciados por genes no ligados. Finalmente, estimando los efectos aditivos de cada de QTL podemos abordar una cuarta pregunta: ¿cuál es el QTL que explica la proporción más alta de la varianza fenotípica en la supervivencia en la etapa huevo-adulto bajo nuestras condiciones (semi)-naturales de estrés por calor en el campo?.

1.4 Termotolerancia al calor en huevos de *Drosophila*

A la fecha, prácticamente no existe información sobre la base genética de la termotolerancia en el estadio de huevo en el insecto modelo *Drosophila melanogaster*. Para comenzar a revertir esta situación, es de interés buscar QTL para la capacidad de eclosión de huevos sometidos a estrés por alta temperatura.

En insectos, el estadio de huevos es un episodio donde los individuos son inmóviles. Por ello, los huevos en un sustrato natural no pueden escapar de la radiación solar directa para evitar la mortalidad en ambientes naturales sometidos a estrés por calor (Hoffmann & Parsons, 1991; Lockwood *et al.*, 2017). La adaptación al estrés por calor depende de la fuerza de la selección a la supervivencia en elevada temperatura desde huevo a adulto, por lo que los estudios de termotolerancia basados solo en estadios de vida móviles pueden sobreestimar el grado al cual los organismos pueden responder a la selección térmica en la naturaleza (Lockwood *et al.*, 2017). En particular, en marcada diferencia con el estadio adulto del ciclo de vida (Norry *et al.*, 2004, 2007, 2008; Morgan & Mackay, 2006), no está claro aún si existe amplia variación genética para termotolerancia en estadios inmóviles del ciclo de vida dado que aún no se conocen estimas del número ni de la localización cromosómica de genes que afecten la variación en la tolerancia térmica de huevos de insectos. A la fecha, existen muy pocos trabajos que examinen la termotolerancia en el estadio inmóvil de insectos, es decir el estadio huevo, para estudiar el potencial evolutivo de la termotolerancia en insectos terrestres (Angilletta *et al.*, 2013; MacLean *et al.*, 2016; Lockwood *et al.*, 2017).

Los estudios de QTL basados en líneas RIL son útiles para estimar el número mínimo y la localización de genes que afectan la termotolerancia en el primer estadio inmóvil del ciclo de vida

en *D. melanogaster*. En este insecto modelo se han identificado QTLs para termotolerancia en adultos y larvas en diferentes líneas RIL (Morgan & Mackay, 2006; Norry *et al.*, 2008; Arias *et al.*, 2012; Sambucetti *et al.*, 2013). Las líneas RIL constituyen una herramienta genética muy útil porque el mapeo de QTLs puede realizarse para múltiples caracteres tanto en adultos como en larvas y huevos en un mismo sistema.

En este estudio se utilizaron las mismas líneas RIL-D48 y RIL-SH2 originalmente usadas para identificar QTLs de termotolerancia adulta por Norry *et al.* (2008). Estas líneas son muy útiles para estudios de termotolerancia porque sus líneas parentales difieren extremadamente en la termotolerancia de moscas adultas (Norry *et al.*, 2004, 2008). La línea parental D48 es originaria de Dinamarca y fue artificialmente seleccionada para una extremadamente baja resistencia al coma por calor (Norry *et al.*, 2004). La línea parental SH2-1 es originaria de Australia y fue artificialmente seleccionada para una excepcionalmente alta resistencia al coma por calor en la mosca adulta (Norry *et al.*, 2004). En particular las líneas RIL-SH2 y RIL-D48 son muy apropiadas para evaluar si los QTLs de termotolerancia en huevos (aún sin mapear) son los mismos que, o solapan con, los previamente identificados para termotolerancia en moscas adultas (Norry *et al.*, 2008).

El presente estudio mapea la termotolerancia al calor en el estadio huevo. Los huevos suelen experimentar estrés por calor en la naturaleza. Por lo tanto, la termotolerancia de huevos es muy importante para la adaptación a temperaturas extremas. En este estudio se midió la termotolerancia en huevos de *D. melanogaster* con el objetivo de mapear QTLs para este carácter en las líneas RIL descritas originalmente en Norry *et al.* (2008).

1.5 Clina térmica altitudinal

1.5.1 Análisis de una clina altitudinal del noroeste argentino para la supervivencia al estrés por calor en individuos adultos de *Drosophila buzzatii*.

El análisis de clinas permite evaluar la hipótesis adaptativa de la variación geográfica de caracteres cuantitativos. Las clinas geográficas de muchos caracteres relacionados son la aptitud suelen ser influenciadas por la adaptación térmica cuando el clima depende de la geografía. Por ejemplo, se han descubierto patrones geográficos de adaptación climática en especies de *Drosophila* y otros ectotermos, sobre la base de caracteres que varían clinalmente con la latitud (James & Partridge, 1995; van't Land *et al.*, 1999; Weeks, McKechnie & Hoffmann, 2002). Mitrovski & Hoffmann (2001) obtuvieron evidencia de variación altitudinal en los patrones reproductivos y supervivencia en *D. melanogaster* a lo largo de un gradiente latitudinal en la costa este de Australia. Se halló evidencia clinal para un gen candidato del envejecimiento, *Methuselah* (un gen de Hsp), que co-varia con un gradiente latitudinal (Schmidt, Duvernell & Eanes, 2000). Se han descubierto muchas clinas latitudinales para caracteres relacionados a la aptitud y se identificaron algunos de los genes candidatos asociados (ej., *hsp-omega*, *hsp68*, *hsp22*, *hsp23*) para adaptación térmica y longevidad (Schmidt *et al.*, 2000; Weeks, McKechnie & Hoffmann, 2002; Frydenberg, Hoffmann & Loeschcke, 2003). Las regiones de gran altitud y latitud comparten condiciones ambientales extremas similares (Lencioni, 2004), pero en relación a los estudios de variación clinal, los gradientes altitudinales han sido mucho menos explorados que los latitudinales.

Si bien existen numerosos factores climáticos y ecológicos que podrían variar a lo largo de una clina latitudinal, uno de los factores con mayor poder predictivo es la temperatura, para el cual existe amplia evidencia de ser un agente selectivo en las clinas latitudinales para muchos caracteres

(Reeve *et al.*, 2000; Norry *et al.*, 2001; Bublly & Loeschcke, 2000). No obstante, surge una complicación al hacer inferencias a partir de la variación latitudinal, ya que mientras la temperatura puede variar en forma predecible a lo largo de la latitud, existen muchos otros factores cuya variación puede ser impredecible con las distancias, incluso siendo tan pequeñas como de un grado de latitud. En los gradientes altitudinales, a menudo se pueden detectar clinas adaptativas a una escala geográfica más estrecha que en las escalas de los gradientes latitudinales (Etges, 1990; Sørensen *et al.*, 2005). Ello es así, porque los gradientes altitudinales ocurren en distancias geográficas (medidas por latitud y longitud) mucho más estrechas que los gradientes latitudinales que requieren muy grandes distancias para que existan cambios significativos en el clima como respuesta a la geografía. En cambio, la temperatura media desciende drásticamente con la altitud en relativamente acotadas distancias geográficas, sobre todo si la pendiente de la elevación o montaña es alta.

Por lo antedicho, las clinas altitudinales son particularmente interesantes para hipótesis adaptativas de termotolerancia dado que la temperatura es una de las principales variables climáticas en gradientes altitudinales que van desde zonas cercanas al nivel del mar hasta zonas de 2000 o más metros de altitud (Sørensen *et al.*, 2005; Norry *et al.*, 2006). *D. buzzatii* es un modelo para análisis de clinas térmicas porque es una especie cactófila que habita en gradientes altitudinales de Argentina y las Islas Canarias (Sørensen *et al.*, 2005; Norry *et al.*, 2006).

En este estudio se considerará la clina térmica altitudinal previamente documentada en *D. buzzatii* para la resistencia al coma por calor en el Noroeste de Argentina (Sørensen *et al.*, 2005). En el presente estudio se continuó el seguimiento de la mencionada clina con el fin de observar su posible variación con el tiempo y analizamos también, para su comparación con el coma por calor, la supervivencia a un estrés potencialmente letal por calor

1.6 Genética cuantitativa

El objeto de estudio de la genética cuantitativa es la herencia de caracteres cuantitativos. Es de fundamental importancia el análisis de la herencia de las diferencias fenotípicas para el estudio de la evolución de las poblaciones naturales. A los caracteres que presentan una variación continua, que se distribuyen de manera continua o cuasi-continua, se los llaman caracteres cuantitativos. La variación continua se genera por dos razones, segregación simultánea de muchos genes con algún efecto sobre el carácter a estudiar y por la superposición de una variación continua producida por causas no genéticas (Falconer & Mackay, 1996). La principal diferencia entre los caracteres que se comportan de manera mendeliana y los que lo hacen de manera cuantitativa reside en el número de genes que afectan al carácter, la magnitud de los efectos de dichos genes sobre la variación fenotípica y la existencia de gran variación ambiental para el carácter. Las propiedades que se pueden observar en una población en relación con los caracteres cuantitativos son las medias, las varianzas y las covarianzas. Todas estas observaciones se basan en medidas de los valores fenotípicos. Para el análisis de las propiedades genéticas de las poblaciones se puede dividir el valor fenotípico en componentes atribuibles a diferentes causas y que contribuyen a la varianza total observada del carácter cuantitativo en la población. La primera división del valor fenotípico (P) es en componentes atribuibles a la influencia del genotipo (G) y del ambiente (E) (Falconer y Mackay, 1996). De esta manera, la variación total observada para un carácter, expresada como la varianza fenotípica del mismo (V_P), resulta de la varianza genética (V_G) y de la varianza ambiental (V_E) de dicho carácter: $V_P = V_G + V_E$

V_G es la fracción de la varianza fenotípica atribuible a la acción combinada de los genes que afectan a la distribución del carácter cuantitativo en la población. Además, el efecto genotípico que ejercen los genes sobre el fenotipo puede variar entre los distintos loci, por lo que dentro de la V_G

se distinguen tres componentes principales denominados varianza aditiva (V_A), varianza de dominancia (V_D) y varianza de interacción epistática (V_I).

V_A representa la fracción de V_G atribuible a los efectos aditivos de los alelos. Dicha varianza es la principal determinante de las propiedades genéticas observables de una población y de la respuesta a la selección. V_A es la varianza de los valores reproductivos (o valores de cría). Definimos valor reproductivo del individuo como la suma de los efectos medios de los genes que presenta un individuo. El efecto medio de un gen (alelo) es la desviación, con respecto a la media de la población, de la media de los individuos que recibieron dicho alelo de uno de sus padres, mientras que el otro alelo recibido del otro parental provino al azar de la población. Explicado de otro modo: si un cierto número de gametas que llevan el alelo A_1 se unen al azar con gametas de la población, la media de los genotipos resultantes se desvía de la media de la población en una cantidad que es igual al efecto medio del alelo A_1 (Falconer y Mackay, 1996). El valor de un individuo juzgado por el valor medio de sus hijos, se llama valor reproductivo.

V_D es la fracción de V_G debida a las desviaciones de dominancia dadas por interacciones entre alelos o *intra-locus*. La desviación por dominancia surge de la propiedad de dominancia entre los alelos de un gen. En ausencia de dominancia el valor genotípico y el mejorante coinciden.

V_I representa la varianza debida a la interacción epistática entre genes de distintos loci, o dicho de otra forma, debida a la interacción no alélica.

La genética de un carácter cuantitativo se centra en su variación. La partición de la varianza en componentes permite estimar la importancia de los distintos determinantes del fenotipo, en particular el papel de la herencia frente al ambiente. La importancia relativa de la variación se da como proporción respecto de la varianza fenotípica total. A esta importancia relativa, V_A/V_P , en la determinación de los valores fenotípicos se la llama *heredabilidad* del carácter (h^2) y representa la fracción heredable de la variación total del carácter en la población. Cuando un carácter está sujeto

a selección natural o artificial, como resultado de tal selección, de los tres componentes de V_G , sólo V_A predice los cambios genéticos del carácter en la población. Esto se debe a que, dado que las gametas son haploides, V_A es el único componente de V_G que determina la cantidad en la cual los fenotipos serán afectados por los alelos transmitidos de una generación a la siguiente en especies diploides.

La heredabilidad de un carácter cuantitativo es una de sus propiedades más importantes, aunque debe tenerse en cuenta que no sólo constituye una propiedad del carácter sino también de la población, así como de las condiciones ambientales en las que los individuos se desarrollan y de la forma en que se evalúa el fenotipo. El valor de la heredabilidad depende de la magnitud de todos los componentes de la varianza fenotípica y, por tanto, puede ser afectada por los cambios que experimente cualquiera de ellos. Dado que todos los componentes de V_G dependen de las frecuencias génicas, éstos pueden diferir de una población a otra.

La varianza ambiental, por su parte, depende de las condiciones ambientales y por lo tanto la heredabilidad disminuye en condiciones ambientales más variables y aumenta cuando éstas son más uniformes. El valor de la heredabilidad de un carácter se refiere a una población y a condiciones ambientales concretas. Los valores que pudieran calcularse en otras poblaciones o ambientes dependerán de la estructura poblacional y del ambiente. Ejemplo de esto es el amplio rango de variación en las estimas de heredabilidad obtenidas para un mismo carácter y organismo, reflejando diferencias entre las poblaciones consideradas o entre las condiciones ambientales en las que éstas se han estudiado (ver Falconer & Mackay, 1996). Sin embargo, las diferencias en la heredabilidad entre distintos caracteres suelen ser grandes y se ha sugerido que la magnitud de la heredabilidad depende de la naturaleza del carácter, siendo los caracteres más estrechamente ligados a la aptitud, aquellos con menores valores de heredabilidad. Esta relación ha sido evidenciada en amplias recopilaciones de heredabilidades de diferentes caracteres (Roff & Mousseau, 1987) y en otros

organismos (ej., Mousseau & Roff, 1987). La termotolerancia es un carácter cuantitativo típico que puede ser analizado utilizando la genética cuantitativa.

1.7 Locus de Carácter cuantitativo (QTL)

Los métodos de mapeo de QTL (Quantitative Trait Loci) permiten abordar el estudio de la localización cromosómica de los genes que afectan a caracteres cuantitativos. Un QTL es un segmento de cromosoma con un efecto sobre el carácter de estudio, no necesariamente un único gen (Falconer & Mackay, 1996).

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

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

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

- Deben ser altamente polimórficos, de manera que las líneas parentales sean portadoras de diferentes variantes alélicas en cada locus.
- Abundantes a lo largo del genoma.
- No afectan al carácter cuantitativo.

- Co-dominantes, para poder identificar todos los genotipos posibles en un locus marcador. Este criterio no es tan restrictivo, y según el diseño pueden utilizarse marcadores dominantes o co-dominantes.

1.8 Líneas Recombinantes Endocriadas (RIL)

Existen diversos diseños de mapeo de QTL, como ser F2, retrocruza y líneas recombinantes endocriadas (RIL). De estos diseños clásicos, el diseño RIL es el que ofrece mayor resolución debido a que involucra muchas más rondas de recombinación que los diseños F2 y retrocruza (Lynch & Walsh, 1998). Además, el diseño RIL tiene la ventaja de que las líneas RIL, al ser casi homocigotas, pueden ser utilizadas para mapear QTL de un carácter en múltiples ambientes (Lynch & Walsh, 1998).

La construcción y el genotipado de las líneas RIL utilizadas en este estudio no fue parte de la presente tesis, y se describen en Norry *et al.* (2008). Aquí se menciona de manera resumida su construcción. A partir de las líneas parentales seleccionadas, se cruzaron las líneas D48 y SH2-2. Cuatro hembras vírgenes de la F1 resultante fueron retrocruzadas a 7 machos de cada una de las respectivas líneas parentales para generar dos poblaciones de retrocruza. A cada una de estas poblaciones de retrocruza se les permitió aparearse libremente por otras dos generaciones. Después de la última generación de apareamiento aleatorio, se procedió a fundar líneas recombinantes endocriadas (RIL). Las RIL fueron iniciadas fundándose 100 parejas únicas para cada retro-cruza (RT) y se establecieron mediante sucesivas rondas de apareamiento entre parejas de hermanos enteros durante 15 generaciones (Figura 1). Todas las líneas RIL fueron construidas y mantenidas a 25°C y un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas, en tubos plásticos de 80 x 20 mm conteniendo 6 ml de medio de cultivo estándar. Para esta tesis usamos 32 RIL para D48 (denotadas RIL- D48) y 21 RIL para SH2 (denotadas RIL-SH2).

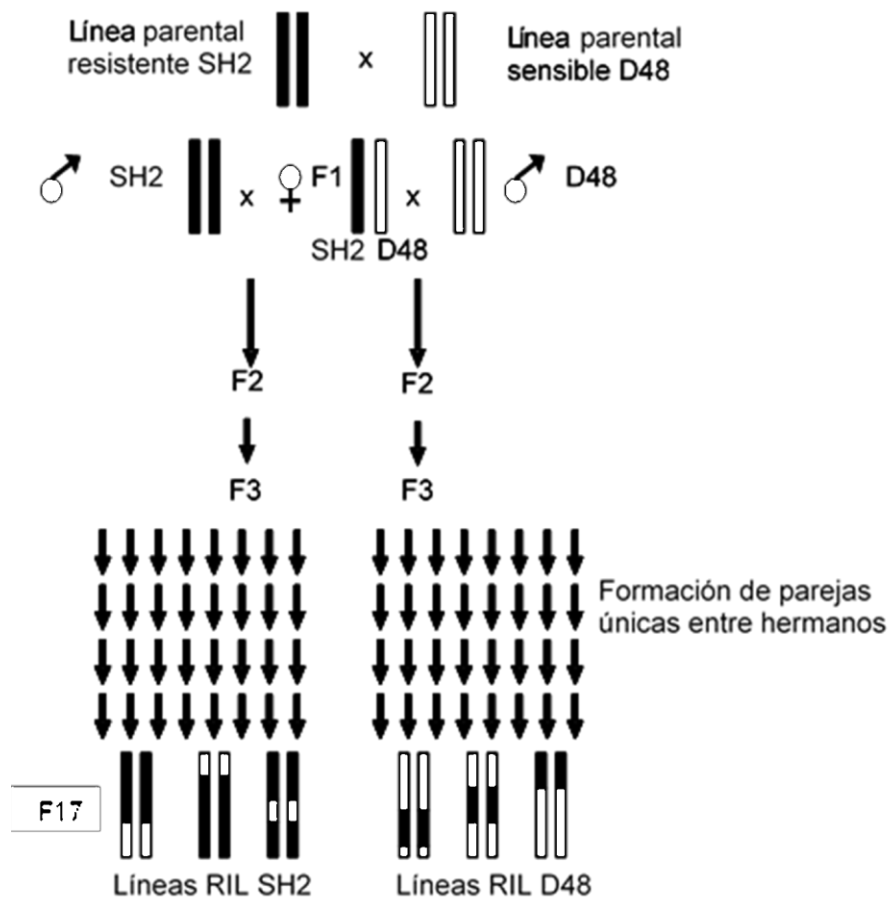


Figura 1. Esquema del diseño de cruzamientos realizados para la construcción de las líneas RIL (Norry *et al* 2008).

1.9 Marcadores moleculares y genotipado

Los microsatélites (repeticiones en tándem de secuencias únicas) son marcadores moleculares excelentes para el mapeo de QTL dado que poseen ciertas características deseables: neutralidad respecto al carácter bajo estudio, codominancia, alto nivel de polimorfismo y amplia distribución a lo largo de todo el genoma. La neutralidad del marcador es necesaria para descartar la existencia de un componente de varianza fenotípica debido al genotipo del marcador, mientras que la codominancia es necesaria para poder identificar todos los posibles genotipos del marcador (ej. entre el heterocigota y cualquiera de los dos homocigotas). Por eso los microsatélites fueron los marcadores elegidos en Norry *et al.* (2008) para el genotipado de las líneas RIL utilizadas en este estudio. La información sobre el mapa citológico y genético de los marcadores asociados a las líneas RIL-D48 y RIL-SH2 se detalla en la Tabla 1. Las tasas de recombinación (r) entre los marcadores fueron estimadas en Norry *et al.* (2008) como $r = 1 / (4/R - 6)$, donde R es la proporción de las líneas RIL que exhibieron un evento de recombinación entre marcadores (Silver, 1985). La posición de mapa de los marcadores en cM fue estimada a partir de las frecuencias de recombinación (r) usando la función de mapa de Kosambi: $100d = \frac{1}{4} \ln [(1 + 2r) / (1 - 2r)]$ (Norry *et al.*, 2008). La distancia promedio entre marcadores en el mapa estándar de *D. melanogaster* es de 8 cM, sin embargo, la generación de RIL resultó en un mapa expandido (Tabla 1). Las distancias de mapa fueron promediadas sobre todas las líneas RIL (RIL-SH2 y RIL-D48). El mapa genético para RIL es expandido en relación al mapa de retrocruza porque suceden más eventos de recombinación durante la construcción de cada RIL. Para el genotipado de las líneas RIL, se extrajo el ADN del cuerpo completo individual de dos machos y dos hembras de cada línea. Las extracciones se llevaron a cabo en el laboratorio de Genética Evolutiva de la Resistencia al Estrés y Senescencia (GERES) utilizando el kit Puregene (Gentra Systems) y siguiendo el protocolo para una única mosca que se indica para dicho kit (<http://gentra.com>). El ADN purificado de cada individuo fue

conservado a -20°C . La extracción de ADN y el genotipado con loci de microsatélites no fue parte de este trabajo doctoral. El mismo fue realizado como se describe en Norry *et al.* (2008) mediante PCR con *primers* marcados y posterior secuenciación automática. La totalidad del genotipado y la obtención del mapa genético resultante (Tabla 1) fue realizado por Fabián Norry en colaboración con Volker Loeschcke del Aarhus Centre for Environmental Stress (Dinamarca).

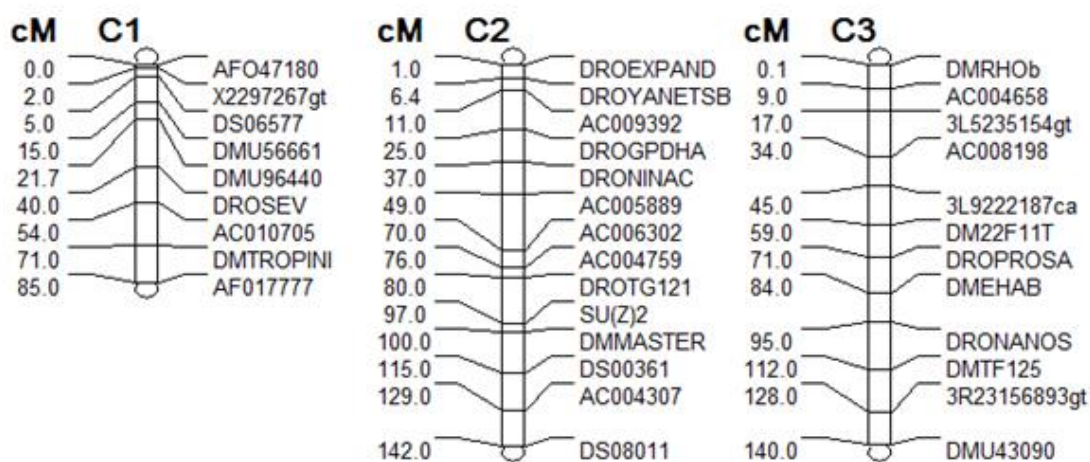


Figura2. Mapa genético para microsatélites en las líneas RIL utilizadas en el presente estudio, como se describe en Norry *et al.* (2008) para el cromosoma X (C1) y los cromosomas 2 (C2) y 3 (C3). Las referencias para cada microsatélite se presentan en Tabla 1.

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

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

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

1.10 Análisis de complementación cuantitativa

En *D. melanogaster*, los stocks con deficiencias (Def) en pruebas de complementación son un método rápido para el mapeo fino de QTLs. Cada stock Def contiene una región del genoma eliminada y es mantenida gracias a un cromosoma balanceador (Bal) para evitar la recombinación, y es marcado con una mutación dominante visible (ej, *curly*, *bar*, etc) de modo tal que sea fácilmente distinguible del cromosoma Def (Anholt & Mackay, 2014).

El stock Def/Bal se cruza con líneas parentales, por ejemplo, P1 y P2 (Figura 1), las cuales contienen diferentes alelos-QTLs, y luego se evalúa el comportamiento del carácter para cada uno de los individuos de las clases genotípicas resultantes; en este caso las clases genotípicas resultantes son: Def/P1, Def/P2, Bal/P1 y Bal/P2. Si la Df deja al descubierto al alelo-QTL, esperaríamos que la diferencia en el fenotipo sea mayor entre los genotipos Def/P1 y Def/P2 con respecto a los fenotipos Bal/P1 y Bal/P2. Cuando esto sucede, se dice que Def no complementa al QTL.

Si se repite esta prueba en stocks que tengan deficiencias superpuestas a lo largo de la región del QTL, se puede inferir la ubicación del QTL a partir del conocimiento de los puntos de corte de la Def, y del patrón de complementación y de falla de complementación.

Debe advertirse que la falla en la complementación puede también ocurrir si la deficiencia interactúa epistáticamente con un QTL diferente que afecte al mismo carácter. Por otro lado, este análisis tampoco distingue la interacción entre los alelos Def y QTL en la región descubierta por Def (alelismo). Por eso, las pruebas de complementación sólo sugieren una región candidata, pero se necesitan de otros estudios para confirmar esta interpretación.

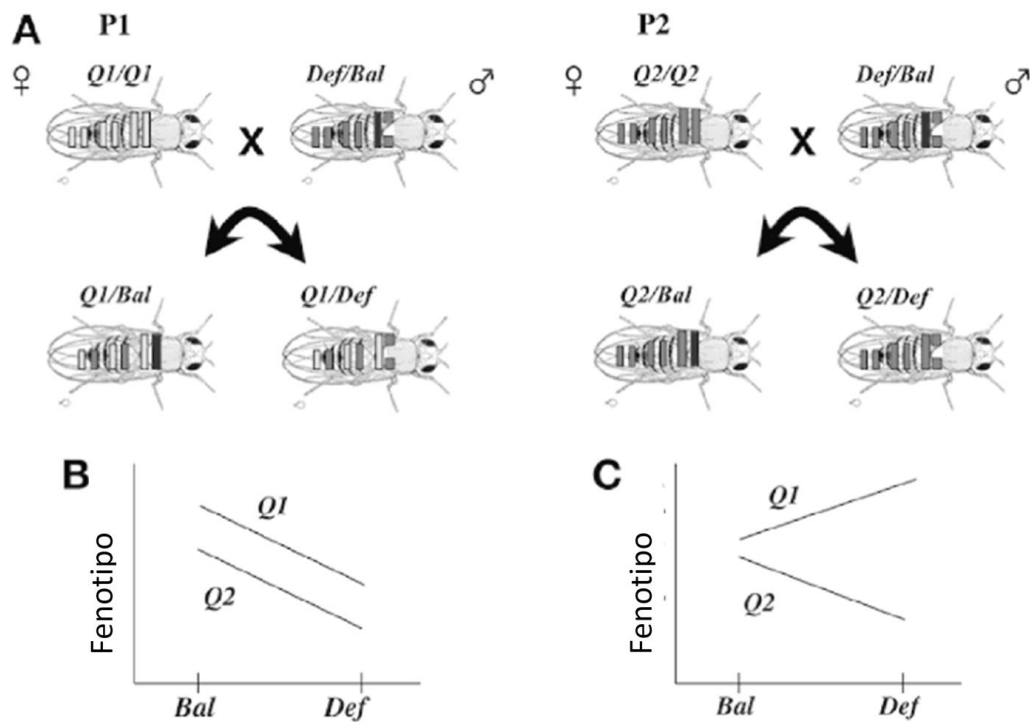


Figura 1. Principio de la prueba de complementación cuantitativa. **A.** Se cruzan hembras vírgenes de cada línea parental (P1 y P2) con machos de los stocks con deficiencias (Def). Los cromosomas Def son letales en homocigosis y son mantenidos gracias a los cromosomas intactos balanceadores (Bal) para prevenir la recombinación. Los cromosomas balanceadores tienen una mutación dominante visible (por ejemplo, alas *curly*) de modo que cuando los stocks de Def se cruzan con otros stocks, la descendencia con el cromosoma balanceador es distinguible de aquella con Def. De estos cruces se producen cuatro genotipos: Def/Q1, Bal/Q1, Def/Q2 y Bal/Q2, en donde Q1 y Q2 se refieren a los alelos del carácter cuantitativo de P1 y P2 respectivamente. La prueba para determinar la falla cuantitativa de los alelos Q1 y Q2 en complementar una deficiencia consiste en contrastar si $((Def/Q1 - Def/Q2) - (Bal/Q1 - Bal/Q2))$ es significativamente diferente de cero. Esto se detecta mediante la interacción cruzada (Def o Bal) por línea (P1 y P2) a través de un análisis de varianza de dos vías. **B.** En este caso no se puede inferir un QTL en la posición de la Def porque la diferencia en el fenotipo entre las líneas P1 y P2 es la misma. La Def no revela diferentes efectos alélicos sobre el carácter entre los alelos Q1 y Q2. **C.** Aquí si se infiere un QTL en la posición de la Def. La diferencia en el valor medio del carácter entre los alelos Q1 y Q2 sobre la deficiencia es mayor que la diferencia entre el valor medio del carácter de los alelos Q1 y Q2 sobre el balanceador. (figura modificada de Tollefsbol, 2007).

2. Materiales y métodos

2.1 Termotolerancia desde larva a la adultez en un ambiente térmico natural

2.1.1 Líneas Recombinantes Endocriadas

Las líneas utilizadas en este estudio son dos grupos de RIL descritas en Norry *et al.* (2008). Dos líneas endocriadas denominadas SH2 y D48 fueron utilizadas como líneas parentales para la construcción de las RIL. Previamente al cruce de las líneas, SH2 (derivada de Melbourne, Australia) fue seleccionada para alta RCAT (resistencia al coma por alta temperatura) mientras que D48 (derivada de Jutlandia, Dinamarca) fue seleccionada para baja RCAT. Para incrementar el poder estadístico en la detección de QTL si se compara con el diseño basado en un solo retrocruzamiento para la construcción de RIL, dos grupos de RIL, denominadas RIL-D48 y RIL-SH2, se construyeron a partir de ambos cruces recíprocos (Norry *et al.*, 2008). El mapa genético asociado a las RIL fue basado en 36 marcadores microsatélite a lo largo de los cromosomas mayores (Figura 2; Norry *et al.*, 2008).

2.1.2 Fenotipos de termotolerancia en etapa huevo-adulto en el campo

Todas las RIL fueron mantenidas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en tubos repicados de 95 x 20-mm (de ahora en adelante tubos estándares) que contienen 6 ml de medio de cultivo preparado con puré de papas instantáneo junto con agua y nipagin. Para obtener los parentales de los individuos experimentales, las RIL fueron expandidas de una generación para todo el stock utilizando 3-4 botellas estándares por RIL con 25 machos

más 25 hembras por botella. Las botellas estándar son botellas de vidrio de 125-ml. que contienen 40 ml. del cultivo mencionado anteriormente.

Se obtuvieron cultivos en los que se sembraron 40 huevos por RIL en cada banana, con dos réplicas por RIL. Estos cultivos fueron puestos individualmente en bolsas de fina red de tela para impedir que se escapen las moscas. En dichos cultivos de banana se registró la supervivencia larvaria directamente en el campo, contabilizando el número de moscas emergidas de cada sexo en cada cultivo. Los datos (% de supervivencia) fueron promediados sobre ambas réplicas y finalmente utilizados para el mapeo de QTL. La temperatura máxima durante el experimento fue de aprox. 35°C.

2.1.3 Análisis de QTL

Se realizó un mapeo de intervalo compuesto para probar la hipótesis de que un intervalo flanqueado por dos marcadores adyacentes contiene un QTL. Esta prueba se realizó utilizando el modelo 6 en el programa QTL-Cartographer Windows versión 2.5, para el diseño Ri2 (RIL), inicialmente con 5 marcadores control y un tamaño de ventana de 10 cM. Se ha explorado los efectos alterando esta combinación inicial de parámetros. Las posiciones de los QTLs encontrados con 10 cM como tamaño de la ventana y 5 marcadores de control fueron consistentes a través de una amplia gama de combinaciones de parámetros. Los umbrales significativos fueron determinados en 1000 permutaciones aleatorias. El análisis de QTL se realizó para cada réplica, así como también al promedio de las réplicas ambos para cada panel de RIL (RIL-D48 y RIL-SH2) y para los paneles RIL agrupados. Como el número de QTL fue mayor en el análisis basado en cada réplica separada más que en el análisis basado tanto en el promedio entre réplicas como en el pool RIL, y porque los picos de QTL de lo contrario se superponen a través del análisis, los resultados son presentados para cada réplica

separada. Los intervalos de confianza fueron calculados para los QTL significativos utilizando 1.5 LOD para una confianza >95%, de acuerdo a Dupuis & Siegmund (1999).

2.2 Termotolerancia al calor en huevos de *Drosophila*

2.2.1 Fenotipo de termotolerancia al calor en huevos de *D. melanogaster*

Se utilizaron 32 líneas RIL-D48 y 34 líneas RIL-SH2 de *D. melanogaster* previamente obtenidas por Norry *et al.* (2008).

Se midió la resistencia al estrés por alta temperatura en huevos en un ambiente de estrés térmico. Se colocaron 10 hembras y 10 machos de 4 días de edad en tubos conteniendo una pequeña cuchara con ágar y pasta de levadura para la colección de huevos en un incubador Lovibond a 25°C. Se colectaron 30 huevos que fueron sembrados en una cuchara con ágar y levadura por RIL. Estos tubos fueron replicados 3 veces por cada RIL. Los tubos conteniendo las cucharas con huevos sembrados se colocaron 75 minutos en el incubador regulado a 38°C, y luego fueron colocados a 25°C. A las 24 hs. se contó el número de huevos de cada cuchara y el porcentaje de los que eclosionaron. Se calculó el promedio de las 4 réplicas de cada RIL para realizar un mapeo del intervalo compuesto. Lo mismo se hizo en tubos con huevos de control con la única diferencia que no fueron expuestos al estrés de 38°C y permanecieron siempre a 25°C.

2.2.3 Análisis de QTL

Se realizó un mapeo de intervalo compuesto para probar la hipótesis de que un intervalo flanqueado por dos marcadores adyacentes contiene un QTL. Esta prueba se realizó utilizando el modelo 6 en el programa QTL-Cartographer Windows versión 2.5, para el diseño Ri2 (RIL), inicialmente con 5 marcadores control y un tamaño de ventana

de 10 cM. Se exploraron los efectos de alterar esta combinación inicial de parámetros. Las posiciones de los QTLs encontrados con 10 cM como tamaño de la ventana y 5 marcadores de control fueron consistentes a través de una amplia gama de combinaciones de parámetros. Los umbrales significativos fueron determinados en 1000 permutaciones aleatorias. Como el número de QTL fue mayor en el análisis basado en cada replica separada más que en el análisis basado tanto en el promedio entre réplicas como en el pool RIL, y porque los picos de QTL de lo contrario se superponen a través del análisis, los resultados son presentados para cada replica separada. Los intervalos de confianza fueron calculados para los QTL significativos utilizando 1.5 LOD para una confianza >95%, de acuerdo a Dupuis & Siegmund (1999).

2.3 Clima térmica altitudinal

2.3.1 Origen de las líneas

En abril de 2016 se tomaron muestras de *Drosophila buzzatii* a lo largo de un gradiente altitudinal que incluyó los sitios de muestreo que se detallan en la Tabla 1, examinados previamente (Sørensen *et al.*, 2005; Norry *et al.*, 2006). Las moscas fueron colectadas en el campo utilizando trampas de banana y cactus en el mismo mes del año que en muestreos previos. A partir de siete isólinas, se formaron en el laboratorio cultivos masivos para cada población (Sambucetti *et al.*, 2006; Norry *et al.*, 2006).

Tabla 1. Sitios de poblaciones a lo largo de un gradiente altitudinal de Argentina (Norry *et al.*, 2006). T min y T max representan estimaciones de las temperaturas mínimas o máximas diarias promediadas entre 1990 y 2000 (Norry *et al.*, 2006, datos provistos por el Servicio Meteorológico Argentino (www.meteofa.mil.ar)).

Localidad	Altitud	Latitud (°)	Longitud (°)	T min (°C)	T max (°C)
Termas 1	202	27.48	64.18	6	34
Termas 2	204	27.48	64.20	6	34
Chumbicha	401	28.52	66.15	4	35
Vipos	739	24.38	65.03	3	33
Trancas	879	26.08	65.11	3	33
Cafayate	1654	26.06	65.58	1	26
Quilmes	1855	26.27	66.02	0	25

2.3.2 Fenotipos de termotolerancia

Todas las muestras fueron mantenidas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en botellas estándar de vidrio de 125-ml. conteniendo 40 ml. de medio de cultivo preparado con puré de papas instantáneo junto con agua y nipagin. Para obtener los parentales de los individuos experimentales, las muestras (F5 o F6 de laboratorio) fueron expandidas una generación para todo el stock utilizando 7-8 botellas estándar por población con 20 machos más 20 hembras por botella.

Se midió el tiempo (en segundos) que tardan en llegar al coma (*KnockDown*) al ser expuestas a 38°C (resistencia al coma por alta temperatura, RCAT), en cada una de las poblaciones de la clina (en la Figura 1 se detalla el equipo utilizado para la medición de este carácter). Las moscas se introducen inicialmente en el extremo superior de la columna, previamente calentada por la circulación de agua caliente a través de una sobrecubierta, agua proveniente de un baño a temperatura controlada. Cuando las moscas alcanzan una temperatura corporal incapacitante (temperatura de *KnockDown*), caen por la columna y son colectadas en viales. La temperatura de *KnockDown* se aproxima midiendo la temperatura del aire dentro de la columna. Se analizaron muestras tomadas en el año 2016.

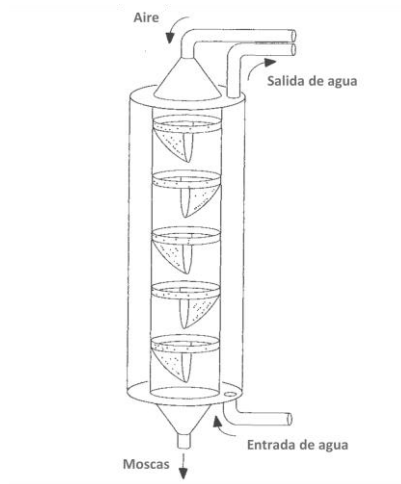


Figura 1. Aparato para la colección de las moscas durante la medición de la resistencia al *KnockDown* por calor. (figura modificada de Huey *et al.*, 1992).

Para medir la supervivencia al estrés por calor (SEC) se utilizó un estrés semi-letal de 40°C por 1 hora, utilizando tubos de vidrio en un baño térmico. La supervivencia al estrés por calor fue medida como la proporción de sobrevivientes 24 hs. después de exponer a todas las poblaciones tanto aclimatadas como no aclimatadas a los 3 días de edad al estrés semi-letal. El tratamiento de aclimatación consistió en exponer a las moscas de dos días de edad a 37°C (baño térmico) por 45 min. Todo el experimento fue replicado tres veces.

2.3.3 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico del carácter *KockDown*, se realizó un análisis de regresión lineal y un ANOVA de dos factores fijos donde la variable continua fue la

altitud de la población y un factor fue el sexo para poner a prueba la hipótesis de variación clinal y diferenciación entre poblaciones en machos y hembras. Todos los análisis estadísticos fueron implementados utilizando STATISTICA (Statsoft, 1995).

2.4 Análisis de complementación cuantitativa

Se usaron líneas con pequeñas deleciones disponibles desde Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDSC), para tratar de localizar el QTL del cromosoma X en una escala más fina. En particular, la línea 25391 de BDSC fue utilizada para esta tesis, mientras otras fueron utilizadas por FM Norry con resultados negativos (Fabian Norry, comunicación personal). Esta línea porta un cromosoma con la deleción que se extiende desde la banda 9F8 hasta la banda 10A4. El gen candidato *hsp60* está ubicado en la banda 10A4. El cromosoma X balanceador de esta línea porta la mutación Bar que es utilizada como marcador morfológico en la F1, como se explicó en la Introducción.

El carácter medido en esta prueba de complementación fue la resistencia al coma por calor (*KnockDown*) en hembras adultas, porque la prueba no se puede desarrollar en otros estadios del ciclo de vida ni en los machos, ya que requiere distinguir el marcador morfológico (ej Bar) en la F1.

El modelo de la prueba de complementación cuantitativa por deficiencia es explicado por Pasyukova et al. (2000). Se realizó un ANOVA de acuerdo con el modelo $Y = \mu + L + G + L \times G + E$, en donde μ es la media fenotípica, L es el efecto fijo del parental y G es el efecto fijo de la deleción. La falla en la complementación es inferida si el término de interacción L x G es significativo ($P < 0.05$). La falla en la complementación sucede cuando $(D48 / Del) - (SH2 / Del) > (D48 / Bal) - (SH2 / Bal)$, correspondiendo D48 al alelo que disminuye la termotolerancia.

3. Resultados

3.1 Termotolerancia desde larva a la adultez en un ambiente térmico natural

3.1.1 Supervivencia de huevo a adulto bajo condiciones de estrés por calor en el campo

La supervivencia desde huevo a adulto (SHA, en %) bajo condiciones de estrés por calor en el campo (Tabla 1), fue entre 3 y 6 veces menor que SHA en un ambiente controlado de laboratorio a 25°C (Figura 1). Cuando SHA fue transformada aplicando \log_e , el efecto experimento (es decir, control a 25°C vs control a 25°C con tratamiento de calor vs campo en condiciones de estrés por calor) fue altamente significativo (Tablas 2 y 3). Se observó una interacción significativa entre los experimentos y el sexo (Tabla 3). Comparaciones Post-hoc revelaron una diferencia significativa alta en SHA, entre el ambiente de estrés por calor natural y el ambiente control de laboratorio a 25°C.

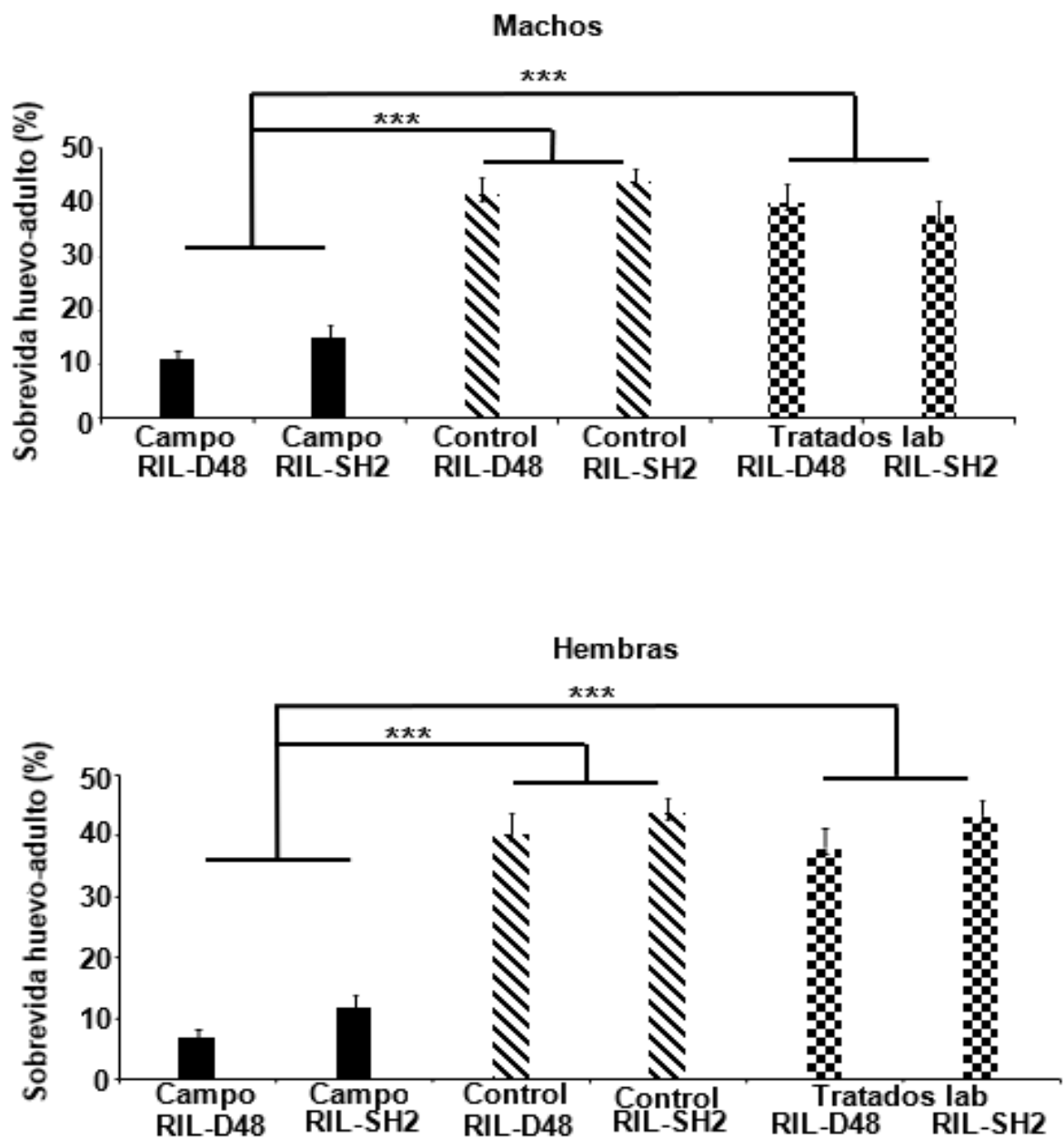


Figura 1. Se muestra la SHA (en %) para el estrés por calor en el campo (barras negras llenas), un control en condiciones de laboratorio a 25°C (barras en rayado diagonal) y para un experimento de laboratorio a 25°C con larvas aclimatadas al calor (tratados por calor, barras cuadriculadas). Las barras de error se corresponden con el error estándar de la media (EEM). Los asteriscos indican diferencias significativas (ver el texto para los detalles). *** $P < 0.001$).

Tabla 1. Temperaturas mínimas, máximas y medias para cada día de marzo de 2015 cuando se llevó a cabo el experimento a campo, en el campo experimental de la Ciudad Universitaria de la Universidad de Buenos Aires.

Día	Temperatura (°C)		
	Mínimo	Máximo	Media
7	23	30	26
8	23	29	27
9	23	31	28
10	24	30	27
11	24	29	26
12	23	31	29
13	23	33	29
14	24	30	27
15	19	27	24
16	22	28	25
17	24	31	28
18	23	30	27
19	22	29	27
20	24	33	29

Tabla 2. Se muestran los valores de SHA transformados (\pm EEM) en dos grupos de RILs, RIL-D48 y RIL-SH2, en condiciones de estrés por calor en campo como también en condiciones de laboratorio a 25°C, con y sin aclimatación al calor.

	Hembras	Machos
Experimento en campo bajo estrés por calor		
RIL-D48	1.38 (0.21)	1.93 (0.21)
RIL-SH2	1.94 (0.27)	2.45 (0.20)
Experimento en lab, a 25°C, no aclimatadas		
RIL-D48	3.52 (0.12)	3.60 (0.10)
RIL-SH2	3.71(0.07)	3.62 (0.05)
Experimento en lab, a 25°C, aclimatadas		
RIL-D48	3.46 (0.13)	3.53 (0.11)
RIL-SH2	3.73 (0.06)	3.58 (0.07)

Tabla 3. ANOVA realizado sobre los datos transformados de SHA, llevado a cabo para poner a prueba los efectos entre los distintos experimentos (experimento en campo, control con y sin aclimatación), los paneles de RILs (RIL-D48 vs RIL-SH2), y el sexo en las líneas RIL utilizadas en este estudio.

Fuente de Variación	g.l.	C.M.	F
(1) Experimento	2	86.34	134.85***
(2) RIL	1	5.00	7.82**
(3) Sexo	1	1.81	2.82
<i>Interacciones</i>			
(1) x (2)	2	1.29	2.02
(1) x (3)	2	2.30	3.59*
(2) x (3)	1	0.38	0.59
(1) x (2) x (3)	2	0.05	0.08
Error	282	0.64	

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

En la Figura 2 se muestra la supervivencia media para cada línea en el experimento en campo y también la SHA en %. En este ensayo bajo condiciones de estrés por calor, el panel RIL-SH2 mostró una supervivencia mayor que el panel RIL-D48, como era de esperar, considerando que el panel RIL-SH2 proviene de una retrocruza con la línea parental resistente al calor, la SH2 (Figuras 1 y 2. Se observó un $P = 0.0013$ en una prueba de Tukey para contraste entre las líneas RIL-D48 y RIL-SH2). También fue significativa la diferencia entre los paneles de RILs en el ensayo en campo al realizar un ANOVA sobre los datos no transformados, con [1] RIL-D48 vs RIL-SH2 and [2] sexo como efectos fijos: $F_{1, 94} = 4.98^*$ para [1], $F_{1, 94} = 3.58$ para [2], $F_{1, 94} = 0.02$ para [1] x [2] ($*P < 0.05$). En ambos paneles de RILs, la correlación entre los sexos fue significativa en el experimento de campo (Figura 2 c. Correlación de Pearson: $r = 0.91^{***}$ para RIL-D48; $r = 0.52^*$ para RIL-SH2. *** $P < 0.005$; $*P < 0.05$).

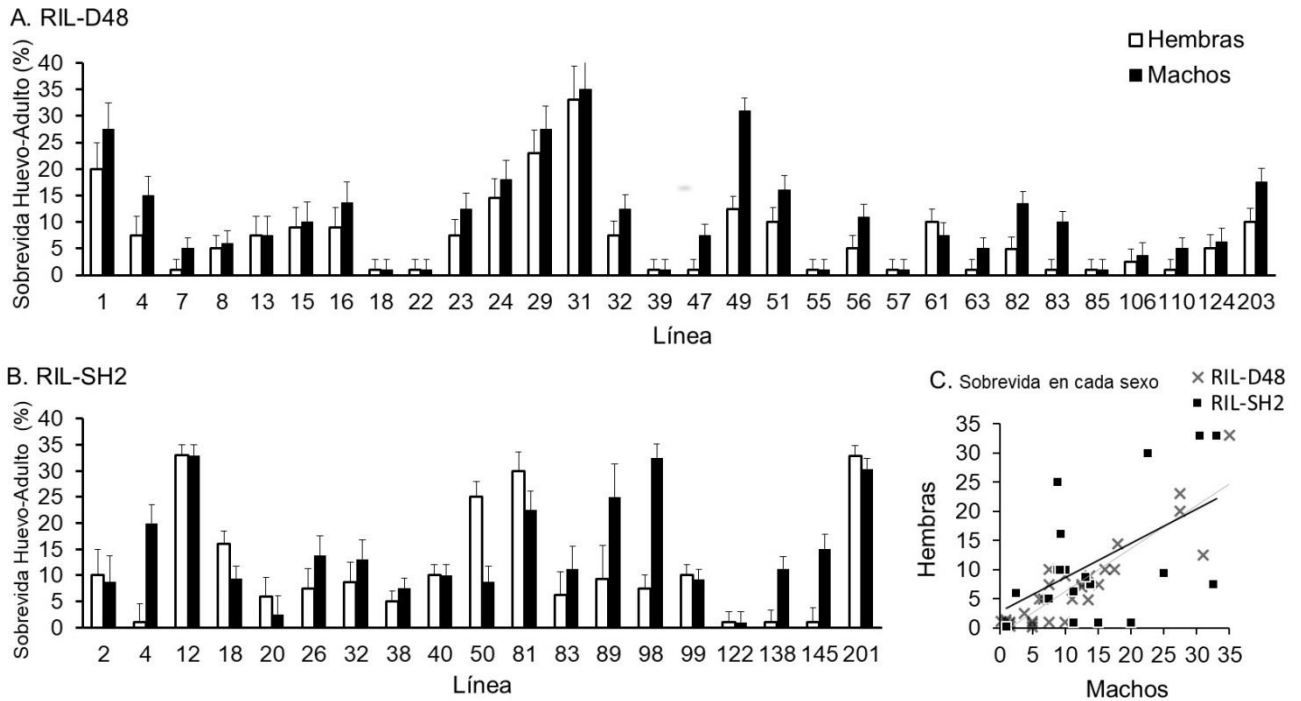


Figura 2. Se muestra la SHA para cada línea RIL-D48 (A) y RIL-SH2 (B) resultado del ensayo de estrés por calor en campo. Se muestra, además, la correlación entre sexos para la SHA en cada panel de RIL (C).

En contraste con el experimento en campo, no hubo una diferencia significativa en la supervivencia entre los paneles RIL-D48 y RIL-SH2 en los experimentos realizados en condiciones de laboratorio a 25°C (Figura 1; $P > 0.15$).

3.1.2 Análisis de QTL

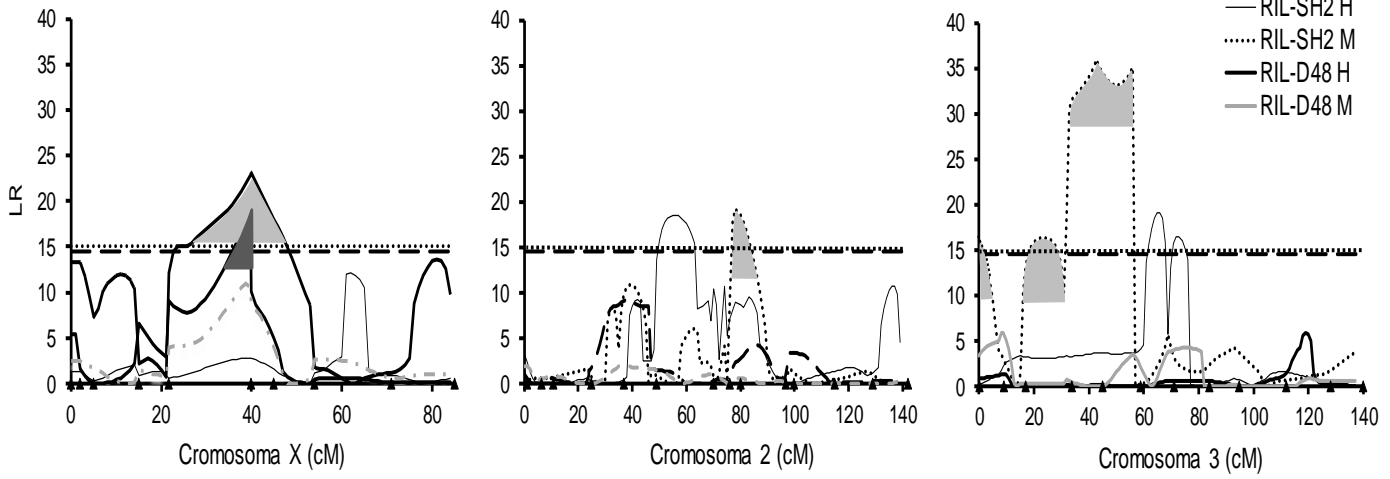
Un mapeo del intervalo compuesto reveló una base multigénica de la variación a la supervivencia por estrés por calor en campo, con al menos 4 QTLs autosómicos significativos en hembras más un QTL ligado al cromosoma X en ambos sexos (Figura 3). La comparación con otros estudios reveló una distribución no al azar de los QTL

sobre el genoma, pues todos los QTLs se solapan con QTLs previamente identificados para la resistencia al calor en condiciones de laboratorio (Tabla 4).

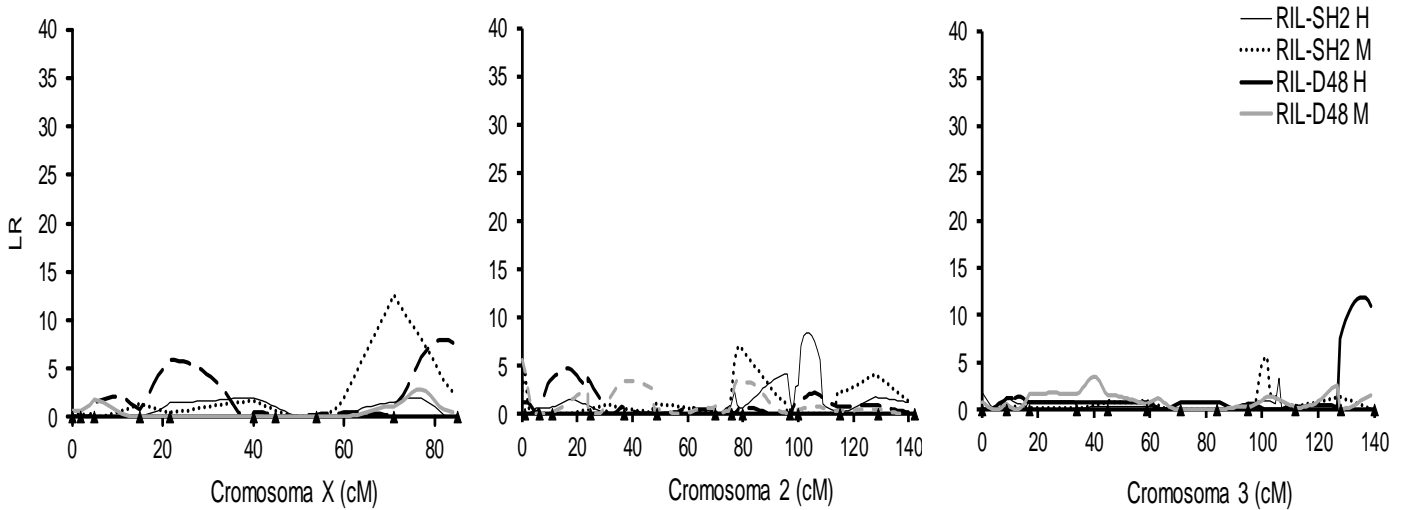
No se encontraron QTLs significativos para la SHA en controles a 25°C no aclimatados, lo que estaría indicando que todos los QTLs identificados en condiciones de estrés por calor en campo son relevantes para la resistencia a elevadas temperaturas y no para la supervivencia del desarrollo en sí mismo. Solo se observaron dos QTLs marginales en cultivos de larvas aclimatadas, y ninguno de ellos co-localizó exactamente con los QTL encontrados en el experimento de estrés por calor en campo (Figura 3).

No se encontraron interacciones epistáticas significativas entre pares de marcadores luego de realizar correcciones para comparaciones múltiples.

A. Experimento en campo bajo estrés por calor



B. Control en laboratorio a 25°C, con larvas no aclimatadas



C. Experimento en laboratorio a 25°C, con larvas

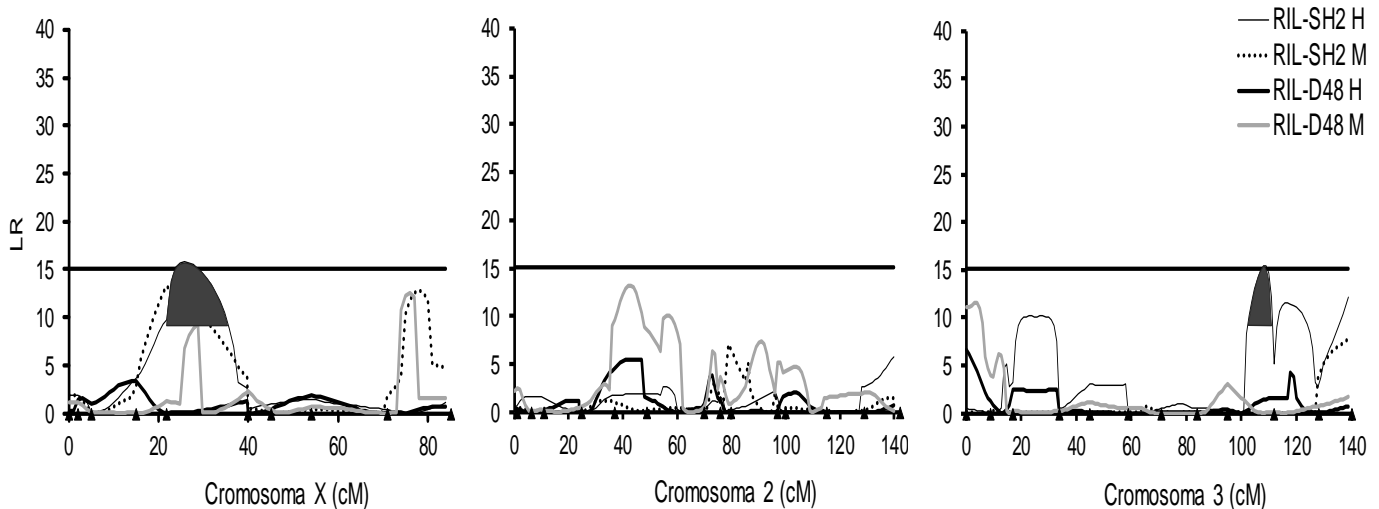


Figura 3. Gráficos de valores de razón de probabilidad (LR) en función de la posición en el mapa (en cM) a partir de un mapeo del intervalo compuesto para la SHA en los paneles RIL-D48 y RIL-SH2 de *D. melanogaster*. Se muestran los resultados para los distintos experimentos mencionados en el texto.

Tabla 4. QTLs para la SHA en condiciones de estrés por calor en campo identificados mediante mapeo del intervalo compuesto en RIL-D48 y RIL-SH2. El rango de los QTLs está dado por bandas citológicas. El “% Var” es el porcentaje de la varianza fenotípica explicada por cada QTL de gran efecto.

QTL	RIL	Sexo	Rango del QTL	% Var	Estudios de laboratorio que muestran solapamiento de QTLs con nuestros ensayos en campo
Q1	RIL-D48	Female	7B3 – 10C3	45	Norry <i>et al.</i> , 2007b; Norry <i>et al.</i> , 2008; Rand <i>et al.</i> , 2010; Arias <i>et al.</i> , 2012
Q1	RIL-SH2	Male	7B3 – 12D-E	14	Mismas referencias del QTL Q1
Q2	RIL-SH2	Male	38E1 – 49C	8	Norry <i>et al.</i> , 2004; Morgan and Mackay, Norry <i>et al.</i> , 2007a; Norry <i>et al.</i> , 2008; Rand <i>et al.</i> , 2010; Arias <i>et al.</i> , 2012; Sambucetti <i>et al.</i> , 2013
Q3	RIL-SH2	Male	60A – 62A	4	Morgan and Mackay, 2006
Q4	RIL-SH2	Male	64D – 66D10	34	Morgan and Mackay, 2006; Norry <i>et al.</i> , Sambucetti <i>et al.</i> , 2013
Q5	RIL-SH2	Male	66D10 – 73B7	34	Norry <i>et al.</i> , 2004; Norry <i>et al.</i> , 2008; Sambucetti <i>et al.</i> , 2013

3.2 Análisis de complementación cuantitativa

Se investigó el QTL de mayor efecto de termotolerancia al calor en el campo (Q1), mediante complementación cuantitativa con deleciones. En el estudio presente se trabajó con la línea 25391.

Como se muestra en la Tabla 1 y Figura 1, la deleción 9F8 – 10A4 (línea 25391 del Bloomington Stock Center) produjo un término significativo para la interacción “*genotipo x línea*” en el modelo de ANOVA correspondiente (ver Materiales y Métodos). Este resultado significativo indica una falla en la complementación cuantitativa implicando que la deleción involucra un gen que afecta al carácter cuantitativo estudiado. Dentro del segmento con la deleción se encuentra, entre otros genes, el gen candidato *hsp60A*.

Tabla 1. Resumen de todos los efectos en un ANOVA. G es el efecto de la deleción y L es el efecto de la línea (de alta y baja termotolerancia, respectivamente).

Efecto	gl	Efecto	gl	Error	F	p
G (1)	1	217415	36	11401.33	19.06	0.000102
L (2)	1	27173874	36	11401.33	2383.39	0.000000
1 x 2	1	250747	36	11401.33	21.99	0.000039

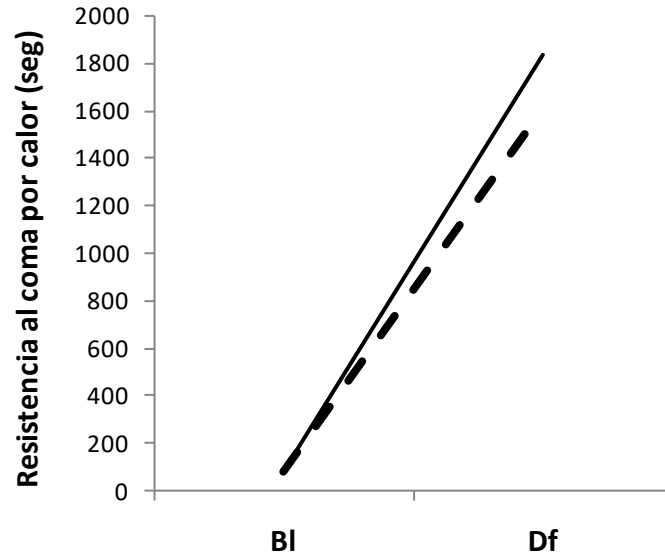


Figura 1. Prueba de complementación cuantitativa con la línea 25391. BL es la termotolerancia en las moscas heterocigotas para el cromosoma balanceador y SH2 (línea continua) o D48 (línea punteada). Df es la termotolerancia poniendo en hemigosis el alelo SH2 o D48 en la región que abarca la delección (9F8 – 10A4).

3.3 Termotolerancia al calor en huevos de *Drosophila*

3.3.1 Fenotipo de Termotolerancia al calor en huevos de *Drosophila*

Luego de sembrar huevos y someterlos a diversos tipos de estrés por calor (tratamientos), se evaluó la supervivencia como porcentaje de eclosión en las líneas RILs, tal como se muestra en las Figuras 1 y 2.

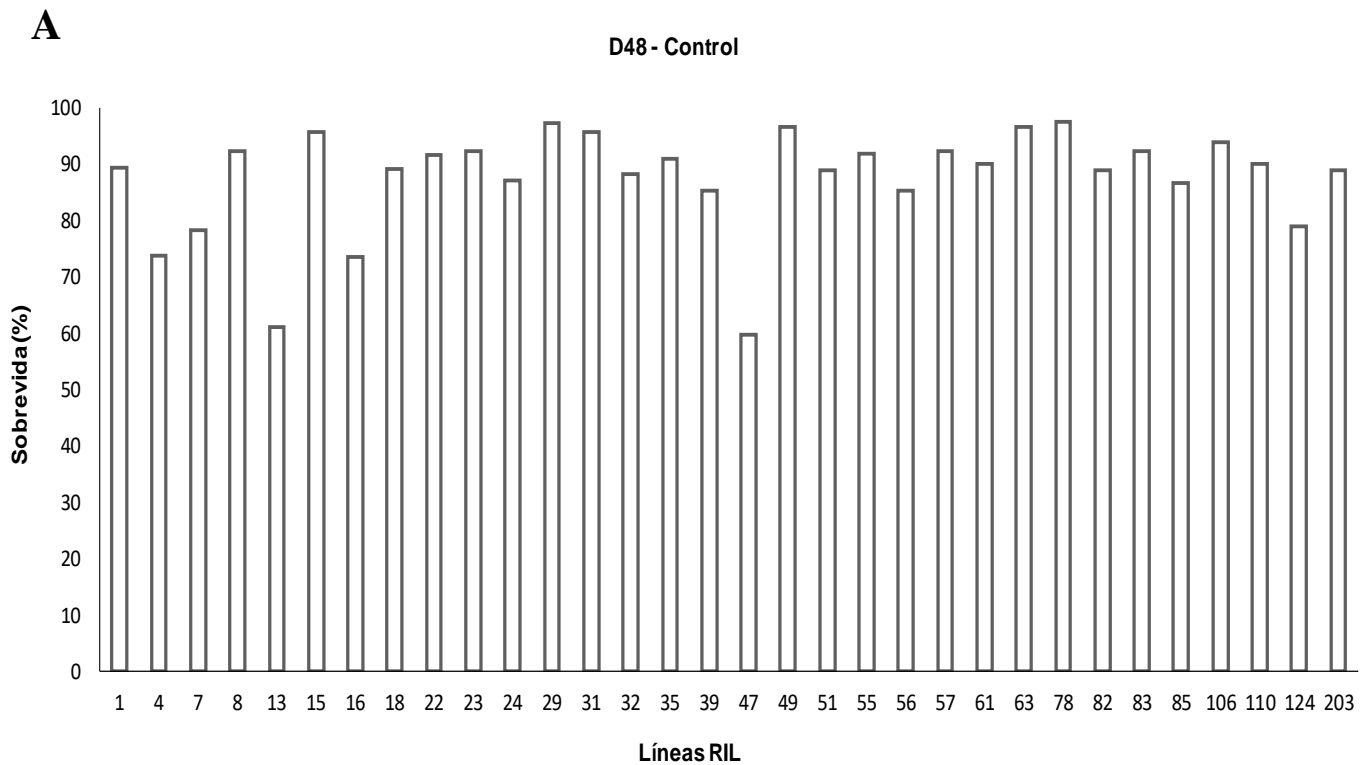


Figura 1. Continúa

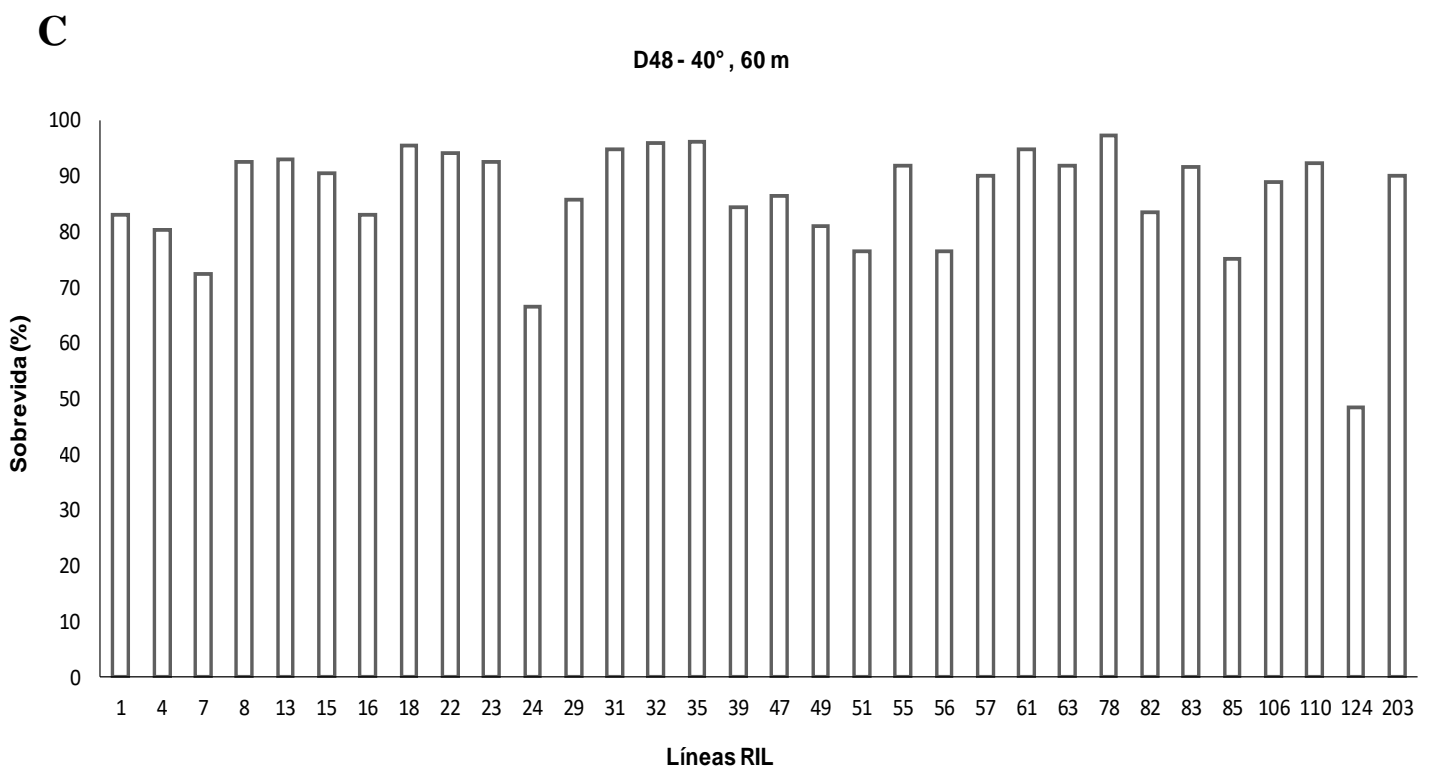
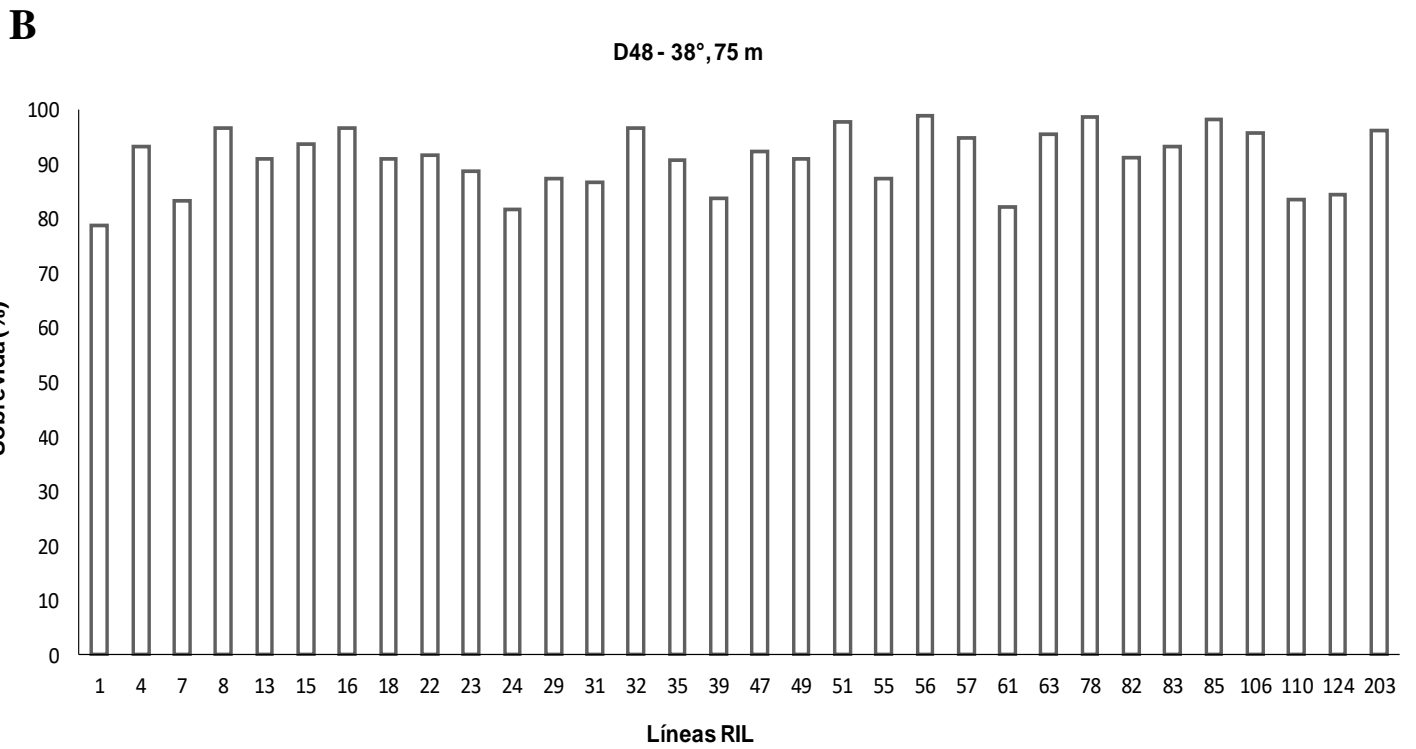


Figura 1. Continúa

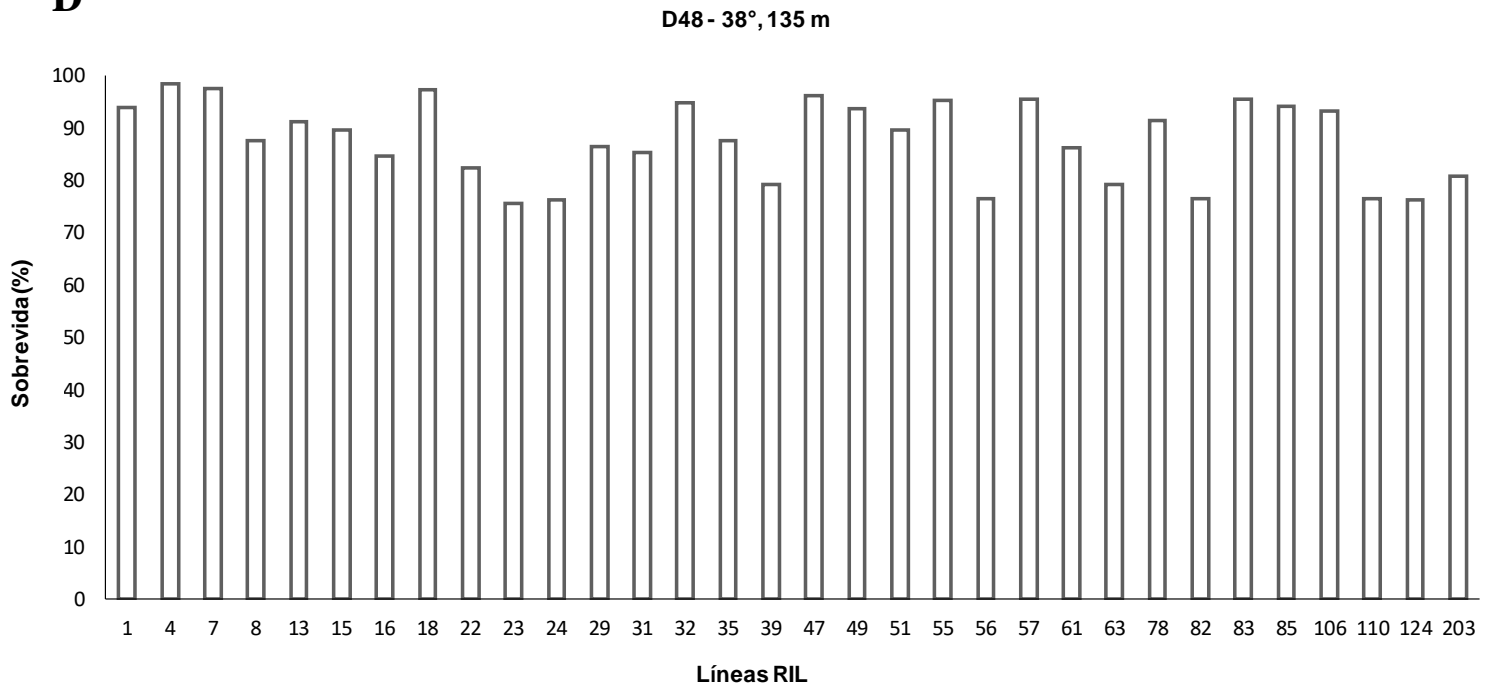
D

Figura 1. Supervivencia media de huevos de *D. melanogaster* en el panel de líneas RIL-D48 expuestos a (A) 25°C constante (control), (B) 38°C durante 75 min, (C) 38°C durante 135 min, (D) 40°C durante 60 min.

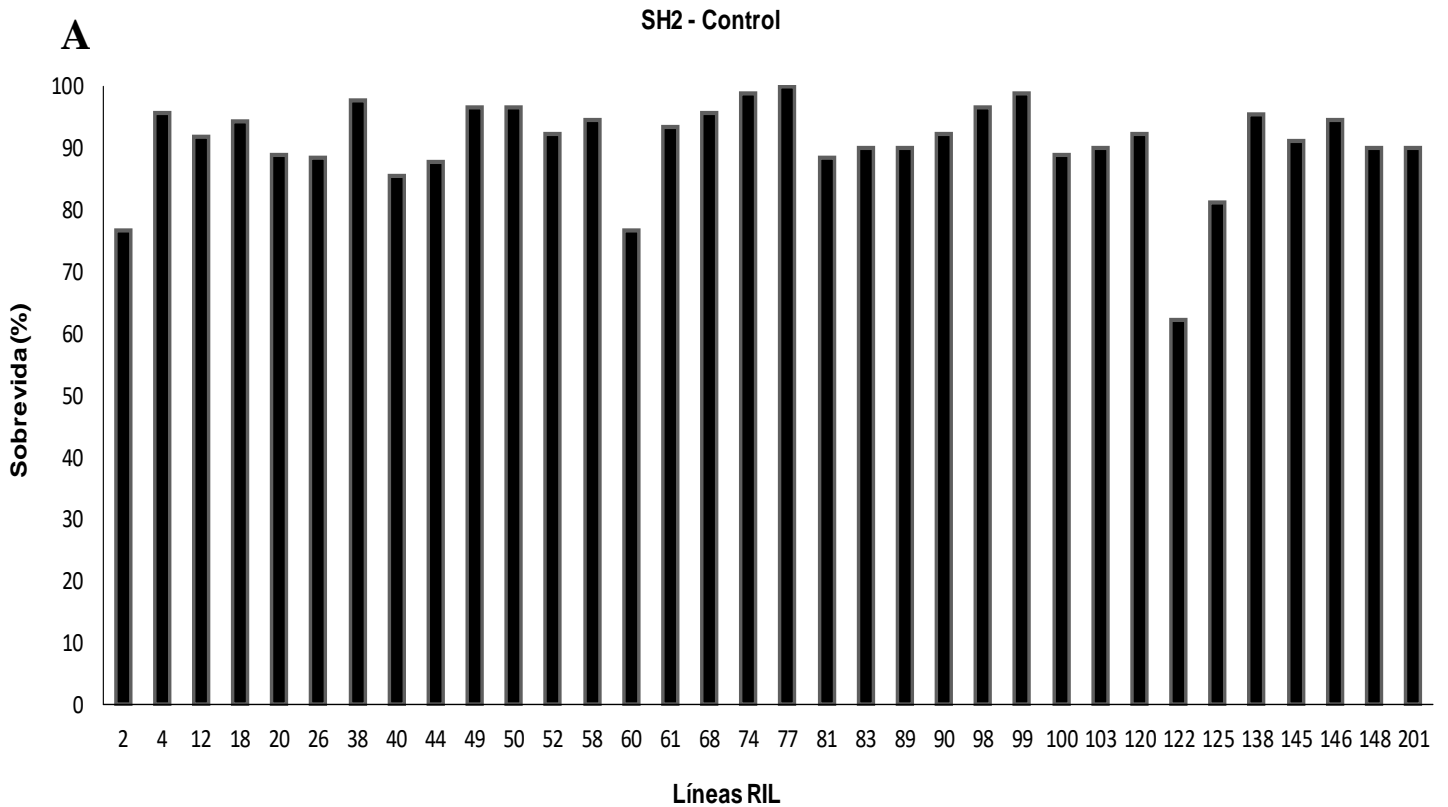


Figura 2. Continúa

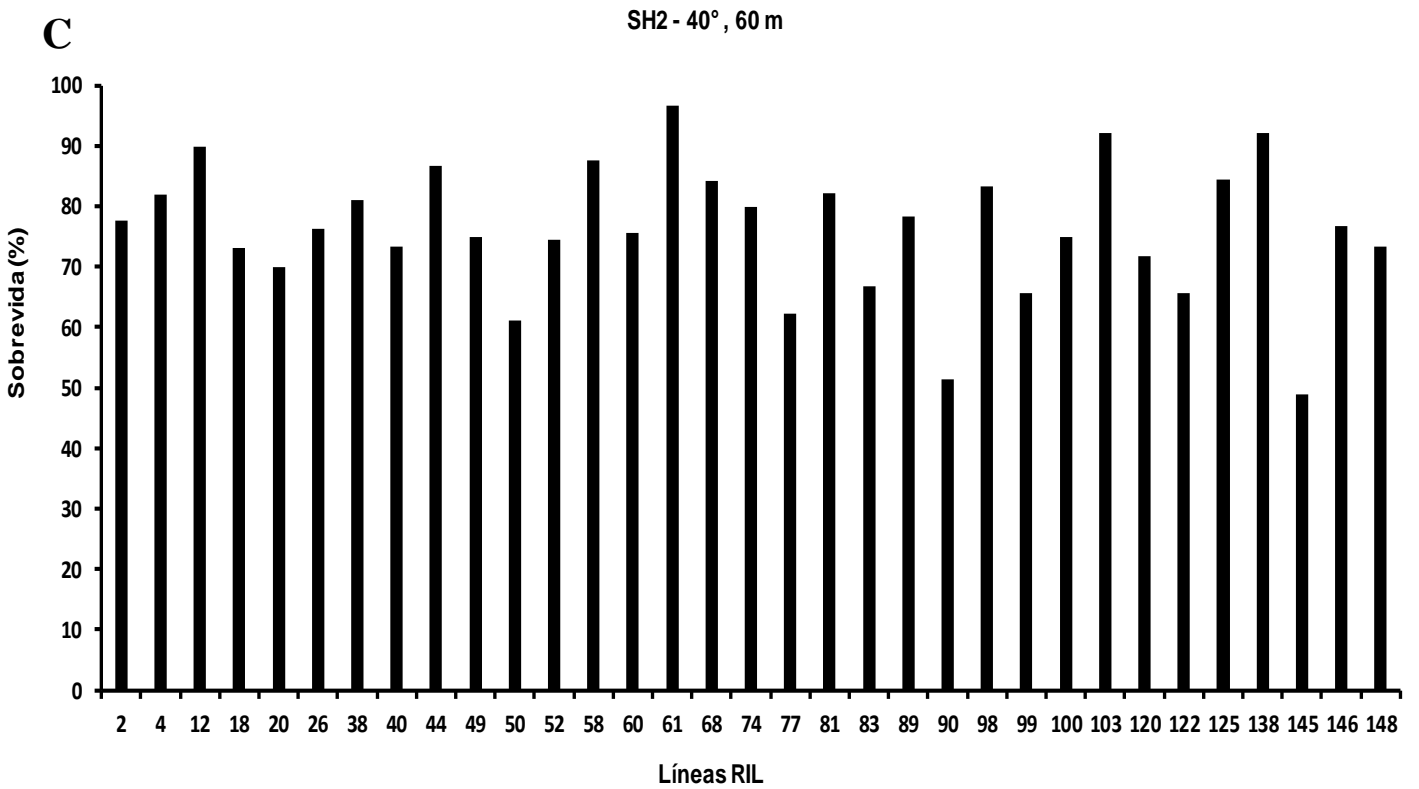
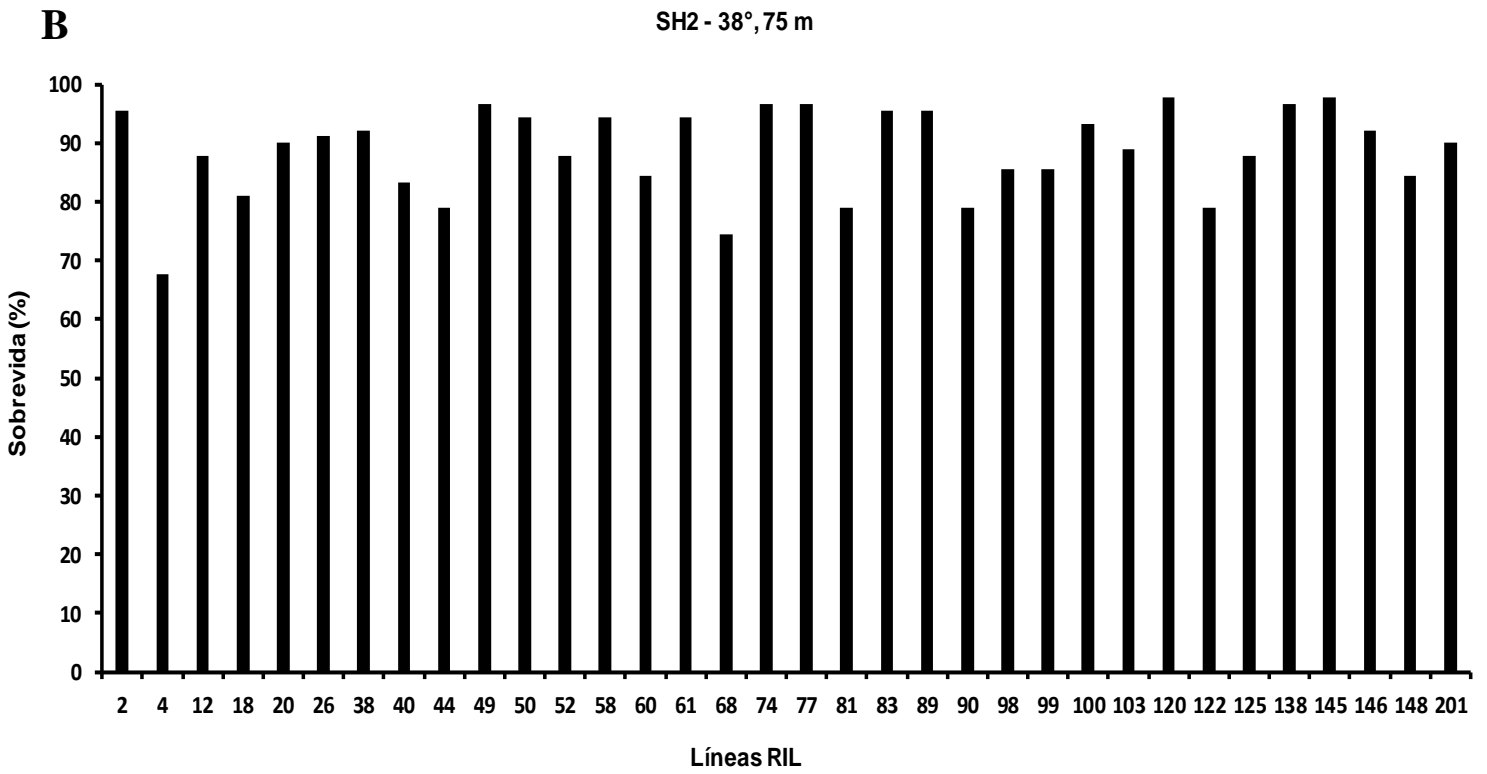


Figura 2. Continúa

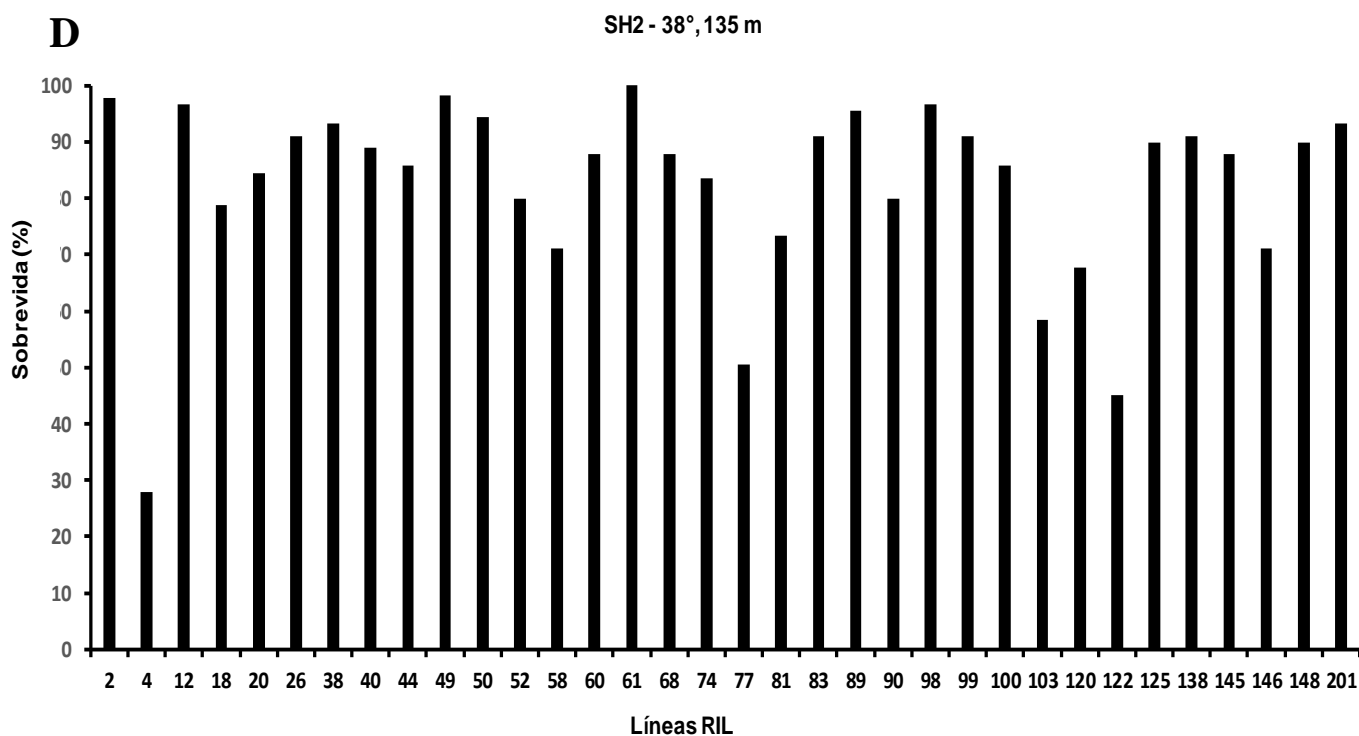


Figura 2. Supervivencia media de huevos de *D. melanogaster* en el panel de líneas RIL-SH2 expuestos a (A) 25°C constante (control), (B) 38°C durante 75 min, (C) 38°C durante 135 min, (D) 40°C durante 60 min.

En la Tabla 1 se muestran los estadísticos más relevantes que resumen los gráficos de las Figuras 1 y 2.

Tabla 1. Parámetros estadísticos descriptivos de mayor relevancia en donde se detallan los efectos de cada línea, tratamiento y las interacciones en relación a la supervivencia media de los huevos.

Efecto	Nivel del Factor	Nivel del Factor	N	Supervivencia Media	σ de la Supervivencia	SE de la Supervivencia
Total			260	86,27308	10,84955	0,672861
RIL	SH2		132	84,56818	12,44849	1,083502
RIL	D48		128	88,03125	8,60684	0,760745
Temperatura	25°		65	89,09231	8,59092	1,065572
Temperatura	38°-75m		64	89,81250	6,82869	0,853586
Temperatura	38°-135m		66	85,24242	12,89611	1,587401
Temperatura	40°-60m		65	81,01538	11,74666	1,456994
RIL*Temperatura	SH2	25°	33	90,63636	7,62323	1,327034
RIL*Temperatura	SH2	38°-75m	32	88,40625	7,67005	1,355886
RIL*Temperatura	SH2	38°-135m	34	83,20588	16,23087	2,783571
RIL*Temperatura	SH2	40°-60m	33	76,18182	10,97285	1,910128
RIL*Temperatura	D48	25°	32	87,50000	9,33948	1,651002
RIL*Temperatura	D48	38°-75m	32	91,21875	5,64392	0,997713
RIL*Temperatura	D48	38°-135m	32	87,40625	7,67425	1,356629
RIL*Temperatura	D48	40°-60m	32	86,00000	10,49116	1,854593

Luego de realizar un ANOVA, se observó una diferencia significativa para la supervivencia, tanto entre las RILs como entre los tratamientos. Además, fue significativa la interacción entre las RILs y los tratamientos (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de ANOVA para la supervivencia de embriones (huevos) expuestos a diferentes tratamientos de estrés por calor y en los controles.

Efecto	Grados de Libertad	SC Supervivencia	CM Supervivencia	F Supervivencia	p
Intersección	1	1936374	1936374	19395,29	0,000000*
RIL	1	762	762	7,63	0,006170*
Temperatura	3	3116	1039	10,40	0,000002*
RIL*Temperatura	3	1379	460	4,61	0,003711*
Error	252	25159	100		
Total	259	30488			

Sorprendentemente, al comparar globalmente la supervivencia de los embriones (huevos) entre las RILs SH2 y D48, se observó que las líneas RIL-D48 son más resistentes al calor que las RIL-SH2 (Figura 3, Tabla 3). Este resultado contrasta con estudios sobre termotolerancia en adultos y larvas, donde siempre las RIL-SH2 son más resistentes al calor que las RIL-D48 (Norry *et al.*, 2008; Arias *et al.*, 2012; Sambucetti *et al.*, 2013).

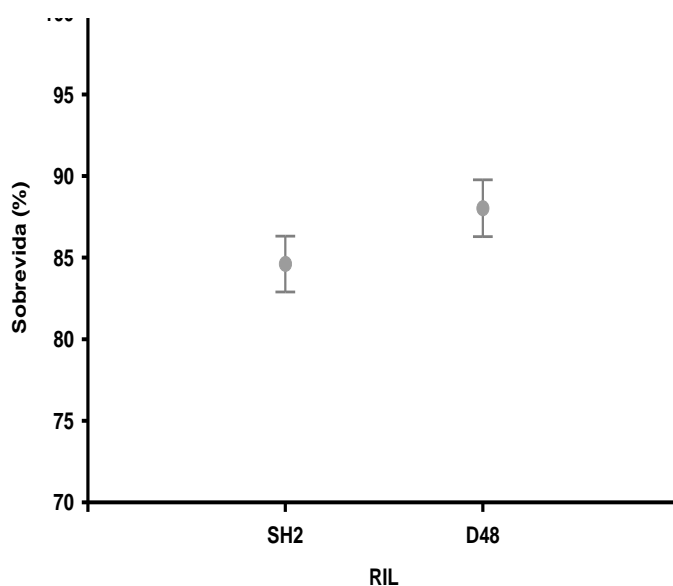


Figura 3. Supervivencia media de los embriones (huevos) en las líneas RIL-SH2 y RIL-D48 agrupadas. Se destaca que el panel RIL-D48 resultó más resistente al estrés por calor en huevos, contrariamente a lo observado en previos estudios en larvas y adultos.

Tabla 3. Supervivencia media (%) de los embriones (huevos) de *D. melanogaster* promediados a través de tratamientos de estrés por calor ($F(1,252)=7,6279$, $p=0,00617$).

RIL	Superviven cia Media	SE de la Superviven cia	N
SH2	84,60758	0,869880	132
D48	88,03125	0,883164	128

En cuanto a los tratamientos, se observó una diferencia significativa entre ellos (Figura 4, Tabla 4).

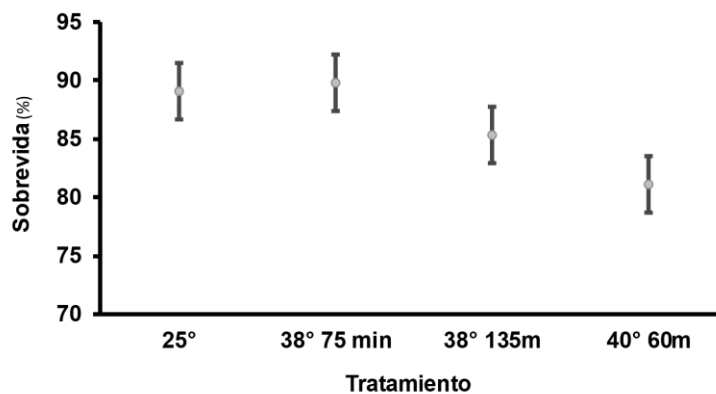


Figura 4. Supervivencia media de embriones (huevos) al estrés por calor agrupando todas las líneas RIL de *D. melanogaster* analizadas. Los resultados se muestran para el control (25°C) y para cada tratamiento de estrés por calor realizado.

Tabla 4. Supervivencia media de embriones (huevos) al estrés por calor agrupando todas las líneas RIL de *D. melanogaster* analizadas. Los resultados se muestran para el control (25°C) y para cada tratamiento de estrés por calor realizado. ($F(3,252)=10,404$, $p=0,00000$).

Temperatura	Superviven cia Media	SE de la Supervivenci a	N
25°	89,06818	1,239485	65
38°-75m	89,81250	1,248983	64
38°-135m	85,30607	1,230479	66
40°-60m	81,09091	1,239485	65

Un análisis más detallado de la interacción entre los tratamientos y las RILs reveló una diferencia significativa entre las RIL-SH2 y RIL-D48 (Figura 5 y Tabla 5). Nuevamente, las líneas RIL-D48 sobrevivieron más al estrés por calor que las RIL-SH2 (Figura 5, Tabla 5).

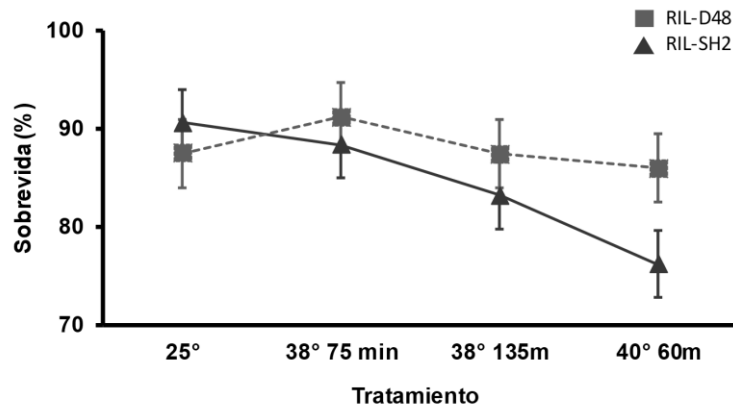


Figura 5. Supervivencia media (\pm EEM) de embriones (huevos) al estrés por calor en líneas RIL-D48 y RIL-SH2 de *D. melanogaster*. Los resultados se muestran para el control (25°C) y para cada tratamiento de estrés por calor realizado.

Tabla 5. Supervivencia media (\pm EEM) de embriones (huevos) al estrés por calor en líneas RIL-D48 y RIL-SH2 de *D. melanogaster*. Los resultados se muestran para el control (25°C) y para cada tratamiento de estrés por calor realizado. ($F(3,252)=4,6054$, $p=0,00371$).

RIL	Temperatura	Superviven cia Media	SE de la Superviven cia	N
SH2	25°	90,63636	1,739360	33
SH2	38°-75m	88,40625	1,766329	32
SH2	38°-135m	83,20588	1,713591	34
SH2	40°-60m	76,18182	1,739360	33
D48	25°	87,50000	1,766329	32
D48	38°-75m	91,21875	1,766329	32
D48	38°-135m	87,40625	1,766329	32
D48	40°-60m	86,00000	1,766329	32

Finalmente, se realizó un análisis de QTL mediante el método de mapeo del intervalo compuesto en huevos expuestos a un estrés por calor y en huevos de control (no tratados por calor). Los resultados se muestran en las Figuras 6A, 6B, 6C, 6D, 7A, 7B, 7C y 7D.

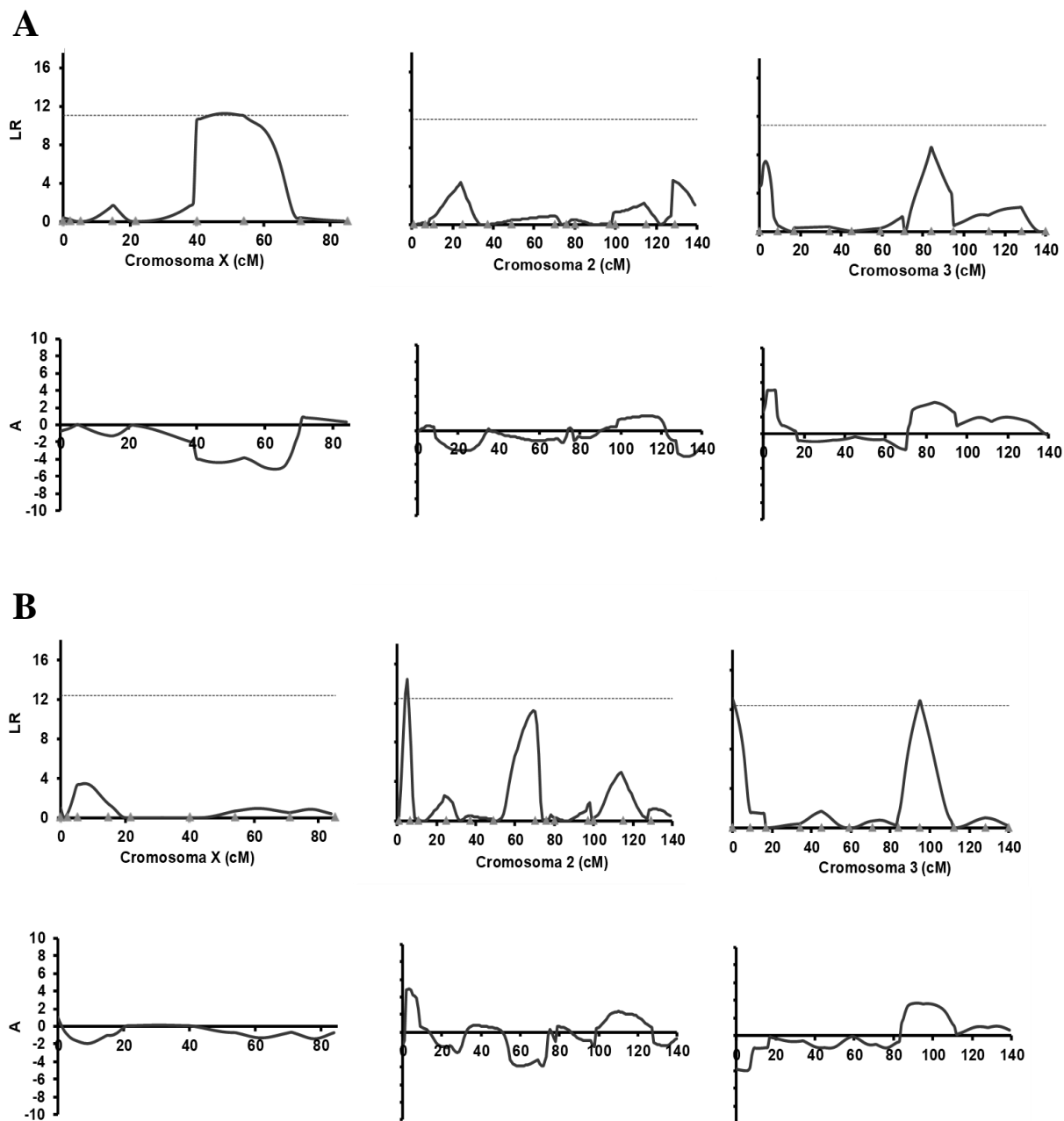


Figura 6. Continúa

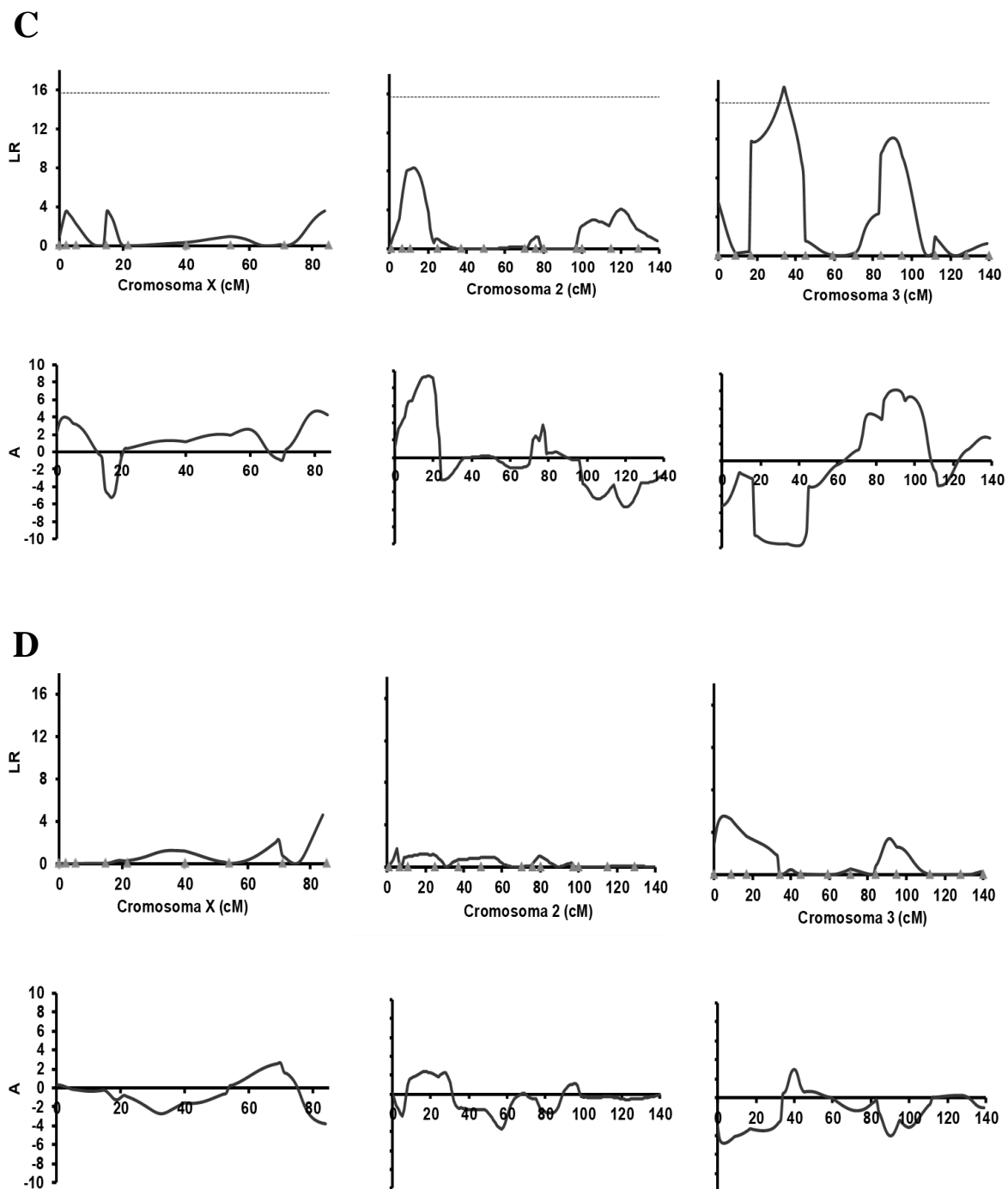


Figura 6. LR en función de la posición de mapa (cM) para la supervivencia de los huevos para el panel RIL-SH-2, utilizando un mapeo del intervalo compuesto sobre el genoma de *D. melanogaster*. Los umbrales de significación fueron determinados mediante 1000 permutaciones (líneas horizontales). Los triángulos ubicados sobre el eje de las abscisas corresponden a la localización de los marcadores utilizados. También se grafica debajo los efectos aditivos (*a*) a lo largo de cada cromosoma. Paneles:(A) 25°C constante (control), (B) 38°C durante 75 min, (C) 38°C durante 135 min, (D) 40°C durante 60 min.

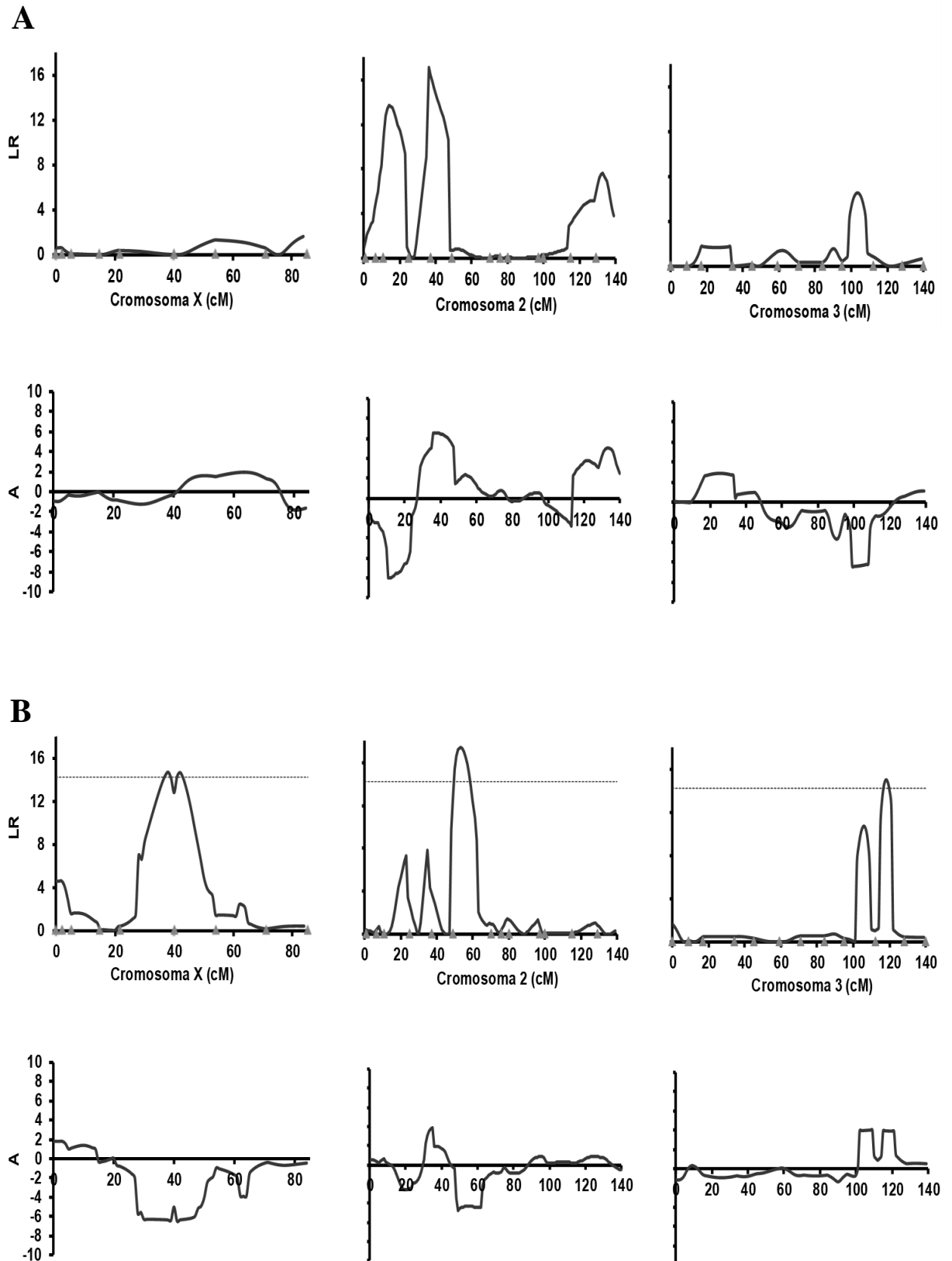


Figura 7. Continúa

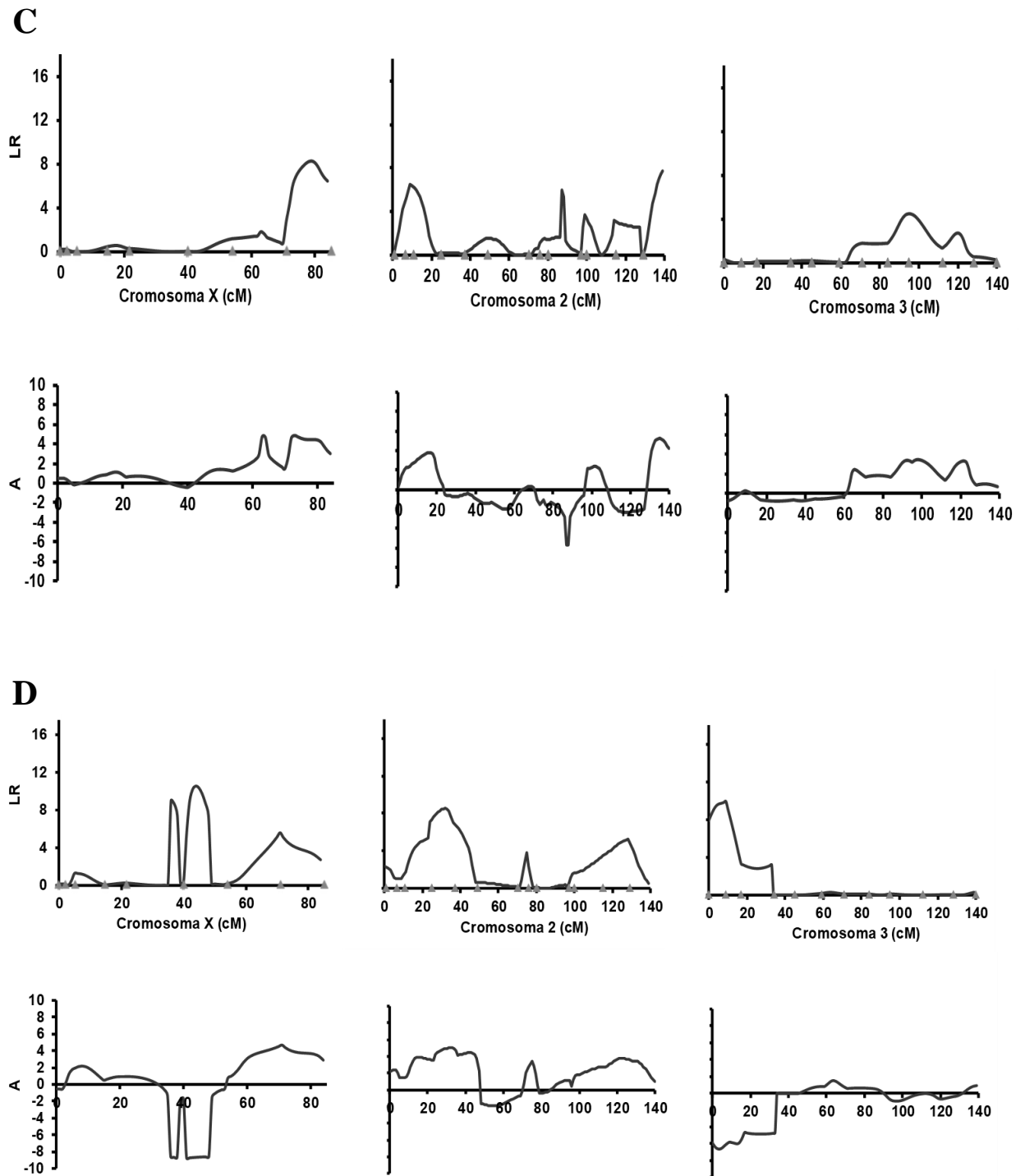


Figura 7. LR en función de la posición de mapa (cM) para la supervivencia de los huevos para el panel D-48, utilizando un mapeo del intervalo compuesto sobre el genoma de *D. melanogaster*. Los umbrales de significación fueron determinados mediante 1000 permutaciones (líneas horizontales). Los triángulos ubicados sobre el eje de las abscisas corresponden a la localización de los marcadores utilizados. También se grafica el efecto aditivo (a) a lo largo de cada cromosoma. Paneles: (A) 25°C constante (control), (B) 38°C durante 75 min, (C) 38°C durante 135 min, (D) 40°C durante 60 min.

En resumen, los QTLs de termotolerancia en huevos se indican en la Tabla 7. Tres de los cuatro QTLs de termotolerancia en huevos son exclusivos de los embriones ya que no co-localizan con QTLs de termotolerancia en adultos y larvas. Este resultado indica que la arquitectura genética de la termotolerancia en huevos difiere en gran medida de la correspondiente a termotolerancia en larvas y adultos.

Tabla 7. QTL para termotolerancia en huevos identificados por mapeo del intervalo compuesto. Los QTL que co-localizaron con el control (solo uno en el medio del cromosoma X) no fueron considerados como QTLs de termotolerancia en esta tabla. Los QTLs que co-localizan con QTL de termotolerancia en adultos también se indican con la referencia bibliográfica correspondiente. Se indica el signo de cada efecto aditivo “*a*”.

QTL	RIL	T°C	<i>a</i>	Rango del QTL	Co-localiza en adultos
Q _{H1}	RIL-SH2	38°C, 75 min	+	21C3 – 23E	No
Q _{H2}	RIL-D48	38°C, 75 min	-	30A3 - 34C4	No
Q _{H3}	RIL-SH2	38°C, 75 min	+	64D – 67A	No
Q _{H4}	RIL-D48	38°C, 75 min	+	95C6 – 97F	Si: Norry et al 2008

3.4 Clina térmica altitudinal

3.4.1 Fenotipos de termotolerancia

En el muestreo del presente estudio, correspondiente al año 2016, también se observó una clina significativa para la con alta significación estadística para el carácter “*KnockDown*”, mostrando menor resistencia al coma por calor al aumentar la altitud (Figuras 1 y 2). Como se mostrará más abajo, también se observó una clina para la supervivencia al calor y con pendiente opuesta a la del carácter *KnockDown*.

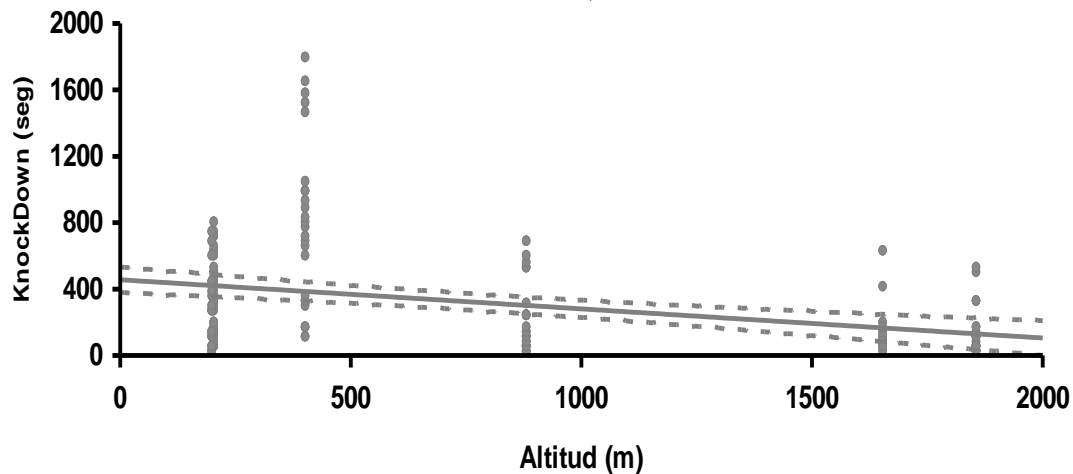


Figura 1. Tiempo en arribar al coma por calor (“*KnockDown*”, en segundos) en machos de *D. buzzatii*, en relación a la altitud de siete poblaciones analizadas. La regresión mostrada es significativa. $\beta = -0,34$; R^2 ajustado = 0,111; $F(1,160) = 21,12$; $p < 0,00001$.

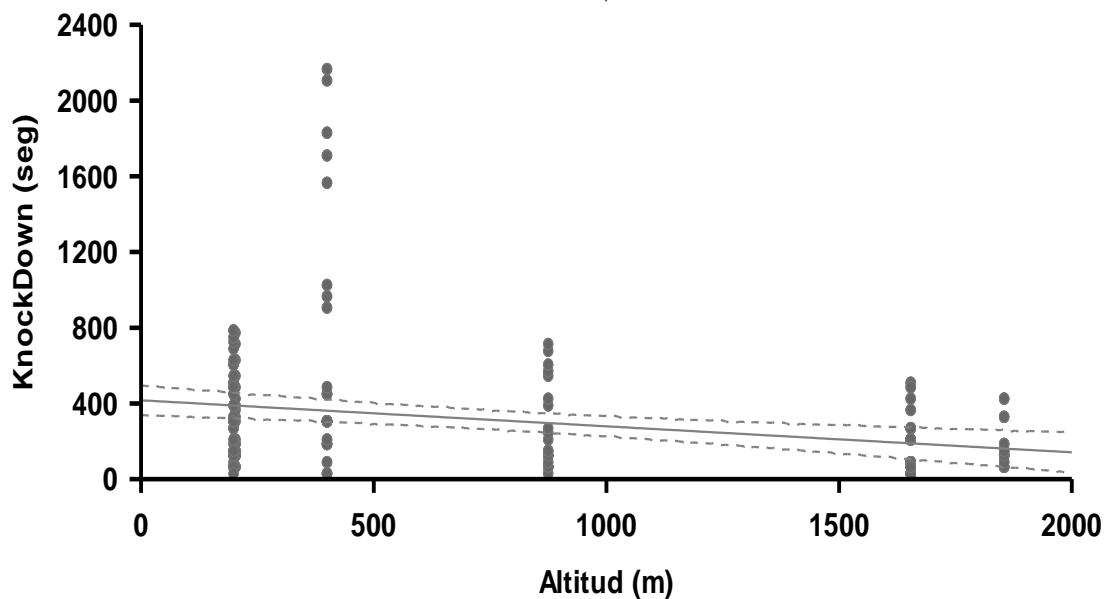


Figura 2. Tiempo en arribar al coma por calor (“*KnockDown*”, en segundos) en hembras de *D. buzzatii*, en relación a la altitud de siete poblaciones analizadas. La regresión mostrada es significativa. $\beta = -0,26$; R^2 ajustado = 0,063; $F(1,169) = 12,52$; $p < 0,00052$.

Un análisis de ANOVA para el carácter *KnockDown* también indicó diferencias significativas entre las poblaciones ($F(6,319) = 23.26$; $p < 0.0000$). Para este carácter, no se observaron diferencias significativas entre los sexos (Figuras 3 y 4).

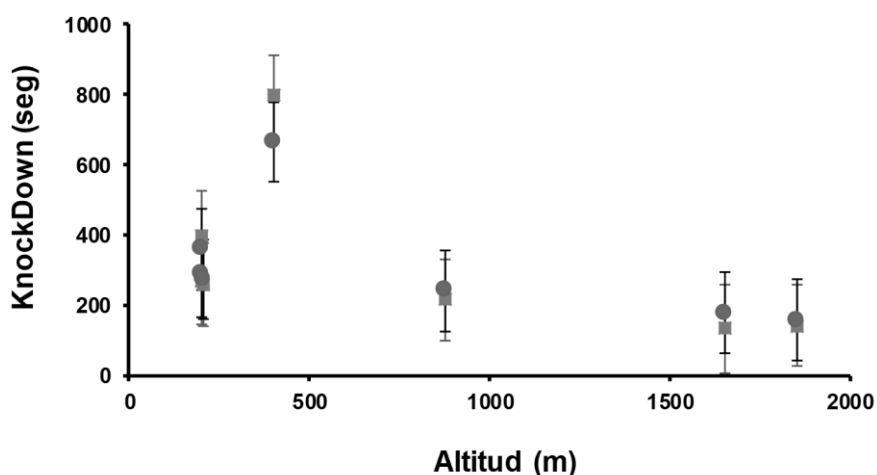


Figura 3. Tiempo promedio en arribar al coma por calor (“*KnockDown*”, en segundos) en hembras (cículos) y machos (cuadrados) de *D. buzzatii*, en relación a la altitud de la población de origen.

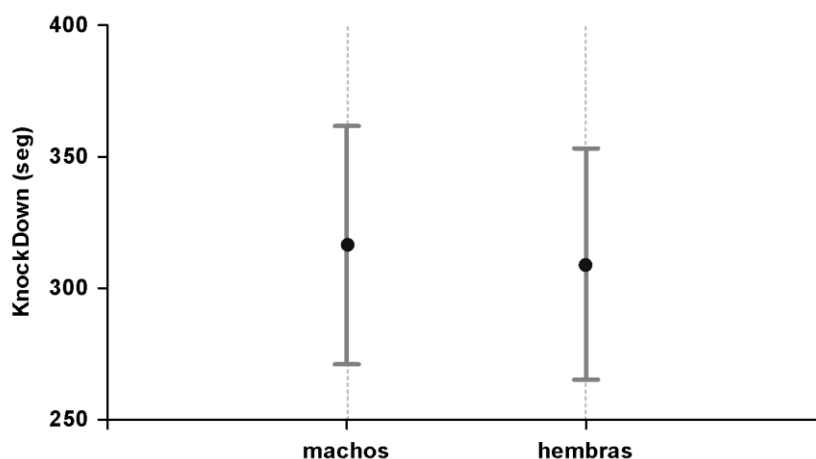


Figura 4. Tiempo en arribar al coma por calor (“*KnockDown*”, en segundos) en hembras y machos de *D. buzzatii*, agrupando todas las poblaciones estudiadas. Un ANOVA para el carácter no detectó diferencias significativas entre machos y hembras ($F(1,319) = 0,0496$; $p = 0,8238$).

Los valores medios de la supervivencia al estrés por calor se muestran en la Figura 5 para moscas aclimatadas y no aclimatadas. El tratamiento de aclimatación aumentó significativamente la supervivencia al estrés por calor [Figura 5; ANOVA de tres factores: (1) $F(6; 221) = 3.784^{***}$ para efecto de población, (2) $F(1; 221) = 18.308^{***}$ para tratamiento de aclimatación; (3) $F(1; 221) = 2.06$ para efecto de sexo; $F(6, 221) = 2.878^*$ para (1) x (2); $F(6, 221) = 0.785$ para (1) x (3); $F(1, 221) = 0.066$ para (2) x (3); $F(6, 221) = 0.282$ para (1) x (2) x (3)].

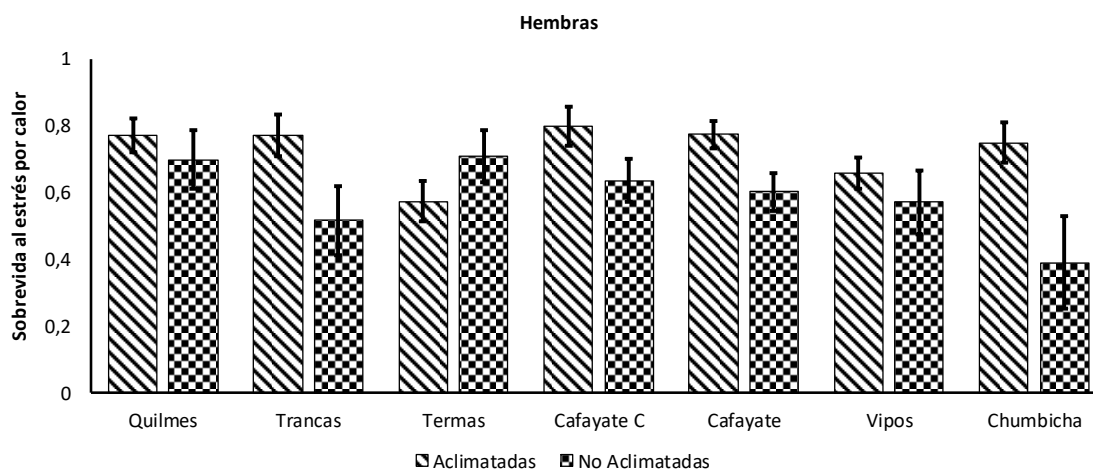


Figura 5 continúa

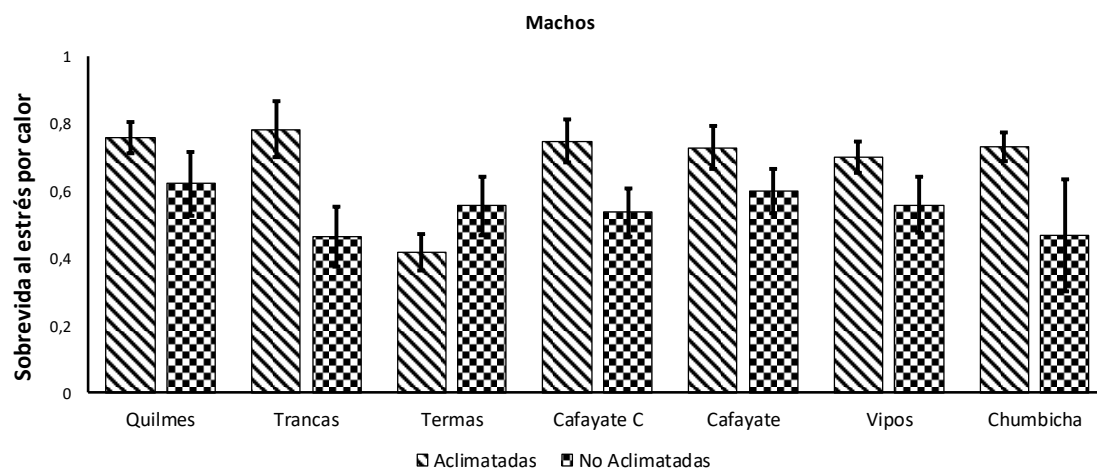


Figura 5. Valores medios para la supervivencia al estrés por calor (SEC) para cada una de las poblaciones del gradiente altitudinal estudiado para moscas aclimatadas y no aclimatadas. La correspondencia entre altitudes y cada localidad se da en Materiales y Métodos. “Cafayate C” es dentro de la Ciudad de Cafayate. El tratamiento de aclimatación aumentó significativamente la supervivencia al estrés por calor.

La población con mayor supervivencia al estrés por calor tendió a ser Quilmes en machos sin aclimatar (Figura 5). La población de menor supervivencia al estrés por calor tendió a ser Termas para ambos sexos en individuos aclimatados, mientras que en individuos no aclimatados la población de menor supervivencia tendió a ser Chumbicha para hembras y Trancas para machos. Este patrón de resultados es inverso al observado para el coma (*KnockDown*) de calor (Figuras 6 – 9). La regresión de la supervivencia al calor como una función de la altitud de la población de origen fue significativa y con pendiente positiva en moscas aclimatadas (Figuras 6 y 7). Sin el pre-tratamiento de aclimatación la pendiente también fue positiva pero la correspondiente regresión no fue significativa (Figuras 8 y 9).

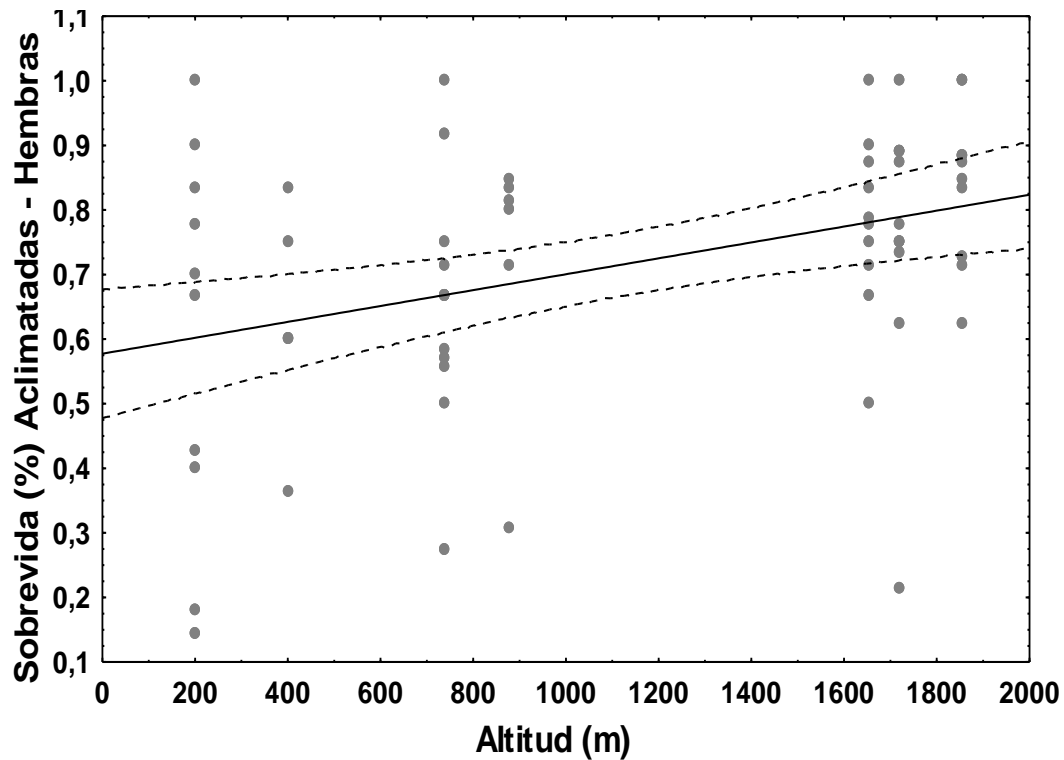


Figura 6. Regresión lineal para la supervivencia al estrés por calor (en proporción = porcentaje/100) en hembras aclimatadas de *D. buzzatii* de siete poblaciones de diversa altitud muestreadas en el noroeste de Argentina ($\beta = 0,38$; $p = 0,0024$).

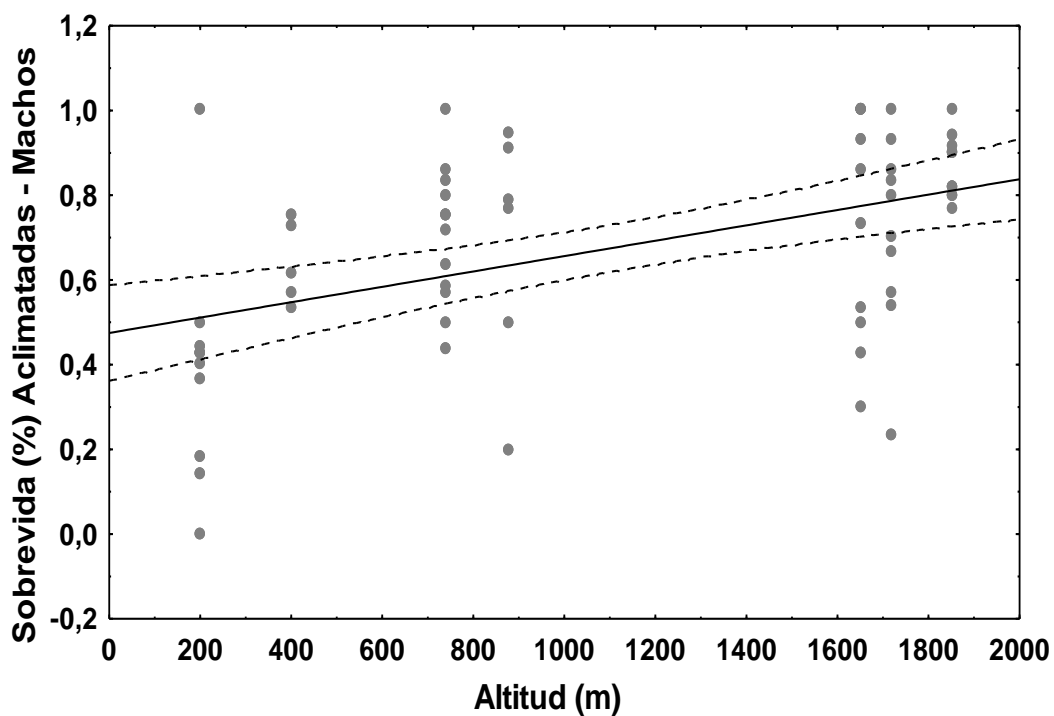


Figura 7. Regresión lineal para la supervivencia al estrés por calor (en proporción = porcentaje/100) en machos aclimatados de *D. buzzatii* de siete poblaciones de diversa altitud muestreadas en el noroeste de Argentina ($\beta = 0,47$; $p = 0,0001$).

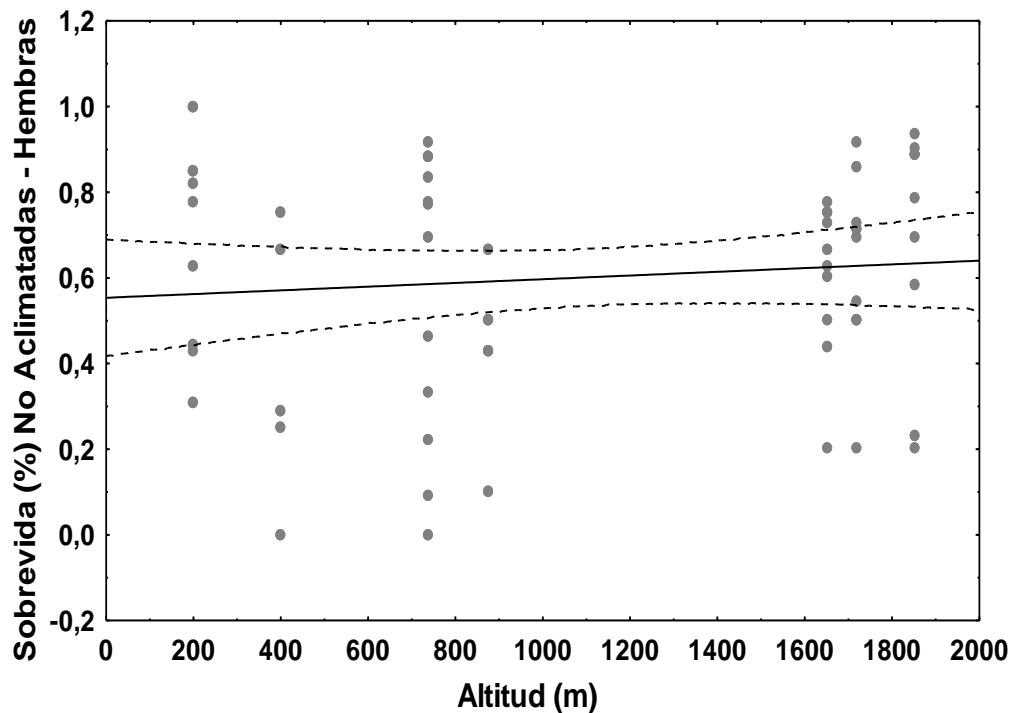


Figura 8. Regresión lineal para la supervivencia al estrés por calor (en proporción = porcentaje/100) en hembras, sin aclimatación, de *D. buzzatii* en siete poblaciones de diversa altitud muestreadas en el noroeste de Argentina ($\beta = 0,10$; $p = 0,4168$).

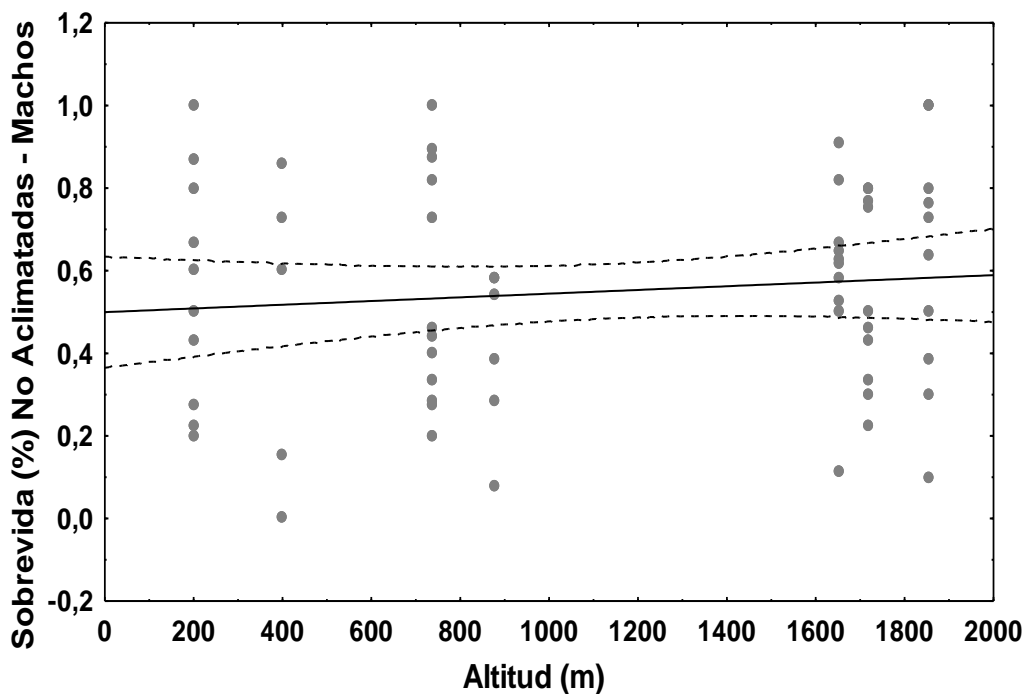


Figura 9. Regresión lineal para la supervivencia al estrés por calor (en proporción = porcentaje/100) en machos, sin aclimatación, de *D. buzzatii* en siete poblaciones de diversa altitud muestreadas en el noroeste de Argentina ($\beta = 0,11$; $p = 0,3961$).

4. Discusión

4.1 Termotolerancia desde larva a la adultez en un ambiente térmico natural

La supervivencia huevo-adulto es un carácter relacionado al *fitness* que, bajo condiciones semi-naturales de estrés por calor en el campo, resultó genéticamente variable entre las RILs. Se hallaron efectos de QTLs significativos para este carácter relacionado al *fitness* bajo condiciones de estrés por calor en el campo, pero no en los cultivos controles a 25°C, lo que indica que los QTLs en este estudio son atribuibles a la elevada temperatura experimentada en el campo. En promedio, en el experimento en el campo, la supervivencia (en %) fue de aproximadamente 4,5 veces menor que la supervivencia en el experimento en el laboratorio a una temperatura constante de 25°C. Ningún QTL fue significativo en las moscas control sometidas a una temperatura constante de 25°C, sin ningún tratamiento.

Es esperable que la supervivencia huevo-adulto a temperaturas elevadas sea un componente importante del *fitness* para muchas poblaciones de insectos, particularmente en un posible escenario de calentamiento global. Uno de los principales objetivos de este estudio fue poner a prueba los efectos de los QTLs en el campo en donde se encuentran condiciones de variaciones naturales de alta temperatura y humedad, ya que los experimentos de laboratorio no siempre toman en cuenta los efectos de la variación térmica en el campo (Stazione *et al.*, 2017). Se han encontrado muchos QTLs de termotolerancia en estudios de laboratorio tanto en larvas como en adultos, y la mayoría de ellos co-localizan con los QTL encontrados en el presente estudio. No obstante, debido a la gran amplitud de los QTLs, el solapamiento de QTLs mostrado en la Tabla 4 (sección 3.1.2) debería ser interpretado como resultado de una base genética común (pleiotropía) o QTLs estrechamente ligados (Rönnerberg-Wästljung *et al.*, 2006). En insectos, aún no está claro si los individuos en desarrollo experimentan

el estrés por calor de la misma manera que los adultos, pero hay evidencia de una respuesta generalizada al estrés con una base genética parcialmente compartida (ej., Sørensen *et al.*, 2017). Además, la correlación en las RILs, entre el tiempo de *KockDown* en moscas adultas (medido en Norry *et al.*, 2008) y la supervivencia huevo-adulto bajo condiciones de estrés por calor en el campo (en el presente estudio) es significativa en hembras.

Como se menciona más arriba, la adaptación a ambientes de alta temperatura requiere de variación genética con relación a los fenotipos de termotolerancia en todos los estadios del ciclo de vida (Hoffmann *et al.*, 2003; Hoffmann & Willi, 2008; Levy *et al.*, 2015; Lommen *et al.*, 2017). Los resultados del presente estudio para la supervivencia huevo-adulto en el campo son consistentes con un estudio de liberación y recaptura basado en moscas adultas en el cual un QTL de termotolerancia encontrado en el laboratorio también fue significativo en moscas adultas liberadas en un contexto de altas temperaturas en el campo (Loeschke *et al.*, 2011). El QTL encontrado en el medio del cromosoma 2 (Q2, Figura 3; Tabla 4; sección 3.1.2) fue puesto a prueba en moscas adultas liberadas en el campo, portando el genotipo del QTL para resistencia al estrés por calor, siendo mejores en la localización de recursos en liberaciones en el campo en un contexto de altas temperaturas (Loeschke *et al.*, 2011). Además, este QTL presente en el cromosoma 2 también fue significativo para la supervivencia huevo-adulto en condiciones de estrés por calor en un experimento de laboratorio (Sambucetti *et al.*, 2013), tal como sucede en el presente estudio. Este QTL podría ser resultado de un número grande de múltiples genes de efecto relativamente pequeño co-expresados, y una expresión combinada de genes muy ligados como *Catsup*, *Ddc* y *Trap1* los cuales son predictores de termotolerancia en moscas en el laboratorio (Norry *et al.*, 2009).

El QTL ligado al X (Q1) hallado en este estudio fue también significativo en estudios de laboratorio. Este QTL fue significativo en numerosas poblaciones de mapeo, y los niveles de expresión de dos genes candidato ubicados dentro de este QTL, *hsc70-3* y *hsp60*, fueron asociados a la resistencia al *KockDown* por calor en moscas adultas (Norry *et al.*, 2009). Más aún, los niveles de expresión constitutiva de *hsc70-3* se correlacionaron negativamente con los niveles de expresión de *hsp60* en un grupo de 8 RILs utilizadas en el presente estudio (Norry *et al.*, 2009). Aunque estos estudios previos no son una prueba directa de la participación de *hsc70-3* y/o *hsp60* en los fenotipos termotolerantes, resulta interesante realizar más estudios sobre el QTL ligado al X (Q1) pues este QTL mostró los efectos más grandes en el ensayo en el campo. Recientemente se reportó que los niveles constitutivos de las proteínas Hsc70-3 y Hsp60 aumentaban al realizar una selección para la resistencia al estrés por calor, así como también en un régimen de exposición constante de 30°C durante el desarrollo (Sørensen *et al.*, 2017). Adicionalmente, el nivel de otra proteína denominada “*Larval serum protein 1 α*”, cuyo código genético se encuentra cercanamente ligada al Q1, aparentemente también respondió a la selección artificial para la resistencia al estrés por calor (Sørensen *et al.*, 2017).

Además de los ya mencionados QTLs de los cromosomas X y 2, se han encontrado otros QTLs para la supervivencia al calor en pre-adultos en el campo que se solapan con QTLs de termotolerancia previamente reportados para moscas adultas en experimentos de laboratorio (ver Tabla 4 para referencias). Por ejemplo, Q4 también fue significativo para la termotolerancia en adultos en varios estudios de laboratorio. Este QTL (Q4) incluye como genes candidato a las proteínas de leve estrés por calor *hsp22*, *hsp23*, *hsp26* y *hsp27* (ej., Frydenberg *et al.*, 2003), además de otros candidatos como las proteínas “*Chorion protein S19*”, que responden a la selección para la

resistencia al estrés por calor (Sørensen *et al.*, 2017). Q3 también fue encontrado como una región que influencia la resistencia al estrés por calor en estudios de laboratorio, y este QTL incluye varios genes candidatos como *mth* (*Methuselah*), *Hsp83* y *DnaJ-1* (Morgan & Mackcay, 2006).

La varianza fenotípica explicada por cada QTL en el experimento en el campo es informativa del efecto de cada QTL. Los QTLs que explicaron la mayor cantidad de varianza fenotípica fueron Q1 en hembras del panel RIL-D48 (45%) y Q4-Q5 (34%) en machos del panel RIL-SH2. Estos resultados en la viabilidad huevo-adulto en el campo contrastan fuertemente con los resultados previos para la resistencia al calor en moscas adultas en el laboratorio, en donde Q2 explicó la mayoría de la varianza fenotípica (27-33%) con relación a la resistencia al *KockDown* por calor (Norry *et al.*, 2008). Adicionalmente, Q2 explicó cerca del 30% de la varianza fenotípica para la viabilidad huevo-adulto bajo condiciones de estrés por calor en el laboratorio (Sambucetti *et al.*, 2013), en contraste con sólo el 8% de la variación de la supervivencia explicada por este QTL en el presente ensayo en el campo. Por lo tanto, la magnitud de los efectos de los QTLs puede diferir entre los ambientes térmicos naturales y de laboratorio. Estos resultados sugieren que cada QTL de termotolerancia puede mostrar efectos mayores o menores de acuerdo a si las condiciones ambientales son naturales o de laboratorio.

En contraste con los experimentos de laboratorio a 25°C, en donde no se encontraron QTLs, sí se encontraron dos QTLs para la supervivencia huevo-adulto a 25°C en el laboratorio en larvas aclimatadas al calor. Uno de estos QTLs co-localiza con un QTL de termotolerancia encontrado en el cromosoma 3 en estudios de laboratorio con moscas adultas (Norry *et al.*, 2004; Morgan & Mackcay, 2006), en una región en la cual se pueden mapear una gran variedad de genes candidatos (ej., *hsp-omega*, CG13833, CG6733, y el gen estrechamente ligado, *hsp68*; ver Rako *et al.*,

2007). Además, otro QTL co-localiza parcialmente con el QTL de termotolerancia ligado al X (Figura 3). Estos dos QTL para la supervivencia en pre-adultos a temperaturas benignas afectaron a la supervivencia huevo-adulto en larvas aclimatadas al calor, reflejando, tal vez, una variación genética en hormesis en los paneles de RILs, con efectos benéficos del aclimatamiento al calor en algunas RILs pero perjudiciales en muchas otras (Gomez *et al*, 2016).

Los experimentos en el campo tendrían una mayor relevancia ecológica que los experimentos realizados a temperaturas constantes, ya que los ensayos en el campo son más representativos de las condiciones térmicas naturales (ej., Hoffmann & Loeschcke, 2006; Loeschcke & Hoffmann, 2007; Angilletta, 2009). Como se discutió previamente la comparación con estudios de laboratorio reveló una distribución no azarosa de los QTL sobre el genoma, ya que todos los QTLs solaparon con QTLs previamente identificados para la resistencia al calor, tanto en adultos como en larvas, en condiciones de laboratorio, pero el efecto de cada QTL difirió fuertemente en magnitud entre los ensayos en el laboratorio y en el campo. Ya que la mayoría de los QTLs para termotolerancia encontrados en el laboratorio en moscas adultas solapan con aquellos QTLs para la supervivencia huevo-adulto en condiciones de estrés por alta temperatura en la naturaleza, estos QTLs continuarán siendo estudiados y considerados dada su gran relevancia ecológica implicada en este estudio. Es crucial que los efectos de los QTLs sean lo suficientemente grandes para determinar la variación fenotípica a la resistencia al calor en un ambiente térmico natural, como sucede en el presente estudio. Como herramientas para futuros estudios dentro de cada QTL se pueden mencionar al mapeo de escala fina (con varias técnicas disponibles), mapeo por asociación con SNPs (polimorfismos de un único nucleótido) y/o análisis de perfiles de expresión.

4.2 Prueba de complementación cuantitativa.

Como se mencionó en Materiales y Métodos se investigó más el QTL de mayor efecto termotolerante en el experimento de campo: Q1 del cromosoma X (Tabla 4, sección 3.1.2). Por ser un QTL ligado al X el análisis de complementación se realizó en hembras solamente. Los resultados de la prueba de complementación cuantitativa revelaron un efecto significativo de uno o más genes incluidos entre las bandas 9F8 y 10A4 (delección correspondiente a la línea Df utilizada en este estudio). Al hacer una búsqueda en flybase de los genes candidatos para termotolerancia encontramos que el gen *hsp60A* se ubica en la banda 10A4. Un estudio previo mostró que este gen tiene niveles de expresión diferenciales en las líneas RIL-D48 y su nivel de expresión se correlacionó con la resistencia al coma por calor en Norry *et al* (2009). Tomados en conjunto, los resultados de Norry *et al* (2009) y el presente sobre complementación cuantitativa indican que este gen tiene variantes alélicas que afectan directamente a la termotolerancia en la mosca adulta. Hsp60A sería al menos uno de los genes responsables del QTL de mayor efecto termotolerante en el campo (Q1) detectado en el presente estudio. Más detalles funcionales de este gen son mencionados en Norry *et al* (2009).

4.3 QTLs para termotolerancia de los huevos de *Drosophila melanogaster*

A pesar de la importancia de los estadios inmóviles del ciclo de vida (huevo y pupa), ningún estudio previo examinó QTLs para resistencia al estrés por calor en embriones jóvenes (huevos), ni en *D. melanogaster* ni en ningún otro insecto. Las líneas RIL-SH2, que en promedio son mucho más tolerantes al calor que las RIL-D48 en larvas y adultos (Norry *et al.*, 2008; Sambucetti *et al.*, 2013), fueron menos resistentes al calor en huevos que las RIL-D48 (resultados presentes). Los resultados del mapeo del intervalo compuesto revelaron que los QTLs de termotolerancia en huevos difieren mucho de los QTLs de termotolerancia previamente identificados en larvas y adultos (Morgan & Mackay 2006; Norry *et al.*, 2008; Arias *et al.*, 2012; Sambucetti *et al.*, 2013). Este resultado no es sorprendente si se considera que el programa de desarrollo de un insecto involucra genes muy diferentes en huevos respecto de larvas y adultos (Lawrence 1992). De esta forma, la selección natural para la adaptación térmica no puede actuar sobre los mismos genes a través del ciclo de vida, ya que una fracción considerable de los genes implicados en termotolerancia en embriones tempranos (huevos) sería diferente del caso de larvas y adultos.

Los embriones tempranos seguramente experimentan temperaturas letales mucho más frecuentemente que las moscas adultas, dado que los adultos pueden escapar del calor extremo del sol para buscar un refugio bajo sombra (Hoffmann & Parsons 1991; Lockwood *et al.*, 2018). Un resultado muy interesante en este estudio fue que los huevos son mucho más resistentes al estrés por calor que las moscas adultas. Esta gran diferencia en termotolerancia entre estadios del ciclo de vida puede explicarse porque los QTLs en huevos difieren de los QTLs en adultos y porque los huevos estarían sujetos a mayor presión de selección para termotolerancia que los adultos (los huevos

no pueden escapar del intenso calor de los rayos solares durante episodios de calor extremo).

La adaptación al estrés por calor en un escenario de calentamiento global requiere de una sustancial variabilidad genética para caracteres de termotolerancia en todos los estadios del ciclo de vida. El estudio presente completa los análisis de QTLs para termotolerancia por agregar datos sobre el estadio de huevo. Varios QTLs fueron identificados para termotolerancia en embriones tempranos, indicando la presencia de variabilidad genética para la supervivencia al estrés por calor en huevos (o “*hatch ability*”). Estos resultados acuerdan con estudios de genómica de población que detectaron una gran diferenciación genética adaptativa entre poblaciones naturales a nivel del genoma (Hoffmann & Weeks 2007; Fabian *et al.*, 2012; Adrion *et al.*, 2015). A la luz de esta evidencia previa y de los QTLs identificados en este estudio, algunos de los cuales incluyen genes candidatos como *hsr-omega* y varios otros que aumentan su expresión por estrés térmico en embriones (Leemans *et al.*, 2000), es posible afirmar que todos los estadios del ciclo de vida presentan variación genética (al menos entre poblaciones) para termotolerancia al calor en *D. melanogaster*. Lo interesante es que la termotolerancia en huevos es al menos parcialmente genéticamente independiente de la termotolerancia en larvas y adultos. Tres de los cuatro QTLs de termotolerancia detectados en huevos no se corresponden con los QTLs de termotolerancia en larvas y adultos (Tabla 7; sección 3.3.1). Este descubrimiento enfatiza lo compleja que es la arquitectura genética para la adaptación a temperaturas y al calentamiento global (Hoffmann & Willi 2008). Wang & Kang (2005) mostraron que la termotolerancia en huevos de ortópteros tiene una compleja base genética que difiere entre poblaciones templada y tropicales posiblemente involucrando *Hsp*. Efectos maternos citoplasmáticos

también podrían contribuir a la termotolerancia de embriones, pero estudios de diferentes poblaciones geográficas no detectaron tales efectos (Lockwood *et al.*, 2018).

Los resultados presentes pueden también tener aplicaciones prácticas, haciendo uso del hecho que la termotolerancia en embriones es en gran medida independiente genéticamente de la termotolerancia en larvas y adultos. Por ejemplo, en insectos plaga como la mosca de los frutales *Ceratitidis capitata* se podrían buscar variantes genéticas que tengan gran termotolerancia en adultos pero que sean muy sensibles al calor en huevos, de modo de que tengan un alto éxito de apareamiento en regiones de elevadas temperaturas pero muy reducida supervivencia de los embriones en las mismas condiciones de alta temperatura. En la naturaleza, las hembras podrían oviponer preferencialmente en partes de los frutos bajo sombra. Incluso así, la temperatura de los frutos pudrientes cuando son expuestos al sol en determinadas horas del día puede exceder por mucho la temperatura del aire ambiente (Lockwood *et al.*, 2018).

Recientemente, Lockwood *et al* (2018) detectaron una gran variación genética entre regiones templadas y tropicales para termotolerancia en huevos de *D. melanogaster*, mientras que los adultos no mostraron el mismo nivel de diferenciación genética (o incluso ninguna diferenciación) en termotolerancia. Los resultados presentes sobre QTLs brindan una explicación a tales resultados discrepantes entre huevo y adultos. En conclusión, la arquitectura genética de termotolerancia en embriones es compleja, parcialmente independiente de la termotolerancia en moscas adultas y merece más estudios en el insecto modelo *D. melanogaster*.

4.4 Clina altitudinal para termotolerancia en *Drosophila buzzatii*.

El análisis de clinas y variación geográfica de caracteres cuantitativos es una poderosa herramienta para investigar respuestas evolutivas dentro de especies (Endler 1977). Las clinas altitudinales y latitudinales, en particular, son de gran importancia para investigar respuestas evolutivas a la selección climática (Fabian *et al.*, 2015).

En muestras del año 2002 analizadas por Sørensen *et al* (2005) en los mismos sitios que en el presente estudio, se detectó una clina altitudinal para la resistencia al coma por calor en moscas no aclimatadas y ninguna clina fue significativa para la supervivencia al estrés por calor, ni en moscas aclimatadas ni sin el tratamiento de aclimatación. Catorce años más tarde, se vuelve a detectar la misma clina para la resistencia al coma por calor y emergió un nuevo patrón clinal, en la dirección opuesta al coma por calor, para el caso de la supervivencia al estrés por calor en moscas aclimatadas (en este trabajo en muestras del año 2016). Para el caso de la resistencia al coma por calor, observamos que este carácter disminuye con la altitud, de modo que las poblaciones de altas elevaciones son las más sensibles y llegan al coma por calor mucho más rápido que las poblaciones cercanas al nivel del mar. En cambio, para la supervivencia al calor extremo las diferentes poblaciones altitudinales parecen haberse adaptado a otros factores como ser la búsqueda de refugios (ejemplo sombra de las plantas) cuando la temperatura asciende a un umbral crítico después del cual llega la muerte. Esta hipótesis parece consistente con los resultados presentes porque las poblaciones de bajas altitudes, donde existe abundante vegetación de refugio para *Drosophila*, son las que tienen mayor resistencia al coma por calor pero mayor mortalidad ante un estrés severo de calor. En cambio las moscas de altas elevaciones no encuentran refugios tan abundantemente y pueden haber sido seleccionadas para tratar

de sobrevivir al calor extremo del sol directo, dada la aridez del ambiente. Es por ello que las poblaciones de altas elevaciones tienen poca resistencia al coma por calor (las temperaturas medias son más bajas que cerca del nivel del mar) y alta supervivencia al calor severo dado que cuando la temperatura es muy elevada no tienen muchos lugares de donde refugiarse y deben soportar el sol directo más frecuentemente que las moscas en ambientes más benignos. Las poblaciones de altas elevaciones expresan más Hsp70 que las poblaciones de bajas elevaciones porque son más sensibles al estrés por calor (Sørensen *et al.*, 2005). Ello podría relacionarse con el hecho que las poblaciones de altas elevaciones son menos resistentes al coma por calor pero sobreviven más al estrés severo por calor que las poblaciones de bajas altitudes. Asimismo, la clina detectada para la supervivencia al calor fue significativa en moscas aclimatadas solamente, es decir previamente expuestas a una temperatura capaz de inducir Hsp70 en este estudio. Un efecto positivo de la expresión de Hsp70 sobre la supervivencia al calor ha sido observado en muchos estudios (ej., Dahlggaard *et al.*, 1998). Alternativamente, otra hipótesis sugiere que la exposición a un calor sub-lethal es menos estresante para poblaciones adaptadas al calor (con mayor temperatura media, como las cercanas al nivel del mar) y de este modo sufren menos daño celular y por ende menor inducción de Hsp (Norry & Loeschke 2003; Sørensen *et al.*, 2005). Otros genes deben estar involucrados en las clinas para termotolerancia. Por ejemplo, Frydenberg *et al* (2003) encontró una clara clina latitudinal para las sHsp (*hsp22*, *hsp23*) en la costa este de Australia, donde *D. melanogaster* forma una clina latitudinal para termotolerancia (Hoffmann *et al.*, 2002).

En las Islas Canarias, Sarup *et al* (2009) estudiaron un gradiente altitudinal pero no detectaron una clina significativa para la supervivencia al estrés por calor en *D. buzzatii*. Sin embargo, el estudio de Sarup *et al* (2009) fue llevado a cabo en la isla La

Gomera donde el gradiente altitudinal llega solo a los 1000 m de altitud sobre el nivel del mar, en contraste a las poblaciones de más de 1800 m de altitud incluidas en el presente estudio en Argentina. A pesar de todo, cabe destacar que la supervivencia al calor tendió a ser más mayor en las poblaciones de más altas elevaciones (Sarup *et al.*, 2009).

A raíz de los presentes resultados, ambos caracteres analizados (coma por calor vs supervivencia al calor) parecen estar parcialmente desacoplados, dado que forman clinas opuestas con la altitud. Esto es evidente desde estudios de QTLs en *D. melanogaster* donde algunos de los QTLs son específicos para la resistencia al coma por calor mientras que otros son específicos para la supervivencia el estrés por calor (Norry *et al.*, 2004; Morgan & Mackay 2006; Norry *et al.*, 2008; Arias *et al.*, 2012).

El tamaño corporal es otro carácter que varía clinalmente con la altitud, con un tamaño más grande en las poblaciones de altas elevaciones (Norry *et al.*, 2000). Sin embargo, el tamaño corporal no está correlacionado con la termotolerancia en *Drosophila* por lo que puede descartarse que las clinas de termotolerancia observadas puedan deberse a un efecto colateral del tamaño corporal o de la tasa de desarrollo (Sørensen *et al.*, 2005; Fabian *et al.*, 2015).

Un aspecto interesante al comparar el estudio de Sørensen *et al* (2005) y el presente es que las poblaciones de altas elevaciones podrían estar experimentando una mayor presión de selección térmica por el calentamiento global, de modo que está surgiendo una clina altitudinal positiva para la supervivencia al calor en contraposición a la clina altitudinal negativa para el coma por calor. Esto es evidente en moscas aclimatadas, en el estudio presente. Esta hipótesis requiere ser probada con más monitoreo, involucrando muestras de 20 años o más. Existe evidencia que indica que el cambio climático debido al calentamiento global tiene un mayor impacto en muchas

especies en las altas elevaciones que en hábitats más benignos cercanos al nivel del mar (Root *et al.*, 2003).

4.5 Conclusiones generales.

Todos los QTLs identificados para la supervivencia de larvas a adultos en el ambiente térmico natural, solaparon con los QTL de termotolerancia ya conocidos en moscas adultas en condiciones de laboratorio. El QTL de mayor efecto fue detectado en el cromosoma X, y colocaliza con un QTL de termotolerancia ya identificado en la banda 10 del cromosoma X en moscas adultas en el laboratorio.

El análisis supervivencia al estrés por calor en huevos reveló que los individuos en este estadio inmóvil del ciclo de vida (huevo) son mucho más tolerantes al calor que en los estadios móviles del ciclo de vida (larvas y moscas adultas). Por otra parte, la base genética de la tolerancia al calor en huevos fue diferente a la conocida en moscas adultas y larvas, ya que los QTL de termotolerancia al calor en huevos no coincidieron en posición en cuanto a sus efectos con los QTLs de termotolerancia conocidos en larvas y adultos. Además, las líneas RIL de alta termotolerancia al calor en adultos (RIL-SH2) tuvieron, en huevos, menor termotolerancia que el panel de línea RIL de baja resistencia al calor en adultos (RIL-D48).

Los resultados en este estudio demuestran que la base genética de la resistencia al calor en el estadio de huevo difiere ampliamente con respecto a larvas y adultos. En cuanto al estadio larvario, también estudiado en el presente trabajo, el mismo mostró una alta co-localización de QTLs con respecto al estadio adulto, previamente estudiado. Estos resultados no resultan sorprendentes si se considera que el estadio de “huevo” está controlado por un programa de desarrollo muy diferente al de larvas en insectos Dípteros. Estos resultados son importantes porque demuestran por vez primera que la

base genética de la resistencia al calor difiere ampliamente en el estadio de huevos respecto al resto de los estadios del ciclo de vida de un insecto. Asimismo, el estudio presente demuestra que la termotolerancia en huevos y larvas también es genéticamente variable. El mapeo de QTL en un ambiente térmico natural desarrollado en larvas, llena un vacío existente en nuestro conocimiento sobre la base genética de termotolerancia en el laboratorio y su correlato en la naturaleza.

Finalmente, el análisis clinal de termotolerancia en moscas adultas de *D. buzzatii* muestra que diferentes caracteres de termotolerancia pueden diferir ampliamente en cuanto a la selección térmica experimentada en la naturaleza. En particular, la resistencia al coma por calor disminuye con la altitud de origen de la población mientras que la supervivencia al estrés por calor muestra un patrón diferente de variación altitudinal.

5. Referencias Bibliográficas

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., et al.** (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. **287**: 2185-2195.
- Adrion, J.R., Hahn, M.W. & Cooper, B.S.** (2015). Revisiting classic clines in *Drosophilamelanogaster* in the age of genomics. *Trends in Genetics*. **31**: 434-444.
- Angilletta, M.J.** (2009). Thermal Adaptation: A Theoretical and Empirical Synthesis. Oxford University Press, Oxford, U.K.
- Anholt, R.R.H. & Mackay, T.F.C.** (2014). En "*Principles of Behavioral Genetics*". Elsevier Academic Press. London.
- Arias, L.N., Sambucetti, P., Scannapieco, A.C., Loeschcke, V. & Norry, F.M.** (2012). Survival to heat stress with and without heat-hardening in *Drosophila melanogaster*: interactions with larval density. *Journal of Experimental Biology*. **215**: 2220-2225.
- Atchley, W.R., Gaskins, C.T. & Anderson, D.** (1976). Statistical properties of ratios. I. *Empirical results. Systematics Zoology*. **25**: 137-148.
- Baldal, E.A., van der Linde, K., van Alphen, J.J.M., Brakefield, P.M. & Zwaan, B.J.** (2005). The effects of larval density on adult life-history traits in three species of *Drosophila*. *Mechanisms of Ageing and Development*. **126**: 407-416.
- Bijlsma, R. & Loeschcke, V.** (1997). Environmental Stress, Adaptation and Evolution. Basel; Boston: Birkhäuser.

- Bubli, O.A., Imasheva, A.G. & Loeschcke, V.** (1998). Selection for knockdown resistance to heat in *Drosophila melanogaster* at high and low larval densities. *Evolution*. **52**: 619-625.
- Bubliy, O. A. & Loeschcke, V.** (2005). Variation of lifehistory and morphometrical traits in *Drosophila buzzatii* and *D. simulans* collected along an altitudinal gradient from a Canary island. *Biological Journal of the Linnean Society*. **84**: 119136
- Capy, P., Pla, E. & David, J. R.** (1993). Phenotypic and genetic variation of morphometrical traits in natural populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. I. Geographic variations. *Evolution*. **25**: 517536.
- Dahlgard, J. & Hoffmann, A.A.** (2000). Stress resistance and environmental dependency of inbreeding depression in *Drosophila melanogaster*. *Conservation Biology Journal*. **14**: 1187-92.
- Dahlgard, J., Loeschcke, V., Michalak, P. & Justesen, J.** (1998). Induced thermotolerance and associated expression of the heat-shock protein Hsp70 in adult *Drosophila melanogaster*. *Functional Ecology*. **12**: 786-793.
- David, J.R., Allemand, R., Van Herrewege, J. & Cohet, Y.** (1983). Ecophysiology: abiotic factors. In: Ashburner, M., Carson, H. L., Thompson Jr., J.N. (Eds.), *The Genetics and Biology of Drosophila*. Academic Press, London, 3d, pp. 105-170.
- Dupuis, J.E. & Siegmund, D.** (1999). Statistical Methods for Mapping Quantitative Trait Loci From a Dense Set of Markers. *Genetics*. **151**: 373-386.

- Endler, J.A.** (1977). *Geographic Variation, Speciation and Clines*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Etges, W.J.** (1990). Quantitative genetic analysis of life-histories in *Drosophila mojavensis*. University of Maryland and the Smithsonian Institute. Four International Congress of Systematic and Evolutionary Biology. Pagination Varies University of Maryland: College Park, Maryland, USA pp: 402.
- Fabian, D.K., Lack, J.B., Mathur, V., Schlötterer, C., Schmidt, P.S., Pool, J.E., Flatt, T.** (2015). Spatially varying selection shapes life history clines among populations of *Drosophila melanogaster* from sub-Saharan Africa. *Journal of Evolutionary Biology*. **28**: 826-840.
- Falconer, D.S. & Mackay T.F.C.** (1996). *Introducción a la genética cuantitativa*. Cuarta edición. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Fanara, J.J., Fontdevila, A. & Hasson E.** (1999). Oviposition preference and life history traits in cactophilic *Drosophila koepferae* and *D. buzzatii* in association with their natural hosts. *Evolutionary Ecology*. **13**: 173-190.
- Fanara, J.J., Hasson, E., Rodriguez, C., Santos, M. & Fontdevilla, A.**(1996). The evolutionary history of *Drosophila buzzatii* .33. Are Opuntia hosts a selective factor for the inversion polymorphism?. *Heredity*. **77**: 500-508.
- Feder, M.E. & Hofmann, G.E.** (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones and the stress response. *Annual Review of Physiology Journal*. **61**: 243-282.

- Feder, M.E. & Krebs, R.A.** (1997). Ecological and evolutionary physiology of heat-shock proteins and the stress response in *Drosophila*: complementary insight from genetic engineering and natural variation. In: Bijlsma, R., Loeschcke, V. (Eds.), *Environmental Stress, Adaptation and Evolution*. Birkhauser Verlag, Basel, pp. 155-173.
- Fontdevila, A., Pla, C., Hasson, E., Wasserman, M., Sanchez, A., Naveira, H., & Ruiz A.** (1988). *Drosophila koepferae*: a new member of the *Drosophila serido* (Diptera-Drosophilidae) superspecies taxon. *Annals of the Entomological Society of America*. **81**: 380-385.
- Franks, S.J. & Hoffmann, A.A.** (2012). Genetics of climate change adaptation. *Annual Review Genetics*. **46**: 185-208.
- Frydenberg J., Hoffmann, A.A., & Loeschcke, V.** (2003). DNA sequence variation and latitudinal associations in hsp23, hsp26 and hsp 27 from natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology*. **12**: 2025-2032.
- Gomez, F.H., Sambucetti, P. & Norry, F.M.** (2016). Elevated extension of longevity by cyclically heat stressing a set of recombinant inbred lines of *Drosophila melanogaster* throughout their adult life. *Biogerontology*. **17**: 883-892.
- Hasson, E., Naveira, H., & Fontdevila, H.** (1992). The breeding sites of the Argentinian species of the *Drosophila mulleri* complex (subgenus *Drosophila-repleta* group). *Revista Chilena de Historia Natural*. **65**: 319-326.

- Hasson, E., Rodriguez, C., Fanara, J.J., Naveira, H. Reig, O.A., & Fontdevila, A. (1995).**
The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXVI. Macrogeographic patterns of inversion polymorphism in new world populations. *Journal of Evolutionary Biology*. **8**: 369-384.
- 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. & Hercus, M.J. (2000).** Environmental stress as an evolutionary force. *Bioscience*. **50**: 217-226.
- Hoffmann, A.A. & Loeschcke, V. (2006).** Are fitness effects of density mediated by body size? Evidence from *Drosophila* field releases. *Evolutionary Ecology Research*. **8**: 813-828.
- Hoffmann, A.A. & Merilä, J. (1999).** Heritable variation and evolution under favorable and unfavorable conditions. *Trends in Ecology & Evolution*. **14**: 96-101.
- Hoffmann, A.A. & Parsons, P.A. (1997).** Extreme Environmental Change and Evolution. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hoffmann, A.A. & Parsons, A. (1991).** *Evolutionary Genetics and Environmental Stress*. Oxford University Press. Oxford.

- Hoffmann, A.A., Sørensen, 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. & Weeks, A.R.** (2007). Climatic selection on genes and traits after a 100 year-old invasion: a critical look at the temperature-tropical clines in *Drosophila melanogaster* from eastern Australia. *Genetica*. **129**: 133-147.
- Hoffmann, A.A. & Willi, Y.** (2008). Detecting genetic responses to environmental change. *Nature Reviews Genetics*. **9**: 421-432.
- 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.
- James, A. C. & Partridge, L.** (1995). Thermal evolution of rate of larval development in *Drosophila melanogaster* in laboratory and field populations. *Journal of Evolutionary Biology*. **8**: 315-330.
- Jiang, C. & Zeng, Z.B.** (1995). Multiple Trait Analysis of Genetic Mapping for Quantitative Trait Loci. *Genetics*. **140**: 1111-1127.

Kingsolver, J.G., Woods, H.A., Buckley, L.B., Maclean, H., Higgins, J.K. & Potter, K.A.

(2011). Complex life cycles and the responses of insects to climate change.

Integrative and Comparative Biology. **51**: 719-732.

Krebs, R. A. & Loeschcke, V. (1994). Costs and Benefits of Activation of the Heat-Shock

Response in *Drosophila melanogaster*. *Functional Ecology*. **8**: 730-737.

Kristensen, T.N., Henningsen, A.K., Aastrup, C., Bech-Hansen, M., Bjerre, L.B.,

Carlsen, B., et al. (2016). Fitness components of *Drosophila melanogaster*

developed on a standard laboratory diet or a typical natural food source. *Insect*

Science. **23**: 771-779.

Kristensen, T.N., Loeschcke, V. & Hoffmann, A.A. (2007). Can artificially selected

phenotypes influence a component of field fitness? Thermal selection and fly

performance under thermal extremes. *Proceedings of the Royal Society of*

London B, Biological Science. **274**: 771-778.

Lawrence, P.A. (1992). The Making of a fly. The genetics of animal design. Blackwell

Science Publications, Oxford. 1-228.

Leemans, R., Egger, B., Loop, T., Kammermeier, L., He, H., Hartmann, B., Certa, U.,

Hirth, F., Reichert, H. (2000). Quantitative transcript imaging in normal and

heat-shocked *Drosophila* embryos by using high-density oligonucleotide arrays.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA. **97**: 12138-12143.

- Leips, J. & Mackay, T.F.C.** (2000). Quantitative trait loci for life span in *Drosophila melanogaster*: Interactions with genetic background and larval density. *Genetics*. **155**: 1773-1788.
- Lencioni, V.** (2004). Survival strategies of freshwater insects in cold environments. *Journal of Limnology*. **63** (s1): 45-55.
- Levy, O., Buckley, L.B., Keitt, T.H., Smith, C.D., Boateng, K.O., Kumar, D.S., et al.** (2015). Resolving the life cycle alters expected impacts of climate change. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. **282**: 20150837.
- Lindquist S.** (1986). The heat shock response. *Annual Review of Biochemistry*. **55**: 151-91.
- Lockwood B.L., Gupta, T., & Scavotto, R.** (2018). Disparate patterns of thermal adaptation between life stages in temperate vs. tropical *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology*. **31**: 323–331.
- Loeschcke, V., Krebs, R.A., Dahlgaard, J. & Michalak, P.** (1997). High temperature stress and the evolution of thermal resistance. In: Bijlsma, R. and Loeschcke, V., Environmental stress, adaptation and evolution. Birkhauser Verlag, Basel, pp 175-191.
- Loeschcke V., Krebs, R.A. & Barker, J.S.F.** (1994). Genetic variation for resistance and acclimation to high temperature stress in *Drosophila buzzatii*. *Biological Journal of the Linnean Society*. **52**: 83-92.

- Loeschcke, V., Kristensen, T.N. & Norry, F.M.** (2011). Consistent effects of a major QTL for thermal resistance in field-released *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*. **57**: 1227-1231.
- Loeschcke, V. & Sørensen, J.G.** (2005). Acclimation, heat shock and hardening - a response from evolutionary biology. *Journal of Thermal Biology*. **30**: 255-257.
- Lommen, S.T.E., de Jong, P.W. & Pannebakker, B.A.** (2017). It is time to bridge the gap between exploring and exploiting: prospects for utilizing intraspecific genetic variation to optimize arthropods for augmentative pest control – a review. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **162**: 108-123.
- Lynch, M. & Walsh, B.** (1998). *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA.
- Maynard Smith, J.** (1958). The effects of temperatures and of egg-laying on the longevity of *Drosophila subobscura*. *Journal of Experimental Biology*. **35**: 832-42.
- Mitrovski, P. & Hoffmann, A.A.** 2001. Postponed reproduction as an adaptation to winter conditions in *Drosophila melanogaster*: evidence for clinal variation under seminatural conditions. *Proceeding of the Royal Society of London. B. Biological Sciences*. **268**: 2163–2168.
- Moehring, A.J. & Mackay, T.F.C.** (2004). The quantitative genetic basis of male mating behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **167**: 1249–1263.

- Morgan, T.J. & Mackay, T.F.C. (2006).** Quantitative trait loci for thermotolerance phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*. **96**: 232-242.
- Mousseau, T.A. & Roff, D.A. (1987).** Natural selection and the heritability of fitness components. *Heredity*. **59**:181-197.
- Norry, F.M., Bublly, O.A. & Loeschcke, V. (2001).** Developmental time, body size and wing loading in *Drosophila buzzatii* from lowland and highland populations in Argentina. *Hereditas*. **135**: 35-40.
- 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., Larsen, P.F., Liu, Y. & Loeschcke, V. (2009).** Combined expression patterns of QTL-linked candidate genes best predict thermotolerance in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*. **55**: 1050-1057.
- Norry F.M. & Loeschcke V. (2003).** Heat-induced expression of a molecular chaperone decreases by selecting for long-lived individuals. *Experimental Gerontology*. **38**: 673-681.

- 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.
- 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., Sambucetti P., Scannapieco A.C. & Loeschcke V. (2006).** Altitudinal patterns for longevity, fecundity and senescence in *Drosophila buzzatii*. *Genetica*. **128**: 81-93.
- Powell, J.R. (1997).** Progress and prospects in evolutionary biology: The *Drosophila* model. Oxford University Press, Oxford. Pp. 562.
- Queitsch, C., Sangster, T.A., & Lindquist, S. (2002).** Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature*. **417**: 618:624.
- Rand, D.M., Weinreich, D.M., Lerman, D., Folk, D. & Gilchrist, G.W. (2010).** Three selections are better than one: clinal variation of thermal QTL from independent selection experiments in *Drosophila*. *Evolution*. **64**: 2921-2934.
- 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.

- Reeve, M.W., Fowler, K. & Partridge, L.** (2000). Increased body size confers greater fitness at lower experimental temperature in male *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology*. **13**: 836-844.
- Reusch, T.B. H. & Wood, T.E.** (2007). Molecular ecology of global change. *Molecular Ecology*. **16**: 3973-3992.
- Roff, D.A. & Mousseau, T.A.** (1987). Quantitative genetics and fitness: lessons from *Drosophila*. *Heredity*. **58**: 103-118.
- Rönnberg-Wästljung, A.C., Åhman, I., Glynn, C. & Widenfalk, O.** (2006). Quantitative trait loci for resistance to herbivores in willow: field experiments with varying soils and climates. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **118**: 163-174.
- Root, T.L., Price, J.T., Hall, K.R., Schneider, S.H., Rosenzweig, C. & Pounds, J.A.** (2003). Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*. **421**: 57-60.
- Rutherford, S.L. & Lindquist, S.** (1998). Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature*. **396**: 336-342.
- Sambucetti, P., Loeschcke, V. & Norry, F.M.** (2006). Developmental time and size-related traits in *Drosophila buzzatii* along and altitudinal gradient from Argentina. *Hereditas*. **143**: 77-83.
- Sambucetti, P., Scannapieco, A.C., Loeschcke, V. & Norry, F.M.** (2013). Heat-stress survival in the pre-adult stage of the life cycle in an intercontinental set of

recombinant inbred lines of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*. **216**: 2953-2959

Sangster, T.A., Salathia, N., Undurraga, S., Milo, R., Schellenberg, K., Lindquist, S. & Queitsch, C. (2008). Hsp90 affects the expression of genetic variation and developmental stability in quantitative traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **105**: 2963-2968.

Sarup, P., Frydenberg, J. & Loeschcke, V. (2009). Local adaptation of stress related traits in *Drosophila buzzatii* and *Drosophila simulans* in spite of high gene flow. *Journal of Evolutionary Biology*. **22**: 1111-1122.

Schmidt, P.S., Duvernell D.D. & Eanes, W.F. (2000). Adaptive evolution of a candidate gene for aging in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. **97**: 10861-10865.

Solomon, J.M., Rossi, J.M., Golic, K., McGarry, T. & Lindquist, S.(1991). Changes in Hsp70 alter thermotolerance and heatshock regulation in *Drosophila*. *New Biology*. **3**: 1106-1120.

Sørensen, J.G., Dahlgaard, J. & Loeschcke, V. (2001). Genetic variation in thermal tolerance among natural populations of *Drosophila buzzatii*: down regulation of Hsp70 expression and variation in heat stress resistance traits. *Functional Ecology*. **15**: 289-296.

Sørensen, J.G., Kristensen, T. N. & Loeschcke, V. (2003). The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*. **6**: 1025-1037.

- Sørensen, J.G. & Loeschcke, V.** (2001). Larval crowding in *Drosophila melanogaster* induces Hsp70 expression, and leads to increased adult longevity and adult thermal stress resistance. *Journal of Insect Physiology*. **47**: 1301-1307.
- Sørensen, J.G., Nielsen, M.M. & Loeschcke, V.** (2007). Gene expression profile analysis of *Drosophila melanogaster* selected for resistance to environmental stressors. *Journal of Evolutionary Biology*. **20**: 1624-1636.
- Sørensen, J.G., Nielsen, M.M., Kruhoffer, M., Justesen, J. & Loeschcke, V.** (2005). Full genome gene expression analysis of the heat stress response, in *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress & Chaperones*. **10**: 312-328.
- Sørensen, J.G., Norry, F.M., Scannapieco, A. & 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.
- Sørensen, J.G., Schou, M.F. & Loeschcke, V.** (2017). Evolutionary adaptation to environmental stressors: a common response at the proteomic level. *Evolution*. **71**: 1627-1642.
- Stazione, L., Norry, F.M. & Sambucetti, P.** (2017). Thermal-specific patterns of longevity and fecundity in a set of heat-sensitive and heat-resistant genotypes of *Drosophila melanogaster*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **165**: 159-168.
- StatSoft** (1999). STATISTICA for Windows (Computer program manual). StatSoft Inc., Tulsa.

- Stearns, S.C.** (1989). The evolutionary significance of phenotypic plasticity. *BioScience*. **39**: 436-445.
- Svetec, N., Werzner, A., Wilches, R., Pavlidis, P., Álvarez-Castro, J.M., Broman, K.W., Metzler, D. & Stephan, W.** (2011). Identification of X-linked quantitative trait loci affecting cold tolerance in *Drosophila melanogaster* and fine mapping by selective sweep analysis. *Molecular Ecology*. **20**: 530-544.
- Takahashi, K., Okada, Y. & Teramura, K.** (2011). Genome-wide deficiency screen for the genomic regions responsible for heat resistance in *Drosophila melanogaster*. *BMC Genetics*. **12**: 57.
- Throckmorton, L.H.** (1975). The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. Pp. 421-467. En King R.C. (ed.). Handbook of Genetic. Vol. 3. Plenum Publ. Corp., New York.
- Throckmorton, L.H.** (1982). Pathways of evolution in the genus *Drosophila* and the founding of the replete group. En "Ecological, Genetics and Evolution". Barker J.S.F. y Starner, W.T. (eds.) Academic Press. Australia.
- Tollefsbol, T.O.** (2007). Techniques for analysis of biological aging. *Methods in Molecular Biology*. **371**: 1-7.
- Tower, J.** (2008). Hsps and aging. *Trends Endocrinology Metabolism*. **20**: 216–22.
- Wang, X.H. & Kang, L.** (2005). Differences in egg thermotolerance between tropical and temperate populations of the migratory locust *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Insect Physiology*. **51**: 1277-85.

Weeks, A.R., McKechnie, S.W. & Hoffmann, A.A. (2002). Dissecting adaptive clinal variation: markers, inversions and size/stress associations in *Drosophila melanogaster* from a central field population. *Ecology Letters*. **5**: 756-763.

Zwaan, B.J., Bijlsma, R., Hoekstra, R.F. (1991). On the developmental theory of ageing. I. Starvation resistance and longevity in *Drosophila melanogaster* in relation to pre-adult breeding conditions. *Heredity*. **66**: 29-39.