



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

**“Conducta sexual de tres poblaciones de *Drosophila funebris*
que viven naturalmente en distintos sitios de crianza”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas
con mención en Genética**

Claudia Jara Orellana

Director de Tesis

Prof. Dr. Raúl Godoy-Herrera

Año 2011

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magíster presentada por la candidata

Claudia Jara Orellana

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Ciencias Médicas y Biológicas con mención en Genética en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 12 de Enero de 2011

Prof. Dr. Raúl Godoy - Herrera

Director de Tesis

Programa de Genética Humana, Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Madeleine Lamborot

Prof. Patricia Iturra

Prof. Dr. Carlos Valenzuela

Prof. Dra. Juana Pincheira
Presidente Comisión de Examen

*A la Doctora Susi Koref-Santibañez, por sus enseñanzas
y constante motivación.*

*A mi madre, por su apoyo incondicional y ejemplo de
fortaleza y perseverancia.*

A Rodrigo, por todo su amor y estímulo.

Agradecimientos

Muchas han sido las personas que han contribuido en este trabajo. En primer lugar, agradezco al Prof. Dr. Raúl Godoy–Herrera, quien dirigió esta Tesis. Por compartir sus conocimientos, todos los valiosos comentarios, críticas y sugerencias aportadas, me incentivaron en descubrir el mundo de la biología evolutiva en *Drosophilas*. Su apoyo fue fundamental para los logros de este trabajo.

A la Doctora Susi Koref, por compartir sus conocimientos, su constante motivación, apoyo y comprensión fueron fundamentales para el desarrollo de esta investigación.

A los académicos, alumnos y personal técnico el Laboratorio de Genética y Evolución de la Conducta. Entre ellos al Prof. Francisco Del Pino, a la Profesora María Cristina Medina y al señor Hector Muñoz. Ellos aportaron, de manera generosa, con sus respectivos conocimientos acerca de métodos, técnicas y enfoques teóricos.

A mis compañeros del programa de Magíster en especial a Cristian Araya por su generosidad con las asesorías en pruebas estadísticas y a Eliana Ayarza por su energía y apoyo.

A los miembros de la Comisión Informante de esta Tesis: Prof. Madeleine Lamborot, Prof. Patricia Iturra, Dr. Carlos Valenzuela y Dra. Juana Pincheira, por todos los valiosos comentarios, sugerencias y críticas que recibí durante las diferentes etapas de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

PÁGINA DE TITULO	i
ÍNDICE GENERAL	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
1.- Material biológico y medio de crianza	14
2.- Localidades de colecta	14
3.- Crianza en el laboratorio	17
4.- Metodología	18
4.1.- Cepas y condiciones de crianza	18
4.2.- Conductas medidas	19
4.3.- Disección de genitalia y gónadas	20
5.- Experimentos	
5.1.- Cortejo	20
5.1.1.- Cruzamientos homogámicos (intrapoblacionales)	21
5.2.- Cruzamientos heterogámicos (interpoblacionales)	22
5.3.- Elección múltiple e índice de aislamiento reproductivo	24
6.- Viabilidad de las generaciones F_1 y F_2	26
7.- Análisis estadístico	27

RESULTADOS	28
1.- Conducta reproductiva en las poblaciones de Melipilla (M), Pelequén (P) y Til Til (TT) de <i>D. funebris</i>	28
2.- Aspectos cuantitativos de la conducta reproductiva de <i>D. funebris</i>	30
2.1.- Machos	30
2.2.- Hembras	33
3.- Conducta frente a los individuos de las otras poblaciones	35
3.1.- Machos	
3.1.1.- Machos Melipilla (M)	36
3.1.2.- Machos Pelequén (P)	38
3.1.3.- Machos Til Til (TT)	39
3.2.- Hembras	
3.2.1.- Hembras Melipilla (M)	42
3.2.2.- Hembras Pelequén (P)	44
3.2.3.- Hembras Til Til (TT)	46
4.- Duración de la copula	48
5.- Latencia	50
6.- Aparato genital femenino y masculino	51
7.- Test de elección múltiple	53
8.- Viabilidad	55
DISCUSIÓN	
1.- Conducta reproductiva y evolución	60
2.- Conducta de apareamiento	
2.1.- Machos Melipilla, Pelequén y Til Til	62
2.2.- Hembras Melipilla, Pelequén y Til Til	64
3.- Conducta reproductiva entre individuos de las poblaciones Melipilla, Pelequén y Til Til	65
3.1.- Machos Melipilla, Pelequén y Til Til	66
3.2.- Hembras Melipilla, Pelequén y Til Til frente a machos de las otras poblaciones	66
4.- Viabilidad	68

CONCLUSIÓN Y COMENTARIO FINAL	69
REFERENCIAS	71
ANEXOS	77

ÍNDICE DE TABLAS

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1.- Localidades de colecta y sitios de crianza de poblaciones de <i>D. funebris</i> utilizados en esta Tesis	15
Tabla 2.- Cruzamientos entre los sexos de cada una de las tres poblaciones de <i>D. funebris</i> (Melipilla, M, Pelequén, P, y Til-Til, TT)	21
Tabla 3. Cruzamientos recíprocos realizados entre los sexos de las poblaciones M, P y TT de <i>D. funebris</i>	23
Tabla 4. Cruzamientos realizados para conocer las preferencias de los sexos de una de las tres poblaciones por otros de la misma población, en presencia de individuos de las otras poblaciones	24

RESULTADOS

Tabla 5.- Número y porcentaje de cortejos y cópulas en las poblaciones de Melipilla (M), Pelequén (P) y Til Til (TT) de <i>D. funebris</i> . Latencia de inicio del cortejo y la duración de la cópula ($\bar{x} \pm ES$)	30
Tabla 6. Eventos por elemento de cortejo en machos de Melipilla (M), Pelequén (P) y Til Til (TT) de <i>D. funebris</i>	31

Tabla 7.- Número promedio ($\bar{X} \pm ES$) de elementos de la conducta reproductiva de las hembras de las poblaciones Melipilla (M), Pelequén (P) y Til Til (TT) de *D. funebris*, cuando son cortejadas por machos de sus respectivas poblaciones 33

Tabla 8.- Tiempo de inicio del cortejo (min; latencia), porcentaje y duración de las cópulas de machos Melipilla, Pelequén y Til Til confrontados a hembras de las otras poblaciones. Se indica el porcentaje de hembras inseminadas posterior al periodo de observación. Las observaciones se realizaron continuamente por 60 min. 35

Tabla 9.- Conducta de cortejo de machos Melipilla (M) frente a hembras intra e interpoblaciones M, P y TT 36

Tabla 10.- Conducta de cortejo de machos Pelequén (P) frente a hembras, Pelequén (P), Til Til (TT) y Melipilla (M), de *D. funebris*. N = 60 parejas 38

Tabla 11.- Conducta de cortejo de machos Til Til (TT) frente a hembras Til Til (TT), Melipilla (M) y Pelequén (P), de *D. funebris*. N=60 parejas 39

Tabla 12.- Conducta de apareamiento de hembras Melipilla (M) frente a machos Til Til (TT) y Pelequén (P), de *D. funebris* 42

Tabla 13.- Conducta de apareamiento de hembras Pelequén frente a machos Til Til (TT) y Melipilla (M), de *D. funebris* 44

Tabla 14.- Conducta de apareamiento de hembras Til Til (TT) frente a machos Melipilla (M) y Pelequén (P), todos de *D. funebris* 46

ELECCION MÚLTIPLE

Tabla.15 A, B y C.- Número y duración de las cópulas en las pruebas de elección múltiple entre las poblaciones Melipilla, Pelequén y Til Til de *D. funebris* 53

VIABILIDAD

Tabla.16.- Duración del ciclo huevo-adulto (días)	59
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura.1.- Sitios ecológicos donde se crían las poblaciones de <i>D. funebris</i> examinadas	16
--	----

RESULTADOS

Figura. 2.- Número promedio ($\bar{x} \pm ES$) de vibraciones de alas exhibidas por machos Melipilla, Pelequén y Til Til	32
--	----

Figura 3.- Promedio ($\bar{x} \pm ES$) de uso del tijereteo alar por las hembras Melipilla, Pelequén y Til Til	34
--	----

Figura 4.- Promedio ($\bar{x} \pm ES$) de uso del tijereteo alar por machos Melipilla, frente a hembras Melipilla, Pelequén y Til Til	37
---	----

Figura 5.- Promedio ($\bar{x} \pm ES$) de Toques realizados por los machos Til Til, frente a hembras Melipilla y Pelequén	40
---	----

Figura 6.- Promedio ($\bar{x} \pm ES$) de tijereteos alares por machos Til Til, frente a hembras Melipilla y Pelequén	40
---	----

Figura 7.- Promedio ($\bar{x} \pm ES$) de seguimientos por machos Til Til, frente a hembras Melipilla y Pelequén	41
--	----

Figura 8.- Promedio ($\bar{x} \pm ES$) de movimientos abdominales por machos Til Til, frente a hembras Melipilla y Pelequén	41
---	----

Figura 9.- Promedio ($\bar{x} \pm ES$) de movimientos abdominales por hembras Melipilla frente a machos Pelequén y Til Til	43
--	----

Figura 10.- Promedio ($\bar{x} \pm ES$) de tijereteos alares de hembras Melipilla frente a machos Pelequén y Til Til	43
Figura 11.- Promedio ($\bar{x} \pm ES$) de toques de hembras Pelequén frente a machos Melipilla y Til Til	45
Figura 12.- Promedio ($\bar{x} \pm ES$) de toques de hembras Til Til frente a machos Melipilla y Pelequén	46
Figura 13.- Promedio ($\bar{x} \pm ES$) de tijereteos de hembras Til Til frente a machos Melipilla y Pelequén	47
Figura 14.- A, B y C.- Duración promedio de la cópula en los cruzamientos dentro y entre las poblaciones Melipilla, Pelequén y Til Til de <i>D. funebris</i>	48
Figura 15.-A, B y C. Tiempo (min.) transcurrido desde el encuentro de los sexos y el inicio del cortejo en los cruzamientos dentro y entre las poblaciones Melipilla, Pelequén y Til Til de <i>D. funebris</i>	50
Figura 16.- Espermatecas <i>D. funebris</i>	51
Figura 17.- Terminalia macho <i>D. funebris</i>	52
Figura 18.- Porcentaje de viabilidad en poblaciones de <i>D. funebris</i> M, P y TT	55
Fig. 19.a, b y c.- Porcentaje de viabilidad de las generaciones F ₁ y F ₂ obtenidas al cruzar recíprocamente adultos M, P y TT	56
Figura 20.- Nivel de contaminación observado en las generaciones: Parentales, F ₁ y F ₂ de <i>D. funebris</i>	58

RESUMEN

Para comprender la naturaleza de los primeros eventos que llevan a originar nuevas especies, se investigaron tres poblaciones alopátricas chilenas de *D.funnebris*, que se crían en diferentes frutos o tejidos fermentados. Se comparó la conducta reproductiva de los adultos de las poblaciones Melipilla (M), formada con adultos emergidos de zapallo fermentado, Pelequén (P) originada de imagos nacidos de tejido descompuesto de tuna y Til Til constituida con moscas nacidas de tejido necrótico de cactus (*Equinopsis chilensis*). Diferencias en conducta reproductiva entre los individuos de las tres poblaciones, pueden constituir una barrera de aislamiento precigótica.

Con el fin de evaluar la posible existencia de mecanismos de aislamiento postcigóticos, se estudió también la viabilidad y duración del ciclo de desarrollo huevo-adulto de los híbridos F_1 y F_2 obtenidos al cruzar recíprocamente las tres poblaciones. Una disminución de estos componentes de la adecuación biológica, puede significar la eliminación de los híbridos.

Los resultados indican que entre las tres poblaciones existen importantes diferencias en conducta de apareamiento de los adultos. Sugiriendo la presencia de barreras precigóticas que restringen el flujo de genes entre las poblaciones M, P y TT de *D. funnebris*. Los híbridos F_1 y F_2 mostraron una disminución de la viabilidad y un alargamiento en la duración del ciclo de desarrollo huevo-adulto. Los hallazgos de esta Tesis indican que entre las poblaciones Melipilla (M), Pelequén (P) y Til Til (TT) de *D. funnebris* existen barreras al flujo de genes, sugiriendo que cada población debería considerarse una subespecie del grupo *funnebris*.

ABSTRACT

To understand some of primary events that bringing to originate new species, I investigated three allopatric Chilean populations of *D. funebris*. The Melipilla (M) strain was formed with adults emerged from decaying pumpkin. The Pelequén (P) isolated strain lives on decaying prickly pear fruits. The Til Til (TT) population rears on decaying cactus tissue (*Echinopsis chilensis*) I studied mating behaviour of adults of each of the populations in the presence and in absence of flies of the other isolated. Interpopulational differences in mating behaviour could constitute a prezygote isolation barrier, and this restricts gene flux between the populations.

To evaluate the presence of postzygotic barriers between the M, P and TT populations of *D. funebris*, I investigated viability and length of egg-adult development cycle. Thus, I reciprocally crossed the three isolates to obtain F₁ and F₂ generations measuring, in each generation, fitness components above indicated those traits could lead to eliminate the F₁ and F₂ hybrids.

The results indicate that there are substantial differences in mating behaviour between the three populations. These findings suggest that this behaviour could be prezygote barrier between the M, P and TT populations of *D. funebris*. On the other hand, F₁ and F₂ hybrids decreased their viability by comparison with the parent populations. F₁ and F₂ hybrids also show on egg-adult life cycle lengths than those of the parent isolates. Taken together the findings of this Thesis suggest that among the M, P and TT natural population of *D. funebris* there are pre and postzygote barriers that restrict gene flux between them. Thus, the Melipilla, Pelequén and Til Til populations of *D. funebris* should in fact be seen as subspecies.

INTRODUCCIÓN

1.- EL PROBLEMA

La diversidad biológica se genera a través de la formación de especies. Cómo las poblaciones de una especie se diferencian hasta llegar a constituir otras nuevas especies, aún constituye un problema abierto no totalmente comprendido (Kelleher y Barbash, 2010). Una hipótesis en relación con la especiación alopátrida, es que los genes de poblaciones que viven en hábitats contrastantes están sometidos a una fuerte selección divergente, como por ejemplo presiones que resultan de la adaptación a una nueva dieta (Matzkin et al. 2009). Como un subproducto, pueden ocurrir cambios en las frecuencias de otros genes, físicamente adyacentes, pero que están relacionados con aislamiento reproductivo o con otros componentes de la adecuación biológica (Mayr, 2001).

Por otro lado, los modelos genómicos de formación de especies que consideran el flujo de genes como un elemento central (ver por ejemplo a Turner et al., 2005, 2010; White et al., 2010), predicen que durante los primeros estados de la especiación, algunas poblaciones se distinguirán como claramente diferentes, pero otras permanecerán indiferenciadas debido a que entre ellas existe un continuo flujo de genes. Este modelo de formación de especies puede ponerse a prueba con las poblaciones que se estudian en esta Tesis.

La comprensión del proceso de especiación requiere identificar las barreras de aislamiento reproductivo que previenen el flujo de genes entre poblaciones alopátricas (Bono y Markow, 2009). Las barreras de aislamiento precigótico incluyen aquellas que limitan los apareamientos heteroespecíficos a través de incompatibilidades ecológicas, conductuales y /o mecánicas. Las barreras postcigóticas se originan después del apareamiento, pero antes de la formación del cigoto (barreras precigóticas postapareamiento). En contraste, las barreras de aislamiento postcigóticas se expresan en una disminución de la adecuación de los híbridos en relación con la de las poblaciones parentales (Coyne y Orr, 2004). En esta Tesis se investigan barreras de aislamiento reproductivo pre y postcigóticas que presumiblemente podrían ser las responsables del aislamiento genético de las tres poblaciones alopátricas de *Drosophila funebris* (ver más adelante).

2.- CONDUCTA DE APAREAMIENTO

Utilizando como modelo biológico especies de *Drosophila* que pertenecen a un mismo clado, se ha dilucidado el rol de la conducta sexual en la formación de especies y en la mantención de la identidad biológica de cada una. Una conclusión importante es que, en el género *Drosophila*, el flujo de genes entre poblaciones disminuye cuando entre los adultos hay diferencias en conducta de cortejo (Spieth, 1983; Saarikettu, 2004).

El comportamiento de los sexos previo a la cópula, es la parte de la conducta sexual de los adultos de *Drosophila melanogaster* mejor comprendida en relación a la barrera de aislamiento precigótica. Por ejemplo, se conocen los genes involucrados en la conducta de cortejo de los machos (North y Greenspan, 2007). Estos genes son controlados y regulados por otros genes cuyos loci están ubicados en los cromosomas autosómicos y sexuales (Greenspan y Ferveur, 2000; North y Greenspan, 2007). La conducta de cortejo del macho se inicia cuando este se orienta hacia la hembra y la toca con sus patas delanteras. Generalmente, la hembra se aleja y el macho la sigue. Luego la hembra tiende a detenerse permitiendo que el macho lama su genitalia. A continuación, el macho intenta copular doblando su abdomen y sacando hacia delante sus genitales. La conducta de la hembra es menos bizarra. Se compone de elementos que se expresan brevemente e incluye saltos, vibraciones de alas y eyección de la genitalia. Cuando esto ocurre, el macho tiende a aumentar su actividad sexual. La conducta sexual femenina descrita, se interpreta como una aceptación del cortejo masculino.

En el caso de la hembra, los genes involucrados en la conducta sexual son poco conocidos. La mayoría se han relacionado con receptividad sexual. Los genes que se conocen y que afectan la conducta sexual femenina inicialmente se descubrieron por sus efectos en la determinación del sexo. Por ejemplo los genes *transformer* (*tra*) y *transformer-2* (*tra-2*) que cuando mutan, transforman hembras XX en machos

estériles, fenotípicamente similares a machos normales (Ferveur, 2007). La proteína *TRA*, codificada por el gen *tra* además regula las características sexuales secundarias como pigmentación y número de tergitos abdominales. Estos genes son pleiotrópicos y afectan también la conducta sexual masculina. Por ejemplo, están relacionados con duración del cortejo y del periodo de vibración de las alas, así como también con la producción de feromonas.

Otros genes ligados al sexo que también participan en el control de la conducta sexual de machos y hembras de *Drosophila melanogaster* son *sex lethal*, *fruitless* y *doublesex*. En el caso de *fruitless (fru)* que codifica un conjunto de factores de transcripción, sus efectos pleiotrópicos se extienden a la viabilidad de ambos sexos (Billeter et al, 2006). Algunos transcritos de *fru* (llamados colectivamente *Fru M*) son procesados de manera diferente por machos y hembras, pero en ambos casos son regulados por la proteína *transformer*. La expresión de *fru* en las células también es diferente para cada sexo. Por ejemplo, sólo están presentes en el tejido neuronal masculino (Goodwin et al, 2000). Las mutaciones que afectan a *fru* y que se expresan en transcritos *Fru M* alterados, se asocian con cambios en la conducta de cortejo del macho. Por ejemplo, pueden producir homosexualidad, disminuir los intentos de cópula y afectar la transferencia de los machos a las hembras de una diversidad de moléculas proteicas y glucídicas que favorecen la producción de huevos (Lee and Hall, 2001). Por otra parte, también se ha establecido que machos

mutantes *fru* no expresan los correspondientes transcritos. En machos silvestres estos transcritos se expresan en neuronas de la región cefálica llamada “median bundle”. Por otra parte, los machos mutantes copulan más rápido y se saltan etapas del cortejo. Las hembras *fru* expresan conductas sexuales masculinas como orientación y vibración de alas, pero son incapaces de lamer la genitalia femenina y de copular con otras hembras.

3.- AISLAMIENTO ENTRE POBLACIONES

Otros aspectos de la conducta sexual de *Drosophila*, son sus efectos en la evolución del género. Algunas especies han suministrado evidencias para el modelo de especiación alopátrica, ya que cuando adultos de dos o más poblaciones están en un mismo receptáculo, los sexos tienden a cortejar y copular con individuos de su población. Esto es la base del aislamiento sexual precopulatorio, indicando que pueden aparecer nuevas especies como un efecto colateral de la selección sexual.

Las observaciones y experimentos sobre los rituales de cortejo que preceden a la copula en varias especies de *Drosophila*, han demostrado que los machos de cada especie exhiben un patrón de cortejo propio (Koref-Santibáñez, 1963; Spieth, 1974; 1983; Saarikettu, 2004); Además, entre especies y poblaciones pueden existir diferencias cualitativas y/o cuantitativas en los elementos constituyentes del cortejo

(Koref-Santibáñez, 1963; Singh y Hoenigsberg, 2004). Estas diferencias conductuales entre poblaciones terminarían por bloquear el flujo de genes entre ellas.

La aparición de aislamiento reproductivo entre poblaciones, se asocia con la adaptación de los individuos a condiciones ecológicas locales (Dobzhansky, 1937; 1940; Mayr, 1942). En *D. melanogaster*, *Drosophila serrata* y *Drosophila mojavensis*, se estudió el aislamiento y la conducta precopulatorio en líneas isomaternas obtenidas por cruzamientos hermana-hermano y que son formadas con parentales de la misma población. Una vez formadas las líneas, se tomaron conjuntos de adultos de cada una y cada grupo se crío en un alimento diferente por varias generaciones. Al comparar la conducta sexual de los individuos se constató divergencia en conducta de apareamiento entre los grupos de una misma línea, criados, cada grupo, en un alimento distinto (Rundle, 2005; Mas, 2005; Etges, 2006). Basándose en estos y otros hallazgos, las especies del género *Drosophila* han constituido un importante modelo para comprender la aparición de los principales productos de la evolución:

(i) diversidad biológica y (ii) origen de las adaptaciones. Cómo los procesos evolutivos en general son lentos y es muy difícil establecer el momento preciso en que un pool de genes ancestral divergió en dos o más poblaciones, hay que estudiar poblaciones alopátricas en las que se han acumulado diferencias genéticas. Una

manera de constatar la acumulación de estas diferencias genéticas es a través de cruzamientos. Cuando estos se realizan se observa que los híbridos exhiben una adecuación menor que la de las poblaciones parentales. (Ross y Markow, 2006; Reed et al, 2007; Matzkin, 2008).

4.- POBLACIONES DE *D. funebris* DE CHILE

En Chile, tres poblaciones alopátricas de *Drosophila funebris* utilizan como sitios de crianza substratos muy diferentes (ver más adelante), ofreciendo una oportunidad para poner a prueba hipótesis como las indicadas en los primeros párrafos de la presente Introducción. Es decir, establecer si poblaciones naturales de *D. funebris*, adaptadas para vivir en hábitats muy distintos, han acumulado diferencias en conductas relacionadas con el apareamiento y/o con respecto a componentes de la adecuación biológica, como viabilidad y velocidad de desarrollo (Powell, 1997; Barton et al., 2007; Bono y Markow, 2009). Si no se encuentran diferencias, entonces, por ejemplo, podría señalarse al flujo de genes como uno de los factores que podría explicar las semejanzas entre esas tres poblaciones de *D.funebris*.

En esta Tesis examino la conducta de apareamiento de machos y hembras de esas poblaciones alopátricas de *D. funebris*. El estudio incluye comparar la conducta de apareamiento de cada población, la de cada sexo, y al confrontar con el sexo

opuesto de las otras poblaciones.

Así mismo, investigué la viabilidad y velocidad de desarrollo huevo – adulto, de los híbridos F_1 y F_2 obtenidos al cruzar recíprocamente las tres poblaciones, como una manera de evaluar la presencia de mecanismos de aislamiento postcigóticos entre las poblaciones aludidas. De esta manera, se podría conocer si esas poblaciones de *D. funebris* no han divergido o en qué magnitud han divergido. Si los dos tipos de híbridos muestran una viabilidad y una velocidad de desarrollo menor que las de las poblaciones parentales, entonces es una manifestación de divergencia de ellas y de la presencia de mecanismos de aislamiento postcigóticos.

Las poblaciones de *D. funebris* seleccionadas fueron la población Melipilla, 70 km al Oeste de Santiago ($33^{\circ}37'31.28''$ S $71^{\circ} 16'16.19''$ O) constituida por adultos emergidos de zapallo (*Curcubita máxima*) fermentado. La población Pelequén, 130 km al Sur de Santiago ($34^{\circ} 28' S 70^{\circ} 55' O$) fundada con adultos nacidos de cladiolos de tuna fermentada (*Opuntia ficus-indica*) y la población Til-Til, 50 Km. al Noroeste de Santiago ($33^{\circ} 06'$ de latitud y $70^{\circ} 56'$ O) constituida con adultos emergidos de tejido necrótico del cactus *Echinopsis chilensis*. Los tejidos de *E. chilensis* y *O. ficus-indica* difieren en composición química, particularmente azúcares, y las concentraciones de alcoholes volátiles en el tejido necrótico de estas plantas también son diferentes (Fogleman y Danielson, 2001).

Es importante destacar que estudios preliminares de frecuencias de algunos marcadores moleculares de ADN presentes en estas mismas tres poblaciones, realizados en el laboratorio de Citogenética y Genética Poblacional de Vertebrados de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, indican que las poblaciones Melipilla, Pelequén y Til-Til son diferentes, aunque todavía es necesario precisar mejor estas diferencias.

HIPÓTESIS

El cambio evolutivo ha afectado a las poblaciones Melipilla, Pelequén y Til Til de *D. funebris*. Como consecuencia, entre estas poblaciones existen barreras que restringen el libre flujo génico debido a la aparición de mecanismos de aislamiento reproductivo precigóticos y postcigóticos.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar algunos elementos de la conducta sexual de tres poblaciones de *Drosophila funebris*, cada una adaptada, a condiciones ecológicas naturales muy diferentes y examinar algunos componentes de la adecuación biológica como viabilidad y duración del ciclo de desarrollo huevo-adulto.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir y comparar cualitativamente y cuantitativamente los elementos de la conducta de cortejo de machos y hembras de tres poblaciones chilenas de *D. funebris*.
- Analizar las preferencias de apareamiento y estimar el grado de aislamiento reproductivo entre las tres poblaciones.
- Investigar si los híbridos F_1 y F_2 obtenidos al cruzar las tres poblaciones muestran una viabilidad disminuida en relación a los parentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MATERIAL BIOLÓGICO Y MEDIO DE CRIANZA

1.1 POSICION TAXONOMICA DE *D. funebris*

La posición Taxonómica de *Drosophila funebris* (Fabricius, 1787) es la siguiente:

Clase: *Insecta*

Orden: *Diptera*

Suborden: *Cyclorrhapha*

Familia: *Drosophilidae*

Género: *Drosophila*

Grupo: *Funebris*

Especie: *Drosophila funebris*.

2.- LOCALIDADES DE COLECTA

La conducta sexual de los adultos se observó en moscas de *D. funebris* colectadas en Melipilla 70 km al Oeste de Santiago (33°37'31.28" S 71° 16'16.19" O), en Pelequén, 130 Km al Sur de Santiago (34° 28`S 70° 55`O) y en Til Til 50 Km al Noroeste de Santiago (33° 06´ de latitud y 70° 56´ O), entre marzo de 2002 y diciembre de 2003 (Tabla 1. Fig.1). Estos lugares se caracterizan por presentar

condiciones ecológicas muy diferentes (ver más adelante). Por ejemplo, la pluviosidad anual en Til-Til alcanza a 180 mm, mientras en Melipilla es de 280- 350 mm y en Pelequén la lluvia anual alcanza un guarismo de 490 mm. Por otro lado (ver Tabla 1), cada población se cría en un substrato muy diferente. Se sabe que el tipo de alimento ingerido por las larvas, influye en la producción cualitativa y cuantitativa de feromonas (Ferveur, 2007).

Tabla 1.- Localidades de colecta y sitios de crianza de poblaciones de *D. funebris* utilizados en esta Tesis.

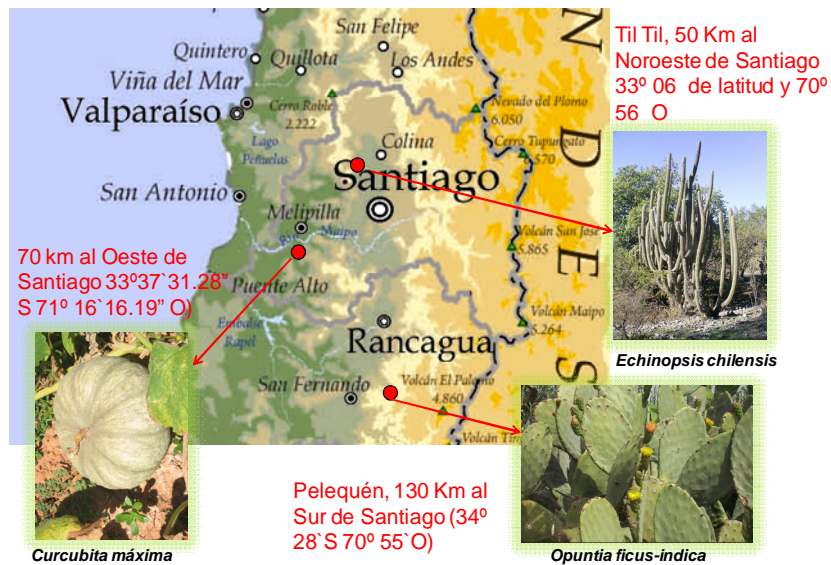
Localidad	Sitio de Crianza*
Pelequén (VI Región)	<i>Opuntia ficus - indica</i> (Tuna)
Melipilla (Región Metropolitana)	<i>Curcubita maxima</i> (Zapallo)
Til-Til (Región Metropolitana)	<i>Echinopsis chilensis</i> (Cactus Columnar)

***Corresponde a tejido o fruta fermentada.**

Los substratos colectados en las localidades indicadas en la Tabla 1, contenían abundantes larvas. Las muestras de tejidos y frutos estaban fermentadas con fuertes olores a alcoholes y a ácido acético. Se colectaron 20 de estos frutos o tejidos y se llevaron al laboratorio donde se depositaron en botellas o cajas convenientemente cubiertas con un trozo de gasa. Una vez emergidos los adultos, se clasificaron

utilizando las claves de Brncic (1957). Alrededor de 20 adultos formaron las correspondientes cepas, pero la proporción de sexos fue variable. Cada cepa se mantuvo durante todos los experimentos en medio de cultivo de Burdick (1954). Este medio tiene la ventaja de no descomponerse a la temperatura a la que se mantuvieron las cepas (ver más adelante).

Figura 1.- Sitios ecológicos donde se crían las poblaciones de *D. funebris* examinadas.



3.- CRIANZA EN EL LABORATORIO

Cada cepa se crió en botellas de vidrio de 250 cc de capacidad, en medio de Burdick (1954); cada botella contiene aproximadamente 50 ml de este medio, cantidad suficiente para mantener una población de 400-500 adultos. Las cepas se mantuvieron por cultivo en masa a 18° C, en cámaras con iluminación constante, en el Laboratorio de Genética y Evolución de la Conducta de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile

La papilla de Burdick tiene la siguiente composición:

Agua destilada	1000 ml.
Sulfato de magnesio	0,7 grs.
Cloruro de potasio	1,2 grs.
Fosfato de potasio	1,2 grs.
Nitrato de sodio	4,2 grs.
Levadura seca	10,0 grs.
Agar-agar	16,0 grs.
Azúcar	43,0 grs.
Sémola	60,0 grs.
Sulfato ferroso	0,125 grs.

Nipagín 12%

12,0 grs.

4.- METODOLOGÍA

4.1.- CEPAS Y CONDICIONES DE CRIANZA

Se conoce que machos y hembras *D. funebris* alcanzan la madurez sexual entre los 7 a 9 días post eclosión de las pupas (Koref-Santibañez y del Solar, 1958).

Se utilizaron individuos vírgenes de 24 horas post emergencia de la carcasa pupal. Estos se anestesiaron con éter. Una vez inmovilizados, se retiraron y separaron hasta 20 individuos de cada sexo en su respectivo tubo de vidrio (10 x 2,5 cm.) rotulado, adicionado con 10 a 12 ml de medio nutritivo de Burdick. Los tubos se mantuvieron a temperatura constante de 18°C, por 7 a 9 días, hasta que los sexos alcanzaron la madurez reproductiva y (Koref-Santibañez y del Solar, 1958). Después de este plazo, se aspiraron los adultos de cada sexo y se utilizaron en los experimentos que se describen más abajo. La actividad de cortejo se observó directamente, con luz y temperatura constante (23 ± 1°C). Las observaciones se realizaron durante 60 minutos, durante la mañana.

4. 2.- CONDUCTAS MEDIDAS

Las conductas sexuales de machos y hembras, se registraron con una grabadora de audio. Adicionalmente, los elementos de cortejo se identificaron, describieron y anotaron también en una planilla de registro (Anexo 1). Estos datos se cuantificaron y analizaron cualitativa y cuantitativamente, aplicando las correspondientes pruebas estadísticas. (Ver resultados)

El tiempo transcurrido desde el momento en que las parejas se colocaron en el tubo de observación hasta el instante que se inició la primera actividad de cortejo, se registró como latencia. En este caso, la latencia representa una medida de la atracción de los sexos.

Se registró también la duración de la copula. Todas las parejas que no copularon durante el periodo de observación (60 min.), se separaron y se dejaron por 3 a 6 días en tubos con medio nutritivo adicionado con crema de levadura. Esta sustancia estimula la copula y oviposición (Koref-Santibáñez 1963; 2001). Posteriormente, se extrajeron las espermatecas de las hembras, para constatar si estaban inseminadas. También se observó si en el medio de cultivo donde se mantuvieron estas parejas, habían huevos y / o larvas.

4. 3.- DISECCIÓN DE GENITALIA Y GONADAS

Se disecaron espermatecas de hembras y genitales externas de machos de las poblaciones Melipilla (M), Pelequén (P) y Til Til (TT), para constatar posibles diferencias morfológicas entre los individuos, las que podrían explicar las diferencias reproductivas descritas en el Capítulo de Resultados. Cada espécimen se colocó en un portaobjeto con gotas de agua destilada y se procedió a su disección; utilizando agujas y pinzas de disección. Esta fase del estudio se realizó bajo microscopio estereoscópico. Las espermatecas y receptáculo ventral de las hembras se limpiaron y depositaron en un portaobjeto. Se observaron bajo microscopio óptico y se registró la presencia de espermios. Las genitales masculinas se disecaron en agua destilada y luego se agregaron gotas de KOH al 10% para ablandar la quitina. Los genitales se montaron en un portaobjeto con gotas de agua destilada y se cubrieron con un cubreobjeto para ser observados y fotografiados.

5.- EXPERIMENTOS

5.1.- CORTEJO

Estos experimentos permitieron comparar la conducta de cortejo de los machos de las poblaciones Melipilla, Pelequén y Til-Til de *D.funnebris* con referencia a: (i) latencia, (ii) componentes del cortejo y (iii) frecuencia de exhibición de cada elemento de cortejo, (por ejemplo: orientación del macho respecto a la hembra, giros del macho alrededor de la hembra, extensión y vibración de alas).

5.1.1.- CRUZAMIENTOS HOMOGÁMICOS (INTRAPOBLACIONALES)

La conducta reproductiva de los sexos frente a individuos de la misma población sirvió como control respecto a la exhibida por los sexos confrontados con el sexo opuesto de las otras poblaciones. Los cruzamientos se muestran en la Tabla 2 (ver más abajo).

Tabla 2.- Cruzamientos entre los sexos homogámicos de cada una de las tres poblaciones de *D. funebris* (Melipilla, M, Pelequén, P, y Til-Til, TT).

HEMBRAS		MACHOS
Melipilla	X	Melipilla
Pelequén	X	Pelequén
Til Til	X	Til Til

Un macho y una hembra virgen de la misma población se depositaron cuidadosamente en un tubo de 10.0 x 2.5 cm (alto x diámetro) y se observó la conducta de cada sexo. Se observaron 60 parejas de cada población. Se registró el tiempo transcurrido desde el momento en que las parejas se colocaron en el tubo de observación hasta el inicio del cortejo (latencia). Se observó simultáneamente la actividad de cortejo de 6 parejas, cada una en su respectivo tubo, por una hora. Se examinó el cortejo de los machos, describiéndolo

cuantitativamente, y la conducta de las hembras de cada población. Los datos se analizaron estadísticamente utilizando pruebas de contingencia como Chi cuadrado. Los datos referente a duración de los elementos medidos y latencia se evaluaron aplicando ANOVA (ver Capítulo de Resultados).

En las parejas que copularon se registro la duración de la copula (min). Las parejas que no copularon se dejaron por 3-6 días a 18°C, tiempo suficiente para que haya cópula. Luego se disecaron y observaron las espermatecas de las hembras para constatar si fueron inseminadas.

5.2.- CRUZAMIENTOS HETEROGÁMICOS (INTERPOBLACIONALES)

Estos experimentos están dirigidos a evaluar los cambios en conducta de cortejo de los sexos de las poblaciones Melipilla (M), Pelequén, (P) y Til-Til (TT), en presencia de adultos de sexo opuesto de las otras dos poblaciones.

Tabla 3.- Cruzamientos recíprocos y heterogámicos realizados entre los sexos de las poblaciones M, P y TT de *D. funebris*.

HEMBRAS		MACHOS
Melipilla	X	Pelequén
Pelequén	X	Melipilla
Melipilla	X	Til Til
Til Til	X	Melipilla
Til-Til	X	Pelequén
Pelequén	X	Til Til

Siguiendo el procedimiento descrito en los cruces homogámicos (Tabla 2), se confrontó un macho de una de las tres poblaciones con una hembra de las otras dos. Se observaron 60 parejas para cada combinación (ver Tabla 3). Las parejas que no copularon se dejaron por 3-6 días en tubos con medio alimenticio adicionado con crema de levadura y después de este tiempo se examinaron las hembras para constatar inseminación.

5.3.- ELECCIÓN MÚLTIPLE

Estos experimentos se realizaron para conocer las preferencias de los sexos por individuos de sexo opuesto de la misma población, cuando tuvieron que escoger entre individuos de su población en presencia de otros de otra población.

Tabla 4.- Cruzamientos realizados para conocer las preferencias de los sexos de una de las tres poblaciones por otros de la misma población, en presencia de individuos de las otras poblaciones.

5 parejas Melipilla *	X	5 parejas Til Til
5 parejas Til Til *	X	5 parejas Melipilla
5 parejas Melipilla *	X	5 parejas Pelequén
5 parejas Pelequén *	X	5 parejas Melipilla
5 parejas Pelequén *	X	5 parejas Til Til
5 parejas Til Til *	X	5 parejas Pelequén

(*) Indica el sexo y población donde se aplico la marca de pintura.

Para realizar estos experimentos, se utilizaron cámaras de observación como las descritas por Ellens y Wattiaux (1964). A cada caja se introdujeron 5 parejas de una de las tres poblaciones y 5 parejas de otra de las dos poblaciones restantes

(Tabla 4). Se realizaron 5 réplicas por cada tipo de cruzamiento. Se registró la latencia (min) para cada pareja y se registró a qué tipo de hembra cortejaba el macho de una determinada población. Se registró también la receptividad de las hembras hacia machos de su misma y de otra población.

Para distinguir a los individuos de cada cepa (Melipilla, Pelequén y Til-Til) se pintó el dorso del tórax de cada sexo con una gota de pintura plateada. La pintura se aplicó en el momento de coleccionar vírgenes. Con el objeto de descartar el efecto de la pintura en la preferencia de los sexos por una u otra pareja, la mitad de las réplicas tenían los machos de una población con el tórax pintado y la otra mitad tenían las hembras de la misma población con la pintura plateada. Es decir, las cópulas entre moscas de una misma población se registraron entre individuos pintados y las cópulas de poblaciones diferentes con solo un individuo pintado, que podría haber sido macho o hembra.

Con los datos de cortejo y cópulas se calculó un índice de aislamiento reproductivo (Dodd, 1989). Con este objeto, se contabilizó el número de parejas que se aparearon distinguiendo entre apareamiento intra e interpoblacional. Luego se aplicó la siguiente fórmula (Dodd, 1989):

$$I = \frac{\text{Apareamientos intrapoblacionales} - \text{apareamiento interpoblacionales}}{\text{Total de apareamientos (N)}}$$

$$ES \text{ de } I = \sqrt{(1 - I^2) / N}$$

Los rangos de aislamiento van de -1 a $+1$. Un valor cercano o igual a cero indica apareamiento fortuito, es decir ausencia de aislamiento (Stalker, 1942). Valores cercanos o iguales a $+1$, indican que el macho insemina de preferencia hembras de su misma población, denotando aislamiento sexual. El índice adquiere valores negativos cuando los machos han inseminado una mayor proporción de hembras de la otra población.

6.- VIABILIDAD DE LAS GENERACIONES F_1 Y F_2

Con el objeto de estudiar la viabilidad de los híbridos F_1 y F_2 , obtenidos al cruzar las poblaciones M, P y TT en todas las combinaciones posibles. Cinco machos y 5 hembras de cada una de estas poblaciones se cruzaron recíprocamente dentro de un tubo como los descritos al comienzo de este Capítulo (Tabla 2). Cada tubo contenía medio de Burdick en cantidad suficiente para criar al menos 100 larvas. Se realizaron 10 réplicas por cada tipo de cruce. Las

parejas permanecieron en sus tubos por 72 horas. Al cabo de este tiempo se contó el número de huevos dejados por las hembras en cada tubo. Aquellos que contenían huevos se incubaron a 18°C hasta la aparición de adultos F_1 y se contó el número de machos y hembras. Luego se escogieron al azar 5 parejas F_1 para obtener la F_2 . Los huevos dejados por las hembras se trataron de la misma manera que los de la F_1 y se contó el número de adultos F_2 emergidos.

7.- ANALISIS ESTADÍSTICOS

Los datos registrados en las diferentes pruebas se evaluaron estadísticamente utilizando el programa estadístico **GraphPad Prism**. Los datos referente a duración de los elementos medidos y latencia se evaluaron aplicando ANOVA de dos vías, con pruebas de ajuste Bonferroni y Scheffe y pruebas *t*. (capitulo de Resultado).

RESULTADOS

1.- CONDUCTA REPRODUCTIVA EN LAS POBLACIONES DE MELIPILLA (M), PELEQUÉN (P) Y TIL TIL (TT) DE *D. funebris*.

1.1.- CONDUCTA DE APAREAMIENTO.

La conducta de cortejo de los machos Melipilla, Pelequén y Til Til, frente a las hembras de las respectivas poblaciones es similar. Se inicia cuando el macho se dirige hacia la hembra. Esta permanece detenida o corre. Si se retira, el macho corre tras ella vibrando las alas, o realizando movimientos de tijereteo. El macho se coloca a milímetros de distancia de la cabeza de la hembra detenida y toca ligeramente con su primer par de patas, las antenas, las alas u otras partes del cuerpo de la hembra. A continuación, el macho realiza movimientos circulares de 180° alrededor de la hembra o giros de 360°. Los movimientos circulares cesan cuando el macho se ubica al frente o al lado de la hembra. Luego, el macho puede mover su abdomen, tocar con sus patas la anatomía femenina, vibrar las alas o realizar movimientos de tijereteo. Si permanece detenida, el macho dirige su atención a la región abdominal de la hembra, extiende su probóscide y lame los órganos genitales de ella, intentando abrir y levantar las alas de la hembra. Si la hembra no está receptiva, corre o pateo al macho con sus patas posteriores; también puede golpear la región facial del macho cortejante y cerrar sus alas.

Cuando la hembra está receptiva, realiza movimientos de tijereteo, extiende las alas y baja su abdomen. El macho la monta apoyando sus patas en la zona posterior lateral del abdomen de la hembra iniciando la cópula. En este momento la hembra puede tijeretear sus alas por unos pocos segundos. Durante la cópula la pareja permanece inmóvil. Ocasionalmente la hembra puede realizar caminatas cortas. Al final de la cópula, la hembra se activa y comienza a patear al macho hasta separarse de él. Una vez separados, cada sexo frota su tercer par de patas y con estas también su genitalia. Con frecuencia, el macho hace unos pocos y rápidos movimientos de vibración de alas y puede tocar a la hembra con su primer par de patas. Esta mueve sus alas y las cierra, impidiendo que el macho lama su genitalia. El macho puede seguir cortejando otras hembras o desistir.

2.-ASPECTOS CUANTITATIVOS DE LA CONDUCTA REPRODUCTIVA DE

D. funebris

2.1.- MACHOS

Tabla 5.- Número y porcentaje de cortejos y cópulas entre parejas procedentes de las poblaciones de Melipilla (M), Pelequén (P) y Til Til (TT) de *D. funebris*. Latencia de inicio del cortejo y duración de la cópula ($\bar{x} \pm ES$).

Cruzamientos		Nº de parejas				
Intrapoblacionales		Con cortejo	Latencia (min.)	Parejas que copulan		Duración cópula (min.)
♀	♂	Nº		Nº	%	
M	x M	60	3,89 ± 0,58	37	61,66	20,243 ± 0,78
P	x P	60	3,41 ± 0,36	33	55,00	20,272 ± 0,59
TT	x TT	60	3,25 ± 0,34	40	66,66	19,625 ± 0,90

La Tabla 5 indica que en condiciones de laboratorio, el 100% de los machos examinados de las poblaciones Melipilla, Pelequén y Til Til cortejan a sus hembras. Sin embargo, las copulas fluctúan entre un 55% (Pelequén) y un 67% (Til Til). Es decir, no copulan todos los machos que cortejan.

El tiempo que transcurre desde el momento en que machos y hembras se ponen en contacto hasta la aparición del primer elemento de cortejo (latencia), es similar en las tres poblaciones (M, P y TT; Tabla 5, ANOVA de dos vías). El promedio de duración de la cópula también es similar.

Tabla 6.- Eventos por elemento de cortejo en machos de Melipilla (M), Pelequén (P) y Til Til (TT) de *D. funebris*.

Elemento de cortejo	Población		
	Melipilla	Pelequén	Til Til
Orientación	3,63 ± 0,39	2,85 ± 0,22	3,48 ± 0,31
Mov Circulares	3,70 ± 1,08	4,43 ± 1,70	1,87 ± 0,38
Toque	3,80 ± 0,44	3,05 ± 0,40	4,72 ± 0,65
Vibración de alas	12,82 ± 2,45	8,73 ± 1,58	16,85 ± 2,49
Tijereteos	3,87 ± 1,03	2,08 ± 0,31	2,72 ± 0,52
Seguimiento	4,28 ± 0,77	4,20 ± 0,57	5,42 ± 1,34
Movimiento Abdominales	4,58 ± 1,44	2,37 ± 0,70	1,50 ± 0,31
Lamido genitalia femenina	2,73 ± 0,60	2,90 ± 0,87	3,88 ± 0,61
Cópula	0,62 ± 0,06	0,55 ± 0,06	0,66 ± 0,006

*Valores en rojo indican diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones estudiadas (P<0.05; ANOVA)

La Tabla 6 muestra que los machos Melipilla (**M**) Pelequén (**P**) y Til Til (**TT**) de *D. funebris* difieren en la frecuencia con que utilizan algunos elementos del cortejo. Por ejemplo, comparados con los machos **P**, los machos **TT** vibran las alas con mayor frecuencia ($F_{2,146} = 9.37$; $p < 0.05$) (Fig. 2). La vibración del ala es importante en el reconocimiento de pareja (Ferveur, 2007).

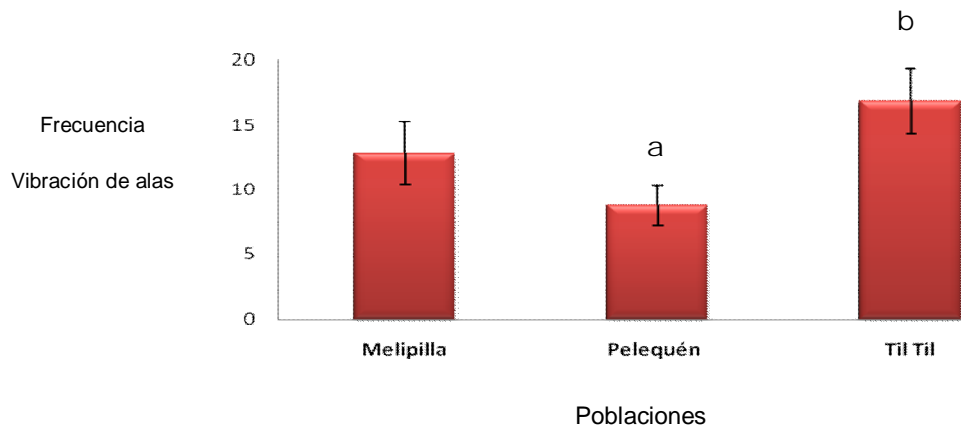


Figura 2.- Número promedio ($\bar{x} \pm ES$) de vibraciones de alas exhibidas por machos Melipilla, Pelequén y Til Til. N = 60 parejas por población. a y b, representan la significancia estadística de las medidas $P < 0,05$.

2.2.- HEMBRAS

Tabla 7.- Número promedio ($\bar{x} \pm ES$) de elementos de la conducta reproductiva de las hembras de las poblaciones Melipilla (M), Pelequén (P) y Til Til (TT) de *D. funebris*, cuando son cortejadas por machos de sus respectivas poblaciones.

Elemento de Conducta Femeninas	Población		
	Melipilla	Pelequén	Til Til
Parada	3,07 ± 0,41	2,08 ± 0,22	2,67 ± 0,30
Patear	2,40 ± 0,64	2,23 ± 0,87	2,68 ± 0,54
Correr	3,43 ± 0,55	2,70 ± 0,30	3,50 ± 0,69
Mov. Abdomen	1,12 ± 0,37	0,53 ± 0,14	0,48 ± 0,12
Toque	2,03 ± 0,33	2,03 ± 0,30	2,25 ± 0,27
Tijeretear	2,31 ± 0,44	2,05 ± 0,24	3,55 ± 0,51
abre alas	1,43 ± 0,20	1,48 ± 0,23	2,00 ± 0,29
cierra alas	0,50 ± 0,11	0,40 ± 0,13	0,55 ± 0,12

* Valores en rojo indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$; ANOVA)

La Tabla 7 indica que las hembras **M**, **P** y **TT** tienen una conducta parecida frente a los machos de sus respectivas poblaciones, con excepción de las hembras **TT** que utilizan el tijereteo de alas con mayor frecuencia que las hembras **P** (Fig. 3)

($F_{2, 177} = 3.71$; $p < 0.05$)

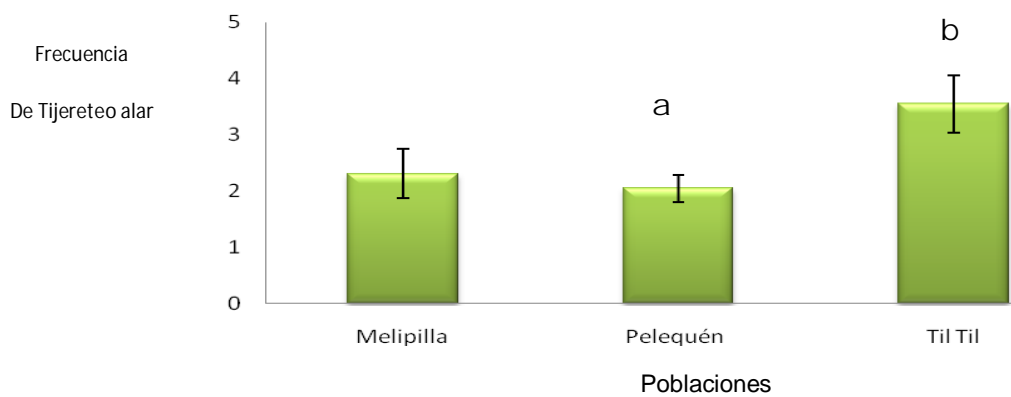


Figura 3.- Promedio ($\bar{x} \pm ES$) de uso del tijereteo alar por las hembras Melipilla, Pelequén y Til Til (N = 60 parejas). a y b, representan la significancia estadística de las medidas. Letras distintas $P < 0,05$.

3.- CONDUCTA FRENTE A LOS INDIVIDUOS DE LAS OTRAS POBLACIONES.

3.1.- MACHOS

Tabla 8.- Tiempo de inicio del cortejo (min; latencia), porcentaje y duración de las cópulas de machos Melipilla, Pelequén y Til Til confrontados a hembras de las otras poblaciones. Se indica el porcentaje de hembras inseminadas posterior al periodo de observación. Las observaciones se realizaron continuamente por 60 min. (N= 60 parejas).

Tipo de pareja	Latencia (min)	Machos cortejando		Parejas copulando		Duración cópula (min)	Hembras inseminadas	
		Nº	%	Nº	%		Nº	%
♀ M x ♂ TT	15,94 ± 1,99	48	80,00	24	40,00	13,54 ± 0,35	36	100,00
♀ TT x ♂ M	13,70 ± 1,63	54	90,00	32	53,33	13,22 ± 0,40	28	100,00
♀ P x ♂ TT	19,90 ± 2,65	41	68,33	21	35,00	14,90 ± 0,31	38	98,33
♀ TT x ♂ P	18,16 ± 2,21	38	63,33	12	20,00	14,92 ± 0,43	46	100,00
♀ P x ♂ M	19,04 ± 2,05	46	76,66	23	38,33	14,87 ± 0,39	37	100,00
♀ M x ♂ P	18,00 ± 1,95	43	71,66	18	30,00	15,44 ± 0,25	42	100,00

La Tabla 8 muestra el tiempo promedio de inicio del cortejo (latencia), el número y porcentaje de machos **M**, **P** y **TT** que cortejan y copulan en los cruces heterogámicos. Por comparación con los cruzamientos intrapoblación (Tabla 5), se

observa que la actividad sexual, disminuye entre 50 y 30%. También disminuye la duración y número de cópulas Melipilla ($F_{2, 89} = 39,27; p < 0.05$), Pelequén ($F_{2, 60} = 28.79; p < 0.05$), Til Til ($F_{2, 82} = 19,24 ;p < 0.05$)

3.1.1.- MACHOS MELIPILLA (M)

Tabla 9.- Conducta de cortejo de machos Melipilla (M) frente a hembras intra e interpoblaciones M, P y TT. Se examinaron N= 60 parejas por tipo de hembra.

Elemento de cortejo	♀M x ♂M (control)	♀TT x ♂ M	♀P x ♂M
Orientación	3,63 ± 0,39	1,79 ± 0,14	1,65 ± 0,14
Mov Circulares	3,70 ± 1,08	2,98 ± 0,90	1,59± 0,42
Toque	3,80 ± 0,44	3,72 ± 0,49	3,74 ± 0,57
Vibración alas	12,82 ± 2,45	14,37 ± 2,56	10,09 ± 1,82
Tijereteos	3,87 ± 1,03	1,28 ± 0,28	1,85 ± 0,29
Seguimiento	4,28 ± 0,77	2,63± 0,55	4,02± 0,93
Movimientos Abdominales	4,58 ± 1,44	2,54 ± 0,51	2,69 ± 0,56
Lamido genitalia femenina	2,73 ± 0,60	3,77 ± 0,71	3,67 ± 0,75
Monta	0,62 ± 0,06	0,59 ± 0,07	0,50 ± 0,07

* Valores en rojo indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$; ANOVA)

La Tabla 9 resume la conducta de cortejo de los machos **M** frente a hembras de su población y a las de Pelequén y Til Til. Los machos **M** disminuyen la actividad de cortejo y la frecuencia de elementos como movimientos circulares y tijereteos

frente a la hembras **P** y **TT** ($F_{2,157} = 3.97; p < 0.05$). La prueba de Bonferroni y Scheffe, realizadas confirman que la principal contribución a la varianza corresponde a las diferencias de movimientos de vibraciones alares y tijereteos (Fig.3) entre machos **TT** y hembras **M**.

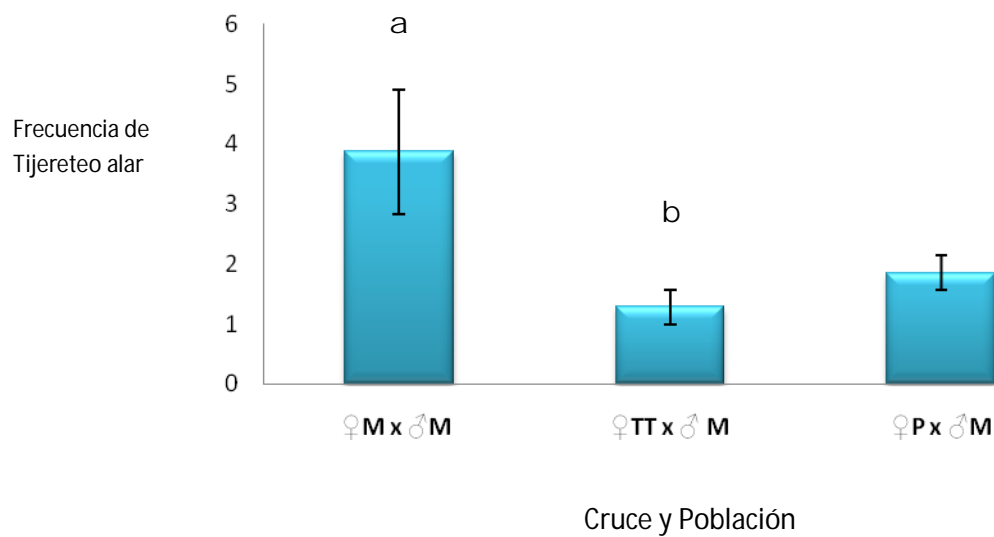


Figura 4.- Promedio ($\bar{x} \pm ES$) de uso del tijereteo alar por machos Melipilla, frente a hembras Melipilla, Pelequén y Til Til. a y b, representan la significancia estadística de las medidas. Letras distintas $P < 0,05$.

3.1.2.- MACHOS PELEQUÉN (P)

Tabla 10.- Conducta de cortejo de machos Pelequén (P) frente a hembras, Pelequén (P), Til Til (TT) y Melipilla (M), de *D. funebris*. N = 60 parejas.

Elemento de cortejo	♀P x ♂P (control)	♀TT x ♂P	♀M x ♂P
Orientación	2,85 ± 0,22	2,00 ± 0,18	1,63 ± 0,13
Mov Circulares	4,43 ± 1,70	0,97± 0,23	1,09± 0,31
Toque	3,05 ± 0,40	3,16 ± 0,48	2,72 ± 0,36
Vibra ala	8,73 ± 1,58	6,29 ± 1,64	6,16 ± 1,01
Tijereteos	2,08 ± 0,31	1,50± 0,42	1,56± 0,24
Seguimiento	2,37 ± 0,70	1,24 ± 0,39	1,02 ± 0,34
Movimientos Abdominales	2,37 ± 0,70	1,24 ± 0,39	1,02 ± 0,34
Lamido genitalia Femenina	2,90 ± 0,87	2,16 ± 0,66	3,14 ± 0,69
Monta	0,55 ± 0,06	0,32 ± 0,08	0,42 ± 0,08

En contraste con los machos **M** (Tabla 9), los machos **P** no cambian su conducta de cortejo frente a hembras, **TT** y **M** (Tabla 10).

3.1.3.-MACHOS TIL TIL (TT)

Tabla 11.- Conducta de cortejo de machos Til Til (TT) frente a hembras Til Til (TT), Melipilla (M) y Pelequén (P), de *D.funnebris*. N=60 parejas.

Elemento de cortejo	♀TT x ♂ TT (control)	♀M x ♂ TT	♀P x ♂TT
Orientación	3,48 ± 0,31	2,17 ± 0,22	1,51 ± 0,12
Mov Circulares	1,87 ± 0,38	1,06 ± 0,25	0,32 ± 0,13
Toque	4,72 ± 0,65	2,92± 0,31	2,68± 0,32
Vibración alas	16,85 ± 2,49	11,40 ± 1,63	4,56 ± 0,73
Tijereteos	2,72 ± 0,52	0,81 ± 0,13	1,02 ± 0,19
Seguimiento	5,42 ± 1,34	2,54 ± 1,25	1,85 ± 0,29
Movimientos Abdomen	1,50 ± 0,31	0,40 ± 0,10	0,46 ± 0,13
Lamido genitalia femenina	3,88 ± 0,61	3,52 ± 0,59	1,66 ± 0,32
Monta	0,66 ± 0,06	0,50 ± 0,08	0,51 ± 0,08

* Valores en rojo indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$; ANOVA)

Una conducta de cortejo muy diferente a la de machos **M** y **P**, es la que exhiben los machos **TT** frente a hembras **M** y **P** (Tabla 11). Por ejemplo, los machos **TT**, disminuyen la proporción de orientaciones frente a las hembras **M** y **P**, los movimientos circulares alrededor de las hembras ($F_{2,148} = 6,25$; $p < 0.05$), el número de toques ($F_{2,148} = 5.15$; $p < 0.05$), el tijereteo ($F_{2,148} = 8.14$; $p < 0.05$), y siguen y mueven su abdomen sustantivamente menos que frente a hembras **TT** ($F_{2,148} = 7.81$; $p < 0.05$).

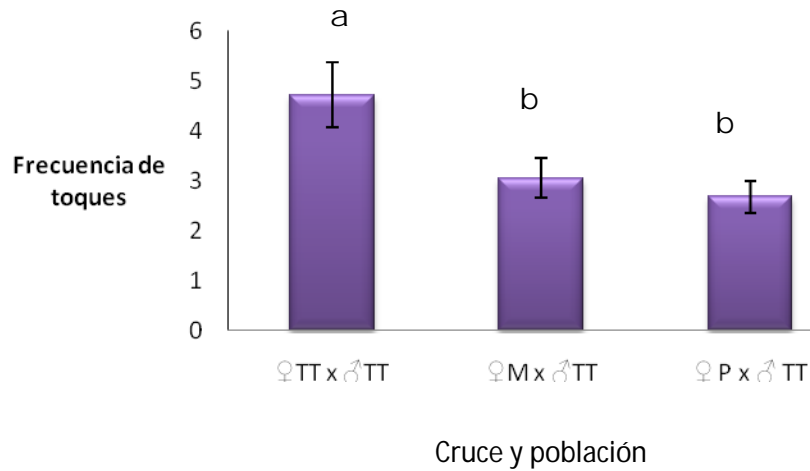


Figura 5.- Promedio ($\bar{x} \pm ES$) de Toques realizados por los machos Til Til, frente a hembras Melipilla y Pelequén. a y b, representan la significancia estadística de las medidas. Letras iguales $P > 0.05$, letras distintas $P < 0,05$.

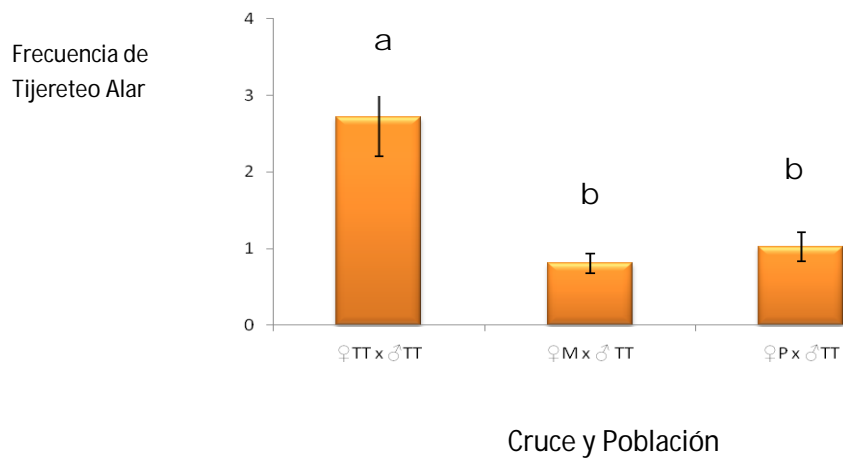


Figura 6.- Promedio ($\bar{x} \pm ES$) de tijereteos alares por machos Til Til, frente a hembras Melipilla y Pelequén. a y b, representan la significancia estadística de las medidas. Letras iguales $P > 0.05$, letras distintas $P < 0,05$.

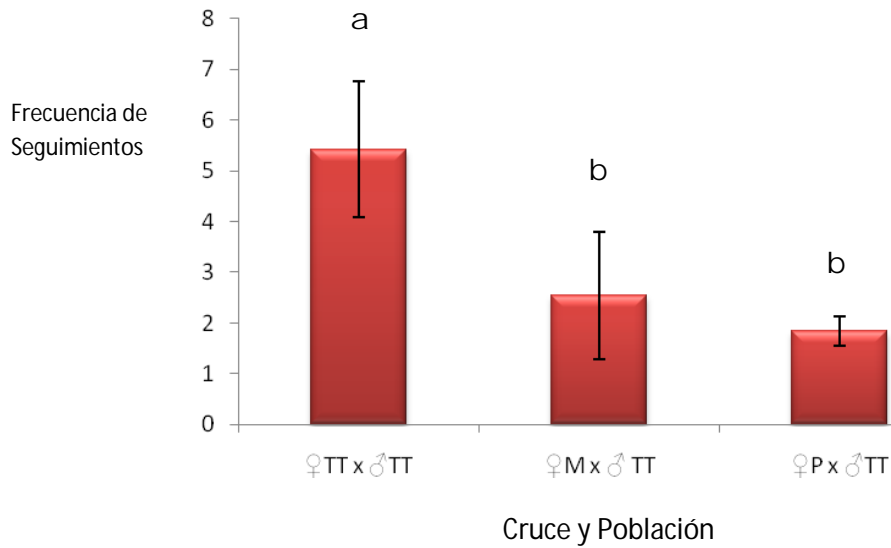


Figura 7.- Promedio ($\bar{x} \pm ES$) de seguimientos por machos Til Til, frente a hembras Melipilla y Pelequén. a y b, representan la significancia estadística de las medidas. Letras iguales $P > 0.05$, letras distintas $P < 0,05$.

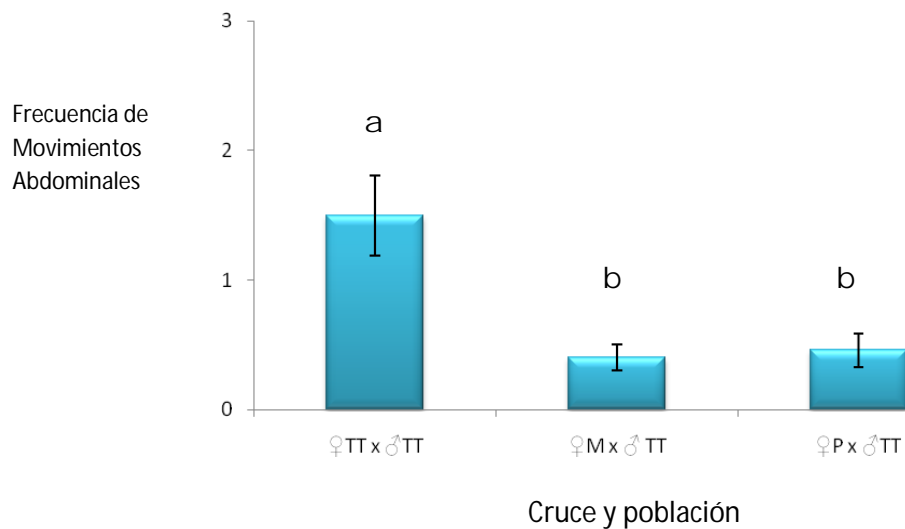


Figura 8.- Promedio ($\bar{x} \pm ES$) de movimientos abdominales por machos Til Til, frente a hembras Melipilla y Pelequén. a y b, representan la significancia estadística de las medidas. Letras iguales $P > 0.05$, letras distintas $P < 0,05$.

3.2.- HEMBRAS

3.2.1.- HEMBRAS MELIPILLA (M)

Tabla 12.- Conducta de apareamiento de hembras Melipilla (M) frente a machos Til Til (TT) y Pelequén (P), de *D. funebris*.

Elemento de cortejo	♀M x ♂ M (control)	♀M x ♂ TT	♀M x ♂ P
Parada	3,07 ± 0,41	2,20 ± 0,21	1,93 ± 0,24
Patear	2,40 ± 0,64	3,38 ± 0,73	2,10 ± 0,36
Correr	3,43 ± 0,55	2,33 ± 0,65	2,13 ± 0,30
Mov. Abdomen	1,12 ± 0,37	0,22 ± 0,09	0,08 ± 0,04
Toque	2,03 ± 0,33	0,63 ± 0,12	1,42 ± 0,19
Tijeretear	2,31 ± 0,44	0,95 ± 0,19	1,22 ± 0,24
abre alas	1,43 ± 0,20	0,90 ± 0,18	0,67 ± 0,16
cierra alas	0,50 ± 0,11	0,18 ± 0,08	0,10 ± 0,05

* Valores en rojo indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$; ANOVA)

A diferencia de los machos de su población, las hembras **M** discriminan a machos **TT** y **P** (Tabla 12). Por ejemplo, ellas tocan menos a los machos **TT** y **P** que a los machos **M** ($F_{2,179} = 9.13$; $p < 0.05$), así como también mueven menos su abdomen ($F_{2,179} = 6.34$; $p < 0.05$), tijeretean menos ($F_{2,177}$; $p < 0.05$) y abren y cierran las alas en menor proporción ($F_{2,179} = 4.78$; $p < 0.05$).

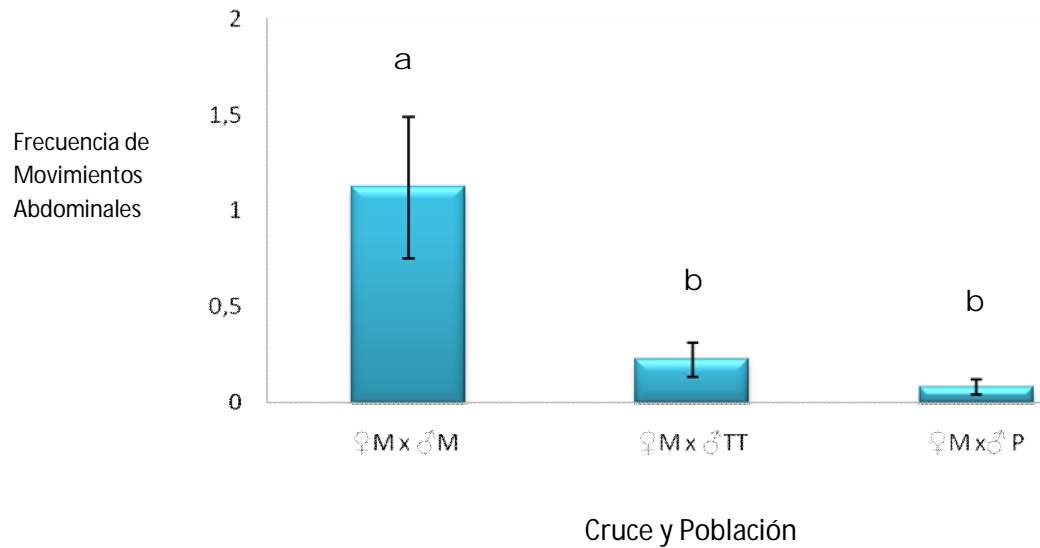


Figura 9.- Promedio ($\bar{x} \pm ES$) de movimientos abdominales por hembras Melipilla frente a machos Pelequén y Til Til. a y b, representan la significancia estadística de las medidas. Letras iguales $P > 0.05$, letras distintas $P < 0.05$.

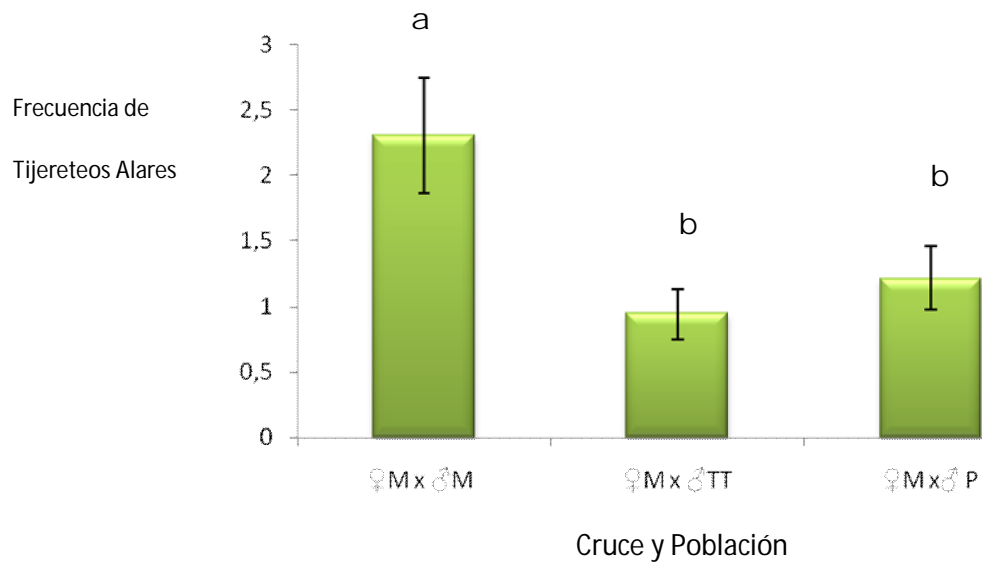


Figura 10.- Promedio ($\bar{x} \pm ES$) de tijereteos alares de hembras Melipilla frente a machos Pelequén y Til Til. a y b, representan la significancia estadística de las medidas. Letras iguales $P > 0.05$, letras distintas $P < 0.05$.

3.2.2.- HEMBRAS PELEQUÉN (P)

Tabla 13.- Conducta de apareamiento de hembras Pelequén frente a machos Til Til (TT) y Melipilla (M), de *D. funebris*

Elemento de cortejo	♀P x ♂ P (control)	♀P x ♂ TT	♀P x ♂ M
Parada	2,08 ± 0,22	1,52 ± 0,21	3,03 ± 0,50
Patear	2,23 ± 0,87	1,37 ± 0,27	3,03 ± 0,67
Correr	2,70 ± 0,30	1,85 ± 0,27	3,90 ± 0,79
Mov. Abdomen	0,53 ± 0,14	0,20 ± 0,07	0,33 ± 0,11
Toque	2,03 ± 0,30	1,02 ± 0,17	1,00 ± 0,16
tijereteo	2,05 ± 0,24	0,87 ± 0,17	1,42 ± 0,32
abre alas	1,48 ± 0,23	0,45 ± 0,11	1,02 ± 0,23
cierra alas	0,40 ± 0,13	0,05 ± 0,04	0,22 ± 0,07

*Valores en rojo indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$; ANOVA)

Resultados comparables a la conducta de las hembras Melipilla (**M**) (Tabla 12) se obtuvieron con las hembras Pelequén (**P**) (Tabla 13), Estas hembras también disminuyen la proporción de toques a los machos **M** y **TT** ($F_{2,179} = 7.28$; $p < 0.05$) (fig. 11). La menor actividad de las hembras Pelequén (P) es frente a machos Til Til (TT). Por ejemplo, disminuyen el tijereteo ($F_{2,179} = 5,52$; $p < 0.05$), y la apertura ($F_{2,179} = 6.89$; $p < 0.05$) y cierre de alas ($F_{2,179} = 4.20$; $p < 0.05$).

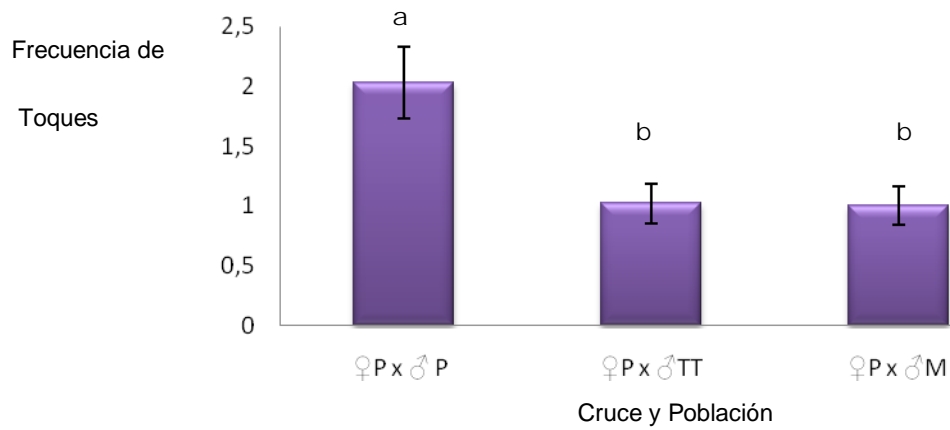


Figura 11.- Promedio ($\bar{x} \pm ES$) de toques de hembras Pelequén frente a machos Melipilla y Til Til. a y b, representan la significancia estadística de las medidas. Letras iguales $P > 0.05$, letras distintas $P < 0.05$.

3.2.3.- HEMBRAS TIL TIL (TT)

Tabla 14.- Conducta de apareamiento de hembras Til Til (TT) frente a machos Melipilla (M) y Pelequén (P), todos de *D. funebris*.

Elemento de cortejo	♀TT x ♂ TT (control)	♀M x ♂ TT	♀P x ♂TT
Parada	2,67 ± 0,30	2,25± 0,24	2,23 ± 0,35
Patear	2,68 ± 0,54	4,95 ± 1,31	1,98 ± 0,45
Correr	3,50 ± 0,69	3,12 ± 0,88	2,75 ± 0,44
Mov. Abdomen	0,48 ± 0,12	1,05 ± 0,27	0,52 ± 0,15
Toque	2,25 ± 0,27	1,37 ± 0,19	0,95 ± 0,17
Tijeretear	3,55± 0,51	1,97 ± 0,44	0,87 ± 0,19
abre alas	2,00 ± 0,29	1,37 ± 0,26	0,45 ± 0,10
cierra alas	0,55 ± 0,12	0,28 ± 0,09	0,12 ± 0,05

*Valores en rojo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$; ANOVA)

La Tabla 14 resume la conducta previa a la cópula de las hembras **TT** frente a machos de su población y machos **M** y **P**. Claramente, las hembras **TT** al ser cortejadas por machos **P** y **M** modifican sustantivamente algunos elementos de conducta. Por ejemplo, Tocan ($F_{2,179} = 9.87$; $p < 0.05$) (Fig. 12) y tijeretean sus alas con menor ($F_{2,179} = 10.98$; $p < 0.05$) (Fig. 12).

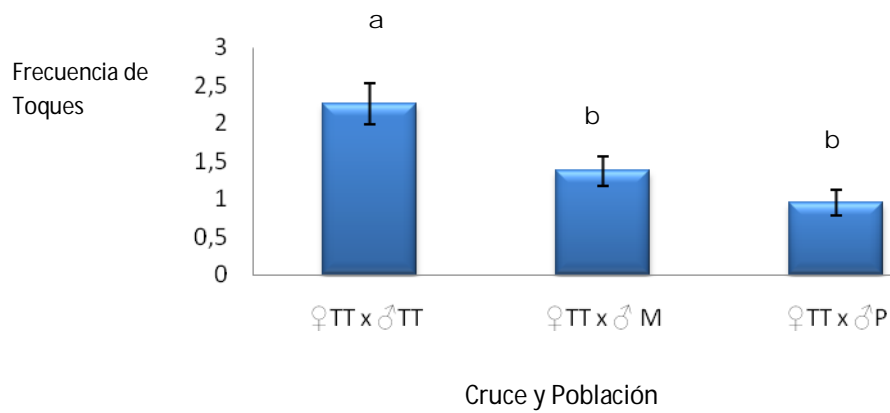


Figura 12.- Promedio ($\bar{x} \pm ES$) de toques de hembras Til Til frente a machos Melipilla y Pelequén. a y b, representan la significancia estadística de las medidas. Letras iguales $P > 0.05$, letras distintas $P < 0.05$.

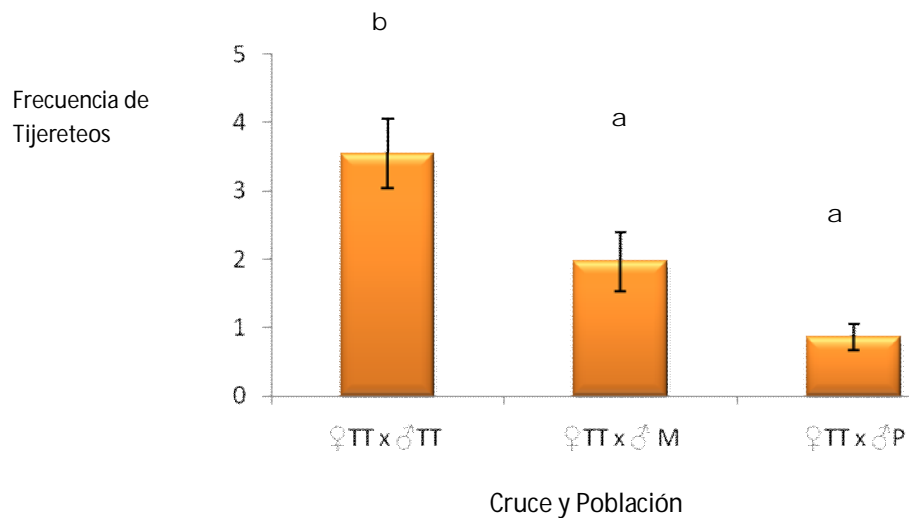


Figura 13.- Promedio ($\bar{x} \pm ES$) de tijeos de hembras Til Til frente a machos Melipilla y Pelequén. a y b, representan la significancia estadística de las medidas. Letras iguales $P > 0.05$, letras distintas $P < 0.05$.

4.- DURACIÓN DE LA CÓPULA

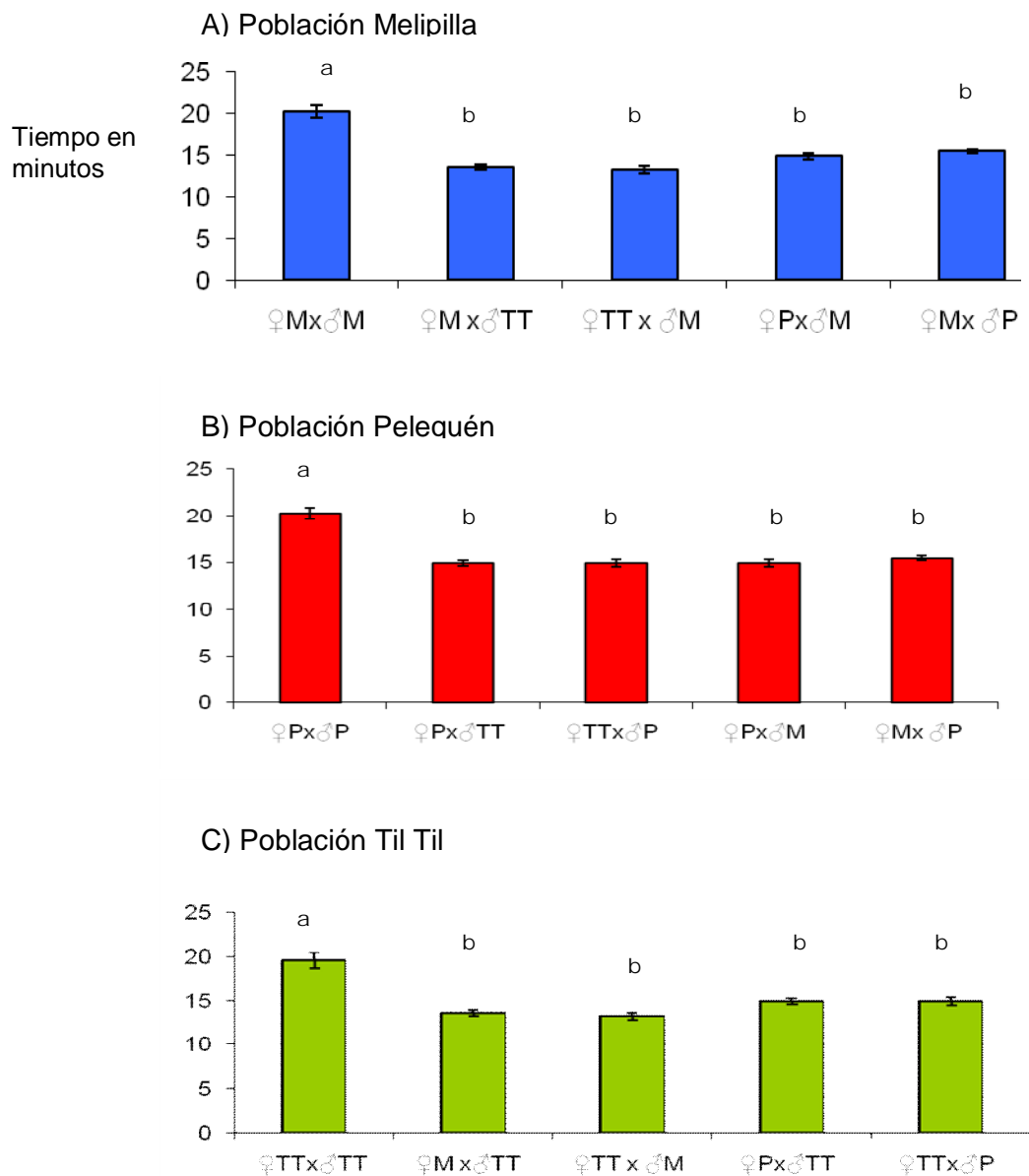


Figura 14.- A, B y C.- Duración promedio de la cópula en los cruzamientos dentro y entre las poblaciones Melipilla, Pelequén y Til Til de *D. funebris*. a y b, representan la significancia estadística de las medidas. Letras iguales $P > 0.05$, letras distintas $P < 0.05$.

La Fig. 14.- A, B y C, muestra la duración de la cópula en las poblaciones Melipilla, Pelequén y Til Til (controles) y en los cruzamientos recíprocos interpoblacionales. La duración de la cópula entre machos y hembras de las diferentes poblaciones, es estadísticamente menor que aquella entre los sexos de la misma población, machos **M** frente a hembras **P** y **TT** ($F_{2,91}= 39.27; p < 0.05$), copulas intrapoblacionales de **TT** ($F_{2,84}= 19,24; p < 0.05$) y de **P** ($F_{2,74}=28,79; p < 0.05$). Es interesante constatar que en las tres poblaciones la duración de la cópula es de alrededor de 20 minutos (Tabla 5), pero en los cruzamientos interpoblaciones es aproximadamente 14 minutos (Tabla 8), es decir, la duración de la cópula disminuye en un 30 %.

5.- LATENCIA

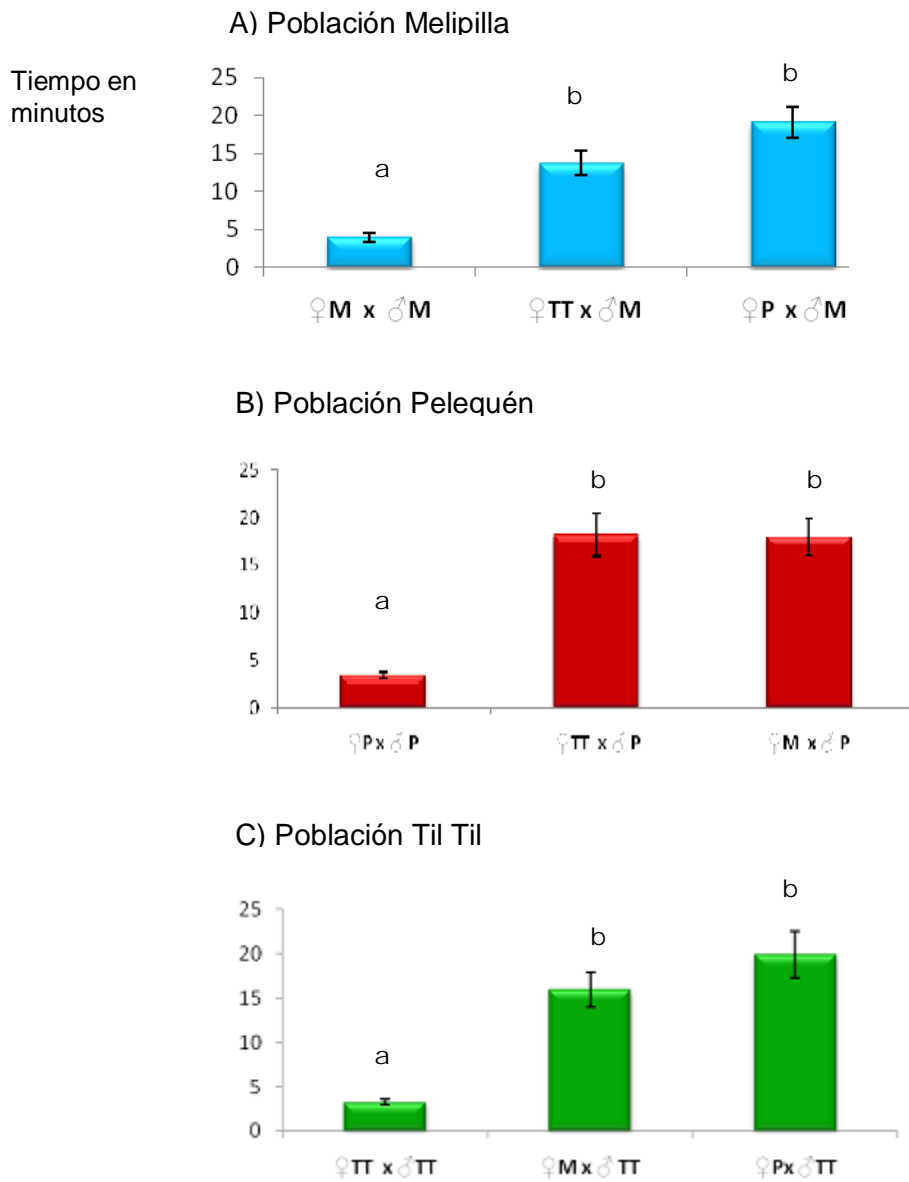


Figura 15.- A, B y C. Tiempo (min.) transcurrido desde el encuentro de los sexos y el inicio del cortejo en los cruzamientos dentro y entre las poblaciones Melipilla, Pelequén y Til Til de *D. funebris*. N = 60 parejas por cada tipo de cruzamiento. **a** y **b** representan la significancia estadística de las medidas. Letras iguales $P > 0.05$, letras distintas $P < 0,05$.

En sintonía con los resultados de las Fig. 15.- A, B y C, la latencia, es decir el tiempo que transcurre desde que se ponen en contacto los sexos hasta que se inicia el cortejo, en los cruzamientos interpoblaciones es más del doble que el tiempo de latencia en los cruces entre machos y hembras de la misma población, machos **M** frente a hembras **P** y **TT** ($F_{2,158} = 28,43; p < 0.05$), machos **P** confrontados con hembras **M** y **TT** ($F_{2,140} = 35,92; p < 0.05$) y machos **TT** frente a hembras de las otras poblaciones ($F_{2,148} = 27,73; p < 0.05$) (Fig.14.- .a, b y c). Estos hallazgos también surgieron que entre las poblaciones Melipilla, Pelequén y Til Til de *D. funebris* hay restricción para el libre flujo de genes.

6.- APARATO GENITAL FEMENINO Y MASCULINO

El estudio de espermatecas, entregó información sobre la presencia de espermios y la anatomía de estas estructuras en las hembras **M**, **P** y **TT** de *D. funebris*. Las espermatecas de las hembras de las tres poblaciones de *D. funebris* son de color amarillo claro (poco quitinizadas, Brncic, 1957).

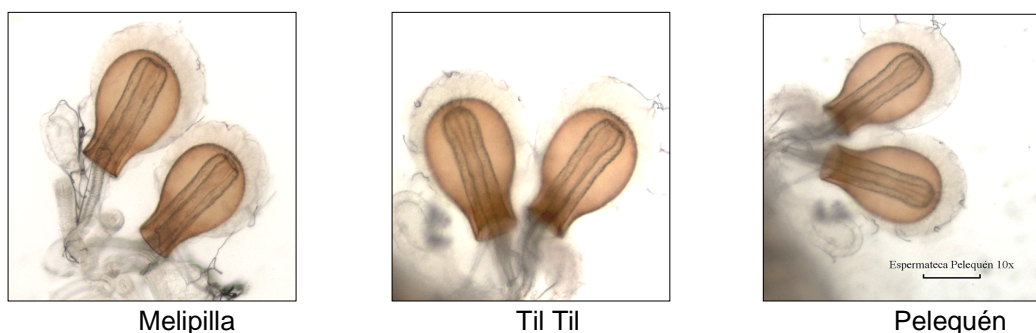


Figura 16.- Espermatecas *D. funebris*

La terminalia de los machos de las tres poblaciones de *D. funebris* no presenta diferencias anatómicas, son semejantes en la distribución y número de cerdas que se encuentran en la placa genital y placa anal. En estas poblaciones existe un gran número de gruesas cerdas que forman un clasper en la parte central de la placa anal y también se disponen en filas paralelas y perpendiculares (Fig.17). En la placa anal, se observa un grupo de espinas gruesas y cortas dispuestas en la parte central, que después se van alargando y adelgazando hasta cubrir toda la zona.



Figura 17.- Terminalia macho *D. funebris* (40 X, imagen aumentada 16,5 veces)

7.- TEST DE ELECCIÓN MÚLTIPLE

Tabla 15.- a, b y c.- Número y duración de las cópulas en las pruebas de elección múltiple entre las poblaciones Melipilla, Pelequén y Til Til de *D. funebris*

	Nº de copulas	Duración promedio en minutos (min.)
a) Melipilla vs Til Til		
M x M	23	17,48 ± 0,29
M x TT	14	14,57 ± 0,47
TT x M	19	14,32 ± 0,56
TT x TT	26	18,78 ± 0,46
b) Melipilla vs Pelequén		
M x M	27	19,26 ± 0,21
M x P	20	11,10 ± 0,40
P x M	26	11,73 ± 0,50
P x P	26	19,32 ± 0,43
c) Til Til vs Pelequén		
TT x TT	29	17,86 ± 0,31
TT x P	18	15,39 ± 0,35
P x TT	14	14,57 ± 0,33
P x P	29	17,97 ± 0,38

*Valores en rojo indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los parentales (P < 0.05; ANOVA).

El número de cópulas entre individuos de diferentes poblaciones tiende a ser menos que entre los sexos de la misma población. Las mayores diferencias se observan entre los adultos **TT** de ambos sexos, frente a las moscas de las poblaciones **M** y **P**. Sin embargo los índices de aislamiento reproductivo son inferior a +1 (**M x TT**, $I = 0,19 \pm 0,11$; **M x P** $I = 0,07 \pm 0,09$; **P x TT**, $I = 0,28 \pm 0,08$) lo que indica que las poblaciones se cruzan libremente aunque el número de copulas intrapoblacionales disminuye y se observa una tendencia de aparearse con los de su misma población. La duración de las cópulas parentales tiende a ser mayor que la registrada entre los sexos de diferentes poblaciones. Los mayores cambios se observan entre adultos las moscas **P** y **M** ($F_{3,97} = 126,0$; $p < 0.05$). La prueba Bonferroni, realizada confirma que la principal contribución a la varianza corresponde a las diferencias de los parentales **M** y **P** versus los cruces interpoblacionales entre estas poblaciones, así cópulas **M x M** vs cópulas **M x P** ($t_{3,89} = 13,87$; $p < 0.05$).

8.- VIABILIDAD

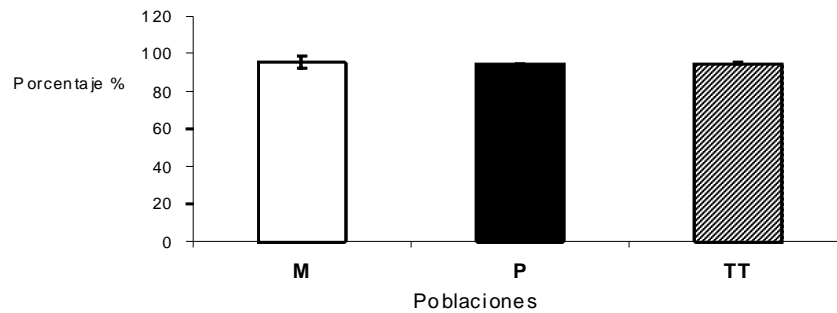
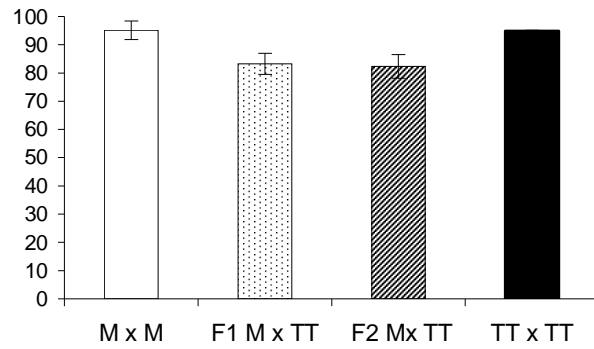


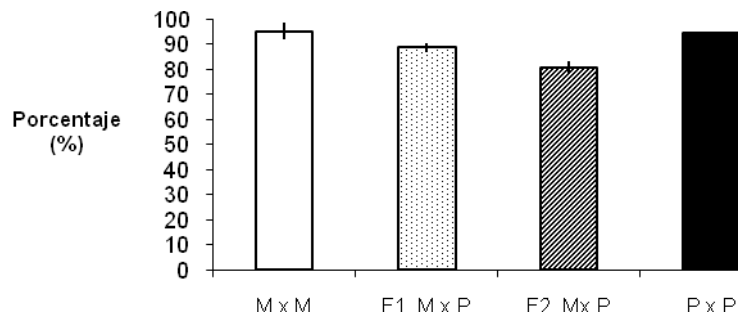
Figura 18.- Porcentaje de Viabilidad en poblaciones de *D. funebris* M, P y TT.

Alrededor del 94% de los huevos de las poblaciones M, P y TT, originaron adultos de ambos sexos. La proporción de machos y hembras es cercana al valor esperado 1:1.

a) Poblaciones Melipilla y Til Til



b) Poblaciones Melipilla y Pelequén



c) Poblaciones Til Til y Pelequén

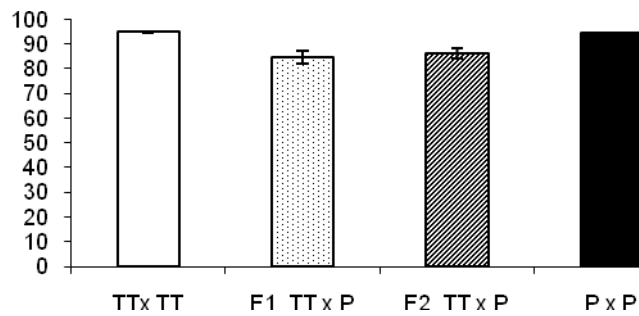


Figura 19 a, b y c.- Porcentaje de viabilidad de las generaciones F₁ y F₂ obtenidas al cruzar recíprocamente adultos M, P y TT

Los híbridos F_2 obtenidos al cruzar recíprocamente las poblaciones **M** y **TT** (Fig. 19.a) y **M** y **P** (Fig. 19.b) exhiben una viabilidad menor a la de las poblaciones parentales (prueba *t* de student). Los híbridos F_2 también tienen una viabilidad menor a la de los F_1 , pero estas diferencias están en el límite de la significancia. La viabilidad de los híbridos F_1 es reducida respecto a los parentales **M**, **P** y **TT**, pero esta diferencia no es significativa (prueba *t* de student) (Fig. 19. a y b). En contraste con los resultados anteriores, los híbridos F_1 y F_2 obtenidos al cruzar recíprocamente individuos **TT** y **P** muestran una viabilidad comparable a la de los individuos de las poblaciones parentales (prueba *t* de student).

Los híbridos F_1 de cada cruzamiento recíproco, no mostraron diferencias importantes en viabilidad. Por esta razón se fusionaron los datos, como lo muestra la Fig. 19.- a, b,c.

Por otro lado, la etapa de desarrollo huevo- adulto se alargó en los híbridos F_1 y F_2 en aproximadamente un 25%, respecto al desarrollo parental, siendo este fenómeno más notable en la F_2 (Tabla. 16).

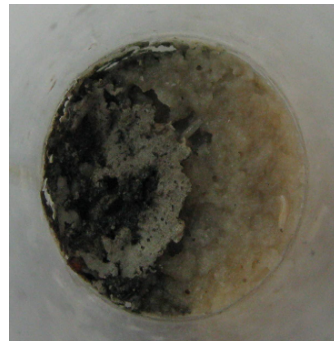
En los tubos que contenían a los híbridos F_1 y F_2 , se observó un aumento de medios de cultivos contaminados (Fig. 20) respecto a los tubos parentales.



Parentales



Híbridos F₁



Híbridos F₂

Figura 20.- Nivel de contaminación observado en las generaciones: Parentales, F₁ y F₂ de *D. funebris*.

Tabla.16.- Duración del ciclo huevo-adulto
(días)

Poblaciones	Promedio \pm ES	\bar{x} días
M x M	30,0 \pm 0,00	30,00
P x P	29,5 \pm 0,22	
TT x TT	30,5 \pm 0,22	
Híbridos F₁		
M x P	32,6 \pm 0,22	32,65
P x M	32,4 \pm 0,27	
M x TT	34,3 \pm 0,29	
TT x M	33,6 \pm 0,34	
M x P	31,5 \pm 0,22	
P x M	31,5 \pm 0,31	
Híbridos F₂		
M x P	35,8 \pm 0,29	36,21
P x M	35,6 \pm 0,27	
M x TT	39,1 \pm 0,38	
TT x M	37,2 \pm 0,36	
M x P	34,6 \pm 0,22	
P x M	35,0 \pm 0,39	

DISCUSIÓN

1.- CONDUCTA REPRODUCTIVA Y EVOLUCIÓN

El problema principal de la biología evolutiva es comprender cómo se forma una nueva especie. Estas son las unidades principales de evolución (Mayr, 1963). Cada especie es única en su genotipo, patrones de expresión de genes, proteóma, conducta, historia y en sus relaciones con el ambiente biótico y abiótico. Mayr sostuvo en su libro *Especies animales y evolución* (1963) que el aislamiento reproductivo se origina en condiciones de alopatria. Desde ese tiempo, la evidencia acumulada indica que Mayr estaba en la razón (revisión en Orr, 2005). Esto no invalida que algunas especies se pueden haber formado en condiciones de simpatria o por algún otro tipo de mecanismo, pero el aislamiento reproductivo en las especies del género *Drosophila*, particularmente las conductas involucradas en el intercambio de genes entre los sexos, normalmente evolucionan en alopatria (Castrezana y Markow, 2008).

El aislamiento geográfico puede restringir el flujo de genes entre poblaciones y si se han acumulado diferencias en conductas reproductivas, entonces aumentan las posibilidades de nulo intercambio de genes. La probabilidad de divergencia aumenta si cada población utiliza diferentes recursos ecológicos y está expuesta a diferentes

factores ambientales que podrían actuar como potenciales presiones de selección natural, aumentando las diferencias entre las poblaciones. Así, las poblaciones que viven en diferentes ambientes ofrecen una oportunidad para investigar los primeros eventos que llevan a originar una nueva especie.

El presente estudio indica que los adultos de las tres poblaciones de *D. funebris* examinadas en esta Tesis, difieren en la expresión de algunos componentes de la conducta de apareamiento, como tijereteo y vibración de alas. Estas diferencias aumentan cuando los individuos de cada población son confrontados con el sexo opuesto de las otras poblaciones. Estos hallazgos sugieren que los individuos de *D. funebris* colectados en Melipilla (M), Pelequén (P) y Til-Til (TT), se encuentran en proceso de acumulación de diferencias fenotípicas y genéticas que podría llevar a que, cada población originará una nueva especie. Esta inferencia encuentra sustento en el hecho que los índices de aislamiento calculados (Staker, 1942) sugieren que machos y hembras prefieren aparearse con los individuos de su misma población.

El proceso de diferenciación no ha ocurrido con la misma rapidez en las tres poblaciones. Los datos sugieren que machos y hembras de la población TT han acumulado más diferencias en conducta reproductiva que los sexos de las poblaciones M y P, como se desprende de sus comportamientos frente a adultos de las otras poblaciones. Por otra parte, los híbridos F_1 y F_2 , obtenidos al cruzar

recíprocamente los adultos de los tres aislados, exhiben una menor viabilidad comparada con los individuos de las poblaciones parentales y también un alargamiento del ciclo de desarrollo huevo-adulto. Estos hallazgos, también sugieren la acumulación de diferencias en las tres poblaciones para estos componentes de la adecuación biológica. Los individuos F_2 exhiben la viabilidad menor, y la mayor extensión del ciclo huevo-adulto, sugiriendo que su desarrollo está más descompensado que el de la generación F_1 . Tomados en conjunto, los hallazgos de esta tesis otra vez indican que las poblaciones M, P y TT de *D. funebris*, se encuentran en un estado de divergencia evolutiva.

2.- CONDUCTA DE APAREAMIENTO

2.1.- MACHOS MELIPILLA, PELEQUEN Y TIL-TIL.

Las hembras y machos de cada una de las tres poblaciones (M, P y TT) difieren en la utilización de unos pocos elementos de conducta reproductiva. Por ejemplo, los machos, exhiben diferencias cuantitativas en movimientos circulares y vibración de alas (Tabla 6 y Fig. 2). Los movimientos circulares se interpretan como actividades masculinas dirigidas a llamar la atención femenina. Si esto se logra, el macho vibra las alas. El patrón de vibración es una de las principales características del cortejo en *Drosophila* y es propio de cada especie (Spieth, 1983). Es decir, las poblaciones M,

P y TT de *D. funebris* difieren en elementos del cortejo que se expresan al inicio, en la parte media y al final de la secuencia de conductas que realiza el macho para sensibilizar a la hembra y copular con ella (Tabla 6 y Fig. 2). En *Drosophila melanogaster* diferentes genes controlan cada una de estas conductas (North y Greenspan, 2007; Ferveur, 2007). Es posible que entre las poblaciones de *D. funebris* examinadas en esta Tesis, existan diferencias genéticas para el control de elementos del cortejo, como por ejemplo movimientos circulares y vibración de alas. Análisis de bioacústica y estudios genéticos más profundos, son necesarios para aclarar estos hallazgos. Markow et. al. (2007) han comparado las secuencias de nucleótidos de los DNA de 12 especies de *Drosophila*, concluyendo que todas ellas exhiben un gran parecido. Además, avances recientes en la comprensión molecular del proceso de formación de especies, han revelado que especies muy diferentes pertenecientes a taxas, como *Drosophila*, mamíferos y levaduras, comparten genes que juegan un importante papel en la especiación (Presgraves, 2010). Estudios posteriores deberían examinar los DNA de las poblaciones M, P y TT, comparándolos con DNA de los genes que, en *D. melanogaster*, controlan elementos del cortejo. Estos estudios podrían proporcionar información sobre la naturaleza de los cambios conductuales observados en estas tres poblaciones. Por otro lado, es de importancia considerar que las tres poblaciones provienen de ancestros criados en la naturaleza en substratos muy distintos. La cepa Pelequén se formó con adultos emergidos de frutos fermentados de tuna; la cepa Melipilla con moscas nacidas de zapallo y la cepa Til Til con imagos criados en tejido fermentado de cactus. Estas

diferencias en la nutrición podrían introducir cambios en la conducta reproductiva de las tres poblaciones. De hecho la nutrición durante el estado de larva, afecta la producción en los adultos de feromonas en calidad y cantidad (Houot et. al., 2010).

2.2.- HEMBRAS MELIPILLA, PELEQUÉN Y TIL-TIL.

Las hembras M, P y TT, también difieren en conducta reproductiva (Tabla 7 y Fig. 3). Estas diferencias son principalmente en los movimientos de alas que recuerdan el de las tijeras al cortar (tijereteo). Se comprende muy poco el papel de esta conducta en el apareamiento de *Drosophila* (Greenspan y Ferveur, 2000). Esta conducta es frecuente en los machos de *D. simulans* y menos frecuente en los de *D. melanogaster*, pero no se ha observado en las hembras de estas especies. Sin embargo, las hembras de las poblaciones examinadas en esta Tesis, responden a señales del macho efectuando este movimiento cuya frecuencia es comparable al de las otras conductas femeninas y aun, como ocurre con la cepa TT, puede exhibir una frecuencia tan alta como el correr (Tabla 7 y Fig. 3).

Claramente, la conducta reproductiva de las hembras M, P y TT de *D. funebris*, presenta diferencias cualitativas importantes respecto a la de las hembras *simulans* y *melanogaster*. Estos resultados indican que, en *Drosophila*, para comprender la

evolución de la conducta reproductiva, es necesario comparar especies de clados filogenéticamente distintos al de *D. melanogaster* y *D. simulans*. La conducta reproductiva de las especies del subgénero *melanogaster*, es la mejor conocida de todas las especies de *Drosophila*, tanto desde un punto de vista de su genética como de su evolución (Presgraves, 2010).

Tal vez, el tijereteo de las alas observado en las hembras de M, P y TT de *D. funebris*, es un componente del conjunto de conductas femeninas cuyo objetivo es incentivar a los machos a cortejar. Así, cuando las hembras M, P y TT son asediadas por machos de las otras poblaciones, la frecuencia de tijereteos tiende a disminuir (Tablas 12, 13 y 14).

3.- CONDUCTA REPRODUCTIVA ENTRE INDIVIDUOS DE LAS POBLACIONES MEPILILLA, PELEQUÉN Y TIL TIL.

Las diferencias de conducta reproductiva entre las poblaciones M, P y TT aumentan cuando se observan parejas en que uno de los sexos es de una población y el otro pertenece a otra población. Estos hallazgos son los que se esperan cuando poblaciones alopátricas están en un proceso de divergencia que puede llevar a formar una nueva especie (Orr, 2005).

3.1.- MACHOS MELIPILLA, PELEQUÉN Y TIL TIL.

Todos los cruzamientos inter-población muestran una disminución de las cópulas. Por ejemplo, solo el 20% de los machos Pelequén logra copular con hembras Til Til, mientras los apareamientos entre los sexos de cada población alcanzan sobre 50.00 % (Tablas 5 y 8). La latencia es decir, el inicio del cortejo aumenta substancialmente cuando los sexos de diferentes poblaciones entran en contacto. Así mismo, la duración de la cópula disminuye en un tercio respecto a la de las poblaciones parentales. Sin embargo, después de una hora el 100 % de las hembras son inseminadas por machos de las otras poblaciones, tal como ocurre con los cruzamientos homogámicos (Tablas 5 y 8). Claramente, estos resultados nuevamente sugieren que se están acumulando diferencias en conducta reproductiva entre los machos de estas poblaciones.

3.2.- HEMBRAS MELIPILLA, PELEQUÉN Y TIL TIL FRENTE A MACHOS DE LAS OTRAS POBLACIONES.

En contraste con los machos, las hembras M, P y TT muestran una conducta de apareamiento muy diferente a la que exhiben frente a machos de sus respectivas poblaciones, cuando son cortejadas por el sexo opuesto de las otras poblaciones,

(Tablas 12 a 14 y Figs. 9 a 11). Así, las hembras cortejadas por machos extraños disminuyen los movimientos abdominales, toques, tijereteos y apertura y cierre de alas. Estos resultados sugieren que la disminución del número de cópulas entre individuos de diferentes poblaciones (Tablas 5 y 8) podría atribuirse también a la conducta de las hembras antes de copular (Tablas 12 a 14 y Figs. 9 a 11).

En el género *Drosophila*, cada especie posee un sistema de reconocimiento propio y que controla el intercambio de información sensorial enviada y recibida durante el juego sexual, previo a la cópula (Greenspan y Ferveur, 2000). Los datos de esta Tesis sugieren que para comprender bien cómo la evolución ha cambiado el genotipo involucrado en la conducta de apareamiento, es importante comparar la conducta reproductiva de los adultos de poblaciones alopátricas que están acumulando diferencias en componentes conductuales que forman parte del cortejo masculino y de la respuesta femenina a esos estímulos. Los resultados de este estudio sugieren que la conducta de las hembras M, P y TT durante el cortejo masculino (Tablas 12 a 14 y Figs. 9 a 11), es clave en el sistema de señales que utiliza *D. funebris* para aparearse y podría estar involucrada en la selección sexual de la pareja.

4.- VIABILIDAD

La viabilidad en condiciones de laboratorio de las tres poblaciones de *D. funebris*, M, P y TT, es similar, es decir cercana al 100%. Sin embargo, los híbridos F₁ y F₂ obtenidos al cruzar esos tres aislados, muestran una viabilidad disminuida (Figs.19 a, b y c). Estos hallazgos indican que las poblaciones M, P y TT han acumulado diferencias para otros rasgos además de la conducta reproductiva, como es viabilidad. Esta es un componente de la adecuación biológica y puede modificarse cuando cambia el ambiente y /o el genotipo ya que son parte del fenotipo (Hanski y Gaggiotti, 2004).

La disminución de la viabilidad de los individuos de una población se relaciona también con extinción en un horizonte de tiempo difícil de precisar. Esta disminución va a depender de variables ambientales y genéticas como la recombinación de genotipos, situación estudiada en esta Tesis. Así, se podría atribuir la disminución de la viabilidad de los híbridos F₁ y F₂, a una descompensación en patrones de actividad génica, producto de la recombinación en los híbridos del patrimonio hereditario de las poblaciones M, P y TT.

Aquí se estimó la viabilidad de las generaciones parentales, F₁ y F₂, en condiciones

ambientales similares. La disminución de este componente de la adecuación en estos híbridos, sugiere que en las poblaciones M, P y TT, se han acumulado diferencias para este elemento de la adecuación. Por otra parte, los datos respecto a fecundidad de las hembras F_1 y F_2 , también indican que este importante rasgo es menor que el de las hembras de las poblaciones parentales M, P y TT (Tabla 16). Este rasgo también es componente de la adecuación biológica. Así mismo, se contaminó un 30% de los tubos sembrados con huevos de la generación F_1 . Este porcentaje subió a un 50% en los tubos sembrados con huevos F_2 . En contraste, no se contaminó ninguno de los tubos sembrados con huevos M, P y TT. Por otro lado, la etapa de desarrollo huevo- adulto se alargó en los híbridos F_1 y F_2 en aproximadamente un 25%, respecto al desarrollo parental, siendo este fenómeno más notable en la F_2 .

Todos estos datos sugieren que entre las poblaciones M, P y TT hay importantes diferencias en varios y diferentes rasgos que componen la adecuación biológica. Por ejemplo, conducta de apareamiento, fecundidad y duración del ciclo de desarrollo huevo-adulto.

CONCLUSIÓN Y COMENTARIO FINAL

Los resultados de esta investigación indican que entre las poblaciones M, P y TT de *D. funebris* hay barreras precigóticas y postcigóticas que restringen el flujo de

genes entre ellas. Es así como la conducta de apareamiento de los sexos de cada población muestra importantes diferencias cuantitativas. En las especies animales, esta conducta es una de las más importantes barreras precigóticas que previene el intercambio de genes. Por otro lado, los híbridos F_1 y F_2 muestran también una importante baja en la viabilidad y fecundidad y un alargamiento del ciclo de desarrollo huevo-adulto. Además, parecen tener serios problemas para controlar infecciones originadas por hongos y bacterias. Estos rasgos son componentes de la adecuación biológica y sus efectos se expresan en extinción debido a una baja adecuación (Coyne y Orr, 2004; Orr, 2005; Mastkin et al, 2008).

Se puede concluir que entre las poblaciones M, P y TT de *D. funebris*, hay barreras para el intercambio de genes. Estas barreras son de tipo precigóticas y postcigóticas. Entonces las poblaciones M, P y TT de *D. funebris*, podrían en realidad corresponder a subespecies.

Estudios basados en cruzamientos entre las generaciones F_1 y F_2 y parentales (retrocruces), podrían aportar mayor luz respecto a este problema. Así mismo, estudios moleculares comparados a nivel de DNA, también podrían ayudar a establecer el status real de cada una de las tres poblaciones M, P y TT de *D. funebris* aquí investigada. Otro tipo de investigación para establecer el status de estos aislados son estudios comparados como los arriba indicados, pero con otras especies del grupo *funebris*. Es decir, los hallazgos de esta Tesis indican la

necesidad de revisar el grupo *funeris* en su totalidad para, tal vez, aumentar el número de especies que componen esta unidad filogenética. Por otra parte, esta Tesis debería verse como un aporte al conocimiento de la biodiversidad de Chile y en particular, al conocimiento de la fauna de drosofilidos que viven en Chile.

REFERENCIAS

Barton HN, Briggs DG, Eisen JA, Goldstein DB & Patel NH (2007). Evolution. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Billeter JC, Rideout EJ, Dornan AJ & Goodwin S (2006). Control of male sexual behaviour in *Drosophila* by the sex determination pathway. *Curr.Biol.*16:766-776.

Burdick AB (1954). New medium of reproductive quality, stable at room temperature. *Drosophila. Inf. Serv.*28:170.

BonoJ, Matzkin L, Castrezana S & Markow TA (2008). Molecular evolution and population genetics of two *Drosophila mettleri* cytochrome P450s involved in host plant utilization. *Molecular Ecology* 17:3211-3221.

Brcic D. (1957). Las especies chilenas de *Drosophilidae*. Ed. Universitaria, Santiago, Chile.

Castrezana S & Markow TA (2008). Sexual isolation and mating propensity among allopatric *Drosophila mettleri* populations. *Behavior Genetics* 38:437-445.

Coyne & Orr, (2004). Speciation. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Dobzhansky Th. (1937). Genetics and the origin of species. Columbia University Press.

Dobzhansky, Th. (1940) Speciation as a stage in evolutionary divergence. *Am. Nat* 74: 3002-321

Dodd D (1989). Reproductive isolation as a consequence of adaptive divergence in *Drosophila pseudoobscura*. *Evolution*, 43:1308-1311.

Ellens A A & Wattiaux JM (1964). Direct observation of sexual isolation. *Drosophila Inf. Serv.* 39:118-119

Etges WJ, Veenstra CL & Jackson LL (2006). Premating isolation is determined by larval rearing substrates in cactophilic *Drosophila mojavensis*. VII. Effects of larval dietary fatty acids on adult epicuticular hydrocarbons. *Journal of Chemical Ecology*. 32: 2629-2646

Flores S (2005). Análisis taxonómico y filogenético de poblaciones de *Drosophila*, pertenecientes al grupo funebris, asociadas a *Echinopsis chilensis*. Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Chile

Ferveur JF (2007). Elements of courtship behavior in *Drosophila*. En: *Invertebrate neurobiology*. North, G and Greenspan, R. J. Cold Spring Harbor laboratory Press, New York, pp 405-435.

Fogleman JC, & Danielson PB (2001). Chemical interactions in the cactus-microorganism-*Drosophila* model system of the Sonoran desert. *Am Zool*. 41:877-889.

Greenspan R & Ferveur JF (2000). Courtship in *Drosophila*. *Genetics* 34:205-232

Goodwin SF, Taylor BJ, Villella M, Foss M, Ryner LC, Baker BS, & Hall JC (2000). Aberrant splicing and altered spatial expression patterns in fruitless mutants of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 154:725-745.

Hanski & Gaggiotti (2004). *Ecology, genetics and evolution of Metapopulation*. Hanski Ilka & Gaggiotti O. Elsevier Academic press, London.

Houot B, Svetec N, Godoy-Herrera R, Ferveur JF (2010). Effect of laboratory acclimation on the variation of reproduction-related characters in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Experimental Biology* 231: 2322-2331.

Lee G & Hall JC (2001). Abnormalities of male-specific FRU protein and serotonin expression in the CNS of fruitless mutants in *Drosophila*. *Journal Neuroscience*. 21: 513-536.

Kelleher ES & Barbash AD (2010). Evolutionary biology: Expanding islands of speciation *Nature* 465:1019-1020.

Koref-Santibáñez S (1963). Courtship and sexual isolation in five species of the *mesophragmatica* group of the genus *Drosophila*. *Evolution*, 17: 99-106.

Koref-Santibáñez S (2001). Effects of age and experience on mating activity in the sibling species *Drosophila pavani* and *Drosophila gaucha*. *Behavior Genetics*. 31:287-97.

Mas F & Jallon JM (2005). Sexual isolation and cuticular hydrocarbon differences between *Drosophila santomea* and *Drosophila yakuba*. *Journal of Chemical ecology*, 31: 2747- 2752.

Markow TA (2007). *Drosophila* 12 Genomes Consortium. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* 450:203-216.

Markow TA & O'Grady PM (2007). *Drosophila* biology in the genomic age. *Genetics*, 177:1269-1276.

Matzkin LM (2008). The molecular basis of host adaptation in cactophilic *Drosophila*: molecular evolution of a glutathione S-transferase gene (*GstD1*) in *Drosophila mojavensis*. *Genetics* 178:1073-1083.

Matzkin LM, Mutsaka K, Johnson S, & Markow TA (2009). Metabolic pools differ among ecologically diverse *Drosophila* species. *Journal of Insect Physiology* 55:1145-1150.

Mayr E (1942). *Systematics and the origin of species*, Columbia University Press. New York

Mayr (1963). "Animal Species and evolution". Belknap. Press, Harvard.

North G & Greenspan RJ (2007). *Invertebrate Neurobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring harbor, New York.

Orr H (2005). The genetic basis of reproductive isolation insights from *Drosophila*. *Procc. Nat. Acad. Scien*, 102:6522-6526.

Powell JR (1997). Progress and Prospects in Evolutionary Biology the *Drosophila* Model. Oxford University Press, Oxford. pp: 213-267.

Presgraves DC & Glor RE (2010). Evolutionary biology: Speciation on islands. *Current Biology* 20: R440-R442.

Presgraves DC (2010). The molecular evolutionary basis of species formation. *Nature Reviews Genetics* 11: 175-180.

Reed LK, Nyboer M & Markow TA. (2007). Evolutionary relationship of *Drosophila mojavensis* geographic host races and their sister species *Drosophila arizonae*. *Molecular Ecology* 16: 1007-1022.

Ross CL, Markow TA (2006). Microsatellite variation among diverging populations of *Drosophila mojavensis*. *Journal of Evolutionary Biology* 19:1691-1700.

Rundle H D, Chenoweth S, Doughty P & Blows M (2005). Divergent selection and the evolution of signal traits and mating preferences. *Plos Biology*. 3: 1988-1995.

Saarikettu MJ, Liimatainen & Hoikkala A (2004). Intraspecific variation in mating behavior does not cause sexual isolation between *Drosophila virilis* strains. *Animal Behavior*, 70:417-426.

Singh SR & Hoenigsberg HF (2004). Reproductive isolation and models of speciation in *Drosophila*. *Genetics and Molecular Research* 3: 213-250.

Spieth HT (1974). Courtship behavior in *Drosophila*. *Ann. Rev. Entomology*, 19:385-405.

Spieth HT & Ringo JM (1983). Mating behavior and sexual isolation in *Drosophila*. In *the genetics and biology of Drosophila*, ed. M Ashburner, HI Carson, J.N Thompson Jr. Vol 3c: 223-284. New York: Academic.

Stalker H (1942). Sexual isolation studies in the species complex *D. virilis*. *Genetics* 27:238-257.

Turner TL, Hahn MW & Nuzhdin SV (2005). Genomic Island of Speciation in *Anopheles gambiae*. *Plos Biology*, 3: 1572-1578.

Turner TL (2010). Genomic Island of speciation on genomic islands and speciation. *Molecular ecology*. 19, 848-850.

White BJ, Cheng Ch, Simard F, Constantini C, Besansky N. (2010). Genetic association of physically unlinked islands of genomic divergence in incipient species of *Anopheles gambiae*. *Molecular Ecology*, 19, 925-939.

ANEXOS

Plantilla de registro.

<i>Drosophila funebris</i>	Edad:		Fecha de registro:			
Población:						
	MACHOS					
Tubos	1	2	3	4	5	6
Hora de inicio						
Elementos						
Orientación						
Mov. Circular						
Toque						
Vibr. Alas						
Tijeretear						
Seguimiento						
Mov. Abd						
Lamido						
Monta						
	HEMBRAS					
Parada						
Patear						
Correr						
Mov Abdom						
Toque						
Tijeretear						
Abre Alas						
Cierra Alas						
Tiempo de cortejo						
Tiempo de latencia						
Tiempo de copula						
Lugar copula						

Instrumental utilizado



a



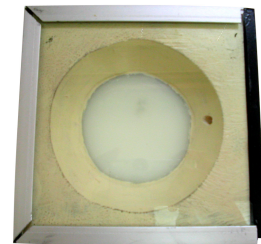
b



c



d



e

a.- frasco anestesiador; b. -pipeta de aspiración; c. -agujas de disección y pinzas

d.-tubos de crianza, maduración y de observación de cortejos individuales;

e.-cámaras de observación pruebas de elección múltiple (diseñada por Ellens y Wattiaux, 1964)

Porcentaje de uso de elementos del cortejo de machos Melipilla (M) Pelequén (P) y Til Til (TT) de *D. funebris*. Las conductas se expresan como número de eventos en 60 min de observación y se representan como porcentajes. (N = 60 machos)

Elemento de cortejo	Poblaciones					
	Melipilla		Pelequén		Til Til	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
	Eventos					
Orientación	218	9,08	171	9,14	209	8,48
Movimiento Circular	220	9,17	266	14,22	112	4,54
Toque	228	9,50	183	9,79	283	11,48
Vibrar Alas	769	32,04	524	28,02	1011	41,00
Tijereteo	232	9,67	125	6,68	163	6,61
Seguimiento	257	10,71	252	13,48	325	13,18
Movimiento Abdominales	275	11,46	142	7,59	90	3,65
Lamido genitalia	164	6,83	174	9,30	233	9,45
Monta	37	1,54	33	1,76	40	1,62
Total	2400	100,00	1870	100,00	2466	100,00

Elementos de conducta desplegados por las hembras Melipilla (M), Pelequén (P) y Til Til (TT) de *D. funebris*. Los elementos se expresan como eventos realizados en 60 minutos de observación y se estandarizaron como porcentajes.

Elemento de conducta femenina	Población					
	Melipilla		Pelequén		Til Til	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Parada	184	18,81	125	15,41	160	15,08
Patea	144	14,72	134	16,52	161	15,17
Corre	206	21,06	162	19,98	210	19,79
Movimiento abdomen	67	6,85	32	3,95	29	2,73
Toque	122	12,47	122	15,04	135	12,72
Tijereteo	139	14,21	123	15,17	213	20,08
Abre alas	86	8,79	89	10,97	120	11,31
Cierra alas	30	3,07	24	2,96	33	3,11
Total	978	100,00	811	100,00	1061	100,00

Cruzamientos controles en pruebas de viabilidad

Controles				
		F ₁		F ₂
TT x TT	Huevos	183		Huevos 187
	Adultos	174		Adultos 177
	Hembras	84		Hembras 91
	Machos	90		Machos 86
		F ₁		F ₂
M X M	Huevos	197		Huevos 190
	Adultos	181		Adultos 187
	Hembras	91		Hembras 93
	Machos	90		Machos 94
		F ₁		F ₂
P x P	Huevos	200		Huevos 187
	Adultos	189		Adultos 178
	Hembras	97		Hembras 85
	Machos	92		Machos 93

Replicas F₁ y F₂ entre las poblaciones de *D. funebris*

Cruzamientos Hembras Melipilla X Machos Pelequén			
Replica 1	F ₁		F ₂
Huevos	96	Huevos	72
Adultos	85	Adultos	47
Hembras	51	Hembras	24
Machos	34	Machos	23
Replica 2	F ₁		F ₂
Huevos	85	Huevos	60
Adultos	75	Adultos	47
Hembras	29	Hembras	23
Machos	37	Machos	24
Replica 3	F ₁		F ₂
Huevos	125	Huevos	102
Adultos	110	Adultos	87
Hembras	54	Hembras	51
Machos	56	Machos	36
replica 4	F ₁		F ₂
Huevos	118	Huevos	195
Adultos	109	Adultos	160
Hembras	59	Hembras	87
Machos	50	Machos	73
	F ₁		F ₂
Huevos	114	Huevos	102
Adultos	106	Adultos	94
Hembras	58	Hembras	48
Machos	48	Machos	46

Cruzamientos Hembras Pelequén X Machos Melipilla				
Replica 1	F ₁			F ₂
Huevos	121		Huevos	113
Adultos	101		Adultos	94
Hembras	48		Hembras	50
Machos	53		Machos	44
Replica 2	F ₁			F ₂
Huevos	96		Huevos	72
Adultos	73		Adultos	53
Hembras	41		Hembras	31
Machos	32		Machos	22
replica 3	F ₁			F ₂
Huevos	112		Huevos	95
Adultos	105		Adultos	85
Hembras	61		Hembras	51
Machos	44		Machos	34
Replica 4	F ₁			F ₂
Huevos	84		Huevos	69
Adultos	79		Adultos	59
Hembras	39		Hembras	29
Machos	40		Machos	30
Replica 5	F ₁			F ₂
Huevos	122		Huevos	70
Adultos	109		Adultos	51
Hembras	58		Hembras	16
Machos	51		Machos	35

Cruzamientos Hembras TT x Machos Melipilla				
Replica1	F ₁			F ₂
Huevos	85		Huevos	87
Adultos	80		Adultos	82
Hembras	38		Hembras	42
Machos	42		Machos	40
Replica 2	F ₁			F ₂
Huevos	89		Huevos	62
Adultos	86		Adultos	41
Hembras	38		Hembras	20
Machos	48		Machos	21
Replica 3	F ₁			F ₂
Huevos	93		Huevos	78
Adultos	78		Adultos	70
Hembras	36		Hembras	36
Machos	42		Machos	34
Replica 4	F ₁			F ₂
Huevos	110		Huevos	98
Adultos	98		Adultos	91
Hembras	52		Hembras	45
Machos	46		Machos	46
Replica 5	F ₁			F ₂
Huevos	101		Huevos	86
Adultos	92		Adultos	81
Hembras	47		Hembras	41
Machos	45		Machos	40

Cruzamientos Hembras Melipilla X Machos TT				
Replia 1	F ₁			F ₂
Huevos	86		Huevos	80
Adultos	57		Adultos	65
Hembras	22		Hembras	31
Machos	37		Machos	34
Replica 2	F ₁			F ₂
Huevos	115		Huevos	112
Adultos	88		Adultos	76
Hembras	40		Hembras	38
Machos	48		Machos	38
Replica 3	F ₁			F ₂
Huevos	92		Huevos	86
Adultos	58		Adultos	51
Hembras	38		Hembras	26
Machos	20		Machos	25
Replica 4	F ₁			F ₂
Huevos	108		Huevos	94
Adultos	86		Adultos	87
Hembras	50		Hembras	42
Machos	36		Machos	45
Replica 5	F ₁			F ₂
Huevos	114		Huevos	96
Adultos	105		Adultos	82
Hembras	48		Hembras	40
Machos	57		Machos	42

Cruzamientos Hembras Pelequén X machos Til Til				
Replica 1	F ₁			F ₂
Huevos	115		Huevos	105
Adultos	106		Adultos	84
Hembras	49		Hembras	38
Machos	57		Machos	46
Replica 2	F ₁			F ₂
Huevos	160		Huevos	120
Adultos	134		Adultos	107
Hembras	61		Hembras	54
Machos	73		Machos	53
Replica 3	F ₁			F ₂
Huevos	92		Huevos	89
Adultos	65		Adultos	81
Hembras	37		Hembras	41
Machos	28		Machos	40
Replica 4	F ₁			F ₂
Huevos	99		Huevos	102
Adultos	85		Adultos	99
Hembras	42		Hembras	45
Machos	43		Machos	44
Replica 5	F ₁			F ₂
Huevos	87		Huevos	76
Adultos	65		Adultos	58
Hembras	33		Hembras	28
Machos	32		Machos	30

Cruzamientos Hembras TT x Machos Pelequén				
Replica 1	F ₁			F ₂
Huevos	102		Huevos	97
Adultos	97		Adultos	87
Hembras	44		Hembras	40
Machos	53		Machos	49
Replica 2	F ₁			F ₂
Huevos	150		Huevos	112
Adultos	137		Adultos	89
Hembras	64		Hembras	40
Machos	73		Machos	49
Replica 3	F ₁			F ₂
Huevos	78		Huevos	67
Adultos	68		Adultos	56
Hembras	35		Hembras	27
Machos	33		Machos	29
Replica 4	F ₁			F ₂
Huevos	142		Huevos	112
Adultos	117		Adultos	91
Hembras	58		Hembras	46
Machos	59		Machos	45
Replica 5	F ₁			F ₂
Huevos	98		Huevos	77
Adultos	90		Adultos	73
Hembras	45		Hembras	37
Machos	45		Machos	36

Tablas. Días de los ciclos de desarrollo de F₁ y F₂ entre las poblaciones

de *D. funebris*

	Controles	Controles		
	M x M	TT x TT	F ₁ ♀ M x ♂ TT	F ₂ ♀ M x ♂ TT
Días	30	30	33	38
	30	31	34	40
			34	39
			35	39
			33	41
			34	40
			36	38
			35	40
			35	39
			34	37

	Controles	Controles		
	M x M	TT x TT	F ₁ ♀ TT x ♂ M	F ₂ ♀ TT x ♂ M
Días	30	30	34	38
	30	31	34	37
			34	38
			33	37
			33	39
			32	36
			36	37
			34	38
			33	37
			33	35

	Controles	Controles		
	TT x TT	P x P	F ₁ ♀ TT x ♂ P	F ₂ ♀ TT x ♂ P
Días	30	30	31	33
	31	29	32	33
			32	34
			30	36
			32	35
			32	36
			31	36
			33	36
			30	35
			32	36

	Controles	Controles		
	TT x TT	P x P	F ₁ ♀ P x ♂ TT	F ₂ ♀ P x ♂ TT
Días	31	30	31	34
	30	29	31	35
			30	35
			32	35
			32	34
			32	33
			32	35
			31	35
			32	35
			32	35

	Controles	Controles		
	M x M	P x P	F ₁ ♀ M x ♂ P	F ₂ ♀ M x ♂ P
Días	30	30	33	36
	30	29	33	37
			32	37
			33	36
			31	35
			33	36
			32	35
			33	36
			33	36
			33	36
			33	34

	Controles	Controles		
	M x M	P x P	F ₁ ♀ P x ♂ M	F ₂ ♀ P x ♂ M
Días	30	30	32	36
	30	29	32	36
			32	35
			33	36
			33	36
			32	37
			31	35
			32	34
			34	36
			33	35

Tabla: Número y porcentaje de tubos contaminados en pruebas de viabilidad

		Tubos contaminados	% de Contaminación		
M x M					
P x P			0%		
TT x TT					
		F_1		F_2	
M x P	6	30,00		M x P	9 45,00
M x TT	7	35,00		M x TT	13 65,00
P x M	5	25,00		P x M	11 55,00
P x TT	6	30,00		P x TT	10 50,00
TT x M	7	35,00		TT x M	11 55,00
TT x P	8	40,00		TT x P	12 60,00

* 20 tubos
por combinación