



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Biblioteca Digital FCEN-UBA

Selección sexual post-copulatoria en *Drosophila*: ¿cuántas moscas no nacen por causa de la competencia espermática?

Hurtado, Juan
2014

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

www.digital.bl.fcen.uba.ar

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Fuente / source:

Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, Genética y Evolución

**Selección sexual post-copulatoria en *Drosophila*:
¿cuántas moscas no nacen por causa de la
competencia espermática?**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área de Ciencias Biológicas

Juan Hurtado

Director de tesis: Dr. Esteban Hasson

Consejero de estudios: Dr. Esteban Hasson

Buenos Aires, 2014

Resumen

Selección sexual post-copulatoria en *Drosophila*: ¿cuántas moscas no nacen por causa de la competencia espermática?

La competencia espermática (CE), ampliamente extendida entre las especies sexuales cuyas hembras son promiscuas, podría representar potentes presiones selectivas promoviendo conflictos intra e intersexuales. Por ello, es considerada un componente dominante de la selección sexual que teóricamente puede disparar evolución adaptativa rápida en caracteres sexuales. Estos caracteres constituyen potenciales barreras reproductivas entre poblaciones divergentes, por lo que la CE también podría facilitar la especiación. El verdadero rol de la CE en la evolución rápida o la especiación, sin embargo, permanece oculto. ¿Que tan frecuente es la promiscuidad de las hembras como para posibilitar la CE? ¿es la CE una fuerza selectiva intensa? ¿su intensidad varía entre las especies? Frente a estas cuestiones, en este trabajo estudiamos la intensidad de la CE y los factores del sistema de apareamiento (conjunto de comportamientos sexuales y reproductivos) que dan cuenta de ella en las especies hermanas *Drosophila buzzatii* y *D. koepferae*. Los análisis de promiscuidad que realizamos con hembras inseminadas en la naturaleza revelaron que la incidencia de paternidad múltiple y, por tanto, el riesgo de CE es mayor en *D. buzzatii* que en *D. koepferae*. El número estimado de padres por camada fue 3,57 en *D. buzzatii* y 1,95 en *D. koepferae*. En consecuencia, la proporción esperada de hembras inseminadas naturalmente por más de un macho fue 0,89 en *D. buzzatii* y 0,58 en *D. koepferae*. Según los experimentos de laboratorio, este patrón podría explicarse tanto por la mayor velocidad con la que las hembras inseminadas de *D. koepferae* utilizan el esperma almacenado, como por la mayor tasa de re-apareamiento de las hembras de *D. buzzatii*. Además, encontramos que el costo reproductivo que la CE impone sobre los machos es también mayor en *D. buzzatii*. Cuando una hembra inseminada copula con un segundo macho, la fertilidad del primero se reduce alrededor de 71% en *D. buzzatii* y sólo 33% en *D. koepferae*. En vista de las estimaciones del riesgo y del costo reproductivo de la CE, concluimos que la selección sexual postcopulatoria o CE representa una fuerza selectiva intensa en *D. buzzatii*. En esta última pudimos inferir que el 71% del esperma funcional no alcanza la fertilización a causa de la CE, en tanto que en *D. koepferae* sólo el 6% del esperma funcional perece a causa de la CE. Frente a estos resultados contrastantes, extendimos los experimentos a una tercera especie cercanamente emparentada, *D. antonietae*, en la cual estimamos que la CE excluye al 69% del esperma funcional. Creemos entonces que la CE tiene un gran potencial para generar evolución adaptativa ya que, en promedio, uno de cada dos espermatozoides no consigue la fecundación a causa de la CE en estas moscas cactófilas.

Palabras clave

Competencia Espermática; Poliandria; Prioridad de Esperma; Selección Sexual; Sistema de apareamiento; Uso de Esperma

Abstract

Postmating sexual selection in cactophilic *Drosophila*: how many flies are not born because of sperm competition?

Sperm competition (SC), which is widespread among sexual species with promiscuous females, may represent strong selective pressures by enhancing intra and intersexual conflicts. Therefore, it is considered a major component of sexual selection that can theoretically trigger rapid adaptive evolution in sexual characters. These traits may promote reproductive isolating barriers between divergent populations, thus SC may also facilitate speciation. The actual role of SC on rapid and adaptive evolution or speciation, however, is poorly understood. Are females promiscuous enough to enable SC? Does SC represent powerful selective pressures? Does its intensity vary among species? In the face of these issues, we studied in this thesis the intensity of SC and the mating system factors (sexual and reproductive behaviours) that account for it in the sibling *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae*. Promiscuity analyses on wild inseminated females revealed that the incidence of multiple paternity and, in turn, SC risk are greater in *D. buzzatii* than in *D. koepferae*. The estimated number of sires per brood was 3,57 in *D. buzzatii* and 1,95 in *D. koepferae*. Therefore, the expected proportion of wild caught females inseminated by more than one male was 0,89 in *D. buzzatii* and 0,58 in *D. koepferae*. Lab experiments indicated that this pattern is accounted for by the fact that *D. buzzatii* females retain sperm for longer periods and re-mate more often than *D. koepferae* females. In addition, we found that SC imposes a greater reproductive cost in *D. buzzatii*. When sperm of two different males co-occurred inside a female, first-mating male fertility was reduced by 71% in *D. buzzatii* and only 33% in *D. koepferae*. Based on the estimations of SC risk and cost, we concluded that postmating sexual selection or SC represents a powerful selective pressure in *D. buzzatii*. In the latter, we infer that 71% of functional sperm do not reach fertilization because of SC, while only 6% of functional sperm fail because of SC in *D. koepferae*. In view of these contrasting results, we extended the experiments to a third related species, *D. antonietae*, in which we estimated that SC excludes 69% of functional sperm. Then, we believe that SC has a great potential to generate adaptive evolution since, on average in these flies, one out of two spermatozoids does not reach fertilization because of SC.

Key words

Mating System; Polyandry; Sexual Selection; Sperm Competition; Sperm Displacement; Sperm Usage

Prefacio y agradecimientos

El desarrollo de esta tesis fue una de las aventuras más complejas de mi vida. Al comienzo experimenté la frustración de no obtener datos debido a los inconvenientes metodológicos que eran previsibles pero que, con suerte y perseverancia, supimos tras varios meses superar. Sufrí el agotamiento de pasar jornadas interminables en el laboratorio y ahí comprendí lo equivocado que estaba cuando apenas me licencié y festejaba el hecho de que nunca iba a tener que pasar más de doce horas en la facultad otra vez. Esta vez, cuando defienda esta tesis y me doctore, seré más prudente en mi festejo. Pero la mayor parte del tiempo la pasé muy bien y aprendí muchas cosas. Entre ellas aprendí que aprender es uno de los placeres más valiosos, aprendí a trabajar en equipo, a compartir logros y dificultades y a valorar las distintas etapas de un trabajo de investigación. Hallé al análisis de resultados la etapa más placentera. Disfruté de la recompensa que dejaba superar los desafíos y alcanzar los objetivos que nos proponíamos Esteban y yo. Además crecí mucho, pasé de tener 27 a tener 32 años, por lo que mi tesis fue testigo de una evolución enorme a nivel personal. Espero transmitir, a quien lea este trabajo, al menos parte de lo que fue esta aventura durante la cual conquistamos humildes logros en el estudio de la competencia espermática (CE) y sus implicancias evolutivas.

El campo de investigación de la CE ha experimentado un crecimiento fenomenal en las últimas décadas. Este incremento se debe principalmente a que cada vez más estudios revelan que la poliandria (sistema de apareamiento en el cual la hembra es promiscua y posee varias parejas sexuales) es un fenómeno ampliamente extendido entre las especies con reproducción sexual. Por ejemplo, recientemente se ha advertido, en especies cuyas hembras se creían monógamas, que la co-ocurrencia de espermatozoides de diferentes machos en el tracto reproductivo de una hembra es muy frecuente. Por ello la creencia de que sólo los machos son típicamente promiscuos está siendo ya abandonada. Incluso varios aspectos enigmáticos del comportamiento sexual y de la morfología genital humana muestran, bajo la luz de nuevos estudios, que la CE ha moldeado características centrales de nuestra biología.

La CE es aparentemente responsable de innumerables adaptaciones tanto en machos como en hembras, y su intensidad como fuerza selectiva, depende de (1) el riesgo de que espermatozoides provenientes de distintos machos se encuentren en el tracto reproductivo de una misma hembra y (2) del costo reproductivo que el encuentro conlleva para cada espermatozoides. El grado de promiscuidad de las hembras, que se refleja en la incidencia de paternidad múltiple (paternidad compartida por múltiples machos), define el riesgo de CE. La reducción de la capacidad reproductiva que experimenta el espermatozoides de un macho al compartir la hembra con otros espermatozoides, por su parte, define el costo reproductivo de la CE. En esta tesis exploramos en *Drosophila antonietae*, *D. buzzatii* y *D. koepferae*, tres especies hermanas de Sudamérica, el

riesgo de CE, los componentes del sistema de apareamiento (conjunto de comportamientos sexuales y reproductivos) que dan cuenta de tal riesgo y el costo reproductivo de la CE.

El texto está organizado en ocho capítulos. Si bien cada uno cuenta con cierta independencia, los capítulos están concatenados y sugiero leerlos ordenadamente para optimizar su comprensión. El primer capítulo es una introducción general. En él se exponen las cuestiones primeras que motivaron el desarrollo de esta tesis y se presentan los antecedentes relevantes de los temas abordados, la trascendencia del trabajo y los objetivos del proyecto. Los siguientes seis capítulos, que están subdivididos en un resumen, una introducción, una sección metodológica, una sección de resultados y una sección de referencias bibliográficas, describen los diferentes experimentos realizados y cómo con ellos pudimos abordar distintas cuestiones particulares de nuestra investigación. El capítulo ocho, el último, consiste en una discusión general. En la misma se integran todos los resultados y se exponen las principales conclusiones del trabajo.

Me siento gustosamente obligado a agradecer a un gran número de personas por haber colaborado en este proyecto de diversas maneras pero voy a mencionar a continuación sólo a aquellas personas cuya contribución fue directa.

En primer lugar quiero expresar mi gratitud a Esteban Hasson quien como director y consejero ha conseguido orientar mi formación científica, fortalecer mis conocimientos en biología evolutiva y, lo más importante, hacerme sentir muy a gusto trabajando a su lado. En particular le agradezco la confianza depositada en mí durante estos años y, sobre todo, la libertad brindada desde el primer momento. Esa libertad me ha permitido correr riesgos propios, llevar a la práctica mis ideas y experimentar protagonismo durante el desarrollo de nuevos proyectos. Espero compartir con él nuevos emprendimientos.

Agradezco enormemente al resto de los integrantes del laboratorio de Evolución cada momento compartido porque confío que sus aportes y comentarios enriquecieron mi trabajo y mi formación, y porque con muchos de ellos la pasamos genial donde sea. Ale Pettino-Zapata, Betina Colines, Diego De Panis, Eduardo Soto, Gonzalo Sabaris, Ignacio Soto, Juan José Fanara, Julian Mensch, Julián Padró, Julieta Goenaga, Marcos Imberti, María Betti, Nahuel Cabrera, Nicolás Frankel, Nicolás Lavagnino, Nicolás Mongiardino, Patricia Iglesias, Pedro Fontanarrosa, Valeria Carreira y Vicky Ortiz, a quienes aprecio mucho y de quienes recibo un afecto muy especial, constituyen un grupo del cual me siento orgulloso de formar parte. En particular, quiero destacar la participación de Patricia Iglesias. Pato a sabido adoptar, con responsabilidad y juicio crítico, una parte muy importante de este trabajo colaborando con las extracciones de ADN, las genotipificaciones y los análisis de paternidad.

Rocío Sampayo, quien fue mi novia los últimos 5 años (me aguantó bastante pero no llegamos juntos al fin de mi doctorado), ha sido la compañera más maravillosa de mi vida y fue

para mí la persona más influyente en este tiempo. Me hizo compañía durante las decenas de fines de semana que me tocó asistir al laboratorio. Incluso viajó conmigo en una de las últimas campañas en la que colectó material biológico valioso. Hizo que cada momento fuera más divertido. Dejó que compartiera con ella cada problema que desde el laboratorio me siguió a casa. Me enseñó mucho. Lo que debo destacar de Ro aquí, por el gran impacto que tuvo sobre mi formación, es su capacidad de mostrarme cuando estaba yo en lo cierto y cuando estaba yo equivocado, tarea nada fácil esta última. Así que agradezco todo esto y me felicito por haberla conquistado.

Hay dos amigos que siempre están ahí incluso cuando no los necesito. Me siento muy afortunado de contar con la amistad de Pablo Fazio y Santiago Revale. Ellos también han contribuido con su apoyo a mi trabajo de forma directa, dándole a mi vida el sentido que no tiene que ver con replicar mis genes. Si no fuera por ellos me habría perdido de muchas de las melodías y sabores de la vida, literal y figurativamente.

Finalmente quiero decir que mis padres merecen mucho más que un agradecimiento. Ellos depositaron en mí una confianza inspiradora y su apoyo prácticamente incondicional ha nutrido mi crecimiento tanto a nivel profesional como personal. Saber que cuento con ellos no sólo ha facilitado este trabajo de tesis sino que ha hecho mi vida mucho más rica y feliz.

El trabajo de esta tesis fue amparado por dos Becas de Postgrado (Tipo I y II) otorgadas por el Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y financiado a través de los siguientes subsidios: 1) Evolución y genética del uso de plantas hospedadoras en el modelo *Cactus/Drosophila* (2011-2014) 20020100100274/UBA; 2) Genómica y transcriptómica de las rutas de detoxificación en *Drosophila* (2011-2013) ANPCyT PICT 2795/2010; 3) Evolución y Genómica de la morfología de la genitalia, el uso de recursos y del comportamiento de elección del sitio de oviposición en *Drosophila* (2009-2013) CONICET PIP 112-200801-01459; 4) Genética y evolución de la morfología de la genitalia y del ala, y el comportamiento de oviposición en especies cactófilas del género *Drosophila* (Drosophilidae, grupo *repleta*) en diferentes etapas de la divergencia interespecífica (2008-2010) Programa UBACyT. X-097; y 5) Arquitectura genética de caracteres asociados a la divergencia y la adaptación en el modelo *Drosophila* (2007-2010) ANPCyT PICT 32146/05.

Juan Hurtado

Buenos Aires, 2014

ÍNDICE

<u>1 INTRODUCCIÓN GENERAL</u>	1
1.1 ¿Por qué esta tesis?	2
1.2 Competencia espermática y selección sexual	8
1.3 Intensidad de la competencia espermática	10
1.4 El grupo <i>repleta</i> del género <i>Drosophila</i>	13
1.5 Objetivos	20
1.6 Referencias	21
<u>2 PROMISCUIDAD DE LAS HEMBRAS</u>	30
2.1 Introducción	31
2.2 Materiales y métodos	35
2.2.1 Stocks de moscas	35
2.2.2 Tiempo cero de los ensayos de re-apareamiento	35
2.2.3 Ensayos de re-apareamiento	37
2.2.4 Análisis del atractivo de las hembras	38
2.2.5 Análisis de la propensión al apareamiento	39
2.2.6 Análisis de la duración del período refractario	39
2.3 Resultados	42
2.3.1 Atractivo de las hembras	42
2.3.2 Propensión al apareamiento	43
2.3.3 Duración del período refractario	44
2.4 Referencias	47
<u>3 VELOCIDAD DE CONSUMO DEL ESPERMA ALMACENADO</u>	51
3.1 Introducción	52
3.2 Materiales y métodos	55
3.2.1 Ensayos de fertilización	55
3.2.2 Análisis del consumo de esperma	55
3.3 Resultados	57
3.4 Referencias	59
<u>4 PATERNIDAD MÚLTIPLE EN LA NATURALEZA</u>	60
4.1 Introducción	61
4.2 Materiales y métodos	63
4.2.1 Recolección de las muestras	63
4.2.2 Genotipificación molecular	63
4.2.3 Análisis de paternidad	64
4.3 Resultados	66
4.4 Referencias	68

<u>5</u>	<u>ÓRGANOS DE ALMACENAMIENTO DE ESPERMA</u>	69
5.1	Introducción	70
5.2	Materiales y métodos	72
5.2.1	Morfología del receptáculo seminal y las espermatecas	72
5.2.2	Cuantificación del esperma almacenado por cópula	73
5.3	Resultados	75
5.3.1	Morfología del receptáculo seminal y las espermatecas	75
5.3.2	Cuantificación del esperma almacenado por cópula	76
5.4	Referencias	77
<u>6</u>	<u>COSTO REPRODUCTIVO DE LA COMPETENCIA ESPERMÁTICA</u>	78
6.1	Introducción	79
6.2	Materiales y métodos	81
6.2.1	Fecundidad de hembras inseminadas por un macho	81
6.2.2	Fecundidad de hembras inseminadas por dos machos	81
6.2.3	Prioridad de esperma	82
6.2.4	Análisis estadísticos	83
6.3	Resultados	85
6.4	Referencias	88
<u>7</u>	<u>UNA ESPECIE MÁS: <i>DROSOPHILA ANTONIETAE</i></u>	90
7.1	Introducción	91
7.2	Materiales y métodos	93
7.2.1	Stocks de moscas	93
7.2.2	Promiscuidad de las hembras	93
7.2.3	Velocidad de consumo del esperma almacenado	95
7.2.4	Paternidad múltiple en la naturaleza	96
7.2.5	Costo reproductivo de la competencia espermática	97
7.3	Resultados	99
7.3.1	Promiscuidad de las hembras	99
7.3.2	Velocidad de consumo del esperma almacenado	102
7.3.3	Paternidad múltiple en la naturaleza	102
7.3.4	Costo reproductivo de la competencia espermática	104
7.4	Referencias	105
<u>8</u>	<u>DISCUSIÓN GENERAL</u>	106
8.1	Integración e interpretación de resultados	107
8.1.1	Promiscuidad de las hembras y propensión al re-apareamiento	107
8.1.2	Patrón temporal del consumo del esperma almacenado	111
8.1.3	Riesgo de competencia espermática	111
8.1.4	Órganos de almacenamiento de esperma	113
8.1.5	Incidencia de paternidad múltiple en la naturaleza	113
8.1.6	Consecuencias de la competencia espermática	117
8.1.7	Intensidad de la competencia espermática	120
8.2	Conclusiones	123
8.3	Referencias	126

CAPÍTULO I

Introducción general



Ejemplares de *Drosophila buzzatii* en el laboratorio: dos machos compitiendo por el acceso a una hembra. Uno de los machos logra montar a la hembra mientras que el otro continúa cortejándola.

1.1. ¿Por qué esta tesis?

Desde hace décadas sabemos que, a nivel molecular, gran parte de las mutaciones son neutrales, es decir, no afectan a la aptitud biológica. Por tanto, las frecuencias alélicas de estos caracteres moleculares evolucionan por deriva génica y son invisibles para la selección natural (Kimura, 1983). Otras tantas mutaciones imparten a los individuos portadores una reducción de su aptitud biológica. En estos casos, la selección negativa obstaculiza la evolución de los caracteres reduciendo las chances de que estas variantes alélicas desfavorables se incorporen al acervo génico de las poblaciones. Luego, están aquellas mutaciones, más infrecuentes, que incrementan la aptitud biológica y, eventualmente, pueden establecerse en las poblaciones por selección positiva. Estas mutaciones suscitan un interés especial porque son responsables fundamentales de la evolución adaptativa, la cual posibilita el advenimiento de adaptaciones. Pero ¿qué es una adaptación? Aunque este es un asunto sobre el que existen diferentes posturas, vamos a considerar aquí que **adaptación** es cualquier carácter que resulta “útil” para su portador, que le confiere “mejor ajuste” al ambiente selectivo (Lloyd, 2000). Entonces, la evolución adaptativa nos permite entender por qué, por ejemplo, los vertebrados terrestres tenemos pulmones mientras los peces poseen branquias o por qué los mamíferos carnívoros tienen colmillos filosos que no están presentes en los rumiantes. En otras palabras, la evolución adaptativa provee una explicación que permite comprender cómo se generaron y desarrollaron las características de los seres vivos que, de otro modo, podrían parecer inteligentemente diseñadas.

Las adaptaciones pueden manifestarse en los organismos (o cualquier otra entidad fenotípica que interactúe con el ambiente) que son los blancos directos de la selección natural. Sin embargo, según Dawkins, las entidades que poseen tales adaptaciones y que se “benefician” con la evolución adaptativa son los **replicadores**, entendiendo por replicador una porción de ADN (no necesariamente restringida a un único gen o marco abierto de lectura) con alta fidelidad de copia (Dawkins, 1989). Un replicador podría ser, por ejemplo, un grupo de varios genes concatenados en un cromosoma, incluidas las porciones intergénicas. En este sentido, cada replicador, junto a otro montón de replicadores, contiene la información necesaria para fabricar individuos y otorgarles cualidades o simplemente “habita” sus cuerpos, los cuales se

renuevan de generación en generación, mientras “compiten” con otras variantes o alelos por ser seleccionado naturalmente. Con decir que los replicadores “compiten” entre sí nos referimos a que aquellas variantes (alelos) que se repliquen más exitosamente que las demás tenderán a aumentar su frecuencia en la población a costa de las demás. Entonces, ¿qué hace que nuestros replicadores estén adaptados? Lo hace el hecho de que, desde el desarrollo de nuestros cuerpos, los replicadores nos proveen de cualidades útiles para nuestra supervivencia y reproducción en el ambiente particular en el que viviremos. ¿El ambiente en el que viviremos? ¿Cómo podría adelantarse un grupo de genes al futuro? No es que los genes puedan adelantarse al futuro; sencillamente, un grupo de genes BIEN ADAPTADO es aquel que codifica la información para fabricar individuos BIEN PREPARADOS para los desafíos que atravesarán durante su vida. Para ello, los replicadores deben conseguir, aunque no deliberadamente, una buena “predicción” de esos desafíos. Si el ambiente del futuro inmediato en el que los replicadores serán seleccionados naturalmente resultara similar al ambiente en el cual han sido seleccionados en el pasado, es posible lograr una buena “predicción” de los futuros desafíos. Si, por el contrario, el ambiente cambiara repentinamente, los replicadores que estaban bien adaptados podrían dejar de estarlo. Por ello, cuanto más previsible es el ambiente más sencillo es para los replicadores o genes permanecer adaptados a él. Por ejemplo, los replicadores de los peces podrían “predecir” (si fueran capaces de hacerlo), con pocas chances de error, que el cuerpo aún no nacido que “habitarán” va a tener que subsistir siempre bajo el agua. Por eso, aquellos involucrados en el desarrollo de las branquias siguen adaptados y codifican la información necesaria para fabricar cuerpos capaces de superar la tarea de incorporar oxígeno del ambiente, ya que vienen siendo seleccionados naturalmente por esa capacidad desde hace muchos millones de años.

Pero, ¿es posible fabricar cuerpos preparados para superar todas las eventuales dificultades que podrían enfrentar a lo largo de la vida? Resulta obvio que no, sencillamente porque algunas de esas dificultades son poco o nada predecibles. Los agentes que atentan contra la supervivencia y reproducción de los individuos se vuelven poco predecibles para los replicadores cuando ellos, los propios agentes selectivos, cambian. Por ejemplo, para los replicadores de un animal que es presa de otro, los cuerpos del predador representan un agente selectivo que atenta contra su subsistencia y, por tanto, es esperable que se adapten de modo que los cuerpos de la

presa puedan escapar de los cuerpos del predador. Al mismo tiempo, las adaptaciones de los replicadores de la presa que incrementan las chances de escape representan para los replicadores del predador un agente selectivo que atenta contra su subsistencia y, por tanto, es esperable que éstos se adapten de modo que los cuerpos del predador puedan evitar el escape de los cuerpos de la presa. En este caso, la presa y el predador estarían compitiendo por los cuerpos de la presa: el predador buscaría utilizar los cuerpos de la presa como fuente de alimento mientras que la presa buscaría utilizarlos como “vehículos” de sus genes. Las variantes genéticas innovadoras, tanto de la presa como del predador, que provean nuevas formas de ganar la batalla, serán seleccionadas positivamente generando una coevolución o carrera armamentista entre los competidores. Es esperable que se desarrollen múltiples adaptaciones como consecuencia de una competencia como esta porque los replicadores son seleccionados por codificar la información necesaria para fabricar individuos preparados para combatir o sobrevivir a un agente selectivo que siempre se va renovando (en este ejemplo, a medida que evoluciona) y que representa un ambiente siempre cambiante, difícil de predecir. Este tipo de coevolución puede darse entre las partes de cualquier conflicto o competencia. Puede darse entre la presa y el predador, entre el parásito y el hospedador, entre machos compitiendo por el acceso a las hembras o incluso entre el macho y la hembra de una misma especie frente a un conflicto intersexual.

La discusión precedente pretende señalar que los conflictos entre seres vivos son motores de evolución adaptativa que pueden actuar incansablemente proponiendo nuevos desafíos, en tanto provoquen la renovación de los agentes selectivos. Pero está claro que no todos los agentes selectivos tienen la misma capacidad de generar evolución adaptativa, de promover el desarrollo y la complejización de adaptaciones. Por un lado, la llegada de un agente selectivo imposible de sortear, como la caída repentina de un meteorito, podría llevar a cualquier población a la extinción sin que haya posibilidad de desarrollar o complejizar adaptación alguna. Para posibilitar la evolución de adaptaciones, el agente selectivo debe ser genéticamente afrontable. Con genéticamente afrontable queremos decir que podría existir, o eventualmente emerger, alguna variante genética que conlleve una mayor capacidad de supervivencia frente a los desafíos que el agente selectivo impone. Por otro lado, un agente selectivo genéticamente afrontable pero muy poco intenso, es decir, que no imponga un costo reproductivo considerable, difícilmente promueva el desarrollo de adaptaciones. Si las

dificultades impuestas por el agente selectivo fueran poco notables, las distintas variantes genéticas serían poco diferenciables por la selección natural y evolucionarían mayormente por deriva génica. Por tanto, los agentes selectivos más fructíferos para la evolución adaptativa son aquellos no sólo genéticamente afrontables sino también suficientemente intensos como para imponer un costo reproductivo elevado. Es decir, aquellos agentes que representan un filtro selectivo mucho más difícil de atravesar para algunos alelos que para otros.

Los sistemas de apareamiento de las especies con reproducción sexual condicionan la evolución adaptativa determinando los conflictos de intereses que tendrán lugar entre los organismos de una misma especie a la hora de reproducirse. Por ejemplo, la poliandria (sistema de apareamiento en el cual la hembra es promiscua y posee varias parejas sexuales) puede imponer la competencia entre los espermias (los espermatozoides junto al resto de los componentes seminales) de diferentes machos dentro del tracto reproductivo de la hembra por el acceso a los óvulos. Esta competencia, que llamamos competencia espermática (CE), implica conflictos entre machos rivales pero también, como veremos más adelante, puede provocar conflictos entre los sexos. Por estos motivos, la CE podría facilitar la evolución adaptativa renovando agentes selectivos y sosteniendo una intensa presión de selección genéticamente afrontable y reproductivamente costosa.

Imaginemos que la CE estuviera muy extendida y pudiera promover altas tasas de evolución adaptativa en caracteres sexuales responsables de establecer las señales bioquímicas y fisiológicas, entre los miembros de una pareja, necesarias para concretar la reproducción. En tal caso, la CE sería un gran inductor de incompatibilidades reproductivas entre machos y hembras provenientes de poblaciones divergentes, originando barreras de aislamiento y facilitando la especiación. Tal vez la CE sea un fenómeno de esos que, como vimos, renovando los agentes selectivos, no sólo haya moldeado la evolución adaptativa de cada especie sino que también haya sido un mecanismo responsable de la evolución de la gran diversidad de especies con reproducción sexual. Tal vez los replicadores estén más adaptados a las condiciones establecidas por la CE que a desafíos climáticos, enfermedades u otras amenazas; sin embargo, la naturaleza críptica de los conflictos sexuales que se originan después del apareamiento dentro del tracto reproductivo de las hembras haya permitido que muchas adaptaciones producto de la CE pasen desapercibidas. Por estos motivos

encontramos que el estudio de la CE es interesante y podría ayudar a comprender no sólo la evolución de los sistemas reproductivos sino también el desarrollo de muchas adaptaciones y el origen de nuevas especies.

En los últimos años, se ha advertido, en especies cuyas hembras se creían monógamas, que la co-ocurrencia de esperma de diferentes machos en el tracto reproductivo de una hembra es muy frecuente (Simmons, 2005). Así, son cada vez más los estudios que revelan que la poliandria es un fenómeno ampliamente extendido entre las especies con reproducción sexual. Por otra parte, las tasas de evolución de la anatomía genital, a nivel morfológico, y las de las proteínas seminales, a nivel molecular, están entre las más altas hasta ahora documentadas para una gran variedad de organismos (Swanson & Vacquier, 2002; Hosken & Stockley, 2004; Civetta, 2012). Debido a que las proteínas reproductivas y la morfología genital pueden afectar directamente el destino de los espermatozoides que compiten dentro del tracto reproductivo de las hembras por el acceso a los óvulos, se cree que su rápida evolución podría ser causada por la CE (Simmons, 2001; Swanson & Vacquier, 2002; Hosken & Stockley, 2004; Civetta, 2012).

Entre las adaptaciones que se adjudican a la CE podemos destacar el origen de los géneros. Cada sexo se define en términos del tamaño de las gametas que produce y, por tanto, el advenimiento de la anisogamia tuvo necesariamente que haber precedido a la separación entre machos y hembras. Una hipótesis sostiene que la competencia gamética, y más tarde la CE, podría haber conducido al origen de la separación entre machos y hembras (Parker *et al.*, 1972). Remontándonos a un momento pre-anisogámico, podemos imaginar un animal primitivo con fertilización externa capaz de incrementar el número de fusiones gaméticas liberando un mayor número de gametas al medio. Si la inversión energética que estos animales destinaran a la producción de gametas fuera fija, para producir un mayor número de gametas deberían disminuir el tamaño de cada una de ellas. Por tanto, si el tamaño de las gametas estuviera genéticamente determinado, los replicadores de este animal que codificaran la información para liberar mayor número de gametas, pero más pequeñas, conseguirían un mayor número de copias por generación pero “habitando” cigotos más pequeños y consecuentemente menos provistos y menos viables. Las simulaciones de este escenario, seguidas luego por distintas soluciones analíticas, revelaron que la estrategia evolutivamente estable frente a este problema es la co-existencia de dos morfos que

difieren en el tamaño de sus gametas: los machos y las hembras (Parker *et al.*, 1972; Maynard Smith, 1978; Hoekstra, 1980).

Incluso aspectos enigmáticos de la sexualidad humana, como la cantidad y calidad del líquido seminal que es eyaculado durante la cópula, las preferencias sexuales y la morfología genital, bajo la luz de nuevos estudios, parecen haber sido modelados por una CE intensa en nuestros ancestros (Goetz *et al.*, 2008; Nummi & Pellikka, 2012).

Por lo expuesto en los últimos tres párrafos la CE parece ser un fenómeno extendido entre las especies sexuales que probablemente haya actuado como un potente motor de adaptaciones. Si ciertamente la CE constituyera un generador de evolución adaptativa tan importante, debería cumplir con el requisito antes enunciado: implicar presiones selectivas genéticamente afrontables y costosas. Vamos a suponer, por ahora, que los costos impuestos por la CE tanto en machos como en hembras son genéticamente afrontables. Entonces queda por evaluar si la CE impone un costo reproductivo verdaderamente elevado como para permitir la selección constante de nuevas adaptaciones. Esta fue la motivación fundamental de esta tesis y por ello su título incluye el interrogante de cuántas moscas no llegan a nacer por causa de la CE, porque la cantidad de espermatozoides que perece a causa de la CE es un indicador de la intensidad de la presión selectiva que ésta representa. En el último capítulo de esta tesis, la Discusión general ([sección 8.1.7](#)), abordaremos esta pregunta integrando los resultados de distintos experimentos que serán descriptos separadamente en los capítulos subsiguientes.

1.2. Competencia espermática y selección sexual

La selección sexual es un modo de selección natural en la que los individuos adultos difieren en su capacidad competitiva de fusionar sus gametas entre sí y así reproducirse. De modo que los individuos más competitivos son reproductivamente más exitosos. Dicha capacidad competitiva puede presentar componentes pre y postcopulatorios. Por ejemplo, cuando los individuos deben competir por conseguir una pareja para copular, se habla de selección sexual precopulatoria o clásica. Cuando las hembras son promiscuas y almacenan gametas de varios machos dentro de su tracto reproductivo, son los espermatozoides los que deben competir entre sí por el acceso a los óvulos. En estos casos la selección sexual es postcopulatoria.

La CE se refiere, en general, a cualquier proceso de selección sexual postcopulatoria. En algunas especies, cuando una hembra es inseminada por más de un macho, ella puede controlar la utilización de los distintos espermias favoreciendo el espermia de algún macho en particular. Este control femenino constituye un componente de la selección sexual postcopulatoria conocido como elección femenina críptica (porque ocurre dentro del tracto reproductivo de las hembras). Muchos autores la distinguen de la CE al considerar que la CE (*sensu stricto*) sólo debiera incluir a la competencia directa entre espermatozoides de diferentes machos por el acceso a los óvulos. En esta tesis, sin embargo, vamos a referirnos a la CE como sinónimo de todos los componentes de la selección sexual postcopulatoria. Esto no solo incluye a la competencia directa entre espermatozoides que coexisten dentro del tracto reproductivo de las hembras o a la elección femenina críptica, sino también a la acción de cualquier factor que afecte la suerte de los espermatozoides transferidos durante la cópula (e.g. la capacidad diferencial de los machos de remover mecánicamente, durante la cópula, el espermia de otros machos previamente almacenado por las hembras).

La CE es reconocida como una fuerza evolutiva intensa (Parker, 1998; Simmons, 2001) responsable de una gran diversidad de adaptaciones comportamentales, fisiológicas y morfológicas en los machos (Parker, 1970; Parker, 1998; Simmons, 2001). El riesgo de que el espermia de un macho sea desplazado por el de otro, promueve adaptaciones útiles tanto para prevenir el desplazamiento del propio espermia como para facilitar el desplazamiento del espermia de otros machos (Simmons, 2001). Por otro lado, es factible que las adaptaciones de los machos promovidas por la CE afecten la

supervivencia y el éxito reproductivo de las hembras, cuyos intereses, respecto a muchos eventos reproductivos, pueden diferir enormemente con los de los machos (Arnqvist, 1998). Por ejemplo, el éxito reproductivo de los machos tiende a maximizarse cuando sus parejas no re-aparean con otros machos, mientras que el éxito reproductivo de las hembras probablemente aumente con la frecuencia de re-apareamiento. Por tanto, la CE podría generar conflictos intersexuales, capaces de promover el advenimiento de una carrera armamentista entre machos y hembras por controlar los eventos reproductivos bajo conflicto sexual (Arnqvist, 1998; Birkhead & Pizzari, 2002). Esta hipótesis de conflicto sexual predice una coevolución sexual antagonista de los caracteres reproductivos que facilitan el control de la reproducción. Caracteres tales como las estructuras genitales y las proteínas seminales, que interactúan directamente con el tracto reproductivo de las hembras, constituyen un excelente terreno para el desarrollo de adaptaciones que faciliten el control de la reproducción. Dado que la coevolución sexual antagonista, producto de la CE y el conflicto sexual, puede en teoría ejercer fuertes presiones selectivas de manera indefinida sobre ambos sexos, también podría disparar una evolución adaptativa acelerada. Esta evolución rápida, a su vez, podría acelerar la divergencia entre poblaciones, promoviendo el aislamiento reproductivo y eventualmente la especiación. Llamativamente, los caracteres sexuales tales como la morfología genital de los machos y las proteínas seminales, muestran tasas de evolución adaptativa significativamente mayores que el resto de los caracteres (Eberhard, 1985; Haerty *et al.*, 2007). Por tanto, la CE ha sido propuesta como responsable de la evolución rápida de estos caracteres reproductivos (Birkhead & Pizzari, 2002; Swanson & Vacquier, 2002; Hosken & Stockley, 2004; Haerty *et al.*, 2007). Una predicción de esta hipótesis es que la intensidad de la CE debe dar cuenta de la tasa de evolución adaptativa de los genes o caracteres de evolución rápida (Wong, 2011). Para poner a prueba esta predicción, lo que ayudaría a clarificar el alcance de la selección sexual postcopulatoria sobre la evolución rápida, es necesario cuantificar la intensidad de la CE entre especies emparentadas en las que genes o caracteres de evolución rápida hayan sido identificados (Wong, 2011).

1.3. Intensidad de la CE

En muchos animales con fertilización interna las hembras son promiscuas y almacenan esperma de varios machos en órganos especializados de su tracto reproductivo (Birkhead & Møller, 1998; Simmons, 2005), lo que hace a la CE un proceso ampliamente extendido en el reino animal. En particular, las hembras del género *Drosophila* pueden almacenar grandes cantidades de esperma en un órgano tubular llamado receptáculo seminal y, en algunas especies, además, en un par de órganos esféricos llamados espermotecas (Fowler, 1973; Pitnick *et al.*, 1999). La cantidad de esperma almacenado en estos órganos cambia con el tiempo transcurrido desde el apareamiento (Patterson, 1954). La dinámica de la cantidad de esperma almacenado a lo largo de la vida de una hembra inseminada está determinada por dos procesos: la Frecuencia con que las Hembras Re-aparean (FHR) y la Velocidad a la que Consumen (usan o desperdician) el Esperma almacenado (VCE). Por un lado, las reservas de esperma se reducen cuando la hembra libera esperma de los órganos de almacenamiento al útero, para conseguir la fertilización de los óvulos que provienen de los ovarios (Bloch Qazi *et al.*, 2003). Por otro lado, las reservas de esperma se recargan cuando la hembra re-aparea y el esperma depositado en el útero, rápidamente encuentra su camino hacia los órganos de almacenamiento (Lefevre & Jonsson, 1962).

Dado que la CE implica la co-ocurrencia de esperma de distintos machos dentro de una misma hembra (Parker, 1970), la intensidad de la CE depende de las variables del sistema de apareamiento (conjunto de comportamientos sexuales y reproductivos) que afectan el riesgo de que espermatozoides de distintos machos se encuentren en el tracto reproductivo de una hembra (Simmons, 2001). Entre las especies del género *Drosophila*, por ejemplo, el riesgo de CE (i.e. la probabilidad de que el esperma de un macho compita contra el de otros por el acceso a un grupo de óvulos) se incrementa a medida que aumenta FHR, pero disminuye a medida que aumenta VCE (Parker, 1970). Difícilmente FHR y VCE sean independientes, en parte porque las hembras de *Drosophila* a menudo re-aparean para recargar las reservas de esperma (Markow, 1996, 2002; Singh *et al.*, 2002). En esos casos, las especies con mayor VCE también exhibirían mayor FHR (Markow *et al.*, 2012), no obstante, la intensidad de la CE aún dependería de cuál, FHR o VCE, es el determinante más fuerte de la CE. Por tanto, sin estimaciones precisas de la intensidad de la CE es muy difícil inferir la importancia relativa de FHR y

VCE como determinantes del riesgo de CE. Hasta ahora, las estimaciones de la intensidad de la CE son mayormente indirectas (Simmons & Beveridge, 2010) y la contribución de los distintos componentes del sistema de apareamiento a la variación interespecífica de la fuerza de la CE sigue siendo desconocida.

Un prerrequisito de la CE es que las hembras re-aparean antes de agotar sus reservas de esperma. Una manera de explorar este prerrequisito es determinar si el tiempo necesario para que las hembras inseminadas gasten el esperma almacenado es mayor que el tiempo de latencia sexual necesario para que las hembras inseminadas re-aparean. Sin embargo, las estimaciones de laboratorio podrían no reflejar acertadamente lo que ocurre en la naturaleza ya que las condiciones ecológicas pueden afectar a VCE y a FHR determinando las oportunidades de oviposición y apareamiento, respectivamente (Markow & O'Grady, 2008). Otra manera de testear la co-ocurrencia de esperma de múltiples machos, que no depende de las condiciones experimentales del laboratorio, es recuperando la variación genética de la progenie de hembras inseminadas y capturadas en la naturaleza, utilizando marcadores altamente polimórficos. Esta aproximación ha sido implementada en varios estudios revelando que la incidencia de la poliandria es altamente variable entre especies de *Drosophila* (Harshman & Clark, 1998; Imhof *et al.*, 1998; Jones & Clark, 2003; Bundgaard *et al.*, 2004; Schlötterer *et al.*, 2005; Good *et al.*, 2006; Frentiu & Chenoweth, 2008).

Al final de una competencia siempre surgen ganadores y perdedores. La poliandria, sin embargo, no necesariamente implica tal resultado, pues no necesariamente provoca un costo reproductivo a los múltiples padres involucrados. Luego, la paternidad múltiple no garantiza la CE a menos que el número de huevos fertilizados por el esperma de un padre se vea reducido por la presencia del esperma de otro padre (Simmons, 2001). Esta reducción de la fertilidad de los machos parece improbable cuando el número de espermatozoides transferidos por cópula es muy bajo y la tasa de liberación de óvulos desde los ovarios para la fertilización es muy alta, i.e. cuando el número de huevos disponible es suficiente para el esperma almacenado de todos los potenciales padres. La competencia directa (*sensu stricto*) tampoco ocurrirá cuando los espermias provenientes de distintos machos son localizados en compartimientos diferentes del tracto reproductivo de la hembra (Simmons, 2001). Por tanto, para estimar la intensidad de la CE como fuerza selectiva, es necesario estudiar

tanto el fenómeno de paternidad múltiple como también las consecuencias reproductivas de tal fenómeno sobre el esperma almacenado.

En esta tesis decidimos explorar tanto el riesgo de que ocurra CE como los costos reproductivos que esta impone utilizando como modelo dos especies del género *Drosophila* que forman parte del *cluster D. buzzatii* del complejo *buzzatii* (grupo *repleta*, subgénero *Drosophila*). Por este motivo, a continuación presentamos una descripción de los antecedentes más relevantes de este grupo de especies que justifican nuestra elección.

1.4. El grupo *repleta* del género *Drosophila*

Con más de 100 especies endémicas del continente americano, el grupo *repleta* representa una de las radiaciones más grandes del género *Drosophila* y ha demostrado ser un modelo evolutivo muy valioso (Patterson & Stone, 1952; Throckmorton, 1975; Vilela, 1983; Wasserman, 1992; Markow & O'Grady, 2006). Estudios en diferentes especies del grupo han permitido comprender más acertadamente aspectos generales de la evolución cromosómica y genómica (Cáceres *et al.*, 1999; Negre *et al.*, 2005), los mecanismos de especiación (Coyne & Orr, 1997; Etges & Jackson, 2001; Etges *et al.*, 2010), las adaptaciones a ambientes desérticos (Gibbs & Matzkin, 2001; Gibbs *et al.*, 2003; Hasson *et al.*, 2009) y, en relación a la CE, la evolución de proteínas reproductivas y la rápida divergencia de la genitalia (Wagstaff & Begun, 2005; Kelleher *et al.*, 2007; Soto *et al.*, 2007; Wagstaff & Begun, 2007; Almeida & DeSalle, 2008, 2009, Soto *et al.*, 2010, 2013).

La mayoría de las especies de este grupo son cactófilas y habitan regiones áridas o semiáridas. Los recursos tróficos o sustratos donde desarrollan sus ciclos de vida son los tejidos necróticos de cactáceas, tanto del género *Opuntia* (tunas) como de varios géneros de cactus columnares (subfamilia Cactoidea) (Fig. 1.1) (Ruiz & Heed, 1988; Ruiz *et al.*, 1990; Hasson *et al.*, 1992). Los tejidos de los cactus se convierten en hábitats propicios para las moscas una vez que se encuentran en descomposición, condición que sigue a una herida en la planta que propicia la subsecuente invasión de bacterias y levaduras. Los adultos se alimentan y aparean (generalmente) sobre la superficie de los sustratos y las hembras inseminadas depositan sus huevos en los tejidos necróticos que sirven luego como alimento para las larvas en desarrollo.

Dado que el grupo *repleta* está confinado al Nuevo Mundo (dejando de lado la influencia humana en la dispersión de algunas especies), parece que su origen ocurrió en Sudamérica tras el surgimiento de los principales grupos de cactáceas que devino con el calentamiento y aridización del interior del continente, durante el elevamiento de la cordillera de los Andes hace cerca de 18 millones de años (Mauseth, 1990; Nyffeler, 2002).

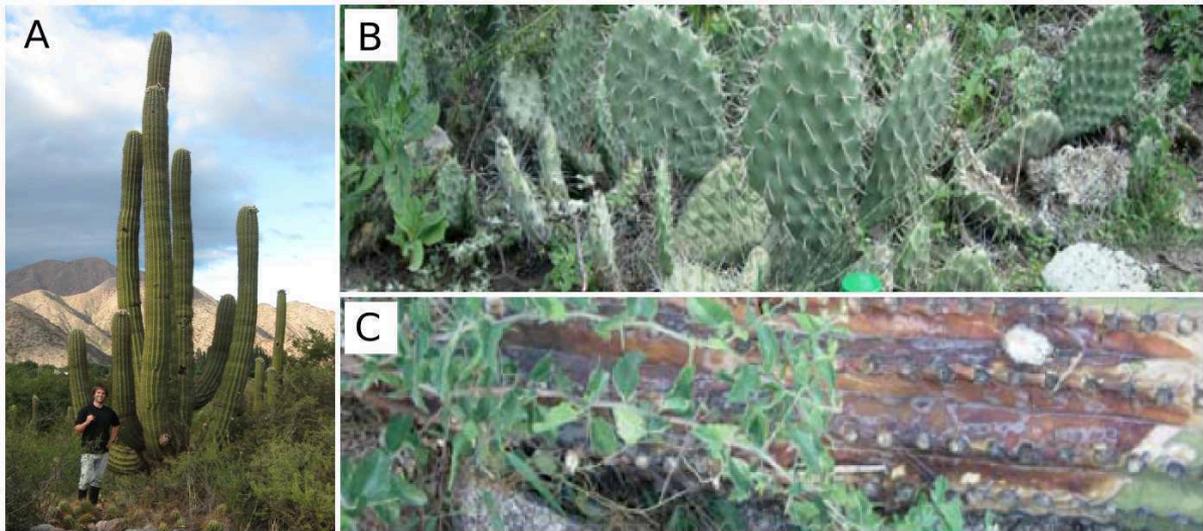


Figura 1.1. Recursos naturales utilizados por las especies *Drosophila buzzatii* y *D. koepferae* en el noroeste de la Argentina. A) Ejemplar de *Trichocereus schekii* (cardón). B) Ejemplar de *Opuntia sulphurea*. C) Porción de cardón en avanzado estado de descomposición.

El número preciso de especies es aún incierto debido a que los nombres de algunos taxa han sido propuestos como sinónimos y a la posible existencia de algunas especies crípticas sin fronteras claras (Oliveira *et al.*, 2005, 2008). Seis subgrupos de especies han sido descritos –*mulleri*, *hydei*, *mercatorum*, *repleta*, *fasciola*, e *inca*– los que, a su vez, se han subdividido en complejos de especies, *clusters* y *subclusters* en base a los patrones de bandas de los cromosomas politénicos y a la morfología genital de los machos (Patterson, 1943; Wharton, 1944; Wasserman, 1962; Rafael & Arcos, 1989). La filogenia más reciente y completa, basada en las secuencias de 10 genes nucleares y mitocondriales, que incluyó a 62 especies del grupo y nueve terminales externos, respalda fuertemente la monofilia del grupo (Fig. 1.2) (Oliveira *et al.*, 2012). Además, la mayoría de las subdivisiones previamente descritas en base a la información que proveen las inversiones cromosómicas fueron recuperadas en el trabajo de Oliveira *et al.* (2012). Las estimaciones de los tiempos de divergencia sugieren que el grupo *repleta* se separó de su grupo hermano hace cerca de 20 millones de años y que su diversificación se remonta a unos 16 millones de años (Oliveira *et al.*, 2012).

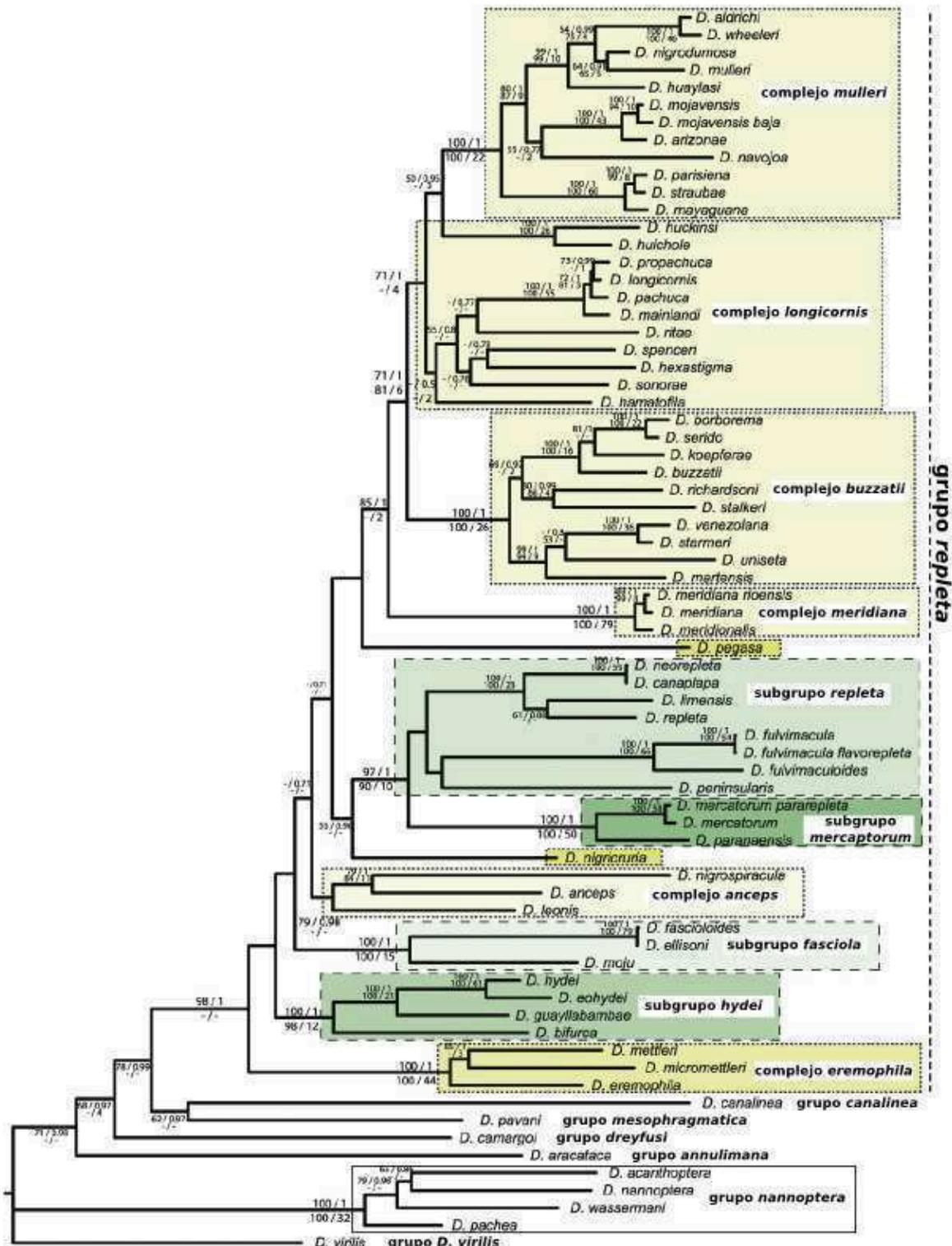


Figura 1.2. Hipótesis filogenética del grupo *repleta* extraída de Oliveira *et al.*, 2012. Árbol obtenido por búsquedas de Máxima Verosimilitud (MV) en base a las secuencias de diez genes mitocondriales y nucleares. Por nodo se muestra: arriba a la izquierda el porcentaje de remuestros MV (>50%), arriba a la derecha la probabilidad posterior obtenida por inferencia bayesiana (>0,7), abajo a la izquierda el porcentaje de remuestros Máxima Parsimonia (>50%) y abajo a la derecha el soporte de Bremer (>1).

Una cualidad interesante del grupo *repleta* es que, además de incluir muchas especies, se han descrito y caracterizado muchos caracteres comportamentales, moleculares y morfológicos de evolución adaptativa rápida. Todos estos caracteres afectan directamente la interacción intersexual durante y tras el apareamiento, i.e. constituyen potenciales caracteres blanco de la selección sexual postcopulatoria y pueden generar barreras reproductivas precigóticas entre poblaciones divergentes. Este hecho hace al grupo un sistema modelo valioso para estudiar el advenimiento de las barreras reproductivas durante el proceso especiogénico, para dilucidar las causas de la evolución adaptativa rápida de ciertos caracteres y, en particular, para investigar el rol de la selección sexual en la evolución de tales caracteres. Veamos algunos ejemplos de estos caracteres de evolución rápida descritos en este grupo.

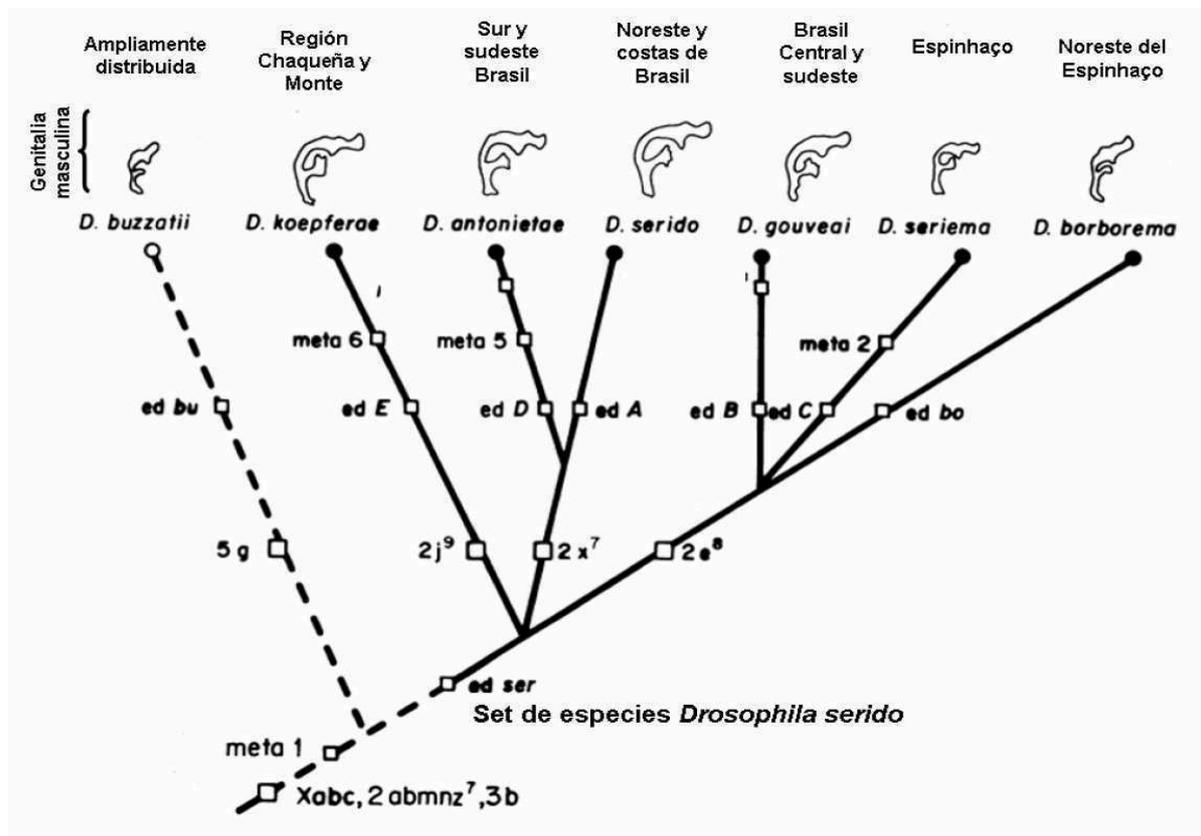


Figura 1.3. Hipótesis filogenética del *cluster buzzatii* basada en inversiones cromosómicas. ed A–E: morfotipos de *aedeagi* (genitalia masculina) según Silva & Sene (1991). bu: *D. buzzatii*; bo: *D. borborema*; meta: tipos de cromosomas metafásicos según Baimai *et al.* (1983). La línea continua indica las relaciones de las especies incluidas dentro del grupo denominado “sibling set de *D. serido*” (Tidon-Sklorz & Sene 1995). Sobre los nombres de las especies se ilustran los contornos de los *aedeagi* y se indica la distribución geográfica en Sudamérica. Figura modificada de Manfrin & Sene (2006).

Los cantos nupciales que exhiben los machos de *Drosophila* producidos por movimientos de las alas durante el cortejo han sido caracterizados en detalle y sus distintos componentes bien identificados en muchas especies del grupo (Ewing & Miyan, 1986; Byrne, 1999; Costa *et al.*, 2000; Costa & Sene 2002; Etges *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2013). Un estudio reciente reveló que la evolución de los cantos nupciales en el *cluster D. buzzatii* es tan rápida que no correlaciona con el tiempo de divergencia entre las especies (Oliveira *et al.*, 2013). Otro carácter que se sabe evoluciona a gran velocidad en la mayoría de los taxa animales es la morfología de ciertas estructuras genitales (Arnqvist, 1997). De hecho, las especies de muchos de los *clusters* del grupo *repleta* son sinmórficas y sólo se pueden distinguir mediante la inspección morfológica del órgano intromitente del macho (*aedeagus*), lo que pone de manifiesto que la tasa de evolución de la morfología de este órgano es más alta que la tasa de evolución del resto del cuerpo de las moscas (Soto *et al.*, 2007). Por este motivo se han realizado diversos estudios morfométricos del *aedeagus* en muchas especies del grupo (Vilela & Sene, 1977; Silva & Sene, 1991; Soto *et al.*, 2007; 2008; Richmond *et al.*, 2012; Soto *et al.*, 2013). Además, se ha observado, recientemente, una rápida divergencia, que parece ser adaptativa, en la morfología del *aedeagus* entre poblaciones de *D. buzzatii* (Soto *et al.*, 2013). Un estudio similar en *D. mojavensis*, otra especie del grupo *repleta*, también reveló elevadas tasas de divergencia en la morfología genital entre razas geográficas (Richmond *et al.*, 2012). Por otra parte, estudios realizados en especies del grupo *repleta* de Centro y Norteamérica mostraron tasas de evolución extremadamente rápidas en los genes que codifican las proteínas seminales, en particular las proteínas que se producen en las glándulas accesorias del sistema reproductivo de los machos (Acps, por sus siglas en inglés) (Almeida & DeSalle, 2009; Kelleher *et al.*, 2009). Las funciones de las Acps podrían estar estrechamente ligadas a la CE ya que sus efectos en la hembra incluyen la disminución de la receptividad sexual, la facilitación de la capacidad de almacenar el esperma o de la fecundación y el incremento en la tasa de ovulación (Wolfner, 2002).

Las especies hermanas *Drosophila buzzatti* y *D. koepferae* forman parte del *cluster D. buzzatii* que incluye al menos siete especies (Manfrin & Sene, 2006). La [figura 1.3](#) muestra las relaciones filogenéticas de estas especies respecto al resto del *cluster*. Estas especies tienen requerimientos ecológicos y características genéticas similares pues ambas se alimentan y reproducen sobre cactus en descomposición, conviven en

simpatría en diversas regiones áridas de Argentina y Bolivia, y en el laboratorio pueden cruzarse y dejar descendencia parcialmente fértil. Además, son morfológicamente indistinguibles excepto por la forma del *aedeagus* (Fig. 1.4). El tiempo de divergencia que las separa ronda los 4 millones de años (Gómez & Hasson, 2003) aunque, según trabajos genético-poblacionales, parecen haber ocurrido eventos de hibridación en la naturaleza que resultaron en la introgresión de variantes alélicas en algunos loci (Gómez & Hasson, 2003; Piccinali *et al.*, 2004). Junto a *D. antonietae*, *D. buzzatii* y *D. koepferae* son las únicas especies del *cluster* que pueden encontrarse en suelo argentino (Fig. 1.5). El hecho de que muchos caracteres de evolución adaptativa rápida, que pueden ser blanco de la selección sexual postcopulatoria, hayan sido descritos y caracterizados en el grupo *repleta* (y algunos en particular en especies del *cluster D. buzzatii*), convierte a *D. buzzatii* y *D. koepferae* en un modelo atractivo para estudiar la conexión entre el sistema de apareamiento, la CE y la evolución adaptativa rápida. Resultaría interesante conocer si las elevadas tasas de evolución de, por ejemplo, las estructuras genitales responden a una intensa CE. Para ello primero es necesario establecer la intensidad de la CE en estas especies.

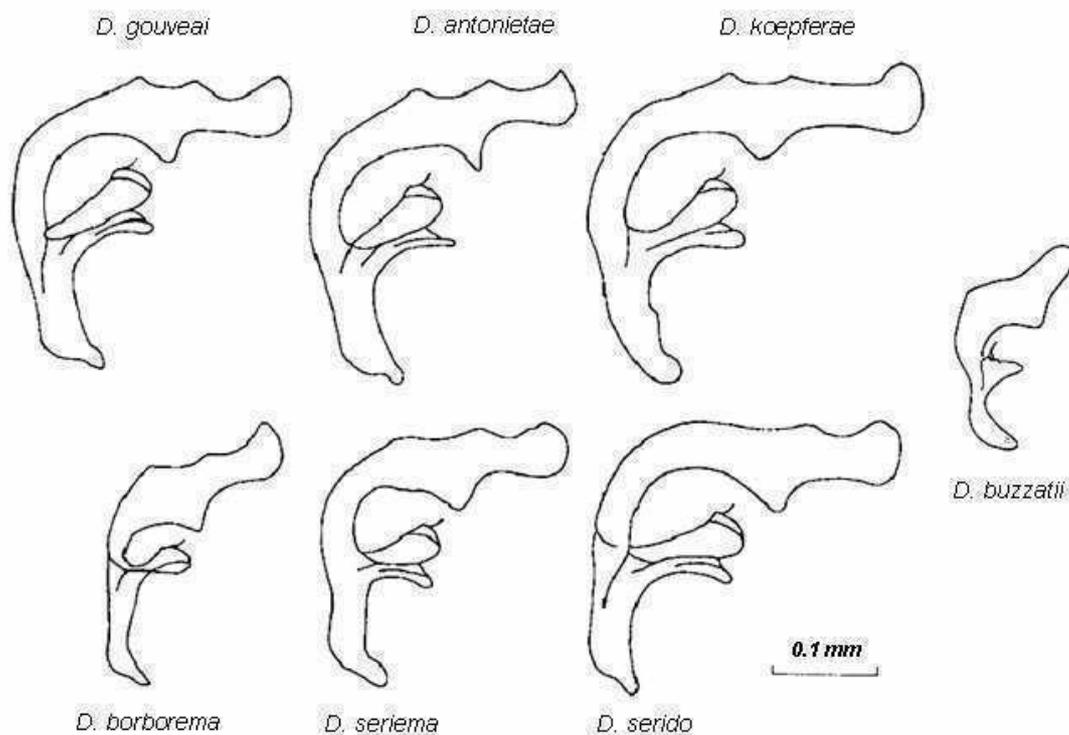


Figura 1.4. Vista lateral izquierda del aspecto del *aedeagus* de las 7 especies del cluster *D. buzzatii*.

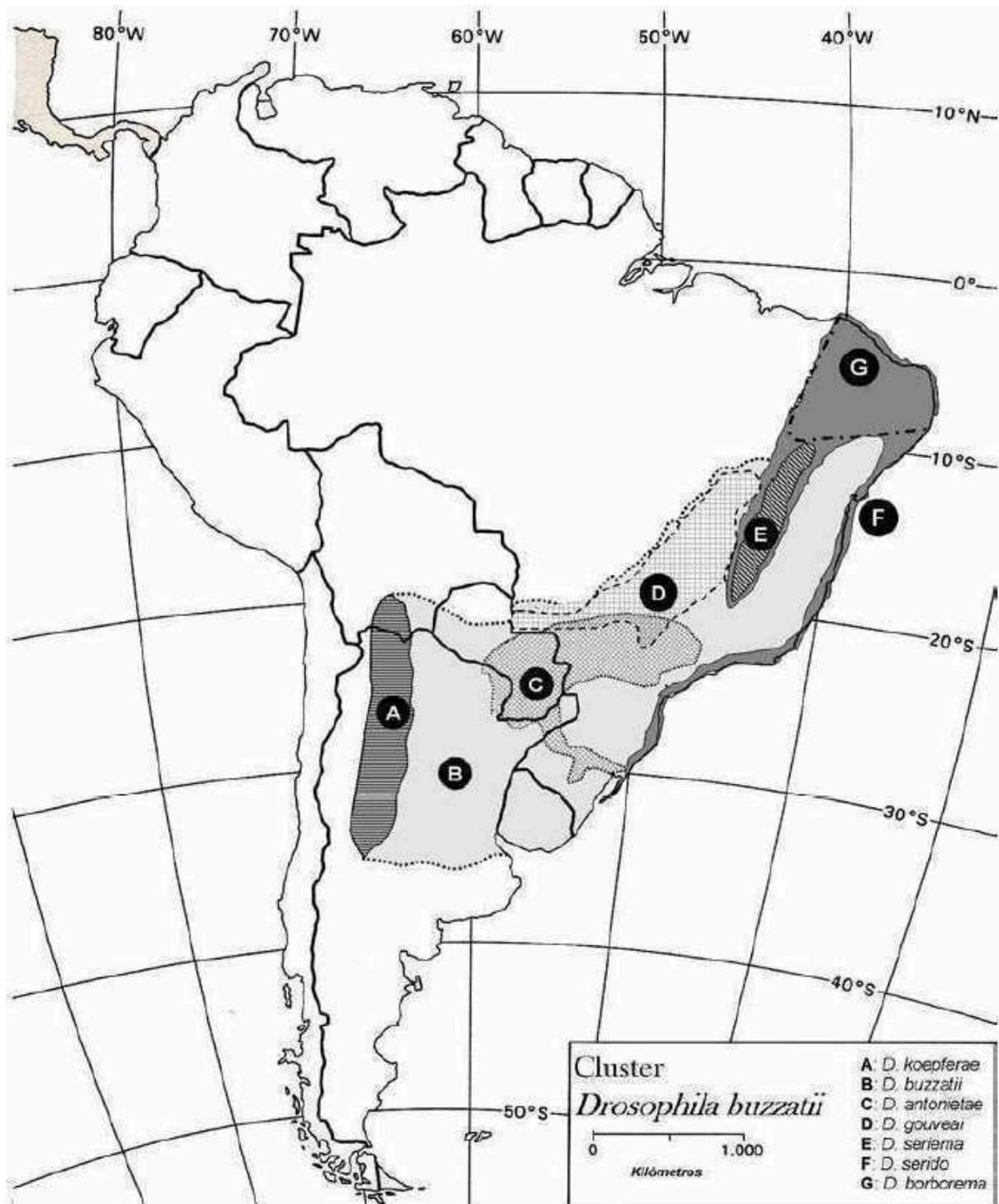


Figura 1.5. Vista parcial del mapa de Sud América en la que se muestra la distribución geográfica de las especies del cluster *D. buzzatii*. La distribución de *D. buzzatii* no se delimita pues se la puede encontrar en todas las áreas donde habitan las otras especies.

1.5. Objetivos

Nuestro objetivo fue determinar si la CE representa una fuerza selectiva intensa en *D. buzzatii* y *D. koepferae*, y si estas especies están sujetas a distintas presiones de selección sexual postcopulatoria. Para ello, estudiamos el riesgo de CE midiendo la incidencia de paternidad múltiple en hembras inseminadas en la naturaleza. Además exploramos las características del sistema de apareamiento que dan cuenta del grado de poliandria en estas especies y la morfología de los órganos de almacenamiento de esperma. Finalmente, para evaluar el costo reproductivo de la CE, determinamos cómo se reduce el éxito reproductivo de un macho cuando las hembras re-aparean con un segundo macho. Integrando algunos resultados de estos estudios logramos estimar además la proporción de espermatozoides que no consiguen fecundar un óvulo por causa de la CE.

1.6. Referencias

Almeida FC, DeSalle R (2008) Evidence of adaptive evolution of accessory gland proteins in closely related species of the *Drosophila repleta* group. *Mol. Biol. Evol.*, **25(9)**, 2043–2053.

Almeida FC, DeSalle R (2009) Orthology, function and evolution of accessory gland proteins in the *Drosophila repleta* group. *Genetics*, **181**, 235-245.

Arnqvist G (1997) The evolution of animal genitalia: distinguishing between hypotheses by single species studies. *Biol J Linn Soc Lond*, **60**, 365-379.

Arnqvist G (1998) Comparative evidence for the evolution of genitalia by sexual selection. *Nature*, **393**, 784–786.

Baimai V, Sene FM, Pereira MAQR (1983) Heterochromatin and karyotypic differentiation of some Neotropical cactus-breeding species of the *Drosophila repleta* species group. *Genetica*, **60**, 81–92.

Birkhead TR, Møller AP, eds. (1998) *Sperm Competition and Sexual Selection*. Academic Press, London.

Birkhead TR, Pizzari T (2002) Postcopulatory sexual selection. *Nature Reviews Genetics*, **3**, 262–273.

Bloch Qazi MC, Heifetz Y, Wolfner MF (2003) The developments between gametogenesis and fertilization: ovulation and female sperm storage in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, **256**, 195-211.

Bundgaard J, Barker JSF, Frydenberg J, Clark AG (2004) Remating and sperm displacement in a natural population of *Drosophila buzzatii* inferred from mother–offspring analysis of microsatellite loci. *Journal of Evolutionary Biology*, **17**, 376–381.

Byrne BC (1999) Behaviour-genetic analysis of lovesongs in desert species of *Drosophila*. Ph.D. Thesis, University of Leicester, Leicester.

- Cáceres M, Ranz JM, Barbadilla A, Long M, Ruiz A (1999) Generation of a widespread *Drosophila* inversion by a transposable element. *Science*, **285**, 415–418.
- Civetta A (2012) Fast evolution of reproductive genes: when is selection sexual? En: Singh RS, Xu J, Kulathinal RJ, eds. *Rapidly Evolving Genes and Genetic Systems*. Oxford University Press.
- Costa CTA, Kuhn GCS, Sene FM (2000) Low courtship song variation in South and Southeastern Brazilian populations of *Drosophila meridionalis* (Diptera, Drosophilidae). *Rev Bras Biol*, **60**, 53-61.
- Costa CTA, Sene FM (2002) Characterization of courtship sounds of species of the subgroup fasciola (Diptera, Drosophilidae, *Drosophila repleta* group): Interspecific and interpopulational analyses. *Brazil J Genet*, **62**, 573-583.
- Coyne JA, Orr HA (1997) “Patterns of speciation in *Drosophila*” revisited. *Evolution*, **51**, 295–303.
- Dawkins R (1989) *The Selfish Gene*. Revised Edition. Oxford University Press. New York City.
- Eberhard WG (1985) *Sexual Selection and Animal Genitalia*. Harvard University Press, Harvard.
- Etges WJ, de Oliveira CC, Noor MAF, Ritchie MG (2010) Genetics of incipient speciation in *Drosophila mojavensis*. III. Life history divergence and reproductive isolation. *Evolution*, **64**, 3549–3569.
- Etges WJ, Jackson LL (2001) Epicuticular hydrocarbon variation in *Drosophila mojavensis* cluster species. *J. Chem. Ecol.*, **27**, 2125–2149.
- Etges WJ, Over KF, Oliveira CC, Ritchie MG (2006) Inheritance of courtship song variation among geographically isolated populations of *Drosophila mojavensis*. *Anim Behav*, **71**, 1205-1214.
- Ewing AW, Miyan JA (1986) Sexual selection, sexual isolation and the evolution of song in the *Drosophila repleta* group of species. *Anim Behav*, **34**, 421-429.
- Fowler GL (1973) Some aspects of the reproductive biology of *Drosophila*: sperm transfer, sperm storage, and sperm utilization. *Advances in Genetics*, **17**, 293-360.

- Frentiu FD, Chenoweth SF (2008) Polyandry and paternity skew in natural and experimental populations of *Drosophila serrata*. *Molecular Ecology*, **17**(6), 1589–1596.
- Gibbs AG, Matzkin LM (2001) Evolution of water balance in the genus *Drosophila*. *J. Exp. Biol.*, **204**, 2331–2338.
- Gibbs AG, Perkins MC, Markow TA (2003) No place to hide: microclimates of Sonoran Desert *Drosophila*. *J. Therm. Biol.*, **28**, 353–362.
- Goetz AT, Shackelford TK, Platek SM, Starratt VG, McKibbin WF (2007) Sperm competition in humans: Implications for male sexual psychology, physiology, anatomy, and behavior. *Annual Review of Sex Research*, **18**, 1-22.
- Gómez GA, Hasson E (2003) Transpecific polymorphisms in an inversion linked esterase locus in *Drosophila buzzatii*. *Mol. Biol. Evol.*, **20**, 410-423.
- Good JM, Ross Charles L, Markow TA (2006) Multiple paternity in wild-caught *Drosophila mojavensis*. *Molecular Ecology*, **15**, 2253–2260.
- Haerty W, Jagadeeshan S, Kulathinal RJ, Wong A, Ram KR, Sirot LK, Levesque L, Artieri CG, Wolfner MF, Civetta A, Singh RS (2007) Evolution in the fast lane: rapidly evolving sex-related genes in *Drosophila*. *Genetics*, **177**, 1321–1335.
- Harshman L, Clark AG (1998) Inference of sperm competition from broods of field-caught *Drosophila*. *Evolution*, **52**, 1334–1341.
- Hasson E, Soto IM, Carreira VP, Corio C, Soto EM, Betti MI (2009) Host plants, fitness and developmental instability in a guild of cactophilic species of the genus *Drosophila*. En: Santos EB, ed. Ecotoxicology research developments. pp 89-109. Nova Science Publishers, Hauppauge.
- Hasson E, Naveira H, Fontdevila A (1992) The breeding sites of the Argentinian species of the *Drosophila mulleri* complex (subgenus *Drosophila-repleta* group). *Revista Chilena de Historia Natural*, **65**, 319–326.

Hoekstra RF (1980) Why do organisms produce gametes of only two different sizes? Some theoretical aspects of the evolution of anisogamy. *J. Theor. Biol.*, **87**, 785–793.

Hosken DJ, Stockley P (2004) Sexual selection and genital evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, **19**, 87–93.

Imhof M, Harr B, Brem G, Schlötterer C (1998) Multiple mating in wild *Drosophila melanogaster* revisited by microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, **7**, 915–917.

Jones B, Clark AG (2003) Bayesian sperm competition estimates. *Genetics*, **163**, 1193–1199.

Kelleher ES, Clark NL, Markow TA (2011) Diversity-enhancing selection acts on a female reproductive protease family in four subspecies of *Drosophila mojavensis*. *Genetics*, **187**(3), 865–76.

Kelleher ES, Watts TD, LaFlemme BA, Haynes PA, Markow TA (2009) Proteomic analysis of *Drosophila mojavensis* male accessory glands suggests novel classes of seminal fluid proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **39**, 366–371.

Kimura M (1983) *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.

Lefevre GJ, Jonsson UB (1962) Sperm transfer, storage, displacement, and utilization in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **47**, 1719–1736.

Lloyd EA (2000) Units and levels of selection: An anatomy of the units of selection debates. En: Singh RS, Krimbas CB, Paul DB, Beatty J, eds. *Thinking About Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.

Manfrin MH, Sene FM (2006) Cactophilic *Drosophila* in South America: A Model for Evolutionary Studies. *Genetica*, **126**, 57–75.

Markow TA (1996) Evolution of *Drosophila* mating systems. *Evolutionary Biology*, **29**, 73–106.

Markow TA (2002) Perspective: female remating, operational sex ratio, and the arena of sexual selection in *Drosophila* species. *Evolution*, **56**, 1725–1734.

Markow TA, O'Grady P (2006) *Drosophila: a Guide to Species Identification and Use*. Elsevier Academic Press, London.

Markow TA, O'Grady PM (2008) Reproductive Ecology of *Drosophila*. *Functional Ecology*, **22**, 747–759.

Markow TA, Beall S, Castrezana S (2012) The wild side of life: *Drosophila* reproduction in nature. *Fly*, **6**, 98–101.

Mauseth JD (1990) Continental drift, climate and the evolution of cacti. *Cact. Succ. J.*, **62**, 302–308.

Maynard Smith J (1978) *The Evolution of Sex*. Cambridge University Press, Cambridge.

Negre B, Casillas S, Suzanne M, Sánchez-Herrero E, Akam M, Nefedov M, Barbadilla A, de Jong P, Ruiz A (2005) Conservation of regulatory sequences and gene expression patterns in the disintegrating *Drosophila* Hox gene complex. *Genome Res.*, **15**, 692–700.

Nummi P, Pellikka J (2012) Do female sex fantasies reflect adaptations for sperm competition? *Annales Zoologici Fennici*, **49**, 93-102.

Nyffeler R (2002) Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from trnK/matK and trnL-trnF sequences. *Am. J. Bot.*, **89**, 312–326.

Oliveira CC, Manfrin MH, Sene FM, Etges WJ (2013) Evolution of male courtship songs in the *Drosophila buzzatii* species cluster. En: Michalak P, ed. *Speciation: Natural Processes, Genetics and Biodiversity*. Nova Science Publishers, Inc., New York.

Oliveira DCSG, Almeida FC, O'Grady PM, Armella MA, DeSalle R, *et al.* (2012) Monophyly, divergence times, and evolution of host plant use inferred from a revised phylogeny of the *Drosophila repleta* species group. *Mol. Phy. Evol.*, **64**, 533-544.

Oliveira DCSG, O'Grady PM, Etges WJ, Heed WB, DeSalle R (2005) Molecular systematics and geographical distribution of the *Drosophila longicornis* species complex (Diptera: Drosophilidae). *Zootaxa*, **1069**, 1–32.

- Oliveira DCSG, Leonidas M, Etges WJ, O'Grady PM, DeSalle R (2008) Species delimitation in the *Drosophila aldrichi* subcluster (Diptera: Drosophilidae) using DNA sequences. *Zootaxa*, **1725**, 37–47.
- Parker GA (1970) Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews*, **45**, 525–567.
- Parker GA (1998) Sperm competition and the evolution of ejaculates: towards a theory base. En: Birkhead TR, Møller AP, eds. Sperm Competition and Sexual Selection. pp 3–54. Academic Press, London.
- Parker GA, Baker RR, Smith VGF (1972) The origin and evolution of gamete dimorphism and the male–female phenomenon. *Journal of Theoretical Biology*, **36**, 529–533.
- Patterson JT (1943) The Drosophilidae of Southwest. *University of Texas Publication*, **4314**, 7–203.
- Patterson JT (1954) Fate of the sperm in the productive tract of the *Drosophila* female in homogamic matings. *University of Texas Publication*, **5422**, 19-37.
- Patterson JT, Stone WS (1952) Evolution in the Genus *Drosophila*. Macmillan, New York.
- Piccinali R, Aguadé M, Hasson E (2004) Comparative molecular population genetics of the Xdh locus in the cactophilic sibling species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae*. *Molecular Biology and Evolution*, **21(1)**, 141-152.
- Pitnick S, Markow T, Spicer GS (1999) Evolution of multiple kinds of female sperm-storage organs in *Drosophila*. *Evolution*, **53**, 1804-1822.
- Rafael V, Arcos G (1989) Subgrupo inca, un nuevo subgrupo del grupo *repleta*, con descripción de *Drosophila huancavilcae* n. sp (Diptera, Drosophilidae). *Evolutionary Biology*, **3**, 233–243.
- Richmond MP, Johnson S, Markow TA (2012) Evolution of reproductive morphology among recently diverged taxa in the *Drosophila mojavensis* species cluster. *Ecology and Evolution*, **2(2)**, 397–408.
- Ruiz A, Heed WB (1988) Host-plant specificity in the cactophilic *Drosophila mulleri* species complex. *The Journal of Animal Ecology*, **57**, 237-249.

- Ruiz A, Heed WB, Wasserman M (1990) Evolution of the *mojavensis* cluster of cactophilic *Drosophila* with descriptions of two new species. *Journal of Heredity*, **81**, 30–42.
- Schlötterer C, Reiss M, Schneider A, Imhof M (2005) Similar mating and sperm displacement patterns in two highly divergent *D. simulans* populations in Africa and Europe. *Molecular Ecology*, **14**, 1511–1515.
- Silva AFG, Sene FM (1991) Morphological geographic variability in *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, **35**, 455–468.
- Simmons LW (2001) Sperm Competition and Its Evolutionary Consequences in The Insects. Princeton University Press, Princeton.
- Simmons LW (2005) The evolution of polyandry: Sperm competition, sperm selection, and offspring viability. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **36**, 125–146.
- Simmons LW, Beveridge M (2010) The strength of postcopulatory sexual selection within natural populations of field crickets. *Behavioral Ecology*, **21(6)**, 1179–1185.
- Singh SR, Singh BN, Hoenigsberg HF (2002) Female remating, sperm competition and sexual selection in *Drosophila*. *Genetics and Molecular Research*, **1(3)**, 178–215.
- Soto IM, Carreira VP, Fanara JJ, Hasson E (2007) Evolution of male genitalia: Environmental and genetic factors affect genital morphology in two *Drosophila* sibling species and their hybrids. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 77.
- Soto IM, Manfrin MH, Hasson E (2008) Host-dependent phenotypic plasticity of male genital morphology in cactophilic *Drosophila*. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **46**, 368–373.
- Soto IM, Soto EM, Corio C, Carreira VP, Manfrin M, Hasson E (2010) Male genital and wing morphology in the cactophilic sibling species *Drosophila gouveai* and *Drosophila antonietae* and their hybrids reared in different host plants. *Environ Entomol*, **39(3)**, 865–73.

Soto IM, Carreira VP, Soto EM, Márquez F, Lipko P, Hasson E (2013) Rapid Divergent Evolution of Male Genitalia Among Populations of *Drosophila buzzatii*. *Evolutionary Biology*, doi:10.1007/s11692-013-9223-x.

Swanson WJ, Vacquier VD (2002) The rapid evolution of reproductive proteins. *Nature Reviews Genetics*, **3**, 137–144.

Tidon-Sklorz R, Sene FM (1995) *Drosophila seriema*: a new member of the *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae) superspecies taxon. *Annals of the Entomological Society of America*, **88**, 139–142.

Throckmorton LH (1975) The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. En: King RC ed. *Handbook of Genetics*. Plenum, NY.

Venables WN, Ripley BD (2002) *Modern Applied Statistics with S*, fourth ed. Springer, New York.

Vilela CR (1983) A revision of the *Drosophila repleta* species group (Diptera, Drosophilidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 1-114.

Vilela CR, Sene FM (1977) Two new Neotropical species of the *repleta* group of the genus *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). *Papéis Avulsos do Departamento de Zoologia (São Paulo)*, **30**, 295–297.

Wagstaff BJ, Begun DJ (2005) Molecular population genetics of accessory gland protein genes and testis-expressed genes in *Drosophila mojavensis* and *D. arizonae*. *Genetics*, **171**, 1083–1101.

Wagstaff BJ, Begun DJ (2007) Adaptive evolution of recently duplicated accessory gland protein genes in desert *Drosophila*. *Genetics*, **177**, 1023–1030.

Wasserman M (1962) Cytological studies of the *repleta* group of the genus *Drosophila*. IV. The *hydei* subgroup. *University of Texas Publication*, **6205**, 73–84.

Wasserman M (1992) Cytological evolution of the *Drosophila repleta* species group. En: Krimbas CB, Powell JR, eds. *Drosophila Inversion Polymorphism*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Wharton LT (1944) Interspecific hybridization in the *repleta* group. *University of Texas Publication*, **4445**, 175–193.

Wolfner MF (2002) The gifts that keep on giving: physiological functions and evolutionary dynamics of male seminal proteins in *Drosophila*. *Heredity*, **88**, 85-93.

Wong A (2011) The molecular evolution of animal reproductive tract proteins: What have we learned from mating-system comparisons? *International Journal of Evolutionary Biology*, doi:10.4061/2011/908735.

CAPÍTULO 2

Promiscuidad de las hembras

La promiscuidad de las hembras, cuyo rigor se refleja en la frecuencia con que re-aparean, es un componente de los sistemas de apareamiento que determina la arena de la selección sexual, promueve conflictos intra e intersexuales y afecta el riesgo de que exista competencia espermática (CE). Aquí, estudiamos el re-apareamiento en *D. buzzatii* y *D. koepferae* explorando cómo cambian las hembras su propensión a re-aparear a medida que transcurre el tiempo tras un primer apareamiento. Nuestro estudio reveló que, tras aparear, las hembras de *D. buzzatii* recuperan la receptividad sexual 14 veces más rápidamente y re-aparean más frecuentemente que las hembras de *D. koepferae*. Por tanto, argüimos que *D. buzzatii* exhibe mayores chances de que espermias provenientes de diferentes machos se encuentren en el tracto reproductivo de una misma hembra. Si esto fuera así, esperaríamos interacciones postcopulatorias más complejas en *D. buzzatii* que en su especie hermana. Además, detectamos variación genética intraespecífica para la duración del periodo refractario en ambas especies mediante la comparación entre genotipos (líneas derivadas de hembras individuales inseminadas en la naturaleza).

2.1. Introducción

La promiscuidad de las hembras, además de ser un prerrequisito para la CE, es un importante componente de los sistemas de apareamiento que determina y afecta fuertemente a la selección sexual y, por ello, juega un papel central en biología evolutiva. Dado que la espermatogénesis es fisiológicamente menos costosa que la ovogénesis, la producción de espermatozoides típicamente excede por mucho la producción de óvulos en cualquier especie cuya relación entre sexos no esté demasiado inclinada en favor de las hembras (Trivers, 1972). Por esta razón, la cantidad de huevos suele ser un factor limitante del crecimiento poblacional y la estrategia reproductiva óptima difiere entre los sexos. Los machos incrementan su aptitud biológica fertilizando la mayor cantidad de huevos posible mientras que las hembras la incrementan produciendo la mayor cantidad de huevos posible (Darwin, 1871; Bateman, 1948; Anderson, 1994). Entonces, los machos suelen competir por el acceso a las hembras y la selección sexual favorecer caracteres que realcen las chances de que los machos consigan aparearse. Sin embargo, cuando las hembras re-aparean muy frecuentemente el número de hembras receptivas es suficiente para todos los machos, i. e. la relación operativa entre sexos no queda sesgada a favor de los machos (Emlen & Oring, 1977). En tal caso, la competencia por las hembras es débil y se relaja la selección sexual precopulatoria, quedando el tracto reproductivo de las hembras como único espacio para la selección sexual.

En la mayoría de los insectos existen las condiciones necesarias para que ocurra CE ya que las hembras promiscuas pueden almacenar y mantener vivo espermatozoides de múltiples machos (Simmons, 2001; Simmons & Siva-Jothy, 1998; Neubaum & Wolfner, 1999). Por ejemplo, las hembras de *Drosophila* pueden almacenar grandes cantidades de espermatozoides de diferentes parejas en un receptáculo seminal tubular y, en muchas especies, en un par de órganos esféricos llamados espermatecas. (Fowler, 1973; Pitnick *et al.*, 1999). Por tanto, el tracto reproductivo de las hembras constituye una *arena* para la selección sexual postcopulatoria que comprende tanto la competencia entre machos en forma de CE *in sensu stricto* como la elección críptica por parte de las hembras (Eberhard, 1985; Birkhead & Pizzari, 2002).

Es así como la selección sexual puede alternativamente promover la evolución de caracteres ventajosas para la competencia precopulatoria entre machos o, de lo

contrario, postcopulatoria; y esto dependerá de la tasa de re-apareamiento de las hembras (Markow, 2002).

El re-apareamiento de las hembras no sólo determina la arena de la selección sexual sino que también puede potenciar una coevolución sexualmente antagonista incrementando la magnitud de los conflictos sexuales. Cuando dos individuos tienen exactamente los mismos intereses sobre un atributo variable que comparten, no hay lugar para conflictos entre ellos. Ese es el caso de las parejas estrictamente monógamas en las cuales cualquier carácter que afecta el *fitness* altera igualmente el éxito reproductivo de ambos compañeros (Parker, 1979). Sin embargo, las desviaciones de la monogamia promueven el conflicto sexual porque los intereses reproductivos de los individuos no coincidirán enteramente (Parker, 1979; Rice, 2000; Rice & Holland, 1997). La promiscuidad de los machos puede llevar a un conflicto sexual sobre, por ejemplo, la cantidad de esperma transferido por cópula. Tal conflicto podría ocurrir porque, durante la cópula, los machos promiscuos pueden incrementar su éxito reproductivo guardando esperma para futuras parejas, transfiriendo insuficiente cantidad para maximizar el éxito reproductivo de las hembras (Parker, 1970). Por otra parte, la promiscuidad de las hembras también puede conducir al conflicto sexual sobre, por ejemplo, la tasa de uso del esperma almacenado o la tasa de re-apareamiento porque los machos que induzcan la ovulación o retrasen el re-apareamiento podrían beneficiarse a costa de las hembras (Rice & Holland, 1997; Arqvist & Rowe, 2005). En *D. melanogaster*, especie naturalmente promiscua, se ha reportado evidencia empírica de estos conflictos. Rice (1996) mostró que cuando se evita experimentalmente que las hembras coevolucionen con machos, los machos rápidamente se adaptan al fenotipo estático de la hembra. Tal adaptación, que comprende un incremento de la habilidad para retrasar el re-apareamiento de las hembras y desplazar el esperma rival, conduce a una reducción de la supervivencia de las hembras. Entonces, las carreras armamentistas, entre machos competidores y entre machos y hembras, por el control del uso del esperma y la tasa de re-apareamiento de las hembras, son esperables en especies en las que el re-apareamiento de las hembras es frecuente (Rice & Holland, 1997; Rice, 2000). De hecho, tras la remoción de la selección sexual imponiendo experimentalmente la monogamia, los machos de *D. melanogaster* evolucionan hacia fenotipos menos dañinos para sus parejas y las hembras hacia fenotipos menos resistentes a los daños inducidos por los machos (Holland & Rice, 1999).

¿Cuáles son los factores que determinan la frecuencia de re-apareamiento de las hembras? Los machos de *Drosophila* obtienen cópulas exhibiendo un cortejo frente a la hembra que pretenden, pero no pueden hacerlo mediante coerción sexual porque las hembras que rehúsan el apareamiento repelen sin mayor dificultad los intentos de cópula (Manning, 1967). Por tanto, la probabilidad de que una hembra copule está determinada no sólo por la frecuencia con la que es cortejada sino también por su propia decisión, la cual depende de su estado fisiológico intrínseco (Dickson, 2008). Luego, la probabilidad de que una hembra apareada, en presencia de un macho interesado en copular, acepte re-aparearse puede pensarse como una función de cuatro variables: (1) el efecto (magnitud y duración) del apareamiento sobre el atractivo (capacidad de inducir el cortejo en machos sexualmente maduros) de la hembra; (2) el atractivo de la hembra antes del apareamiento; (3) el efecto del apareamiento sobre la receptividad sexual de la hembra y (4) la receptividad de la hembra antes del apareamiento. Tanto el atractivo como la receptividad de las hembras se ven afectados negativamente por el apareamiento en *D. melanogaster* (Fuyama, 1995; Tram & Wolfner, 1998). La evidencia reunida hasta ahora indica que el esperma y las proteínas de las glándulas accesorias (Acps) que los machos transfieren a las hembras durante la cópula provocan un tiempo de latencia durante el cual las hembras rehúsan el re-apareamiento (Wolfner, 1997; Wolfner *et al.*, 2005). Más allá de los componentes del eyaculado, la cópula misma podría modificar la receptividad en las hembras probablemente por interacción genital (Eberhard, 1985). Tal reducción de la receptividad o el atractivo de las hembras tras el apareamiento, conocida como el periodo refractario, ha sido reportada en muchas especies de *Drosophila* (Markow, 1996). La duración del periodo refractario varía enormemente entre los miembros del género desde algunos minutos en *D. hydei* (Markow, 1985), hasta más de 10 días en *D. biarmipes* (McRoberts *et al.*, 1997).

Estudios previos de las preferencias de oviposición de *D. buzzatii* y *D. koepferae* mostraron que las hembras inseminadas privadas de machos suelen ovipositar durante al menos tres días tras la inseminación (Fanara *et al.*, 1999; Fanara & Hasson, 2001). Sin embargo, la probabilidad de que espermias de diferentes eyaculados exhiban superposición temporal dentro del tracto reproductivo de una hembra no sólo depende del tiempo necesario para agotar la carga de esperma sino también del tiempo que transcurre hasta el re-apareamiento de la hembra. Por tanto, para determinar si *D.*

buzzatii y *D. koepferae* están sujetas a diferentes presiones de selección sexual postcopulatoria, es necesario investigar la tasa de re-apareamiento de las hembras, hasta ahora desconocida en estas especies.

En este capítulo exploramos la frecuencia de re-apareamiento de las hembras en *D. buzzatii* y *D. koepferae*. En particular, examinamos: (1) cómo el atractivo y la receptividad de las hembras cambia con el tiempo transcurrido tras el apareamiento y (2) si la variación intraespecífica de la duración del periodo refractario es explicada por efectos del macho o de la hembra. Para investigar estas cuestiones evaluamos, en diferentes genotipos (isolíneas) de ambas especies, la probabilidad de que hembras vírgenes accedan al apareamiento cuando son cortejadas y la magnitud y duración de los efectos del apareamiento sobre la probabilidad de que las hembras re-apareen.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Stocks de moscas

Se establecieron en el laboratorio decenas de aislíneas de *D. buzzatii* y de *D. koepferae* a partir de la progenie de 129 hembras inseminadas en la naturaleza, que fueron colectadas en varias localidades del noreste argentino (provincias de Catamarca, La Rioja, Salta y Tucumán) en Febrero de 2010. Mediante la inspección de los cromosomas politénicos de las glándulas salivales de las larvas se investigaron los polimorfismos cromosómicos de ambas especies para los rearrreglos estructurales (inversiones) de los cromosomas 2, 3, 4 y 5 (Fig. 2.1). Dado que nos interesaba contar con líneas homocigóticas para diferentes rearrreglos cromosómicos, para utilizarlos como marcadores citogenéticos con el fin de establecer paternidad en experimentos de inseminación múltiple, se seleccionaron aislíneas en las que se lograron fijar rearrreglos cromosómicos diferentes. Para facilitar el proceso de fijación alélica, las aislíneas fueron mantenidas de forma separada y bajo un régimen de estricta endogamia (en cada generación se seleccionaron al azar parejas de hermanos como parentales de la siguiente generación) durante ocho generaciones. De esta manera se consiguieron 20 aislíneas homocigóticas para diferentes rearrreglos de los cromosomas 2 o 4 de las cuales se eligieron al azar cuatro de *D. buzzatii* (DB1, DB2, DB3 y DB4) y cuatro de *D. koepferae* (DK1, DK2, DK3 y DK4) que se mantuvieron en el laboratorio. Las aislíneas restantes fueron descartadas.

2.2.2. Tiempo cero de los ensayos de re-apareamiento

Para medir la propensión con la que las hembras re-aparean, primero, es necesario contar con hembras apareadas. Para esto, se colocaron individualmente hembras vírgenes de 5 días de edad junto a dos machos vírgenes de 5 días de edad ("primeros machos") en un tubo de 3 cm³ conteniendo medio de cría, desde las 8 am hasta que ocurriera la cópula (Fig. 2.2). Entonces, 8 am fue considerado como el tiempo cero (T0) de los ensayos de re-apareamiento (que se describen en el siguiente párrafo). Inmediatamente luego de la cópula, cada hembra fue aspirada suavemente y liberada individualmente en un tubo con medio fresco de cría hasta el momento del ensayo de re-apareamiento. Mas del 90% de las hembras aparearon dentro del lapso de una hora.

Luego de transcurridos diferentes tiempos desde T0, se examinó en las hembras su propensión a re-aparear. Las hembras vírgenes que no aparearon durante la primera hora fueron descartadas.

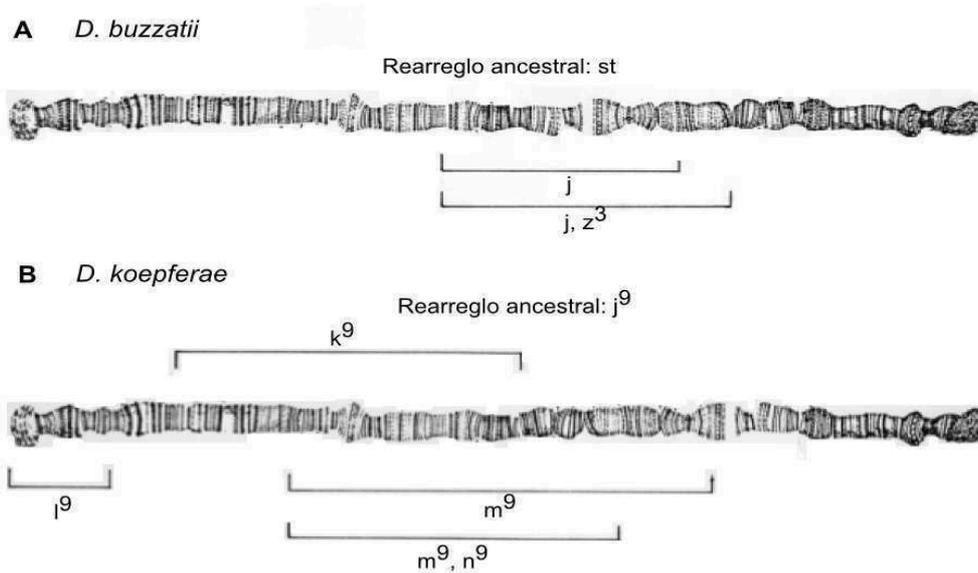


Figura 2.1. Aspecto del cromosoma 2 politénico de (A) *D. buzzatii* y (B) *D. koepferae*. Para cada especie, se muestra el ordenamiento que se considera ancestral (Ruiz & Wasserman, 1993) sobre el que se marcan las posiciones extremas de las inversiones y su nombre correspondiente.



Figura 2.2. Fotografía ilustrativa de un ensayo de re-apareamiento. Dos machos vírgenes de 5 días de edad (arriba) con una hembra (abajo) de *D. buzzatii*.

2.2.3. Ensayos de re-apareamiento

Los ensayos de re-apareamiento fueron realizados a diferentes tiempos desde T0. Para cada tiempo y en cada isolínea, los ensayos implicaron el estudio simultáneo de la propensión a re-aparear en dos grupos de 12 hembras cada uno. Un grupo consistió en hembras apareadas (“grupo apareado”) y el otro en hembras de la misma edad pero vírgenes (“grupo virgen”). Cada hembra de ambos grupos fue liberada individualmente con dos machos vírgenes de 5 días de edad (“segundos machos”) en un tubo de 3 cm³ con medio fresco (Fig. 2.2). En estos 24 tríos se determinó simultáneamente la ocurrencia de apareamientos durante 15 min. Luego, en cada grupo de hembras, se estableció la proporción de hembras que accedió a copular y la proporción de hembras que fueron cortejadas (perseguidas, interceptadas o enfrentadas por algún macho) dentro de los primeros 3 min. Acorde a los ensayos preliminares, un periodo de tiempo más prolongado habría implicado proporciones demasiado elevadas de hembras cortejadas, y entonces las diferencias entre grupos habrían sido indetectables.

En cada especie los ensayos de re-apareamiento se realizaron a diferentes intervalos temporales desde T0, ya que los ensayos preliminares habían mostrado importantes diferencias interespecíficas en la duración del período refractario o latencia al re-apareamiento. El tiempo de latencia había sido menor a 24 h y mayor a 48 h en *D. buzzatii* y *D. koepferae*, respectivamente. Por tanto, los ensayos de re-apareamiento se realizaron 1,5, 3, 6, 12 y 24 h tras T0 en *D. buzzatii*, y 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h tras T0 en *D. koepferae*.

Este protocolo experimental fue repetido tres veces para cada isolínea y cada Tiempo, excepto para los ensayos hechos 12 h tras T0 en *D. koepferae*, que sólo fueron hechos dos veces.

Todos las moscas utilizadas en estos ensayos, como en todos los ensayos de esta tesis, fueron criadas, desde el primer estadio larval, en condiciones de densidad controlada (30-40 larvas por tubo) con el objeto de minimizar los efectos de la competencia intraespecífica. Creemos que, de esta manera, validamos la suposición (conveniente a los efectos de los análisis estadísticos) de que cada individuo es una unidad experimental independiente.

Las variables o factores predictores en los experimentos fueron: (1) Especie, con dos niveles: *D. buzzatii* y *D. koepferae*, (2) Tiempo, con cinco o seis niveles dependiendo

de la especie, (3) Isolínea, con cuatro niveles por Especie, (4) Ensayo, con tres niveles o réplicas por Isolínea por Tiempo y (5) Status de las hembras, con dos niveles por Ensayo: vírgenes y apareadas. Las variables respuesta que medimos fueron: (1) la proporción de hembras cortejadas por alguno de los dos machos durante los primeros 3 min del ensayo de re-apareamiento y (2) la proporción de hembras que accedieron a copular dentro de los 15 min del ensayo (propensión a re-aparear). Aunque el atractivo de una hembra es una cualidad compleja, puede considerarse como su capacidad de inducir el cortejo en machos. Por tanto, creemos que la proporción de hembras cortejadas puede ser considerada como un predictor del atractivo de las hembras.

El diseño experimental nos permitió estimar una variable respuesta adicional que llamamos la Razón entre la probabilidad de Re-apareamiento y la de Apareamiento (RRA) y que definimos como la propensión a re-aparear del grupo apareado dividida por la propensión a aparear del grupo virgen de la misma edad. Este cociente depende del efecto del primer apareamiento sobre la receptividad y/o el atractivo de las hembras. La propensión a re-aparear del grupo apareado debería ser menor que la propensión a aparear del grupo virgen dada la reducción de la receptividad y del atractivo de las hembras que típicamente se observa en numerosas especies del género *Drosophila* (Gillot, 2003). Por tanto, esperábamos que RRA fuera menor que 1 y que aumentara con el Tiempo hasta llegar a 1, cuando los efectos del apareamiento sobre el comportamiento de las hembras se diluyeran completamente, y entonces la tasa de re-apareamiento igualara la de apareamiento. Entonces, examinar cómo varía RRA con el Tiempo puede ser útil para inferir la duración del período refractario de las hembras.

2.2.4. Análisis del atractivo de las hembras

Para evaluar si el Tiempo o el Status de las hembras (vírgenes o apareadas) afecta a la proporción de hembras cortejadas (atractivo), se aplicó un procedimiento de máxima verosimilitud restringida (REML, por sus siglas en inglés) para ajustar un modelo lineal de efectos mixtos en cada especie utilizando R (función *lme* del paquete *nlme* (Pinheiro *et al.*, 2012)). El modelo incluyó al Tiempo como una covariable, al Status de las hembras como un factor fijo categórico, a la Isolínea como un factor aleatorio categórico y al Ensayo como un factor aleatorio categórico anidado en Isolínea.

Dado que los términos de interacción no incrementaron significativamente la bondad de ajuste del modelo (resultado no mostrado), fueron excluidos del mismo.

2.2.5. Análisis de la propensión al apareamiento

También se implementó un procedimiento REML para testear si el Tiempo o el Status de las hembras afectan la propensión a (re)-aparear de las hembras. En este caso se utilizó un modelo lineal de efectos mixtos por especie en R (función *lme* del paquete *nlme*) que incluyó al Tiempo como una covariable, al Status de las hembras como un factor fijo categórico, a la Isolínea como factor aleatorio categórico y al Ensayo como un factor aleatorio categórico anidado en Isolínea. Como se detectó un efecto de interacción entre el Tiempo y el Status de las hembras, se implementó otro modelo para cada nivel de Status por separado. Estos modelos incluyeron al Tiempo como una covariable y a la Isolínea como un factor aleatorio.

Sólo se pudieron realizar comparaciones interespecíficas de la propensión de las hembras a (re)-aparear a las 12 y 24 h desde T0 dado que los niveles del factor Tiempo del resto de los ensayos no fueron coincidentes entre las especies. Entonces, se exploró si la propensión a (re)-aparear difiere entre *D. buzzatii* y *D. koepferae* ajustando, para cada nivel de Status, un modelo lineal de efectos mixtos con Especie como un factor fijo categórico y con Isolínea, anidada en Especie, como un factor aleatorio categórico.

2.2.6. Análisis de la duración del tiempo refractario

Con el objeto de caracterizar el período refractario, se estimó como su sucedáneo, en cada isolínea, el tiempo requerido por las hembras apareadas para recuperar el 50% de su propensión a re-aparear (receptividad y/o atractivo) luego del apareamiento. Llamamos a este tiempo R50. Dado que supusimos que RRA es función sigmoidea del Tiempo, se abordó esta estimación con un análisis de regresión no-lineal utilizando el siguiente modelo:

$$\text{RRA} = 1 / (1 + \exp (\alpha \times (\text{R50} - \text{Tiempo})))$$

donde α representa un parámetro ajustable que refleja la sensibilidad de RRA al Tiempo. Llamamos “Modelo Sigmoido” a esta ecuación. Se empleó una aproximación no-lineal de cuadrados mínimos en R (función *nls* del paquete *stats* (R Development Core Team, 2012)) para estimar los valores esperados de α y R50. Para evaluar si R50 difirió entre las isóneas dentro de cada especie se realizó un análisis de desviación en R (función *anova* del paquete *stats*). Este análisis nos permitió comparar la incertidumbre de R50 suponiendo un único valor para todas las isóneas de la misma especie con la incertidumbre de R50 obtenida sin hacer tal suposición. Para encontrar cuáles isóneas difieren entre sí respecto de la duración del período refractario, los intervalos de confianza al 95% de R50, para cada isónea, fueron computados en R mediante interpolación de los rastros de las iteraciones resultantes de la estimación del parámetro (función *confint* del paquete *MASS* (Venables & Ripley, 2002)). Este procedimiento nos permitió identificar, en cada especie, una isónea con un período refractario corto (“Isónea Rápida”) y otra con un período refractario largo (“Isónea Lenta”).

Además nos propusimos averiguar si los factores subyacentes a la variación genética de la duración del periodo refractario yacen en la hembra, en el primer macho o en el segundo macho, de los ensayos de re-apareamiento. En otras palabras, quisimos evaluar hasta qué punto la isónea de origen de la hembra, del primer macho o del segundo macho puede afectar a R50. Para ello, se condujeron ensayos de re-apareamiento adicionales en los que las hembras, los primeros machos y los segundos machos provinieron de la Isónea Rápida o de la Isónea Lenta, en todas las combinaciones posibles. Por ejemplo, hembras de la Isónea Rápida apareadas primero con machos de la Isónea Lenta y luego ensayadas con segundos machos de la Isónea Rápida. El Modelo Sigmoido fue nuevamente implementado para representar RRA como función del Tiempo. Esta vez, R50 fue considerado como linealmente determinado por la Isónea del Primer Macho (IPM), la Isónea del Segundo Macho (ISM) y la Isónea de la Hembra (IH). Entonces, se reemplazó R50 del Modelo Sigmoido de acuerdo a la siguiente expresión:

$$R50 = b + c \times IPM + d \times ISM + e \times IH$$

donde b denota el valor mínimo de R50 y c , d y e , el efecto de IPM, ISM y IH, respectivamente. IPM, ISM o IH es igual a 1 cuando las moscas provienen de la Isolínea Lenta y es igual a 0 cuando provienen de la Isolínea rápida. Mediante una aproximación por mínimos cuadrados no lineal computada en R (función *nls* del paquete *stats*) se estimaron los parámetros del modelo (α , b , c , d y e).

Para evaluar las diferencias en la duración del período refractario entre las especies se compararon los valores de R50 estimados para las isolíneas de *D. buzzatii* con los valores estimados para las isolíneas de *D. koepferae*, empleando un test de Wilcoxon de dos muestras en R (función *wilcox.test* del paquete *stats*).

Antes de realizar los análisis estadísticos se aplicó una transformación angular a todas las proporciones que fueron utilizadas como variable respuesta.

2.3. Resultados

2.3.1. Atractivo de las hembras

La proporción de hembras cortejadas durante los primeros 3 minutos de los ensayos de re-apareamiento no difirió entre el grupo virgen y el apareado en *D. buzzatii* ($F(59, 1) = 0,37$, $p\text{-valor} = 0,543$) ni en *D. koepferae* ($F(73, 1) = 1,43$, $p\text{-valor} = 0,235$), sugiriendo que el Status sexual de las hembras no afecta fuertemente su atractivo (Fig. 2.3).

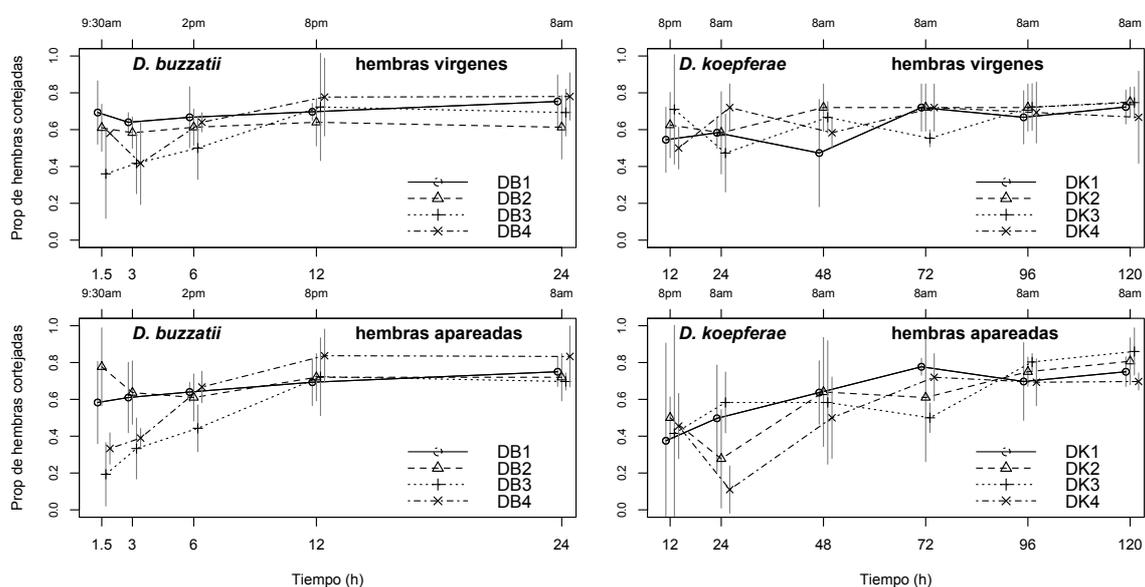


Figura 2.3. Variación temporal de la proporción de hembras cortejadas en cada aislínea. Se muestran los valores medios con sus errores estándar. El eje horizontal representa el tiempo transcurrido desde el primer apareamiento del grupo de hembras apareadas. Se presenta un gráfico para cada combinación de especie por status sexual. También se incluye, sobre el eje horizontal superior, el momento del día en el que se realizaron los ensayos.

Las escalas temporales empleadas en cada especie fueron muy disímiles y apenas se solaparon. Por este motivo, no pudimos comparar entre las especies el efecto del tiempo transcurrido desde el primer apareamiento (Tiempo) sobre el atractivo de las hembras (proporción de hembras cortejadas). Sin embargo, en cada especie, hallamos una relación lineal positiva, aunque débil, entre la proporción de hembras cortejadas y el Tiempo, tanto en el grupo de hembras apareadas como en el de hembras vírgenes (Fig. 2.3), revelando que el atractivo depende del Tiempo, de la edad o del

horario del ensayo. De acuerdo al modelo implementado, la proporción media de hembras cortejadas se incrementó por día en 0,28 tras T0 (de 0,50 a 0,78 dentro de las primeras 24 h) en *D. buzzatii* ($F(55, 1) = 20,04$, p-valor $< 0,0001$) y en 0,07 tras T0 (de 0,43 a 0,77 dentro de las 120 h) en *D. koepferae* ($F(69, 1) = 30,03$, p-valor $< 0,0001$).

2.3.2. Propensión al apareamiento

Encontramos un efecto de interacción entre el Tiempo y el Status sexual de las hembras sobre la propensión a (re-)aparear tanto en *D. buzzatii* ($F(58, 1) = 23,42$, p-valor $< 0,0001$) como en *D. koepferae* ($F(72, 1) = 128,44$, p-valor $< 0,0001$). Por ello, procedimos a realizar análisis separados para cada grupo de hembras: las vírgenes y las apareadas, en los que evaluamos el efecto del Tiempo sobre la propensión a (re-)aparear. Estas pruebas revelaron que el Tiempo no constituye un buen predictor de la propensión a aparear en las hembras vírgenes de *D. buzzatii* ($F(55, 1) = 0,77$, p-valor = 0,383) o de *D. koepferae* ($F(69, 1) = 0,03$, p-valor = 0,866). En contraste, el Tiempo sí afectó a la propensión a re-aparear (en el grupo apareado) en ambas especies; estas hembras incrementaron su predisposición al re-apareamiento a medida que transcurrió el Tiempo ([Fig. 2.4](#)). Los efectos estimados del Tiempo nos muestran que en *D. buzzatii* la propensión a re-aparear aumentó en promedio 0,54 por día tras T0, de 0,23 a 0,77 dentro de las primeras 24 h ($F(55, 1) = 36,99$, p-valor $< 0,0001$), mientras que en *D. koepferae* la misma aumentó en promedio 0,18 por día tras T0, de 0,00 a 0,87 dentro de las primeras 120 h ($F(69, 1) = 175,99$, p-valor $< 0,0001$). Estos resultados sugieren que el efecto negativo que la cópula ejerce sobre la receptividad de las hembras se diluye con el tiempo.

La proporción de hembras vírgenes que accedieron a aparear 12 o 24 h tras T0 no difirió entre *D. buzzatii* (67%) y *D. koepferae* (72%) ($F(6, 1) = 1,74$, p-valor = 0,235). En contraste, la proporción de hembras del grupo apareado que accedieron a re-aparear con un segundo macho 12 o 24 h tras T0 fue significativamente mayor en *D. buzzatii* (64%) que en *D. koepferae* (5%) ($F(6, 1) = 147,39$, p-valor $< 0,0001$).

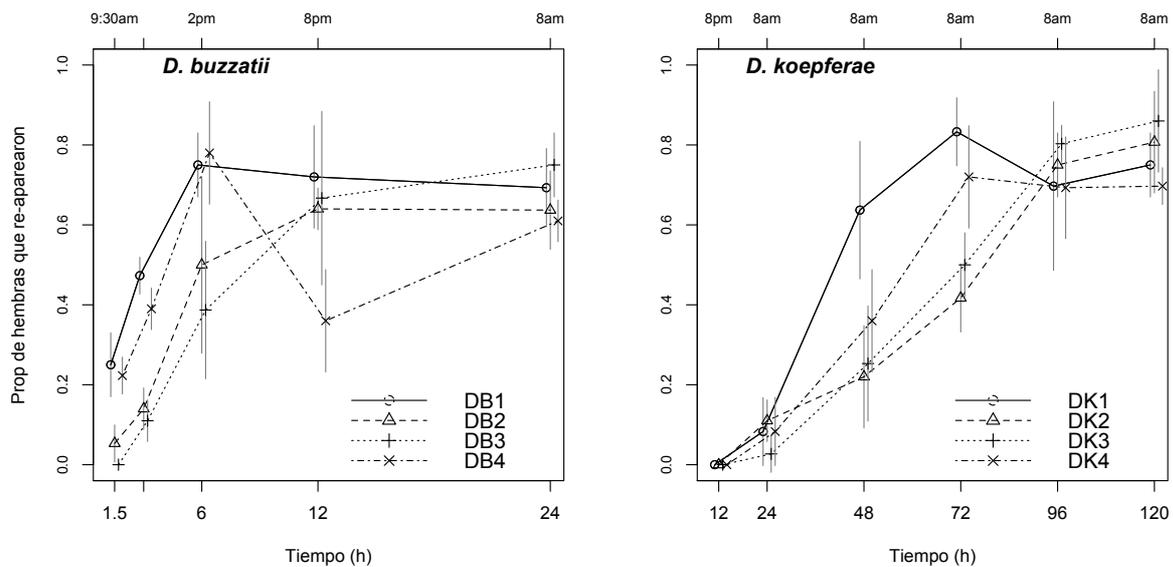


Figura 2.4. Variación temporal de la proporción de hembras apareadas que accedieron a re-aparear en cada isolínea. Se exhiben los valores medios de la propensión a re-aparear con sus errores estándar. El eje horizontal representa el tiempo transcurrido desde el primer apareamiento. Los resultados obtenidos en cada especie se presentan en gráficos separados. También se incluye, sobre el eje horizontal superior, el momento del día en el que se realizaron los ensayos.

2.3.3. Duración del período refractario

La Razón entre la probabilidad de Re-apareamiento y la de Apareamiento (RRA), que definimos como la propensión a re-aparear del grupo apareado dividida por la propensión a aparear del grupo virgen de la misma edad, aumentó con el Tiempo desde valores cercanos a 0 hasta valores cercanos a 1, en todas las isolíneas (Fig. 2.5). Los análisis implementados revelaron que el tiempo que las hembras necesitan, luego de aparear, para recuperar el 50% de su propensión a aparear (R50) dependió de la isolínea, tanto en *D. buzzatii* ($F(66, 3) = 9,36$, $p\text{-valor} < 0,0001$) como en *D. koepferae* ($F(80, 3) = 10,17$, $p\text{-valor} < 0,0001$). Esto indica que la duración del período refractario varió entre las isolíneas de la misma especie. Las estimaciones de los R50 y sus intervalos de confianza al 95% se muestran en la figura 2.6. En ambas especies los intervalos de confianza al 95% del R50 de las isolíneas más divergentes no se solaparon entre sí. Las isolíneas DB4 (R50 = 1,92 h) y DK1 (R50 = 33,25 h) exhibieron períodos refractarios significativamente más cortos que las isolíneas DB3 (R50 = 5,65 h) y DK2

(R50 = 62,42 h), respectivamente. Por tanto, DB4 y DK1 fueron consideradas “isolíneas rápidas”, y DB3 y DK2 “isolíneas lentas”.

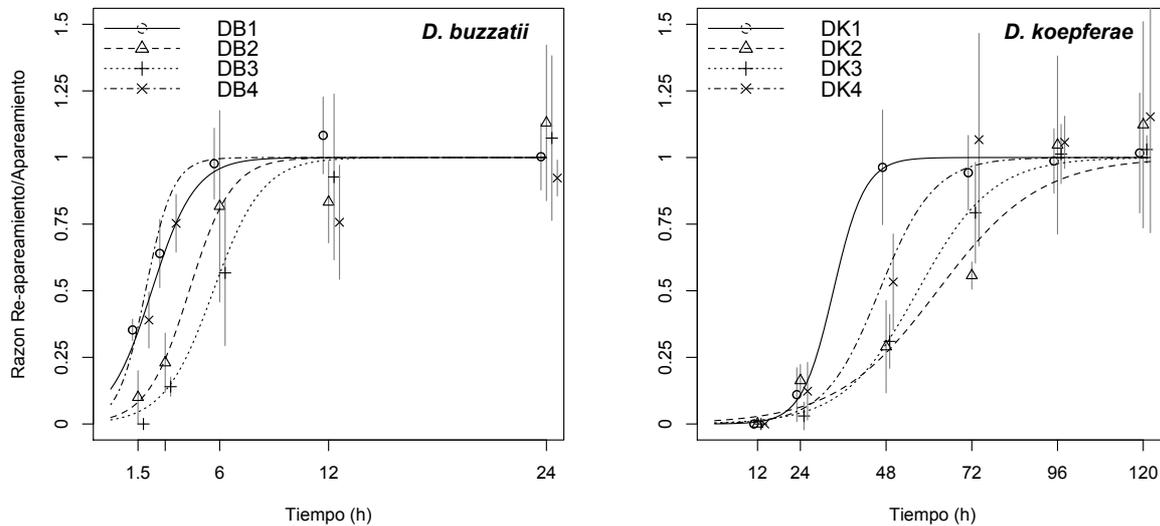


Figura 2.5. Variación temporal de RRA en cada isolínea de *D. buzzatii* (panel izquierdo) y *D. koepferae* (panel derecho). Cada punto representa el valor medio acompañado por su error estándar. Se ajusta una curva sigmoidea a los datos de cada isolínea para ilustrar cómo las hembras inseminadas recuperan la propensión a aparear.

Utilizando la Isolínea Rápida y la Isolínea Lenta de cada especie en ensayos de re-apareamiento adicionales, controlamos independientemente la Isolínea del Primer Macho (IPM), la del Segundo Macho (ISM) y la de la Hembra (IH), como predictores de R50. En *D. buzzatii*, sólo IH afectó significativamente a R50 mientras que tanto IPM como IH afectaron a R50 en *D. koepferae* (Tabla 2.1). Estos resultados sugieren que la isolínea de origen de la hembra y (al menos en *D. koepferae*) la del primer macho pueden dar cuenta de las diferencias genéticas de la duración del periodo refractario.

Finalmente, también encontramos diferencias conspicuas en la duración del período refractario entre las especies ($W8 = 0$, $p\text{-valor} = 0,029$) dado que el R50 medio fue 14 veces mayor en *D. koepferae* (49,66 h) que en *D. buzzatii* (3,54 h).

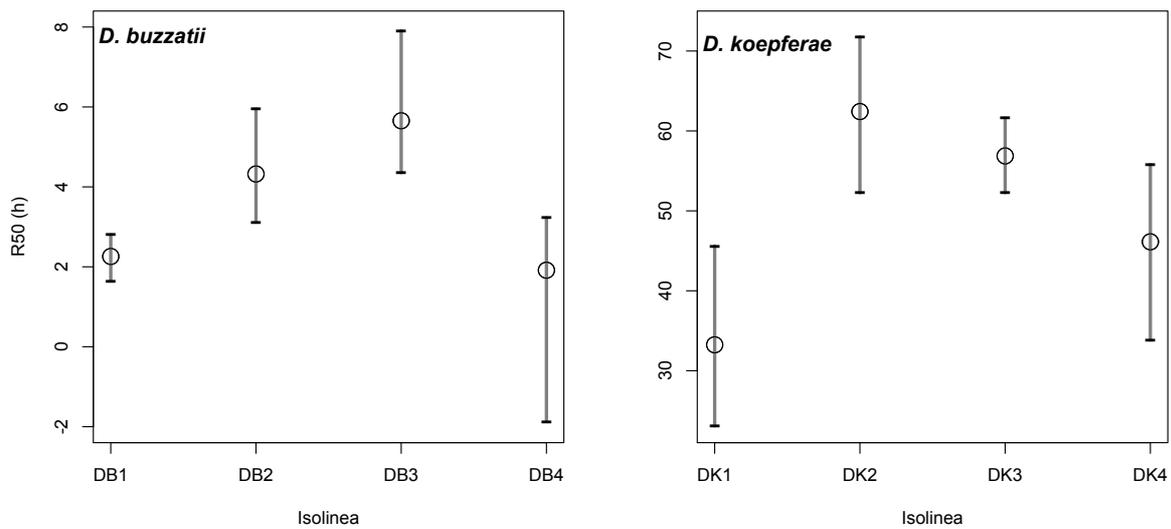


Figura 2.6. Duración del período refractario en *D. buzzatii* (panel izquierdo) y *D. koepferae* (panel derecho). Se muestra el tiempo medio que las hembras inseminadas requieren para recuperar el 50% de su propensión a aparear (R50) con su intervalo de confianza al 95% para cada isolínea. Cada valor medio fue estimado como un parámetro del modelo sigmoideo implementado para describir la variación temporal de RRA.

Tabla 2.1. Efectos de cada línea de origen de los machos y de las hembras sobre el tiempo que las hembras apareadas demoran en recuperar el 50% de su propensión a re-aparear (R50). Las estimaciones de cada factor (Isolínea del Primer Macho (IPM), la del Segundo Macho (ISM) y la de la Hembra (IH)) fueron obtenidas mediante la implementación de un modelo sigmoideo que describe la Razón entre la probabilidad de Re-apareamiento y la de Apareamiento (RRA) como función del tiempo transcurrido después del primer apareamiento (para mayor detalle ver la [sección 2.2.6](#)). Los efectos estimados fueron referidos al menor R50 (valor de R50 de la “Isolínea Rápida”) de cada especie.

Especie	Parámetro	Estimación	t-valor	p-valor
<i>D. buzzatii</i>	menor R50	1,80	5,92	3,486E-08
	efecto de IPM	0,49	1,56	0,122
	efecto de ISM	0,10	0,30	0,764
	efecto de IH	3,31	10,23	7,358E-18
<i>D. koepferae</i>	menor R50	31,99	12,88	2,90E-26
	efecto de IPM	7,71	3,37	9,455E-04
	efecto de ISM	-0,09	-0,04	0,968
	efecto de IH	20,14	8,51	1,390E-14

2.4. Referencias

- Andersson M (1994) Sexual Selection. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Arnqvist G, Rowe L (2005) Sexual Conflict. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Bateman AJ (1948) Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*, **2** (3), 349–368.
- Birkhead TR, Pizzari T (2002) Postcopulatory sexual selection. *Nature Reviews Genetics*, **3**, 262–273.
- Darwin C (1871) The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex. John Murray, London.
- Dickson BJ (2008) Wired for sex: the neurobiology of *Drosophila* mating decisions. *Science*, **322**(5903), 904-909.
- Eberhard WG (1985) Sexual Selection and Animal Genitalia. Harvard University Press, Harvard.
- Emlen ST, Oring LW (1977) Ecology, sexual selection and the evolution of mating systems. *Science*, **197**, 215-223.
- Fanara JJ, Fontdevila A, Hasson E (1999) Oviposition preference and life history traits in the cactophilic sibling species *Drosophila koepferae* and *Drosophila buzzatii* in association to their natural host. *Evolutionary Ecology*, **13**, 173-190.
- Fanara JJ, Hasson E (2001) Oviposition acceptance and fecundity schedule in the cactophilic sibling species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae* on their natural hosts. *Evolution*, **55**, 2615–2619.
- Fowler GL (1973) Some aspects of the reproductive biology of *Drosophila*: sperm transfer, sperm storage, and sperm utilization. *Advances in Genetics*, **17**, 293-360.
- Fuyama Y (1995) Genetic evidence that ovulation reduces sexual receptivity in *Drosophila melanogaster* females. *Behavior Genetics*, **25**, 581-587.

- Holland B, Rice WR (1999) Experimental removal of sexual selection reverses intersexual antagonistic coevolution and removes a reproductive load. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 5083–5088.
- Manning A (1967) The control of sexual receptivity in female *Drosophila*. *Animal Behaviour*, **15**, 239-250.
- Markow TA (1985) A comparative investigation of the mating system of *Drosophila hydei*. *Animal Behaviour*, **33**, 775-781.
- Markow TA (1996) Evolution of *Drosophila* mating systems. *Evolutionary Biology*, **29**, 73–106.
- Markow TA (2002) Perspective: female remating, operational sex ratio, and the arena of sexual selection in *Drosophila* species. *Evolution*, **56**, 1725–1734.
- McRobert SP, Adams CR, Wutjke M, Frank J, Jackson LL (1997) A comparison of female post-copulatory behaviour in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila biarmipes*. *Journal of Insect Behavior*, **10**, 761-770.
- Neubaum DM, Wolfner MF (1999) Mated *Drosophila melanogaster* females require a seminal fluid protein, Acp36DE, to store sperm efficiently. *Genetics*, **153(2)**, 845–857.
- Parker GA (1970) Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews*, **45**, 525–567.
- Parker, G.A. (1979). Sexual selection and sexual conflict. En: Blum MS, Blum NA, eds. Sexual Selection and Reproductive Competition in Insects. Academic Press, New York.
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, the R Development Core Team (2012) Nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-104. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Pitnick S, Markow T, Spicer GS (1999) Evolution of multiple kinds of female sperm-storage organs in *Drosophila*. *Evolution*, **53**, 1804-1822.

R Development Core Team (2012) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

Rice WR (1996) Sexually antagonistic male adaptation triggered by experimental arrest of female evolution. *Nature*, **381**, 232–234.

Rice WR, 2000. Dangerous liaisons. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **97**, 12953-55.

Rice WR, Holland B (1997) The enemies within: inter-genomic conflict, inter-locus contest evolution (ICE), and the intra-specific red queen. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **41**, 1-10.

Ruiz A, Wasserman M (1993) Evolutionary cytogenetics of the *Drosophila buzzatii* species complex. *Heredity*, **70**, 582-596.

Simmons LW (2001) Sperm Competition and Its Evolutionary Consequences in The Insects. Princeton University Press, Princeton.

Simmons LW, Siva-Jothy MT (1998) Sperm competition in insects: mechanisms and the potential for selection. En: Birkhead T, Møller A, eds. Sexual Selection and Sperm Competition. Academic Press, San Diego.

Tram U, Wolfner MF (1998) Seminal fluid regulation of female sexual attractiveness in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 4051-4054.

Trivers RL (1972) Parental investment and sexual selection. En: Campbell B, ed. Sexual selection and the descent of man, 1871-1971. Aldine, Chicago.

Venables WN, Ripley BD (2002) Modern Applied Statistics with S, fourth ed. Springer, New York.

Wolfner MF (1997) Tokens of love: Functions and regulation of *Drosophila* male accessory gland products. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **27**, 179-192.

Wolfner MF, Applebaum S, Heifetz Y (2005) Insect gonadal glands and their gene products. En: Gilbert L, Iatrou K, Gill S, eds. pp 179-212. Comprehensive insect physiology, biochemistry, pharmacology and molecular biology. Elsevier, Amsterdam.

CAPÍTULO 3

Velocidad de consumo del esperma almacenado

En el género *Drosophila*, como en muchos otros taxa, el esperma transferido durante el apareamiento se almacena en el tracto reproductivo de la hembra y puede ser utilizado para fecundar los óvulos durante varios días después de la cópula. Cuanto mayor sea la velocidad con la que las hembras consumen el esperma almacenado menor será el riesgo de competencia espermática (CE) pues sólo las hembras que re-aparean antes de agotar sus reservas de esperma posibilitan la competencia. En el capítulo anterior vimos cuánto tardan las hembras de *D. buzzatii* y *D. koepferae* en recuperar la receptividad para re-aparear. En este capítulo investigamos el tiempo que tardan las hembras inseminadas de ambas especies en agotar las reservas de esperma funcional. Encontramos que las hembras de *D. buzzatii* consumen el esperma almacenado más lentamente que las de *D. koepferae*. Por ejemplo, al segundo día tras la inseminación, las hembras de *D. buzzatii* consumieron cerca del 30% de sus reservas de esperma mientras que las de *D. koepferae* ya agotaron entre el 60 y el 90% de las mismas. Dado que las hembras de *D. buzzatii* tienden a re-aparear más rápidamente y consumen el esperma más lentamente concluimos que el riesgo de CE, en las condiciones del laboratorio, es mayor en esta especie que en su hermana.

3.1. Introducción

En las moscas del género *Drosophila*, el esperma que las hembras reciben durante el apareamiento es almacenado en un órgano tubular llamado receptáculo seminal y, en algunas especies, además en un par de órganos esféricos llamados espermatecas (Fowler, 1973; Pitnick *et al.*, 1999). El almacenamiento de esperma dentro de estos órganos ofrece diferentes formas de aumentar el éxito reproductivo. Debido a que la ovogénesis es lenta y costosa en comparación con la espermatogénesis, las hembras demoran varios días en producir suficiente cantidad de óvulos maduros como para aprovechar las grandes cantidades de esperma transferido durante una cópula. Por tanto, almacenar el esperma de una única cópula y utilizarlo gradualmente durante varios días permite un mayor aprovechamiento del esperma y aumentar así la fecundidad. Además, el almacenamiento de esperma también permite desacoplar el momento o lugar de la cópula con el momento o lugar de la fertilización que es inmediatamente seguida por la oviposición. De esta manera las hembras que copulan en lugares y momentos poco propicios para oviponer pueden, tras el apareamiento, buscar o esperar mejores condiciones para depositar sus huevos.

Las hembras inseminadas que poseen esperma almacenado van consumiéndolo a medida que ovulan. Cuando la hembra ovula, los óvulos maduros viajan desde el ovario por el oviducto hasta el útero. El oviducto, así como cualquiera de los órganos de almacenamiento de esperma, desemboca en la porción anterior del útero donde ocurre la fecundación (Fig. 3.1). Al momento en que un óvulo alcanza el útero se libera un grupo de espermatozoides y, aunque puede entrar al óvulo más de uno, sólo un espermatozoide consigue la fertilización (Chapman, 1982). El huevo fertilizado es rápidamente expulsado del útero y depositado en algún sustrato. Entonces, la reducción de la cantidad de esperma almacenado a lo largo de la vida de una hembra inseminada está determinada por la tasa de ovulación y la cantidad de esperma liberado por óvulo. En cualquier caso, producto de una elevada tasa de ovulación o de una gran cantidad de esperma invertido por óvulo, las hembras que exhiban un consumo rápido del esperma almacenado y no re-aparean, disminuyen rápidamente su potencial reproductivo. Por tanto, sin necesidad de explorar los procesos crípticos de ovulación o liberación de esperma, es posible estudiar la dinámica del consumo de esperma midiendo la

velocidad con la que las hembras van perdiendo su potencial reproductivo tras ser inseminadas.

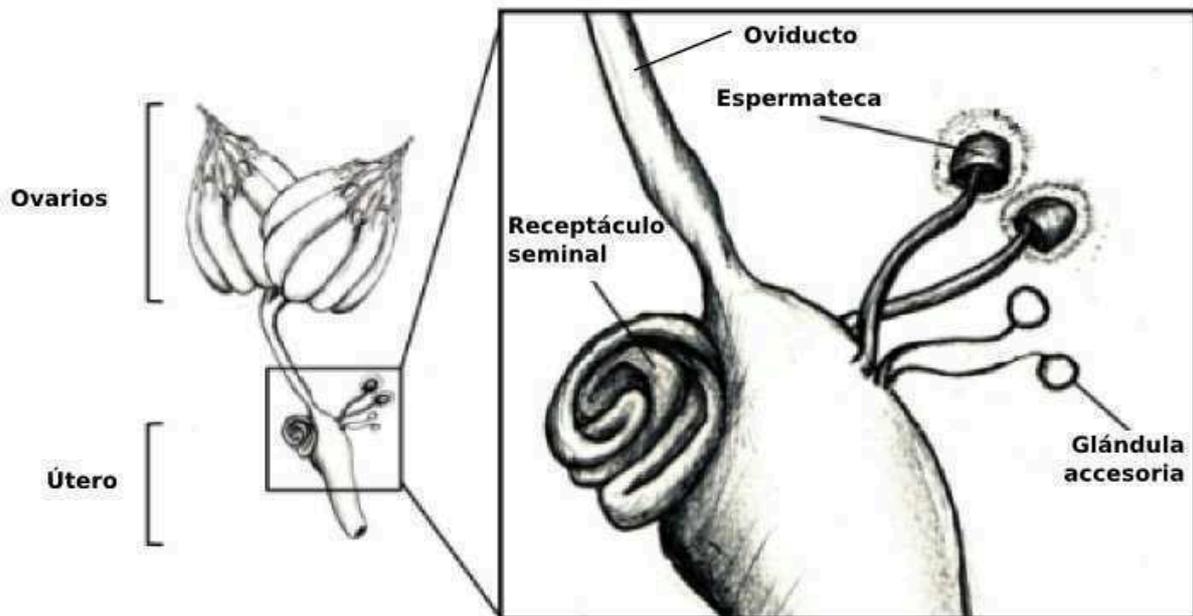


Figura 3.1. Esquema del tracto reproductivo de una hembra de *Drosophila*.

El riesgo de que ocurra CE disminuye a medida que aumenta la velocidad con la que las hembras consumen el esperma almacenado pues sólo las hembras que re-aparean antes de agotar sus reservas de esperma posibilitan la competencia. En el capítulo anterior vimos cuánto tardan las hembras de *D. buzzatii* y *D. koepferae* en recuperar la receptividad para re-aparear. Para valorar la intensidad de la CE en estas especies sería complementario conocer cuánto tardan en agotar sus reservas de esperma.

El propósito de los experimentos descritos en este capítulo fue investigar el tiempo que tarda una hembra inseminada en agotar las reservas de esperma que es funcional para la CE, es decir, esperma que puede alterar el potencial reproductivo de esperma proveniente de otros machos o cuyo potencial reproductivo puede ser alterado por esperma proveniente de otros machos. Abordamos esta empresa asumiendo que el número de espermatozoides almacenados que son funcionales para la CE es igual al número de espermatozoides almacenados que son funcionales para la fertilización. Por tanto, describimos el uso de esperma contando el número de huevos que son fertilizados por día en hembras inseminadas por un único macho, hasta el consumo total de la carga de esperma almacenado. A partir de estos números, luego calculamos

los tiempos transcurridos hasta que las hembras utilizan diferentes fracciones de sus reservas de esperma. Utilizamos para estos ensayos las mismas isolíneas (descriptas en el capítulo anterior ([sección 2.2.1](#))) que utilizamos en los ensayos de re-apareamiento.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Ensayos de fertilización

El uso de espermatozoides fue estudiado en 6-20 (14 en promedio) hembras por aislón. Para obtener esas hembras, se colocaron en forma individual 12-24 hembras vírgenes (de 5 días de edad) de cada aislón junto a dos machos vírgenes (de 5 días de edad) en tubos de 3 cm³ conteniendo medio de cría (Fig. 2.2), desde las 8 am hasta la ocurrencia de la cópula. Inmediatamente luego de la cópula, cada hembra fue gentilmente aspirada y liberada individualmente en un tubo adosado a una cámara de oviposición con medio fresco para la recolección de huevos (cámara de huevos de aquí en adelante). Algunas hembras (4-50% dependiendo de la aislón) no aparearon tras una hora de ensayo y fueron descartadas. Las cámaras de huevos fueron reemplazadas diariamente durante 8 días dado que los ensayos preliminares habían mostrado que las hembras dejan de colocar huevos fértiles después del octavo día desde la inseminación. Dado que las hembras de *Drosophila* frecuentemente depositan huevos no fertilizados (Hanson & Ferris, 1929), decidimos valorar el número de larvas de primer estadio recién eclosionadas en cada cámara de huevos como un indicador del número de huevos fértiles depositados por día. El número de larvas observadas en una cámara de huevos puede considerarse un buen predictor del número de huevos fértiles depositados por día dado que la mortalidad de los huevos es muy baja en *D. buzzatii* y *D. koepferae* (Fanara & Hasson, 2001). Debido a que la liberación del espermatozoides almacenado por las hembras para la fertilización de los óvulos ocurre inmediatamente antes de la deposición de los huevos (Campos-Ortega & Hartenstein, 1985), el número de larvas de primer estadio por cámara de huevos también es un sucedáneo de la liberación diaria de espermatozoides almacenado para la fertilización efectiva. Consideramos que las cópulas de las hembras que no produjeron progenie fueron estériles, por lo cual dichas hembras fueron excluidas del análisis.

3.2.2. Análisis del consumo de espermatozoides

Para evaluar si *D. buzzatii* y *D. koepferae* difieren en la velocidad a la que las hembras usan las reservas de espermatozoides para fertilizar sus huevos, examinamos la hipótesis nula de que las hembras inseminadas por un macho tardan, en ambas

especies, el mismo tiempo en agotar una determinada proporción de su carga efectiva de esperma. Por tanto, establecimos como variable dependiente, por cada aislónea, el número de días transcurridos desde el apareamiento hasta que el número de huevos depositados por el grupo de hembras inseminadas excedió el 30%, el 60% y el 90% de su fecundidad total. Elegimos estos porcentajes porque el tiempo transcurrido desde la inseminación hasta la fertilización de huevos covarió linealmente con esos valores particulares. Realizamos un ANOVA de medidas repetidas en R (función *ezANOVA* del paquete *ez* (Lawrence, 2012)) con Especie (*D. buzzatii* o *D. koepferae*) como un factor categórico fijo entre aislóneas y con la proporción de la fecundidad de las hembras (30%, 60% o 90%) como una covariable dentro de aislónea.

3.3. Resultados

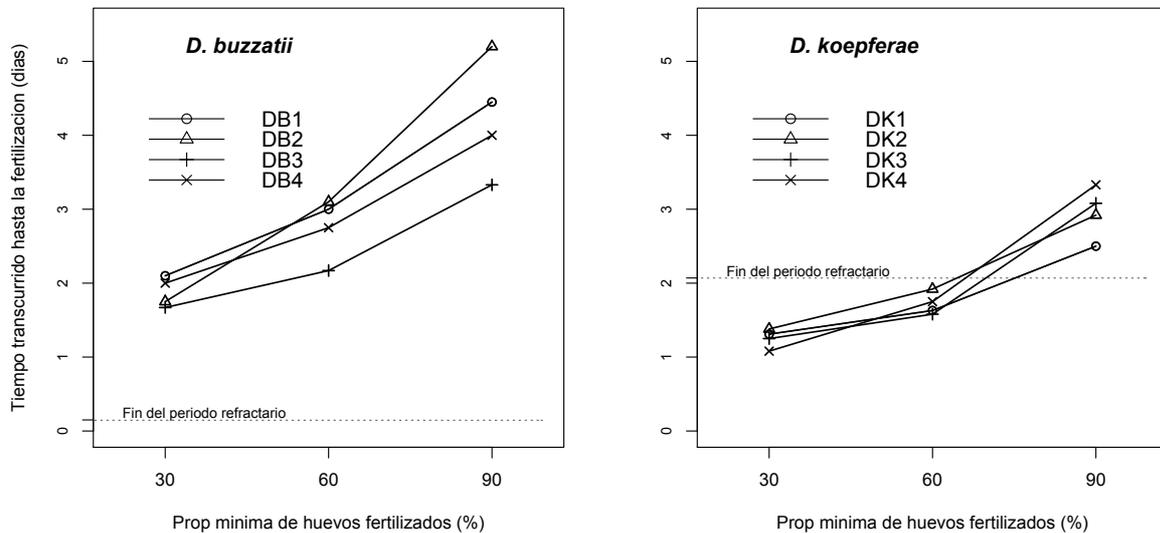


Figura 3.2. Patrón temporal del uso del esperma almacenado en *D. buzzatii* (panel izquierdo) y *D. koepferae* (panel derecho). Cada punto representa el tiempo que le tomó al grupo de hembras de cada aislónea fertilizar, al menos, 30, 60 y 90% del número total de huevos fecundados. Los valores fueron calculados a partir de la fecundidad total de grupos de 6-20 hembras inseminadas, por aislónea. En línea discontinua se exhibe la duración del período refractario en cada especie.

En promedio, el tiempo requerido por las hembras inseminadas en consumir una dada proporción (30%, 60% o 90%) de su carga efectiva de esperma fue mayor en *D. buzzatii* que en *D. koepferae* ($F(6,1) = 20,30$, $p\text{-valor} = 0,004$). Las [figuras 3.2](#) y [3.3](#) muestran (en términos relativos al número total de huevos fertilizados y en números absolutos de huevos fertilizados, respectivamente) el patrón temporal del uso de esperma para la fertilización en las cuatro aislóneas de cada especie. En la [tabla 9.1](#) (material suplementario) se muestra el número de huevos que cada hembra depositó por día.

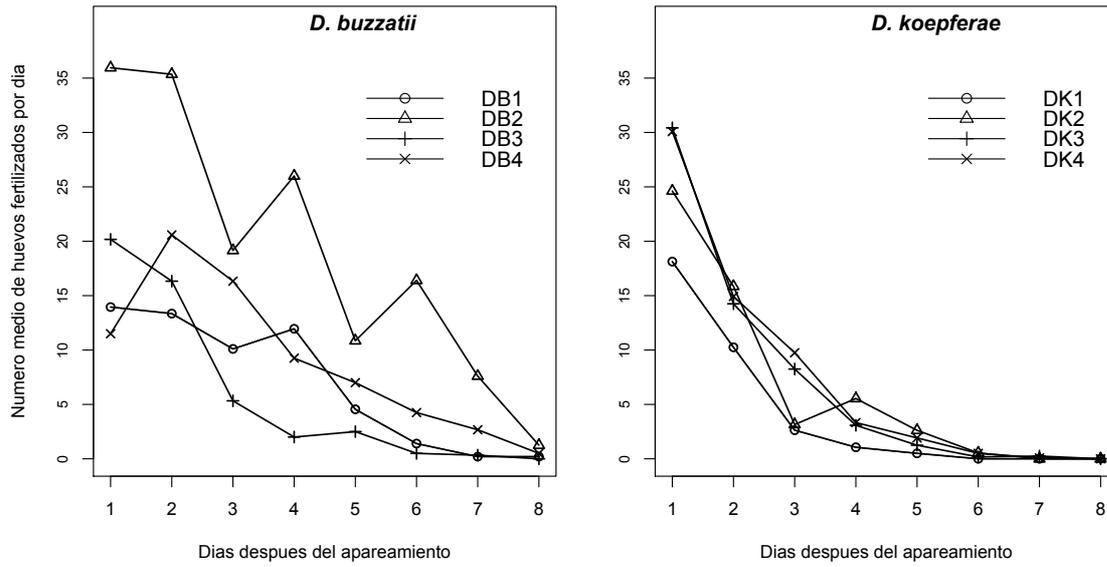


Figura 3.3. Número medio de huevos fertilizados por día después de un único apareamiento en *D. buzzatii* (panel izquierdo) y *D. koepferae* (panel derecho). Los valores fueron obtenidos a partir de la fecundidad diaria total de grupos de 6-20 hembras inseminadas, por cada isolínea.

3.4. Referencias

Campos-Ortega JA, Hartenstein V (1985) The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*. Springer-Verlag, Berlin.

Chapman RF (1982) The Insects: Structure and Function. Third ed. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Fanara JJ, Hasson E (2001) Oviposition acceptance and fecundity schedule in the cactophilic sibling species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae* on their natural hosts. *Evolution*, **55**, 2615–2619.

Fowler GL (1973) Some aspects of the reproductive biology of *Drosophila*: sperm transfer, sperm storage, and sperm utilization. *Advances in Genetics*, **17**, 293-360.

Hanson FB, Ferris FR (1929) A quantitative study of fecundity in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Zoology*, **54**, 485–506.

Lawrence MA (2012) ez: Easy analysis and visualization of factorial experiments. R package (version 4.1-1). <http://CRAN.R-project.org/package=ez>.

Pitnick S, Markow T, Spicer GS (1999) Evolution of multiple kinds of female sperm-storage organs in *Drosophila*. *Evolution*, **53**, 1804-1822.

CAPÍTULO 4

Paternidad múltiple en la naturaleza

En los capítulos anteriores mostramos que las hembras de *D. buzzatii* tienden a re-aparear más rápidamente y a consumir el esperma más lentamente que las de *D. koepferae*. Ambos resultados apuntan a que el riesgo de CE sería mayor en *D. buzzatii* que en su especie hermana. Sin embargo, los experimentos que nos llevaron a tales inferencias fueron realizados en condiciones de laboratorio que distan mucho de las naturales y pudieron haber influido en los resultados. Por ello decidimos examinar cuál es el riesgo de CE en la naturaleza. En este capítulo, entonces, estudiamos la incidencia de paternidad múltiple recuperando la variación genética de la progenie de hembras inseminadas y capturadas en la naturaleza. Nuestros análisis revelan que *D. buzzatii* presenta una mayor incidencia de paternidad múltiple y un mayor riesgo de CE, lo cual respalda y robustece nuestras inferencias de los capítulos previos. El número estimado de padres por camada fue 3,57 en *D. buzzatii* y 1,95 en *D. koepferae*. En consecuencia, la proporción esperada de hembras inseminadas naturalmente por más de un macho fue 0,89 en *D. buzzatii* y 0,58 en *D. koepferae*. Acorde a nuestros resultados obtenidos en los primeros capítulos, este patrón se explica tanto por una mayor velocidad con la que las hembras inseminadas de *D. koepferae* utilizan el esperma almacenado, como por una mayor tasa de re-apareamiento en las hembras de *D. buzzatii*.

4.1. Introducción

La intensidad de la competencia espermática (CE) puede verse afectada por cualquier variable que perturbe el riesgo de que espermias de distintos machos coexistan en el tracto reproductivo de una hembra. En el primer capítulo ([sección 1.3](#)) vimos que, en *Drosophila*, la probabilidad de que el espermia de un macho compita con el de otros por el acceso a un dado grupo de óvulos, es esperable que aumente junto con la Frecuencia con que las Hembras Re-aparean (FHR) y disminuya junto con la Velocidad a la que Consumen (usan o desperdician) el Esperma almacenado (VCE). Por tanto, cualquier variable que afecte a FHR o a VCE afectará las chances de que ocurra CE. Consideremos, por ejemplo, las siguientes variables: la densidad poblacional (que influye en la probabilidad de encuentro entre machos y hembras), la distribución espacial y temporal de los recursos o sustratos donde las moscas aparean y las hembras oviponen y cualquier condición climática que afecte la capacidad de las moscas de detectar potenciales compañeros sexuales o encontrar un sustrato adecuado donde depositar sus huevos. Cualquiera de estas variables muy probablemente condiciona a FHR y a VCE porque determina las oportunidades de apareamiento y oviposición de las moscas. Sin embargo, las condiciones que estas u otras variables relevantes imponen en la naturaleza son muy difíciles de reproducir en el laboratorio, en parte porque muchas pueden ser desconocidas. De modo que para mensurar el verdadero riesgo de CE en una población o especie es necesario hacerlo en la naturaleza. Un modo de hacerlo es inferir el número de padres por camada recuperando la variación genética de la progenie de hembras inseminadas y capturadas en la naturaleza, utilizando para ello marcadores con alto poder discriminativo. Esta aproximación ha sido implementada en varios estudios revelando que la incidencia de la poliandria es altamente variable entre especies de *Drosophila* (Harshman & Clark, 1998; Imhof *et al.*, 1998; Jones & Clark, 2003; Bundgaard *et al.*, 2004; Schlötterer *et al.*, 2005; Good *et al.*, 2006; Frentiu & Chenoweth, 2008).

En los dos capítulos anteriores vimos que, en las condiciones de laboratorio, las hembras de *D. buzzatii* tienden a re-aparear más rápidamente y consumen el espermia más lentamente que las de *D. koepferae*. Ambos resultados insinúan que el riesgo de CE es mayor en *D. buzzatii* que en su especie hermana. Para investigar la propensión a re-aparear de las hembras colocamos a cada hembra junto a dos machos vírgenes de 5-6

días de edad durante 15 min en un tubo de 3 cm³ (Fig. 2.2) a 25°C. Para investigar la velocidad de consumo de esperma almacenado cada hembra fue mantenida individualmente en presencia de un sustrato fresco, de condiciones ideales para oviponer, las 24 h de cada día del ensayo siempre a 25°C. Debido a que estas condiciones distan mucho de las naturales decidimos examinar el riesgo de CE en condiciones naturales. En este capítulo, entonces, estudiamos la incidencia de paternidad múltiple en hembras inseminadas y capturadas en la naturaleza. Con el objeto de explorar el riesgo de CE en *D. buzzatii* y *D. koepferae*, estimamos el número de padres por camada y la proporción de hembras inseminadas por más de un macho. Abordamos este objetivo mediante un estudio de paternidad que consistió en el análisis genético de la progenie de hembras inseminadas y capturadas en la naturaleza utilizando marcadores genéticos polimórficos.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Recolección de las muestras

Un total de 204 hembras fueron colectadas utilizando trampas con banana fermentada como cebo, en la provincia de La Rioja (Argentina) en Febrero de 2011. Las moscas colectadas fueron inmediatamente colocadas en tubos individuales con medio de cría instantáneo de *Drosophila* (medio de cría de aquí en adelante), transferidas a nuevos tubos cada 48 h hasta que cesó la oviposición y finalmente preservadas en etanol absoluto a -20°C. Sesenta y ocho hembras no produjeron descendencia tras dos semanas y fueron descartadas. Cuando comenzaron a emerger los descendientes de las hembras fértiles, las moscas emergentes fueron recuperadas cada 24 h, fijadas en etanol absoluto y conservadas a -20°C. La identificación de especie, que se realizó inspeccionando la morfología genital de uno de los descendientes adultos macho (dado que las hembras de ambas especies son morfológicamente indistinguibles), reveló que 72 de las hembras colectadas pertenecían a *D. buzzatii* y 64 a *D. koepferae*.

4.2.2. Genotipificación molecular

De las hembras preservadas en etanol que habían producido descendencia, se escogieron al azar 20 de *D. buzzatii* y 14 de *D. koepferae*, y 17-23 (21 en promedio) descendientes de cada hembra (un total de 748 moscas) para genotipificar.

Se extrajo ADN de cada individuo utilizando el Kit de purificación de ADN Puregene (Gentra Systems) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante para moscas individuales. Se generaron genotipos multilocus utilizando cinco loci microsatélites de repeticiones de dos nucleótidos. Cuatro loci, llamados B65, K72, K75 y K76, pudieron ser amplificados en ambas especies, mientras que K60 sólo pudo ser amplificado en *D. koepferae*. Los cinco microsatélites fueron desarrollados a partir de librerías genómicas siguiendo la metodología de Hamilton *et al.* (1999) con modificaciones menores. En un estudio reciente, no se encontraron desviaciones de las frecuencias genotípicas del equilibrio de Hardy-Weinberg ni evidencias de desequilibrio de ligamiento en ninguno de estos marcadores, los cuales tampoco están ligados entre sí (Lipko & Hasson no publicado). Del par de *primers* utilizado para amplificar por PCR cada microsatélite, uno se marcó en su extremo 5'. Se utilizaron cuatro fluoróforos

diferentes para el marcado con el fin de poder genotipificar todos los loci simultáneamente tras amplificarlos en una única PCR múltiple por muestra. Para las PCRs se usó Platinum Multiplex PCR Master Mix (Applied Biosystems). Las secuencias de los *primers* empleados en este trabajo se muestran en la [tabla 4.1](#).

Tabla 4.1. Secuencias de los *primers* de cada microsatélite utilizado para las amplificaciones por PCR. Los loci B65, K72, K75 y K76, fueron amplificados en las muestras de *D. buzzatii* y *D. koepferae*. El locus K60 fue amplificado en las muestras de *D. antonietae* ([capítulo 7](#)) y *D. koepferae*. El locus B55 sólo fue amplificado en las muestras de *D. antonietae* ([capítulo 7](#)).

Locus	Marcación	Secuencia (5'-3')
B55	6FAM	F: CCGGATGAACTGTCCAATAGATTAC
		R: AAGTTCCACTCGCATTTGCTACATC
B65	6FAM	F: GAATTGTGGCCAAGTTTCGTAGAATC
		R: CTGCCACTAGTGAAGTATCAACAATG
K60	6FAM	F: CAACCATTGCCATTTTCATCTTACTGC
		R: AAGACAATCCAGCTTTCTATATGGCG
K72	NED	F: CAAATGACCAGAGGGAAGCGGG
		R: CGCCGAGGCACAGGAGCTGTTG
K75	PET	F: TGCCCTGAATACCAGGAGCATAAT
		R: ATAGGCAAACAGAGCGGCAAATAAC
K76	VIC	F: TTAACAGACAAGTCGATGCCGCTTC
		R: CGATCTCAAATGCAAGCACTACCTG

Los productos de las PCRs fueron genotipificados en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología del INTA (Castelar, Argentina) con un secuenciador ABI 3130XL Genetic Analyser (Applied Biosystems). Utilizamos Peak Scanner™ software v1.0 (Applied Biosystems) para la asignación de los alelos.

4.2.3. Análisis de paternidad

Para cada especie, se ajustaron dos parámetros de un modelo que describe el número de parejas por hembra inseminada (α) y la proporción de descendientes del último macho en aparear con la hembra (β) (Jones & Clark 2003). El modelo supone que la densidad de probabilidad del número de parejas por hembra sigue una distribución de Poisson truncada (la posibilidad de cero parejas es eliminada) con α como

parámetro. Luego, a diferencia de la distribución de Poisson regular, el número medio de padres no es α , sino $\alpha/(1-\exp(-\alpha))$, y la probabilidad de encontrar más de un padre por camada es $1-\alpha/(\exp(\alpha)-1)$. El modelo también supone que después de que una hembra aparee con un macho, el siguiente macho en aparear con ella desplaza una fracción β del esperma ya almacenado en la hembra, de modo que el último macho da cuenta de una proporción β de la descendencia. Este supuesto está basado en un fenómeno conocido como prioridad o precedencia de esperma que es muy común en el género *Drosophila* e implica que el último macho logra fecundar la mayoría de los huevos. La estimación de los parámetros fue realizada con el software SCARE (disponible en http://www.massey.ac.nz/~mbjones/research/content_local/scare.html). Este programa implementa una Cadena de Markov de Monte Carlo (MCMC, por sus siglas en inglés) para generar 10000 muestras de la distribución posterior conjunta de ambos parámetros. De estas muestras simuladas, computamos los valores medios de α y β , sus correspondientes intervalos de credibilidad al 90%, la proporción esperada de hembras inseminadas por múltiples machos y el número esperado de padres por camada.

4.3. Resultados

En la [tabla 4.2](#) se muestran las estimaciones de la heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He) para cada locus. Las mismas fueron calculadas a partir de los genotipos de 20 hembras de *D. buzzatii* y 14 de *D. koepferae*, todas inseminadas y colectadas en la naturaleza. La He de los cuatro loci amplificados en ambas especies fue mayor en *D. buzzatii*. No obstante, el poder discriminatorio (PD) del conjunto de loci microsatélite no difirió apreciablemente entre *D. buzzatii* (PD = 1.00) y *D. koepferae* (PD = 1.00) debido a que en *D. koepferae* utilizamos un locus adicional que no amplificó en *D. buzzatii*. Ninguno de los loci mostró discrepancias significativas de la heterocigosidad observada respecto de las frecuencias genotípicas esperadas para una población en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 4.2. Variabilidad de los microsatélites encontrada entre las madres capturadas en la naturaleza. Se muestra, para cada locus y por especie, la heterocigosidad observada (Ho) y la esperada (He), y los p-valores para la hipótesis nula de que las poblaciones están en equilibrio Hardy-Weinberg (función *HWE.test* del paquete *genetics* del programa R (Warnes *et al.*, 2012)).

Locus	<i>D. buzzatii</i>			<i>D. koepferae</i>		
	Ho	He	p-valor	Ho	He	p-valor
B65	0,75	0,85	1,00	0,07	0,13	0,07
K60	-	-	-	0,48	0,53	0,65
K72	0,65	0,74	1,00	0,86	0,72	1,00
K75	1,00	0,90	1,00	0,57	0,53	1,00
K76	0,95	0,90	1,00	0,64	0,60	1,00

La inspección de los genotipos multilocus de las madres colectadas en la naturaleza y de sus progenies, mostró que *D. buzzatii* y *D. koepferae* presentan patrones de apareamiento marcadamente diferentes. El 95% (19/20) de las camadas de *D. buzzatii* tuvo al menos dos padres diferentes (presentaron más de dos alelos no maternos en alguno de los locus) y el 40% (8/20) tuvo al menos tres padres diferentes (presentaron más de cuatro alelos no maternos). En *D. koepferae*, en cambio, sólo el 36% (5/14) de las camadas tuvo al menos dos padres diferentes y en ninguna podemos asegurar que hubo al menos tres padres diferentes. En la [tabla 9.2](#) (material suplementario) se muestran los genotipos multilocus de cada individuo analizado.

El análisis de paternidad con SCARE reveló que entre las hembras inseminadas y colectadas en la naturaleza la incidencia de paternidad múltiple fue significativamente mayor en *D. buzzatii* que en *D. koepferae*. El valor promedio de α fue 3,46 con un intervalo de credibilidad al 90% de 2,70 - 4,31 en *D. buzzatii*. En consecuencia, de acuerdo al modelo implementado, la proporción esperada de hembras de *D. buzzatii* inseminadas por más de un macho fue 0,89, y el número medio de padres 3,57. En *D. koepferae*, el valor promedio de α fue 1,53 con un intervalo de credibilidad al 90% de 0,89 - 2,29. Luego, la proporción esperada de hembras inseminadas por múltiples machos fue 0,58, y el número medio de padres 1,95. En la [figura 4.1A, B](#) se muestran los histogramas obtenidos a partir de 10000 muestras de α para ambas especies.

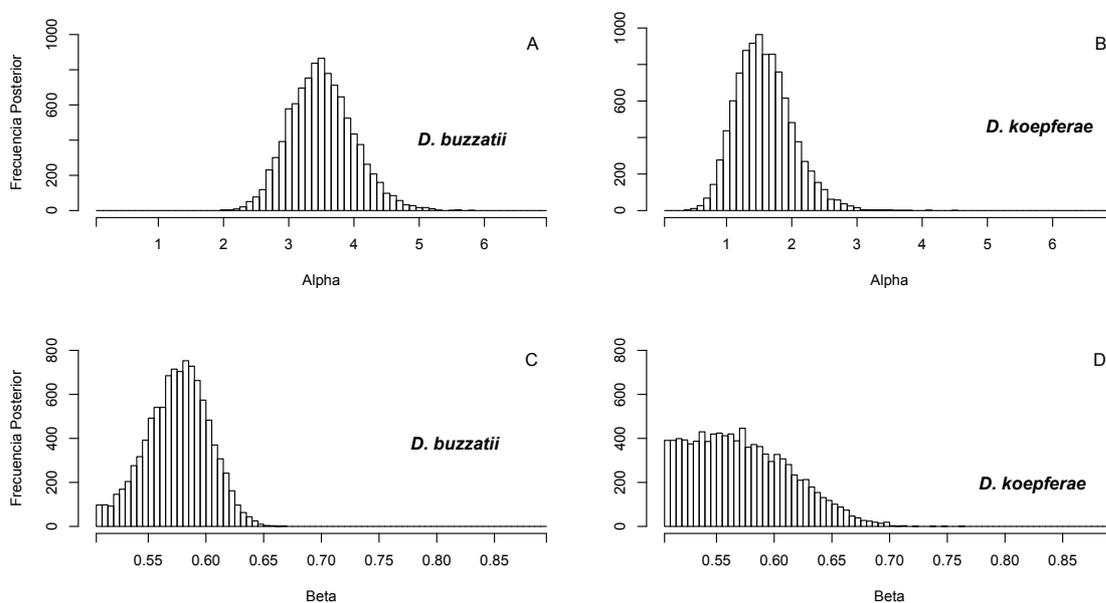


Figura 4.1. Histogramas de la distribución posterior de α (A, B) y β (C, D) para *D. buzzatii* (panel izquierdo) y *D. koepferae* (panel derecho). Los gráficos están basados en 10000 muestras obtenidas de la distribución posterior conjunta de ambos parámetros, mediante Cadenas de Markov de Monte Carlo.

Las estimaciones de β indicaron que la prioridad o precedencia de espermatozoides del último macho en hembras inseminadas en la naturaleza fue muy similar en ambas especies. La proporción esperada de la progenie prolijada por el último macho fue 0,57 con un intervalo de credibilidad al 90% de 0,52-0,61 en *D. buzzatii*, y 0,57 con un intervalo de credibilidad al 90% de 0,51-0,64 en *D. koepferae* ([Fig. 4.1C, D](#)).

4.4. Referencias

Bundgaard J, Barker JSF, Frydenberg J, Clark AG (2004) Remating and sperm displacement in a natural population of *Drosophila buzzatii* inferred from mother–offspring analysis of microsatellite loci. *Journal of Evolutionary Biology*, **17**, 376–381.

Frentiu FD, Chenoweth SF (2008) Polyandry and paternity skew in natural and experimental populations of *Drosophila serrata*. *Molecular Ecology*, **17**(6), 1589–1596.

Good JM, Ross Charles L, Markow TA (2006) Multiple paternity in wild-caught *Drosophila mojavensis*. *Molecular Ecology*, **15**, 2253–2260.

Hamilton MB, Pincus EL, Di Fiore A, Fleischer RC (1999) Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques*, **3**, 500–507.

Harshman L, Clark AG (1998) Inference of sperm competition from broods of field-caught *Drosophila*. *Evolution*, **52**, 1334–1341.

Imhof M, Harr B, Brem G, Schlötterer C (1998) Multiple mating in wild *Drosophila melanogaster* revisited by microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, **7**, 915–917.

Jones B, Clark AG (2003) Bayesian sperm competition estimates. *Genetics*, **163**, 1193–1199.

Schlötterer C, Reiss M, Schneider A, Imhof M (2005) Similar mating and sperm displacement patterns in two highly divergent *D. simulans* populations in Africa and Europe. *Molecular Ecology*, **14**, 1511–1515.

Warnes G, with contributions from Gorjanc G, Leisch F, Man M (2012) Genetics: Population Genetics. R package (version 1.3.8). <http://CRAN.R-project.org/package=genetics>.

CAPÍTULO 5

Órganos de almacenamiento de esperma

El riesgo de competencia espermática dentro de los órganos de almacenamiento de esperma de las hembras del género *Drosophila*, está fuertemente determinado por la Frecuencia con que las Hembras Re-aparean (FHR) y cargan así sus reservas de esperma. Pero ¿qué determina FHR? Probablemente la cantidad de esperma que las hembras pueden almacenar y la que los machos transfieren durante la cópula den cuenta de FHR. Si la cantidad de esperma transferido por cópula fuera menor que la cantidad de esperma que las hembras son capaces de almacenar, sería necesario que las hembras re-aparean para colmar sus órganos de almacenamiento y así minimizar la posibilidad de quedarse sin reservas de esperma. Entonces, cuanto mayor fuera el número de eyaculados necesarios para colmar la cantidad de esperma que las hembras son capaces de almacenar, mayor sería FHR. Llamamos a esta hipótesis “la hipótesis del almacén siempre lleno”. Dado que *D. buzzatii* mostró mayor FHR que *D. koepferae*, en este capítulo pusimos a prueba “la hipótesis del almacén siempre lleno” explorando en ambas especies la capacidad de almacenamiento de esperma y la cantidad de esperma almacenado por cópula. Si bien, debido a dificultades metodológicas, no conseguimos cuantificar el esperma transferido o almacenado por cópula, descubrimos que en estas especies el esperma es almacenado exclusivamente en el receptáculo seminal. Además, desde el punto de vista morfológico, no encontramos diferencias en el tamaño de los órganos de almacenamiento de esperma entre *D. buzzatii* y *D. koepferae*. Por tanto, argüimos que la capacidad de almacenamiento de esperma en estas especies no difiere y no explica las grandes diferencias interespecíficas halladas respecto a FHR.

5.1. Introducción

Como mencionamos en el primer capítulo, las hembras del género *Drosophila* pueden almacenar grandes cantidades de esperma en un órgano tubular y alargado llamado receptáculo seminal y, en algunas especies, además en un par de órganos esféricos llamados espermatecas (Fowler, 1973; Pitnick *et al.*, 1999). También establecimos que el riesgo de que espermas provenientes de diferentes machos compitan (por el acceso a los óvulos) dentro del receptáculo seminal o de las espermatecas de una misma hembra queda principalmente definido por dos variables: la Frecuencia con que las Hembras Re-aparean (FHR) y la Velocidad a la que Consumen (usan o desperdician) el Esperma almacenado (VCE).

Pero ¿cuáles son los factores que determinan FHR y VCE? Por un lado, están los determinantes ecológicos o ambientales y por el otro los determinantes intrínsecos de la especie. Entre los determinantes ecológicos de las moscas del género *Drosophila* podemos destacar la disponibilidad espacial y temporal de los recursos. Las oportunidades de apareamiento y oviposición, que afectan directamente a FHR y a VCE, respectivamente, obedecen a la facilidad con la que los individuos encuentran fuentes de alimento, ya que las moscas suelen aparear y oviponer sobre los mismos sustratos que utilizan para alimentarse (Markow & O'Grady, 2008). Entre los factores intrínsecos que determinan FHR y VCE también se encuentran variables que afectan directamente las oportunidades de apareamiento u oviposición. Por ejemplo, la capacidad que poseen las moscas de encontrar recursos. Pero además encontramos innumerables variables que afectan FHR o VCE una vez que las moscas están sobre un recurso adecuado para aparear y oviponer. Por ejemplo, cuando una hembra inseminada encuentra un sustrato adecuado para oviponer, el tiempo necesario para liberar del ovario y luego fecundar en el útero a un óvulo maduro puede afectar a VCE. Por otra parte, la cantidad de esperma que las hembras son capaces de almacenar y la cantidad de esperma que los machos transfieren durante la cópula podrían ser determinantes clave de FHR. Veamos por qué: si la cantidad de esperma que los machos transfieren a las hembras por cópula fuera menor que la cantidad de esperma que las hembras son capaces de almacenar, sólo las hembras que re-aparean lograrían colmar sus órganos de almacenamiento. De esta manera, el re-apareamiento proporcionaría a las hembras un mecanismo para minimizar la posibilidad de quedarse sin reservas de esperma. En tal caso, cuanto

mayor fuera la diferencia entre la cantidad de esperma que las hembras pueden almacenar y la cantidad de esperma que transfieren los machos por cópula, más frecuentemente deberían re-aparear las hembras para mantener colmadas sus reservas. Llamemos a esta hipótesis “la hipótesis del almacén siempre lleno”. Si esta hipótesis fuera cierta, la cantidad de esperma que las hembras pueden almacenar y/o la cantidad de esperma que los machos transfieren durante la cópula darían cuenta de la variación interespecífica de FHR. Aquellas especies con mayores FHR exhibirían mayor capacidad de almacenar esperma por parte de las hembras o bien sus machos transferirían menor cantidad de esperma durante la cópula.

Los resultados del [capítulo 2](#) revelaron que las hembras de *D. buzzatii* recuperan la receptividad sexual 14 veces más rápidamente y re-aparean más frecuentemente que las hembras de *D. koepferae*. Por tanto, en estas especies, es posible poner a prueba “la hipótesis del almacén siempre lleno”: cuanto mayor es el número de eyaculados necesarios para colmar la cantidad de esperma que las hembras son capaces de almacenar, mayor es FHR. Según esta hipótesis, las hembras de *D. buzzatii*, la especie que exhibe mayor FHR, serían capaces de almacenar esperma de un mayor número de eyaculados, ya sea debido a una mayor capacidad de las hembras en almacenar esperma o debido a un menor número de espermatozoides transferidos por cópula. Miller & Pitnick (2003) hallaron, en *D. melanogaster*, que las hembras con receptáculos seminales más largos almacenan mayor número de espermatozoides. Por tanto, si las hembras de *D. buzzatii* fueran más capaces de almacenar esperma que las de *D. koepferae*, sería esperable que la longitud de los receptáculos seminales fuera mayor en *D. buzzatii*. Alternativamente (de no haber diferencias interespecíficas en la capacidad de almacenar esperma), “la hipótesis del almacén siempre lleno” también predice que el número de espermatozoides transferidos por cópula a los órganos de almacenamiento sería menor en *D. buzzatii*. El objetivo de este capítulo fue poner a prueba esta hipótesis explorando, en *D. buzzatii* y *D. koepferae*, la morfología de los órganos de almacenamiento de esperma (tamaño del receptáculo seminal y las espermatecas) y cuantificando los espermatozoides transferidos y almacenados por cópula. En estos experimentos utilizamos las mismas isolíneas (descritas en la [sección 2.2.1](#)) que en los ensayos de re-apareamiento y uso de esperma.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Morfología del receptáculo seminal y las espermatecas

Por cada aislónea, se extrajeron con pinzas entomológicas de disección los tractos reproductivos de 25 hembras que fueron previamente anestesiadas con dióxido de carbono. Durante la disección de cada individuo, que consistió en tironear cuidadosamente del órgano ovipositor hasta desprender el tracto reproductivo y liberarlo del resto del cuerpo, el oviducto se rompe dejando a los ovarios dentro de la cavidad abdominal de la hembra. El resto del tracto reproductivo de cada hembra (vulva, útero, glándulas accesorias, espermatecas, receptáculo seminal y parte del oviducto (Fig. 3.1)), fue montado sobre un portaobjetos en PBS (pH = 7,2). Se eligieron aleatoriamente 10 tractos para medir la longitud del receptáculo seminal y los 15 restantes para medir el tamaño de una de las espermatecas. Durante el montaje de los 10 tractos elegidos para medir el tamaño del receptáculo seminal, el receptáculo fue cuidadosamente desenrollado y extendido con la ayuda de pinzas entomológicas finas que permitieron cortar el tejido conectivo que mantiene al órgano contraído. Durante el montaje de los 15 tractos elegidos para medir el tamaño de una de las espermatecas sólo fue preciso acomodar y descubrir alguna de las espermatecas para que sus límites queden expuestos y pueda cuantificarse su tamaño. Todos los preparados fueron cubiertos con un cubreobjetos y fotografiados a 400X con una cámara adosada a un microscopio binocular. Debido a la longitud de los receptáculos seminales extendidos, cada uno de estos órganos requirió 3-5 fotografías concatenadas para capturar toda su extensión (Fig. 5.1).

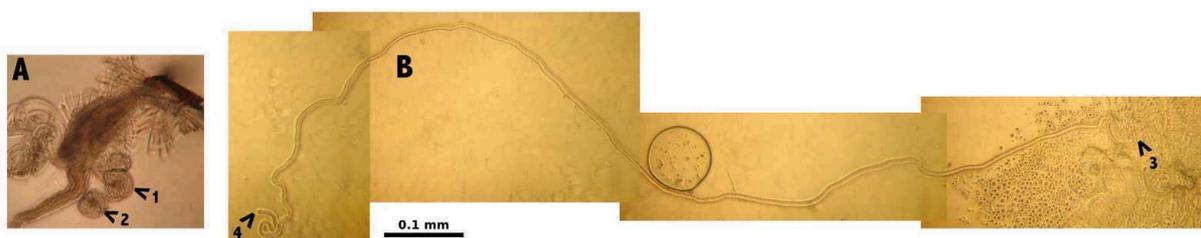


Figura 5.1. Ejemplos de las imágenes obtenidas por fotografía digital a 400X a partir de las cuales se estimaron los tamaños de (A) las espermatecas o (B) el receptáculo seminal en *D. buzzatii* y *D. koepferae*. Las flechas 1 y 2 señalan las dos espermatecas mientras que las flechas 3 y 4 señalan los extremos del receptáculo seminal.

A partir de las imágenes digitales, se estimaron los tamaños de los órganos de almacenamiento. Como estimador del tamaño del receptáculo seminal, se determinó su longitud total, en tanto que como estimador del tamaño de las espermatecas se midió el área que ocupa la imagen de una de ellas. Estas mediciones fueron obtenidas con la ayuda del programa ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004).

Para evaluar si el tamaño del receptáculo seminal o de las espermatecas difiere entre las especies, se aplicó, por cada variable respuesta, un procedimiento de máxima verosimilitud restringida (REML, por sus siglas en inglés) para ajustar un modelo lineal de efectos mixtos utilizando R (función *lme* del paquete *nlme* (Pinheiro *et al.*, 2012)). El modelo incluyó a la Especie como un factor fijo categórico, y a la Isolínea como un factor aleatorio categórico anidado en Especie.

5.2.2. Cuantificación del esperma almacenado por cópula

La capacidad de almacenamiento de esperma del receptáculo seminal y de las espermatecas fue determinada en múltiples hembras de cada isolínea. Para explorar el almacenamiento de esperma primero fue preciso conseguir que hembras vírgenes aparean. Para esto, múltiples hembras vírgenes de 5 días de edad se colocaron individualmente junto a dos machos vírgenes de 5 días de edad en un tubo de 3 cm³ conteniendo medio de cría, desde las 8 am hasta que ocurriera la cópula ([Fig. 2.2](#)). Inmediatamente luego de la cópula, cada hembra fue aspirada suavemente y liberada individualmente en un tubo con medio fresco de cría hasta el momento de la disección.

Seis horas tras la inseminación, cada hembra fue anestesiada en dióxido de carbono y su tracto reproductivo fue extraído sobre un portaobjetos según se describe en el primer párrafo de la [sección 5.2.2](#). Inmediatamente, cada muestra fue tratada unos minutos en detergente Tritón para permeabilizar las membranas celulares. Luego el tejido fue fijado en solución de Carnoy y lavado con PBS. Se utilizó DAPI para teñir los núcleos de los espermatozoides almacenados. Finalmente, cada muestra fue lavada con PBS y cubierta con un cubreobjetos.

Los preparados fueron explorados a 400X en un microscopio de fluorescencia para cuantificar el esperma almacenado.

Otro grupo de hembras (8-12 por isolínea) inseminadas por uno o dos machos (no se controló el número de apareamientos) fue utilizado para observar los

espermatozoides vivos inmediatamente tras la disección. Para ello, se exploraron al microscopio, a las 6-24 h desde la inseminación, los tractos reproductivos que no fueron fijados ni teñidos tras su disección.

5.3. Resultados

5.3.1. Morfología del receptáculo seminal y las espermatecas

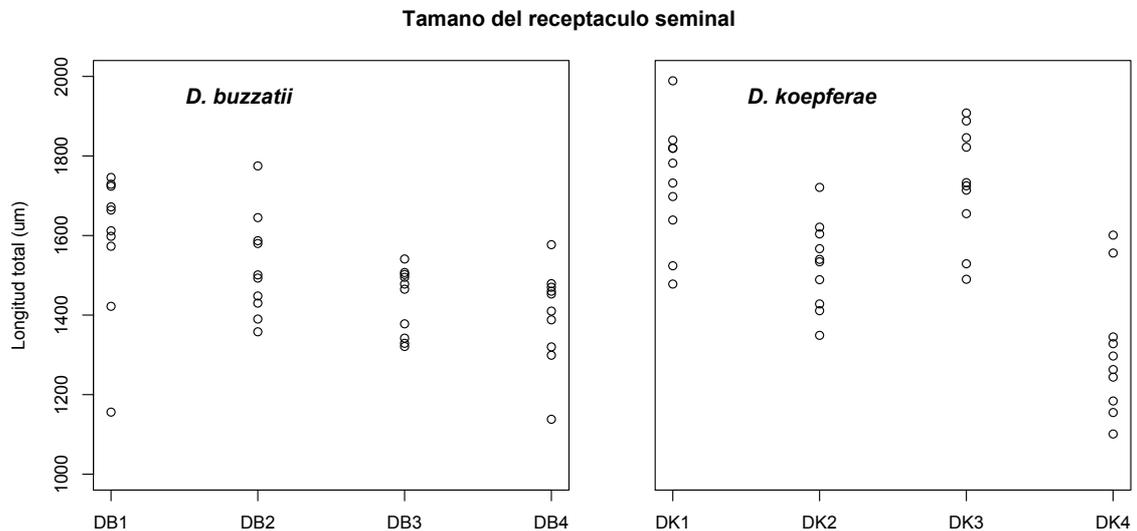


Figura 5.2. Variación en el tamaño del receptáculo seminal entre las aislíneas de *D. buzzatii* (izquierda) y *D. koepferae* (derecha). Cada punto representa la longitud del receptáculo seminal estimada a partir de la imagen digital del tracto reproductivo de una hembra.

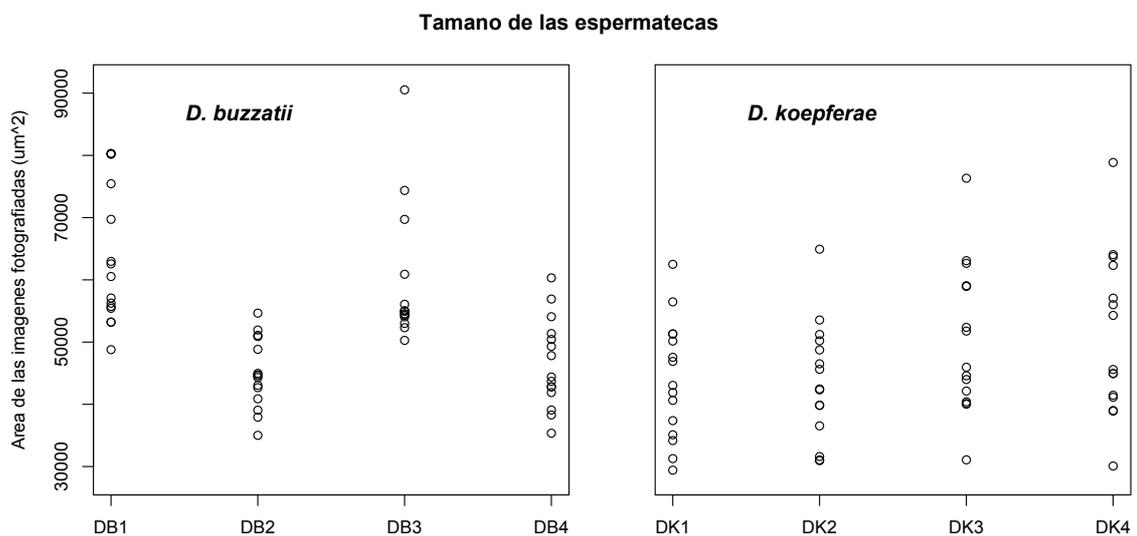


Figura 5.3. Variación en el tamaño de espermatecas entre las aislíneas de *D. buzzatii* (izquierda) y *D. koepferae* (derecha). Cada punto representa el área de una de las espermatecas de la imagen digital del tracto reproductivo de una hembra.

No se encontraron diferencias interespecíficas de tamaño del receptáculo seminal ($F(6, 1) = 0,64$, p-valor = 0,455) ni de las espermatecas ($F(6, 1) = 1,66$, p-valor = 0,245). En las [figuras 5.2](#) y [5.3](#) se muestran las estimaciones realizadas en ambos órganos.

5.3.2. Cuantificación del esperma almacenado por cópula

A pesar de implementar diversos tipos de modificaciones al protocolo de fijación y tinción de los espermatozoides almacenados, no se consiguió visualizar sus núcleos en ninguna de las aislíneas de *D. buzzatii* o *D. koepferae* (aunque si se observaron en los tractos reproductivos de ejemplares de *D. melanogaster*). Por tanto, no fue posible determinar la cantidad de espermatozoides almacenados. El receptáculo seminal de *D. buzzatii* o *D. koepferae* es notoriamente más ancho y su contorno posee más células que el de *D. melanogaster*. Probablemente la señal de fluorescencia del DAPI proveniente de las células del tracto reproductivo de las hembras de *D. buzzatii* o *D. koepferae* sea tan fuerte que tape la señal de los núcleos de los espermatozoides.

Si bien en los preparados fijados no se logró contabilizar el esperma almacenado, en los preparados vivos, el movimiento de las colas de los espermatozoides hizo posible detectar su presencia (aunque no cuantificarla). La exploración de estos preparados reveló que en *D. buzzatii* y en *D. koepferae* el esperma es almacenado exclusivamente en el receptáculo seminal. En todas las muestras analizadas se observaron espermatozoides vivos en el receptáculo seminal mientras que en ninguna de las ocho aislíneas se registró la presencia de espermatozoides en las espermatecas.

5.4. Referencias

Abramoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ (2004) Image processing with ImageJ, Igitur Archief, Utrecht Publishing and Archiving Service.

Fowler GL (1973) Some aspects of the reproductive biology of *Drosophila*: sperm transfer, sperm storage, and sperm utilization. *Advances in Genetics*, **17**, 293-360.

Markow TA, O'Grady PM (2008) Reproductive Ecology of *Drosophila*. *Functional Ecology*, **22**, 747–759.

Miller G T, Pitnick S (2003) Functional significance of seminal receptacle length in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology*, **16**, 114-126.

Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, the R Development Core Team (2012) Nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-104. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

Pitnick S, Markow T, Spicer GS (1999) Evolution of multiple kinds of female sperm-storage organs in *Drosophila*. *Evolution*, **53**, 1804-1822.

CAPÍTULO 6

Costo reproductivo de la competencia espermática

La competencia espermática (CE) implica que algunos espermatozoides no consiguen fecundar un óvulo a causa de la presencia de esperma rival. Por este motivo, cuando ocurre CE el éxito reproductivo de alguno de los machos rivales se ve reducido. La paternidad múltiple no necesariamente provoca un costo reproductivo a los múltiples padres involucrados, por lo que no es suficiente para garantizar la ocurrencia de CE. Por tanto, para estimar la intensidad de la CE, no basta con estudiar la incidencia de paternidad múltiple, sino que además es necesario estudiar las consecuencias reproductivas de tal fenómeno. En el [capítulo 4](#) confirmamos la incidencia de paternidad múltiple en *D. buzzatii* y en *D. koepferae* y descubrimos que la mayor parte de las hembras inseminadas en la naturaleza almacenan esperma de más de un macho. En este capítulo, investigamos el costo reproductivo que la CE impone sobre los machos de *D. buzzatii* y *D. koepferae*. Para ello, medimos cómo se reduce la fertilidad de un macho cuando la hembra re-aparea con un segundo macho. Encontramos que el re-apareamiento de las hembras provoca una reducción de la capacidad reproductiva de los machos en ambas especies. Sin embargo, el costo relativo de la CE fue notablemente mayor para los machos de *D. buzzatii*. En promedio, cuando una hembra apareó con un segundo macho, la fertilidad del primer macho se redujo 71,4% en *D. buzzatii* y sólo 33.3% en *D. koepferae*.

6.1. Introducción

Supongamos que, en una determinada especie, las hembras, que tienen la capacidad de almacenar esperma en el receptáculo seminal, suelen re-aparear con nuevas parejas antes de agotar sus reservas de esperma. ¿Podríamos asegurar que ocurre competencia espermática (CE)? La respuesta es no. Porque podría ocurrir que tanto el espacio disponible para el almacenamiento de esperma como el número de óvulos sean suficiente para los espermatozoides de todos los machos que inseminan a la misma hembra. En tal caso, no esperaríamos competencia alguna porque no habría ningún recurso escaso por el que competir. De modo que la cantidad de óvulos que fertilizaría el esperma de un macho que insemina a una hembra no variaría con el número de parejas de esa hembra. O sea que no podríamos asegurar que en esa supuesta especie ocurre CE. En otras palabras, la paternidad múltiple no necesariamente implica un costo reproductivo para los múltiples padres involucrados.

Pero si ocurriera CE está claro que algunos espermatozoides no conseguirían fecundar un óvulo a causa de la presencia del esperma rival, y entonces el éxito reproductivo de alguno de los machos rivales se vería reducido. Luego, la paternidad múltiple no garantiza la CE a menos que el número de huevos fertilizados por el esperma de un padre se vea reducido por la presencia del esperma de otro padre (Simmons, 2001). Por tanto, para estimar la intensidad de la CE como fuerza selectiva y promotora de evolución adaptativa, no basta con estudiar la incidencia de paternidad múltiple, sino que además es necesario estudiar las consecuencias reproductivas de tal fenómeno.

En muchos animales, y particularmente en todas las especies del género *Drosophila* en las que se ha estudiado la precedencia o prioridad de esperma, la mayor parte de la progenie de hembras inseminadas por dos machos es prohijada por el segundo macho (Smith, 1984; Birkhead & Møller, 1992; Simmons & Siva-Jothy, 1998). Por ejemplo, en *D. melanogaster* el segundo macho consigue fertilizar cerca del 80% del total de óvulos que son fertilizados (Gromko *et al.*, 1984). Aunque los mecanismos de este fenómeno son aún objeto de estudio (Manier *et al.*, 2010; Yeh *et al.*, 2012; Lüpold *et al.*, 2012), se ha observado que el último macho en copular con una hembra no virgen puede desplazar e incapacitar el esperma previamente almacenado de otros machos y reducir así la capacidad reproductiva de sus rivales (Price *et al.*, 1999). Por ello, las

consecuencias de la CE en *Drosophila* pueden encontrarse en la reducción de la capacidad reproductiva del primer macho cuando la hembra copula con un segundo macho.

En el [capítulo 4](#) confirmamos la incidencia de paternidad múltiple en *D. buzzatii* y en *D. koepferae*. De acuerdo a las probabilidades proyectadas en nuestro análisis, el porcentaje de hembras inseminadas en la naturaleza que almacenan esperma de más de un macho es 89% en *D. buzzatii* y 58% en *D. koepferae*. En este capítulo, investigamos las consecuencias de la CE en la capacidad reproductiva de los machos, en ambas especies. Para ello, medimos cómo se reduce la fertilidad de un macho cuando la hembra re-aparea con un segundo macho. Nuestra estrategia fue la siguiente. Primero, se estimó el porcentaje de la progenie prohibada por el primer y el segundo padre en hembras doblemente inseminadas (P1 y P2, respectivamente) y la fecundidad de hembras doblemente inseminadas (F2). Luego, la fertilidad del primer macho pudo ser calculada como $P1 \times F2$ para, finalmente, ser comparada con la fertilidad de los machos cuando las hembras no re-aparearon con otros machos (i.e. sin CE). Utilizamos para estos ensayos las mismas isóneas (descriptas en la [sección 2.2.1](#)) que utilizamos en los ensayos de re-apareamiento y uso de esperma, y en la descripción de la morfología de los órganos de almacenamiento de esperma.

6.2. Materiales y métodos

6.2.1. Fecundidad de hembras inseminadas por un macho

Estimamos la capacidad reproductiva de hembras inseminadas por un macho (F1), que es también la capacidad reproductiva del macho en ausencia de CE, utilizando los datos obtenidos en los análisis de velocidad de consumo del esperma almacenado descritos detalladamente en la [sección 3.2.2](#). En esos ensayos se determinó, por isólnea, el número de huevos fértiles que una hembra inseminada por un macho deposita por día hasta que consume la totalidad del esperma almacenado. Consideramos que las cópulas de las hembras que no produjeron progenie fueron estériles, por lo cual dichas hembras fueron excluidas del análisis.

6.2.2. Fecundidad de hembras inseminadas por dos machos

Se colocaron en forma individual varias hembras vírgenes de 5 días de edad junto a dos machos vírgenes de 5 días de edad (primeros machos) en un tubo de 3 cm³ conteniendo medio de cría, desde las 8 am ([Fig. 2.2](#)). Luego de la cópula, los machos de cada tubo fueron reemplazados por otros dos machos vírgenes de 5 días de edad (segundos machos). Inmediatamente después de la segunda cópula, cada hembra fue gentilmente aspirada y liberada individualmente en un tubo adosado a una cámara de huevos que fue reemplazada diariamente durante ocho días. Una gran proporción de hembras no re-apareó dentro de los 90 min desde las 8 am (lo cual, en base a la reducción de la receptividad sexual de las hembras recientemente inseminadas que observamos en el [capítulo 2](#), no nos sorprendió) y fueron descartadas. Se obtuvieron, por isólnea 9-12 hembras doblemente inseminadas. Como un indicador de la fecundidad de las hembras inseminadas por dos machos (F2) se empleó el número total de larvas de primer estadio observadas en las cámaras de huevos que fueron ofrecidas a cada hembra durante los ocho días del ensayo (en la [sección 3.2.1](#) explicamos la estrecha relación entre la variable medida y la fecundidad). Consideramos que las cópulas de las hembras que no produjeron progenie fueron estériles, por lo cual dichas hembras fueron excluidas del análisis.

6.2.3. Prioridad de esperma

Estudiamos la prioridad o precedencia de esperma midiendo P1 y P2 en hembras inseminadas por dos machos. Las mismas se obtuvieron del modo en que se obtuvieron las hembras de los ensayos de fecundidad (ver la [sección 6.2.2](#)). En este caso, sin embargo, utilizamos primeros y segundos machos provenientes de diferentes aislamientos ya que cada aislamiento era homocigoto para un rearrreglo cromosómico distintivo (para mayor detalle ver la [sección 2.2.1](#)) que fue utilizado como marcador citogenético. En estos experimentos, se emplearon dos pares de aislamientos por especie: DB1-DB2 y DB3-DB4; DK1-DK2 y DK3-DK4. Por cada par de aislamientos, se midió la prioridad de esperma en las dos posibles combinaciones de primeros y segundos machos y con hembras de ambas aislamientos, es decir, en las cuatro posibles combinaciones de genotipos de machos y hembras. Por ejemplo, para el par DB1-DB2, se utilizaron, en algunos ensayos, hembras y primeros machos de la aislamiento DB1, en otros, hembras de la aislamiento DB1 y primeros machos de la aislamiento DB2, en otros, hembras de la aislamiento DB2 y primeros machos de la aislamiento DB1 y, en otros, hembras y primeros machos de la aislamiento DB2. Por cada una de estas combinaciones, se determinó P2 en 4-11 (6 en promedio) hembras mediante genotipificación citológica de 7-20 (10 en promedio) larvas de tercer estadio de la progenie de cada hembra.

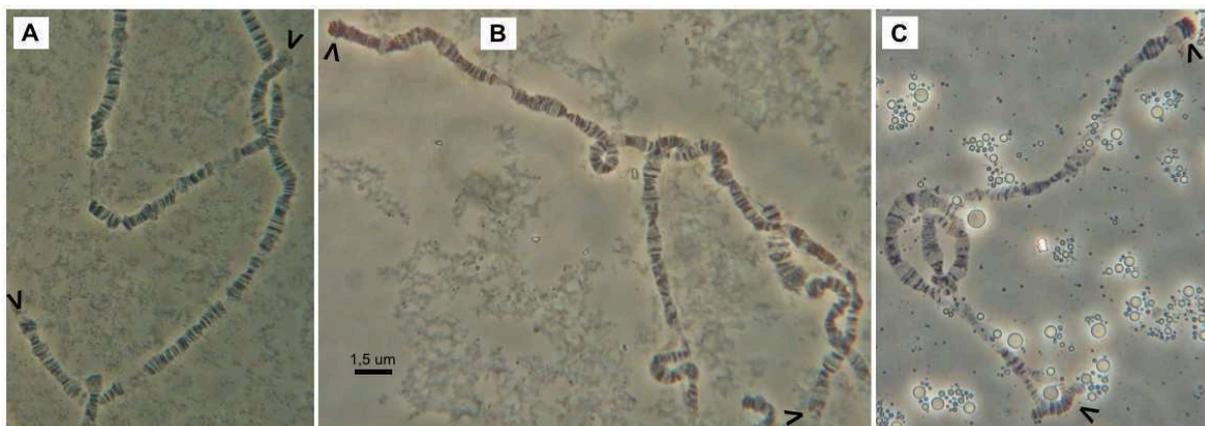


Figura 6.1. Cromosoma 2 politénico de larvas de (A) *D. buzzatii* y (B, C) *D. koepferae*. Genotipo de (A): j/j, (B): l^9m^9/l^9m^9 y (C): l^9m^9/k^9 (ver la [figura 2.1](#) para una descripción de cada rearrreglo). La presencia de rulos de inversión en (C) indica el genotipo heterocigótico del ejemplar.

La caracterización citogenética fue realizada mediante la inspección de los cromosomas politénicos de las glándulas salivales. La [figura 6.1](#) ilustra la asignación del

genotipo en 3 individuos. Los preparados de los cromosomas fueron obtenidos siguiendo la metodología de Fontdevila *et al.* (1981) y observados al microscopio a 400X.

6.2.4. Análisis estadísticos

Para evaluar si la fecundidad de las hembras difiere entre *D. buzzatii* y *D. koepferae* o si se ve incrementada con el número de padres, se implementó un procedimiento de máxima verosimilitud restringida (REML, por sus siglas en inglés) con el que se ajustó un modelo de efectos mixtos en R (función *lmer* del paquete *lme4* (Bates *et al.*, 2011)). El modelo incluyó a la Especie (*D. buzzatii* o *D. koepferae*) y al número de padres (1 o 2) como factores categóricos fijos, a la interacción entre la Especie y el número de padres y a la isolínea (1, 2, 3 o 4) como un factor aleatorio anidado en la Especie. Los p-valores fueron computados en R mediante simulaciones MCMC aplicando la función *pvals.fnc* del paquete *languageR* (Baayen, 2011).

Para evaluar si estas especies exhiben diferentes patrones de precedencia de esperma, se analizó P2 implementando un modelo de regresión logística en R (función *lmer* (*link='logit'*) del paquete *lme4*) con la Especie como un factor categórico fijo y con el par de isolíneas (1-2 o 3-4) como un factor aleatorio anidado en la Especie. Para este análisis asumimos que P2 no varió entre ensayos que involucraron el mismo par de isolíneas. La validez de esta suposición se ve avalada por los resultados de análisis de regresión logística realizados para cada uno de los cuatro pares de isolíneas evaluadas. En efecto, estos análisis no mostraron evidencia de que la isolínea de origen de la hembra, la isolínea de origen del primer macho o la interacción entre ambos factores haya tenido algún efecto sobre P2/P1. El menor p-valor obtenido fue 0,32.

Finalmente, se computó por cada isolínea la reducción de la fertilidad de los machos causada por la CE como $F1 - P1 \times F2$. Donde F1 y F2 representa la fecundidad media de las hembras inseminadas por uno y dos machos, respectivamente, y P1 denota la proporción de la progenie prohijada por el primer macho en hembras doblemente inseminadas. Asumimos para estos cálculos que el cociente P2/P1 no varió entre las isolíneas de la misma especie. Además, decidimos dividir esta variable ($F1 - P1 \times F2$) por F1 con el objeto de obtener una estimación relativa del costo de la CE que sea independiente de la fecundidad. Por tanto, se realizó un ANOVA del costo relativo de la

CE en R (función *lm* del paquete *stats* (R Development Core Team, 2012)), con *Especie* como un factor categórico fijo, para testear si la capacidad reproductiva es igualmente reducida en *D. buzzatii* y *D. koepferae*.

6.3. Resultados

El análisis del tamaño medio de camada reveló que el número de padres afectó la fecundidad de las hembras en ambas especies. Las hembras inseminadas por dos machos produjeron en promedio 37,13 descendientes más que las hembras inseminadas por un solo macho (p-valor <0,001). Por otra parte, el tamaño medio de camada de *D. buzzatii* superó, aunque no significativamente, al de *D. koepferae* por 31,36 descendientes, en promedio (p-valor = 0,160). No se detectó interacción entre el factor Especie y el número de padres por camada (efecto estimado = 2,16, p-valor = 0,860). Además, la inclusión del término de interacción no incrementó significativamente la bondad de ajuste del modelo ($\chi^2(1) = 0,05$, p-valor = 0,830) y, por ende, fue excluido del mismo para el cómputo de los efectos principales. La [figura 6.2](#) muestra el tamaño medio de camada de hembras inseminadas por uno y dos machos, para ambas especies. El tamaño de camada de cada hembra se muestra en la [tabla 9.3](#) (material suplementario).

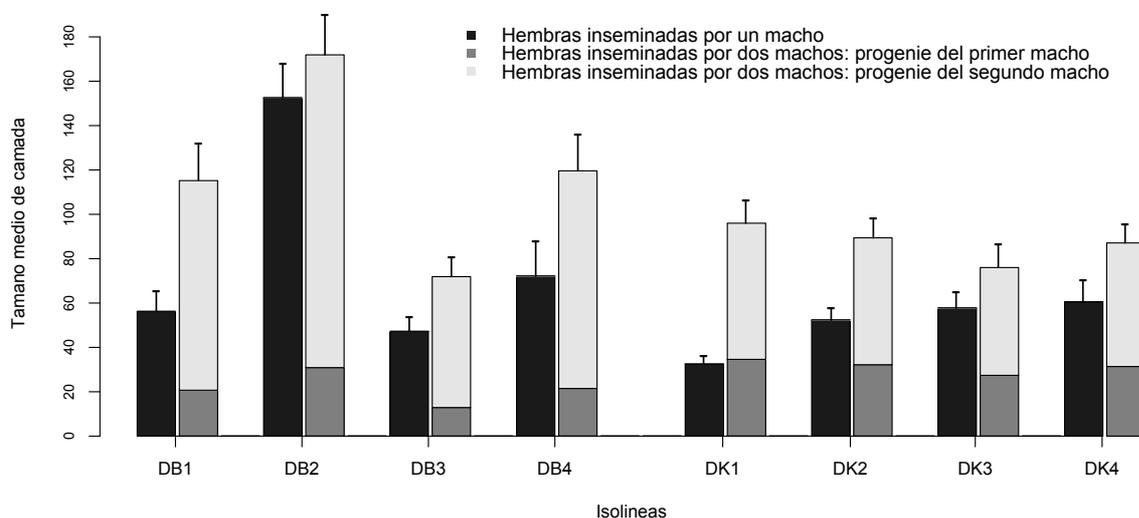


Figura 6.2. Capacidad reproductiva de hembras inseminadas por uno y dos machos en *D. buzzatii* y *D. koepferae*. Se muestra, por isolínea, el tamaño medio de camada con su error estándar, calculado a partir de la progenie producida por 6-20 hembras. En cada isolínea, la barra de la izquierda representa a las hembras inseminadas por un macho y la de la derecha a las inseminadas por dos machos. La porción inferior y superior de las barras de la derecha distinguen a la progenie esperada del primer y segundo macho, respectivamente, asumiendo que el cociente P2/P1 no difiere entre isolíneas de la misma especie.

Tabla 6.1. Proporción media de la progenie prohijada por el último macho (P2) en *D. buzzatii* y *D. koepferae*. Los resultados (incluyendo P2 medio y el número observado de descendientes (N)) están separados por la isolínea de origen de la hembra (IH), la isolínea de origen del primer macho (IPM) y la isolínea de origen del segundo macho (ISM).

<i>D. buzzatii</i>					<i>D. koepferae</i>				
IH	IPM	ISM	N	P2	IH	IPM	ISM	N	P2
DB1	DB1	DB2	53	0,85	DK1	DK1	DK2	120	0,57
DB2	DB1	DB2	54	0,80	DK2	DK1	DK2	65	0,83
DB1	DB2	DB1	59	0,86	DK1	DK2	DK1	135	0,49
DB2	DB2	DB1	57	0,84	DK2	DK2	DK1	80	0,84
DB3	DB3	DB4	70	0,89	DK3	DK3	DK4	43	0,65
DB4	DB3	DB4	47	0,66	DK4	DK3	DK4	28	0,71
DB3	DB4	DB3	59	0,78	DK3	DK4	DK3	42	0,67
DB4	DB4	DB3	48	0,81	DK4	DK4	DK3	26	0,54
Total			447	0,82	Total			539	0,64

Tabla 6.2. Capacidad reproductiva de los machos de *D. buzzatii* y *D. koepferae* en presencia y en ausencia de la CE. Se muestran, por isolínea, los valores medios de las fecundidades de hembras inseminadas por un macho (F1) y de hembras inseminadas por dos machos (F2), como también los valores calculados de la capacidad reproductiva del primer macho y cuánto se reduce la misma por causa de la CE.

Especie	Isolínea	Capacidad reproductiva de los machos sin CE	Capacidad reproductiva de las hembras inseminadas por dos machos	Capacidad reproductiva del primer macho en hembras inseminadas por dos machos	Costo relativo de la CE sobre la capacidad reproductiva del primer macho
		F1	F2	P1×F2	(F1 - P1×F2)/F1
<i>D. buzz.</i>	DB1	56,20	115,17	20,73	0,63
	DB2	152,55	163,91	29,50	0,80
	DB3	47,17	71,90	12,94	0,73
	DB4	72,68	119,58	21,52	0,70
<i>D. koep.</i>	DK1	32,56	96,00	34,56	-0,06
	DK2	52,31	89,36	32,17	0,39
	DK3	57,67	76,00	27,36	0,53
	DK4	60,58	87,10	31,36	0,48

En la [tabla 6.1](#) se muestra la proporción media de la progenie prohijada por el segundo macho (P2) en *D. buzzatii* y *D. koepferae*. Aunque se observó cierta variación

intraespecífica de P2 ([Tabla 6.1](#)), nuestros resultados muestran que la precedencia de esperma difirió entre las especies. En efecto, el análisis de regresión logística reveló que el cociente P2/P1 fue, en promedio, 2,5 veces mayor en *D. buzzatii* (efecto estimado = 0,91, p-valor < 0,001). En la [tabla 9.4](#) (material suplementario) se muestra, de la progenie analizada por camada, el número de descendientes de cada padre.

El número esperado de descendientes pro hijados por el primer macho en hembras doblemente inseminadas (P1×F2) fue menor que el tamaño de camada de las hembras inseminadas por un único macho en todas las aislíneas excepto en DK1 ([Fig. 6.2](#)), lo que indica que la capacidad reproductiva de los machos fue reducida a causa del re-apareamiento de las hembras en ambas especies. Sin embargo, el costo relativo de la CE $((F1 - P1 \times F2)/F1)$ dependió fuertemente de la especie (p-valor = 0,033). En promedio, cuando una hembra apareó con un segundo macho, la fertilidad del primer macho se redujo en un 71,4% en *D. buzzatii* y sólo un 33.3% en *D. koepferae* ([Tabla 6.2](#)).

6.4. Referencias

Baayen RH (2011) LanguageR: Data sets and functions with "Analyzing Linguistic Data: A practical introduction to statistics". R package (version 1.4). <http://CRAN.R-project.org/package=languageR>.

Bates D, Maechler M, Bolker B (2011) lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and Eigen. R package (version 0.999375-39). <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>.

Birkhead TR, Møller AP (1992) Sperm Competition in Birds. Academic Press, London.

Fontdevila A, Ruiz A, Alonso G, Ocará J (1981) The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. I. Natural chromosomal polymorphism in colonized populations of the Old World. *Evolution*, **35**, 148–157.

Gromko MH, Newport MEA, Kortier MG (1984) Sperm dependence of female receptivity to remating in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, **38**, 1273–1282.

Lüpold S, Manier MK, Berben KS, Smith KJ, Daley BD, Buckley SH, Belote JM, Pitnick S (2012) How multivariate ejaculate traits determine competitive fertilization success in *Drosophila melanogaster*. *Current Biology*, **22**, 1667–1672.

Manier MK, Belote JM, Berben KS, Novikov D, Stuart WT, Pitnick S (2010) Resolving mechanisms of competitive fertilization success in *Drosophila melanogaster*. *Science*, **328(5976)**, 354 – 357.

Price CSC, Dyer KA, Coyne JA (1999) Sperm competition between *Drosophila* males involves both displacement and incapacitation. *Nature*, **400**, 449–452.

R Development Core Team (2012) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

Simmons LW (2001) Sperm Competition and Its Evolutionary Consequences in The Insects. Princeton University Press, Princeton.

Simmons LW, Siva-Jothy MT (1998) Sperm competition in insects: mechanisms and the potential for selection. En: Birkhead T, Møller A, eds. Sexual Selection and Sperm Competition. Academic Press, San Diego.

Smith RL, ed. (1984) Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems. Academic Press, NY.

Yeh SD, Do T, Abbassi M, Ranz JM (2012) Functional relevance of the newly evolved sperm dynein intermediate chain multigene family in *Drosophila melanogaster* males. *Communicative and Integrative Biology*, **5(5)**, 462-465.

CAPÍTULO 7

Una especie más: *Drosophila antonietae*

En los capítulos previos, exploramos la intensidad de la competencia espermática (CE) como fuerza selectiva en dos especies del *cluster D. buzzatii*. Según nuestros resultados las hembras de *D. buzzatii* son más promiscuas que las de *D. koepferae*, consumen el esperma almacenado más lentamente y posibilitan así una CE más intensa que impone mayores costos reproductivos a los machos rivales. Frente a estos resultados tan contrastantes nos preguntamos cómo se comportan en general las moscas de este *cluster*: ¿como las de *D. buzzatii* o como las de *D. koepferae*? Para abordar esta cuestión y caracterizar al *cluster D. buzzatii* respecto a la intensidad de la CE, extendimos algunos de los experimentos realizados a una tercera especie del grupo, *D. antonietae*. Las moscas de esta especie se mostraron muy similares a las de *D. buzzatii* en todos los aspectos que evaluamos en este capítulo. Las hembras de *D. antonietae* exhibieron tasas de re-apareamiento elevadas, como las de *D. buzzatii* aunque consumieron el esperma almacenado más lentamente que cualquiera de las otras dos especies. Los análisis de incidencia de paternidad múltiple en la naturaleza revelaron que en promedio el número medio de padres por camada fue 3,47, muy similar al de *D. buzzatii* (3,57) y mayor al de *D. koepferae* (1,95). Por último, nuestras estimaciones del costo relativo que la CE impone a los machos rivales reflejaron que cuando una hembra aparea con un segundo macho, la fertilidad del primer macho se reduce, en promedio, 69%. Concluimos que la CE representa una fuerza selectiva intensa, en particular, en *D. antonietae* y, en general, en las moscas del *cluster D. buzzatii*.

7.1. Introducción

¿Qué tan común es, entre las especies sexuales, que las hembras sean suficientemente promiscuas como para posibilitar la competencia espermática (CE)? ¿En aquellas especies donde puede ocurrir, es la CE una fuerza selectiva intensa? ¿Varía la intensidad de la competencia espermática entre las especies? Estos interrogantes, qué constituyen la guía motivacional de esta tesis, son demasiado generales como para ser respondidas estudiando un par de especies. Cuantas más especies estudiemos mayor será el alcance de las conclusiones y más cerca estaremos de encontrar respuestas certeras. Por fortuna (o por causas que no viene al caso discutir aquí) no estamos solos en la empresa de responder estas preguntas, y las especies en las que se viene estudiando la selección sexual postcopulatoria son numerosas y diversas (Birkhead & Møller, 1998; Birkhead & Pizzari, 2002).

En los capítulos previos, exploramos la promiscuidad de las hembras y la intensidad de la CE en *D. buzzatii* y *D. koepferae*, dos especies del *cluster D. buzzatii* del grupo *repleta* del género *Drosophila*. Siendo optimistas, el alcance de nuestras conclusiones terminaría en el *cluster D. buzzatii*. Pero entonces surge la siguiente pregunta: ¿en general, cómo se comportan las moscas de este *cluster*, como las de *D. buzzatii* (cuyas hembras, según vimos en los capítulos previos, son muy promiscuas y posibilitan una CE intensa que impone altos costos reproductivos a los machos rivales) o como las de *D. koepferae* (donde encontramos que la incidencia de paternidad múltiple es menor y donde los pocos machos que comparten una hembra no padecen un costo reproductivo elevado)? Frente a resultados tan contrastantes decidimos extender algunos de los experimentos a una tercera especie del *cluster*, *D. antonietae*, como para poder caracterizar al *cluster D. buzzatii* respecto a la intensidad de la CE.

La [figura 1.3](#) muestra las relaciones filogenéticas entre *D. antonietae*, *D. buzzatii* y *D. koepferae* y entre estas especies respecto al resto del *cluster*. *D. antonietae*, como *D. buzzatii* y *D. koepferae*, también se alimenta y reproduce sobre cactus en descomposición, convive en simpatria con *D. buzzatii* en diversas regiones semiáridas de Argentina y Brasil, y en el laboratorio puede cruzarse fácilmente con *D. koepferae* y dejar descendencia parcialmente fértil. Además, es morfológicamente indistinguible de *D. buzzatii* o *D. koepferae* excepto por la forma del *aedeagus* ([Fig. 1.4](#)). *D. antonietae* es la única especie descrita del *cluster*, además de *D. buzzatii* y *D. koepferae*, que puede

encontrarse en territorio argentino ([Fig. 1.5](#)). Hasta la fecha, el sitio de captura más austral reportado para esta especie era Puerto Tirol, una localidad del sur de la provincia de Chaco (Tidon-Sklorz & Sene, 2001). Sin embargo, basándose en los requerimientos ecológicos descritos para esta especie y su asociación a la cuenca del río Paraná (Tidon-Sklorz & Sene, 2001), E. Hasson sospechó que era factible encontrarla más al sur, en la Isla Martín García. Realizamos una campaña exploratoria en 2012 que permitió confirmar la sospecha. Dada la cercanía entre la isla y la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, esto nos facilitó la recolección de los ejemplares necesarios para fundar las isóneas utilizadas en los ensayos del presente capítulo.

Los objetivos específicos del capítulo fueron: estudiar la Frecuencia con la que las Hembras Re-aparean (FHR), la Velocidad a la que Consumen el Esperma almacenado (VCE), la incidencia de paternidad múltiple en la naturaleza y el costo reproductivo de la CE, en cada caso retratando las metodologías empleadas con *D. buzzatii* y *D. koepferae*.

7.2. Materiales y métodos

7.2.1. Stocks de moscas

Se establecieron decenas de aislíneas de *D. antonietae* en el laboratorio a partir de la progenie de 43 hembras inseminadas en la naturaleza que fueron colectadas en la Isla Martín García (provincia de Buenos Aires, Argentina) en Febrero y Marzo de 2012. Se eligieron al azar tres aislíneas (DA1, DA2 y DA3) que se mantuvieron en el laboratorio y las aislíneas restantes fueron descartadas.

Para medir la prioridad o precedencia de esperma en hembras inseminadas por dos machos, y así poder estimar el costo que la CE impone sobre los machos rivales, nos interesaba contar con líneas homocigóticas para diferentes rearrreglos cromosómicos, pues son útiles marcadores citogenéticos para establecer paternidad en los experimentos de inseminación múltiple. Mediante la inspección de los cromosomas politénicos de las glándulas salivales de las larvas se investigaron, en las tres aislíneas, los polimorfismos cromosómicos para los rearrreglos estructurales (inversiones) de los cromosomas 2, 3, 4 y 5. Sin embargo, dentro de los plazos previstos para este trabajo, no se consiguió fijar, por selección, aislíneas homocigóticas para rearrreglos cromosómicos distintivos. Por este motivo, en *D. antonietae*, no se realizaron los ensayos de doble inseminación, como los practicados en *D. buzzatii* y *D. koepferae*, para determinar la prioridad o precedencia de esperma. Alternativamente, decidimos estimarla mediante inferencia bayesiana a partir de análisis genotípicos de paternidad múltiple con hembras inseminadas en la naturaleza que se explican en la [sección 7.2.5](#).

7.2.2. Promiscuidad de las hembras

Estudiamos la promiscuidad de las hembras midiendo, en cada aislínea, la propensión con la que las hembras re-aparean. Para ello, se siguió el protocolo empleado en el estudio de las aislíneas de *D. buzzatii* y *D. koepferae* ([sección 2.2.3](#)). En este caso, sin embargo, no se determinó la proporción de hembras cortejadas, pues no estábamos interesados en estudiar el atractivo de las hembras, y sólo se determinó la proporción de hembras del grupo virgen que aparearon y la proporción de hembras del grupo apareado que re-aparearon.

En cada isolínea los ensayos de re-apareamiento se realizaron a los siguientes Tiempos desde las 8 am (momento del primer apareamiento (T0)): 1,5, 3, 6, 12 y 24 h.

El protocolo experimental fue repetido dos veces por cada isolínea y cada Tiempo.

Se implementó un procedimiento REML para testear si el Tiempo afecta la propensión a (re)-aparear de las hembras. En este caso se utilizó un modelo lineal de efectos mixtos por especie y por Status en R (función *lme* del paquete *nlme*) que incluyó al Tiempo como una covariable y a la Isolínea como factor aleatorio categórico, previa transformación angular de las proporciones.

El diseño experimental nos permitió estimar la Razón entre la probabilidad de Re-apareamiento y la de Apareamiento (RRA) que definimos como la propensión a re-aparear del grupo apareado dividida por la propensión a aparear del grupo virgen de la misma edad. Consideramos a esta variable dependiente del Tiempo. Con el objeto de caracterizar el período refractario en cada isolínea, se estimó como su sucedáneo el tiempo requerido por las hembras apareadas para recuperar el 50% de su propensión a re-aparear luego del apareamiento. Llamamos a este tiempo R50. Estas estimaciones y sus intervalos de confianza se realizaron empleando el mismo procedimiento que para *D. buzzatii* y *D. koepferae* (para una descripción detallada ver la [sección 2.2.6](#)). En este caso, sin embargo, el Modelo Sigmoideo de dos parámetros (α y R50) resultó inadecuado o sobre-parametrizado para el set de datos de esta especie (resultados no mostrados). En su lugar utilizamos el siguiente modelo de RRA en función del Tiempo con R50 como único parámetro.

$$RRA = 1 / (1 + \exp (R50 - \text{Tiempo}))$$

Para evaluar si R50 difirió entre las isolíneas se realizó un análisis de desviación en R (función *anova* del paquete *stats*). Este análisis nos permitió comparar la incertidumbre de R50 suponiendo un único valor para las tres isolíneas con la incertidumbre de R50 obtenida sin hacer tal suposición.

Se realizaron comparaciones interespecíficas de la propensión de las hembras a (re)-aparear sólo a las 12 y 24 h desde T0 dado que los niveles del factor Tiempo del resto de los ensayos no fueron coincidentes entre las tres especies. Entonces, se exploró si la propensión a (re)-aparear difiere entre *D. antonietae*, *D. buzzatii* y *D. koepferae*

ajustando, para cada status sexual, un modelo lineal de efectos mixtos con Especie como un factor fijo categórico y con Isolínea, anidada en Especie, como un factor aleatorio categórico. La variable respuesta, proporción de hembras que aparearon por ensayo, fue angularmente transformada para estos análisis. Para generar los modelos utilizamos en R la función *lme* del paquete *nlme* (Pinheiro *et al.*, 2012) y para valorar la significancia del efecto de Especie la función *anova* del paquete *stats* (R Development Core Team, 2012). Además se comparó la proporción a (re)-aparear de *D. antonietae* con la de cada una de las otras dos especies mediante contrastes de Tukey en R (función *glht* del paquete *multcomp* (Hothorn *et al.*, 2008)).

7.2.3. Velocidad de consumo del esperma almacenado

El uso de esperma fue estudiado en cinco hembras por isolínea. Para conseguir las hembras inseminadas se empleó el mismo protocolo que el de los ensayos de fertilización en las isolíneas de *D. buzzatii* y *D. koepferae* (ver la [sección 3.2.1](#)).

Se calcularon los tiempos transcurridos hasta que las hembras utilizaron el 30, el 60 y el 90% de sus reservas de esperma. Estos cálculos se realizaron, a partir del número de huevos que son fertilizados por día, de la misma manera en la que se realizaron en *D. buzzatii* y *D. koepferae* (ver la [sección 3.2.2](#)).

Para evaluar si *D. antonietae*, *D. buzzatii* y *D. koepferae* difieren en la velocidad a la que las hembras usan las reservas de esperma para fertilizar sus huevos, examinamos la hipótesis nula de que las hembras inseminadas por un macho tardan, en las tres especies, el mismo tiempo en agotar una determinada proporción de su carga efectiva de esperma. Por tanto, establecimos como variable dependiente, por cada isolínea, el número de días transcurridos desde el apareamiento hasta que el número de huevos depositados por el grupo de hembras inseminadas excedió el 30%, el 60% y el 90% de su fecundidad total. Elegimos estos porcentajes porque el tiempo transcurrido desde la inseminación hasta la fertilización de huevos covarió linealmente con esos valores particulares. Realizamos un ANOVA de medidas repetidas en R (función *ezANOVA* del paquete *ez* (Lawrence, 2012)) con Especie (*D. antonietae*, *D. buzzatii* o *D. koepferae*) como un factor categórico fijo entre isolíneas y con la proporción de la fecundidad de las hembras (30%, 60% o 90%) como una covariable dentro de isolínea.

7.2.4. Paternidad múltiple en la naturaleza

Un total de 40 hembras fueron colectadas utilizando trampas con banana fermentada como cebo, en la Isla Martín García (provincia de Buenos Aires, Argentina) en Marzo de 2012. Las moscas colectadas fueron inmediatamente colocadas en tubos individuales con medio de cría, transferidas a nuevos tubos cada 48 h hasta que cesó la oviposición y finalmente preservadas en etanol absoluto a -20°C. Dieciséis hembras no produjeron descendencia tras dos semanas y fueron descartadas. Cuando comenzaron a emerger los descendientes de las hembras fértiles, las moscas emergentes fueron recuperadas cada 24 h, fijadas en etanol absoluto y conservadas a -20°C. La identificación de especie, que se realizó inspeccionando la morfología genital de uno de los descendientes adultos macho (dado que las hembras de ambas especies son morfológicamente indistinguibles), reveló que 18 de las hembras fértiles colectadas pertenecían a *D. antonietae* y seis a *D. buzzatii*.

De las hembras de *D. antonietae* preservadas en etanol que habían producido descendencia, se escogieron al azar 15 y 12-24 (21 en promedio) descendientes de cada camada (un total de 330 moscas) para genotipificar.

Se extrajo ADN de cada individuo utilizando el Kit de purificación de ADN Puregene (Gentra Systems) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante para moscas individuales. Se generaron genotipos multilocus utilizando cuatro loci microsatélites de repeticiones de dos nucleótidos: B55, K60, K72 y K75. Los microsatélites fueron desarrollados a partir de librerías genómicas siguiendo la metodología de Hamilton *et al.* (1999) con modificaciones menores. En un estudio reciente, no se encontraron desviaciones de las frecuencias genotípicas del equilibrio de Hardy-Weinberg ni evidencias de desequilibrio de ligamiento en ninguno de estos marcadores, los cuales tampoco están ligados entre sí (Lipko, 2013; Lipko & Hasson no publicado). Del par de *primers* utilizado para amplificar por PCR cada microsatélite, uno se marcó en su extremo 5'. Se utilizaron cuatro fluoróforos diferentes para el marcado con el fin de poder genotipificar todos los loci simultáneamente tras amplificarlos en una única PCR múltiple por muestra. Para las PCRs se usó Platinum Multiplex PCR Master Mix (Applied Biosystems). Las secuencias de los *primers* empleados en este trabajo se muestra en la [tabla 4.1](#).

Los productos de las PCRs fueron genotificados en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología del INTA (Castelar, Argentina) con un secuenciador ABI 3130XL Genetic Analyser (Applied Biosystems). Utilizamos Peak Scanner™ software v1.0 (Applied Biosystems) para la asignación de los alelos.

Se ajustaron dos parámetros de un modelo que describe el número de parejas por hembra inseminada (α) y la proporción de descendientes del último macho en aparear con la hembra (β) (Jones & Clark 2003). El modelo y las simulaciones que permitieron estimar estos parámetros están descritos en la [sección 4.2.3](#). De las muestras simuladas, computamos los valores medios de α y β , sus correspondientes intervalos de credibilidad al 90%, la proporción esperada de hembras inseminadas por múltiples machos y el número esperado de padres por camada.

7.2.5. Costo reproductivo de la competencia espermática

Para investigar las consecuencias de la CE en la capacidad reproductiva de los machos de *D. antonietae* no se contó con marcadores citogenéticos distintivos entre las isolíneas. Por tanto, no pudimos medir (como sí lo hicimos en *D. buzzatii* y *D. koepferae*) la proporción de la progenie prohijada por cada padre cuando la hembra re-aparea con un segundo macho. En este caso, se utilizó la estimación del parámetro β del modelo que se empleó para determinar la incidencia de paternidad múltiple en la naturaleza (para una explicación del modelo ver la [sección 4.2.3](#)). Suponiendo que (1) el desplazamiento de esperma no depende del número de machos con los que las hembras copulan, (2) que las hembras no consumen el esperma almacenado hasta que no copulan con el último macho y (3) que las hembras no tienden a consumir antes el esperma almacenado de un determinado macho que el de otro, β es un estimador insesgado de la proporción de la progenie prohijada por el segundo macho en hembras inseminadas por dos machos (P2). Por tanto, utilizando β como indicador de P2 y midiendo en cada isolínea la fecundidad media de cinco hembras doblemente inseminadas (F2), se calculó la fertilidad del primer macho como $(1 - \beta) \times F2$. Las hembras doblemente inseminadas de *D. antonietae* se obtuvieron de la misma manera que en los ensayos de fecundidad realizados en *D. buzzatii* y *D. koepferae*, descritos en la [sección 6.2.2](#). La capacidad reproductiva del primer macho se comparó con la fecundidad de hembras inseminadas por un único macho (F1), que es igual a fertilidad

de los machos cuando las hembras no re-aparean con otros machos (i.e. sin CE). Finalmente, se computó por cada isolínea la reducción de la fertilidad de los machos causada por la CE como $F1 - (1 - \beta) \times F2$. Donde $F1$ y $F2$ representa la fecundidad media de las hembras inseminadas por uno y dos machos, respectivamente, y $(1 - \beta)$ denota la proporción de la progenie prohiada por el primer macho en hembras doblemente inseminadas. Asumimos para estos cálculos que la proporción de la progenie prohiada por el primer macho en hembras doblemente inseminadas no depende de la isolínea. Además, se dividió esta variable $(F1 - (1 - \beta) \times F2)$ por $F1$ con el objeto de obtener una estimación relativa del costo de la CE que sea independiente de la fecundidad.

7.3. Resultados

7.3.1. Promiscuidad de las hembras

Las hembras de esta especie mostraron una recuperación muy rápida de la propensión a re-aparear. A partir de las 3 h transcurridas desde el primer apareamiento no se percibieron diferencias notables entre la propensión a re-aparear del grupo de hembras apareadas y la propensión a aparear del grupo de hembras vírgenes (Fig. 7.1). Sin embargo, a la hora y media del primer apareamiento, todas las aislneas mostraron una propensión al re-apareamiento ligeramente inferior en comparación con la propensión a aparear del grupo de hembras vírgenes (Fig. 7.1). No se detectaron efectos lineales del tiempo transcurrido desde T0 sobre la propensión al apareamiento en el grupo de hembras vírgenes ($F(26, 1) = 1,25$, p-valor = 0,273) o el de hembras apareadas ($F(26, 1) = 1,27$, p-valor = 0,271). Sin embargo, la figura 7.1 muestra que la propensión a re-aparear tiende a aumentar hasta las 3 o 6 h en el grupo de hembras apareadas. Por lo cual, aunque muy corto, las hembras de esta especie parecen exhibir un periodo refractario lábil.

La variación temporal de RRA se muestra en la figura 7.2A. Los análisis implementados revelaron que el grado de incertidumbre de la estimación de R50 no se redujo al suponer el mismo valor de R50 para las tres aislneas ($F(27, 2) = 0,41$, p-valor = 0,671), sugiriendo que el tiempo que las hembras necesitan, luego de aparear, para recuperar el 50% de su propensión a aparear (R50) no varía entre estas aislneas. De hecho, los intervalos de confianza al 95% de R50 se solaparon ampliamente entre las tres aislneas (Fig. 7.2B). Los análisis implementados revelaron que, en promedio entre las tres aislneas, el tiempo que las hembras necesitan, luego de aparear, para recuperar el 50% de su propensión a aparear (R50) fue de sólo 1,47 h. Entre todas las aislneas de las tres especies analizadas, las dos más rápidas en recuperar la propensión al re-apareamiento (cuya estimación de R50 fue menor) fueron DA2 y DA1 seguidas por DB4, DA3, DB1, DB2, DB3, DK1, DK4, DK3 y DK2, en ese orden (Tabla 7.1). Lo cual expone que, entre estas especies, el periodo refractario más corto probablemente sea el de las hembras de *D. antonietae*.

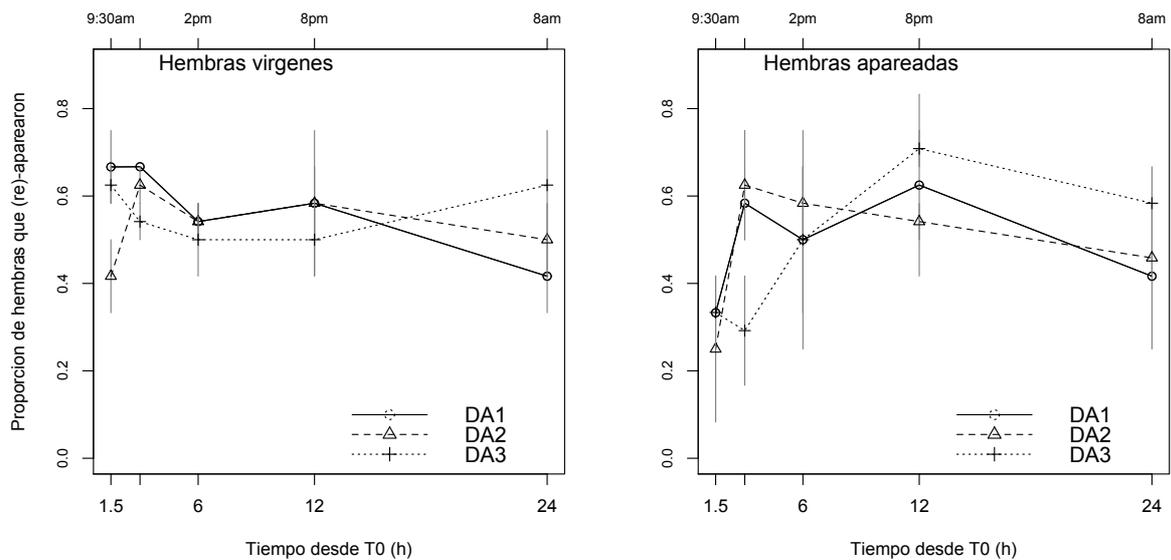


Figura 7.1. Variación temporal de la proporción de hembras vírgenes (izquierda) y apareadas (derecha) que accedieron a (re)-aparear en cada aislón de *D. antonietae*. Se exhiben los valores medios de la propensión a (re)-aparear con sus errores estándar. El eje horizontal representa el tiempo transcurrido desde el primer apareamiento del grupo de hembras apareadas (T0). También se incluye, sobre el eje horizontal superior, el momento del día en el que se realizaron los ensayos.

La proporción de hembras vírgenes que accedieron a aparear 12 o 24 h tras T0 difirió entre las especies ($F(8,2) = 6,12$, p -valor $< 0,05$). La de *D. antonietae* fue algo inferior a la de *D. buzzatii* (p -valor = 0,051) y a la de *D. koepferae* (p -valor $< 0,005$) (Tabla 7.1). Estas diferencias sugieren que frente a un encuentro entre machos y hembras *D. antonietae* muestra menor facilidad para copular, al menos en las condiciones experimentales. La proporción de hembras del grupo apareado que accedieron a re-aparear con un segundo macho 12 o 24 h tras T0 también difirió entre las especies ($F(8,2) = 89,29$, p -valor $< 0,0001$). En este caso, la de *D. antonietae* fue muy similar a la de *D. buzzatii* (p -valor = 0,469) pero muy superior a la de *D. koepferae* (p -valor $< 0,0001$) (Tabla 7.1).

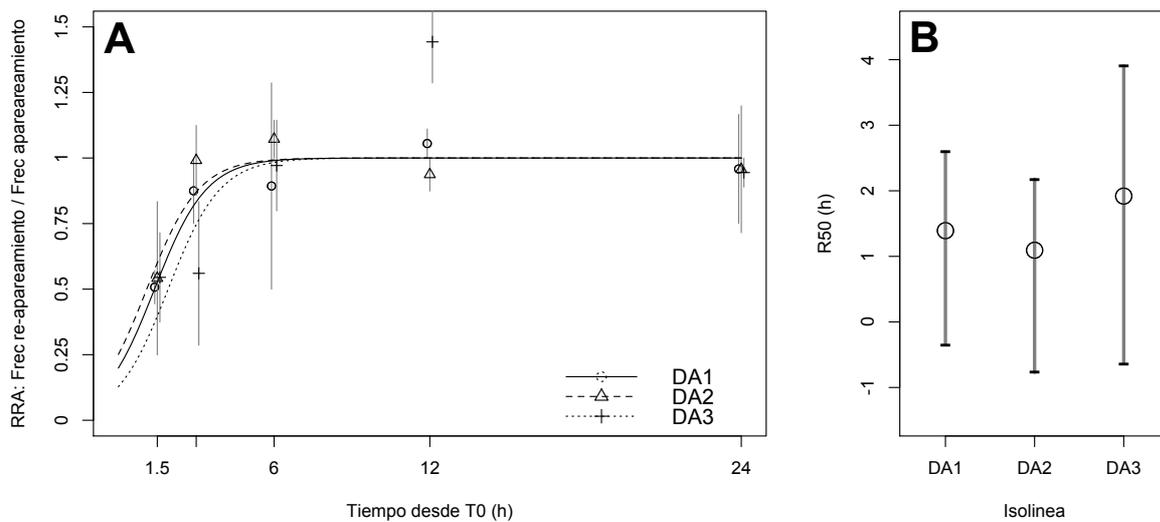


Figura 7.2. Duración del periodo refractario en *D. antonietae*. (A) Variación temporal de RRA en cada isolínea. Cada punto representa el valor medio acompañado por su error estándar. Se ajusta una curva a los datos de cada isolínea para ilustrar cómo las hembras inseminadas recuperan la propensión a aparear. **(B) Valores de R50 estimados en cada isolínea.** Se muestra el tiempo medio que las hembras inseminadas requieren para recuperar el 50% de su propensión a aparear (R50) con su intervalo de confianza al 95% para cada isolínea. Cada valor medio fue estimado como un parámetro del modelo no lineal implementado para describir la variación temporal de RRA.

Tabla 7.1. Propensión al (re)-apareamiento 12 o 24 h desde el momento del primer apareamiento del grupo de hembras apareadas (T0) y duración del periodo refractario (R50) en hembras de *D. antonietae*, *D. buzzatii* y *D. koepferae*.

Especie	Isolínea	Frecuencia de hembras que (re)-aparearon		R50	95% IC del R50
		Vírgenes	Apareadas		
<i>D. antonietae</i>	DA1	24/48 (50%)	25/48 (52%)	1,39	-0,35 – 2,59
	DA2	26/48 (54%)	24/48 (50%)	1,09	-0,77 – 2,18
	DA3	27/48 (56%)	31/48 (65%)	1,92	-0,64 – 3,90
<i>D. buzzatii</i>	DB1	49/72 (68%)	51/72 (71%)	2,26	1,65 – 2,80
	DB2	50/72 (69%)	46/72 (64%)	4,32	3,12 – 5,95
	DB3	52/72 (72%)	51/72 (71%)	5,65	4,36 – 7,91
	DB4	42/72 (58%)	35/72 (49%)	1,92	-1,87 – 3,22
<i>D. koepferae</i>	DK1	40/60 (67%)	3/60 (5%)	33,25	23,10 – 45,61
	DK2	42/60 (70%)	4/60 (7%)	62,42	52,26 – 71,74
	DK3	51/60 (85%)	1/60 (2%)	56,87	52,27 – 61,59
	DK4	43/60 (72%)	3/60 (5%)	46,13	33,84 – 55,78

7.3.2. Velocidad de consumo del esperma almacenado

En promedio, el tiempo requerido por las hembras inseminadas en consumir una dada proporción (30%, 60% o 90%) de su carga efectiva de esperma difirió entre las especies ($F(8,2) = 18,87$, p -valor $< 0,001$). En particular, las hembras inseminadas de *D. antonietae* son las que consumieron más lentamente sus reservas de esperma (Fig. 7.3B). La figura 7.3A y B muestra (en términos absolutos y relativos al número total de huevos fertilizados, respectivamente) el patrón temporal del uso de esperma para la fertilización en las tres aislneas de esta especie.

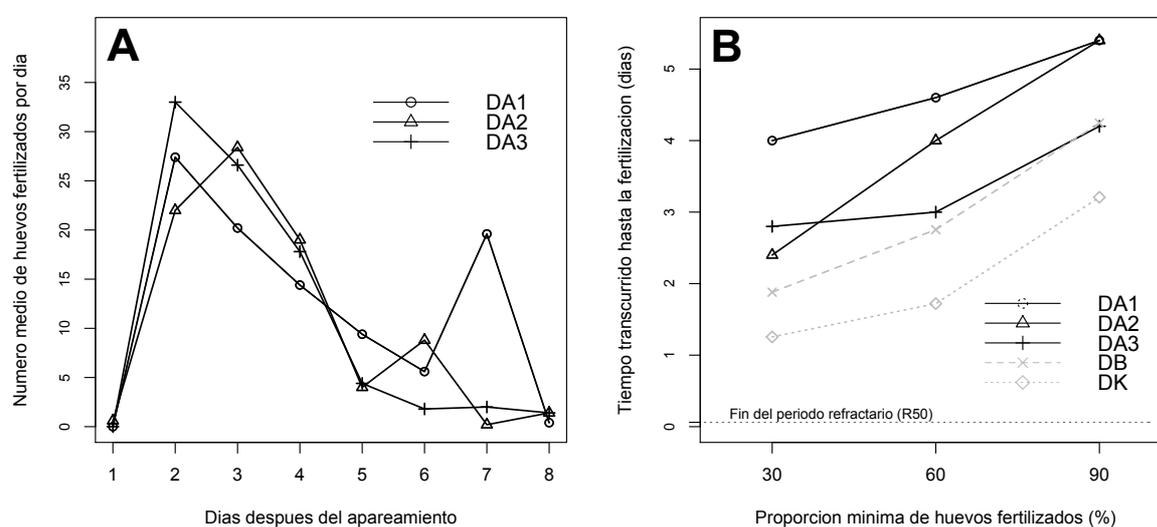


Figura 7.3. Patrón temporal del uso de esperma almacenado para la fertilización en *D. antonietae*. (A) Número medio de huevos fertilizados por día después del apareamiento. Los valores fueron obtenidos a partir de la fecundidad diaria total de grupos de 5 hembras inseminadas por cada aislnea. (B) Tiempo necesario para agotar un dada proporción de las reservas de esperma. Cada punto representa el tiempo que le tomó al grupo de hembras fertilizar, al menos, 30, 60 y 90% del número total de huevos fecundados. Los valores fueron calculados a partir de la fecundidad total de grupos de 5 hembras inseminadas por cada aislnea. En gris se muestran los valores promedio de las cuatro aislneas de *D. buzzatii* (DB) y de las cuatro aislneas de *D. koepferae* (DK). En línea discontinua también se exhibe la duración del período refractario de *D. antonietae*.

7.3.3. Paternidad múltiple en la naturaleza

La inspección de los genotipos multilocus de las madres colectadas en la naturaleza y de sus progenies, mostró que las hembras de *D. antonietae* son muy

promiscuas. El 93% (14/15) de las camadas no pudo tener menos de dos padres diferentes (presentaron más de dos alelos no maternos en algún locus) y el 20% (3/15) no pudo tener menos de tres padres diferentes (presentaron más de cuatro alelos no maternos).

El análisis de paternidad con SCARE reveló que entre las hembras inseminadas y colectadas en la naturaleza la incidencia de paternidad múltiple fue similar a la de *D. buzzatii* y, entonces, superior a la de *D. koepferae*. El valor promedio de α fue 3,35 con un intervalo de credibilidad al 90% de 2,29 – 4,62. En consecuencia, de acuerdo al modelo implementado, la proporción esperada de hembras inseminadas por más de un macho fue 0,88 y el número medio de padres 3,47. En la [figura 7.4A](#) se muestran los histogramas obtenidos a partir de 10000 muestras de α .

Las estimaciones de β indicaron que la prioridad o precedencia de esperma del último macho en hembras de *D. antonietae* inseminadas en la naturaleza fue mayor a la estimada con el mismo procedimiento en hembras de *D. buzzatii* y *D. koepferae*. La proporción esperada de la progenie prohijada por el último macho fue 0,72 con un intervalo de credibilidad al 90% de 0,67 – 0,77. ([Fig. 7.4B](#)).

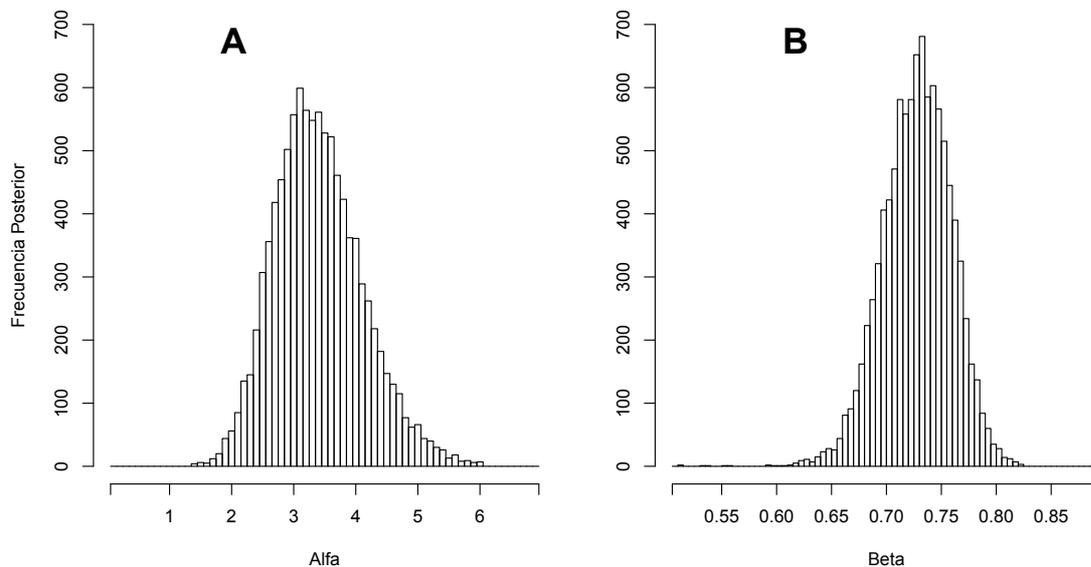


Figura 7.4. Histogramas de la distribución posterior de α (A) y β (B) para *D. antonietae*. Los gráficos están basados en 10000 muestras obtenidas de la distribución posterior conjunta de ambos parámetros, mediante Cadenas de Markov de Monte Carlo.

7.3.4. Costo reproductivo de la competencia espermática

El número esperado de descendientes prohijados por el primer macho en hembras doblemente inseminadas $((1 - \beta) \times F2)$ fue menor que el tamaño de camada de las hembras inseminadas por un único macho ($F1$) en las tres isolíneas (Fig. 7.5), lo que indica que la capacidad reproductiva de los machos fue reducida a causa del reapareamiento de las hembras. Nuestras estimaciones del costo relativo de la CE $(F1 - ((1 - \beta) \times F2)/F1)$, reflejan que cuando una hembra apareó con un segundo macho, la fertilidad del primer macho se redujo, en promedio, 64% en DA1, 70% en DA2 y 72% en DA3.

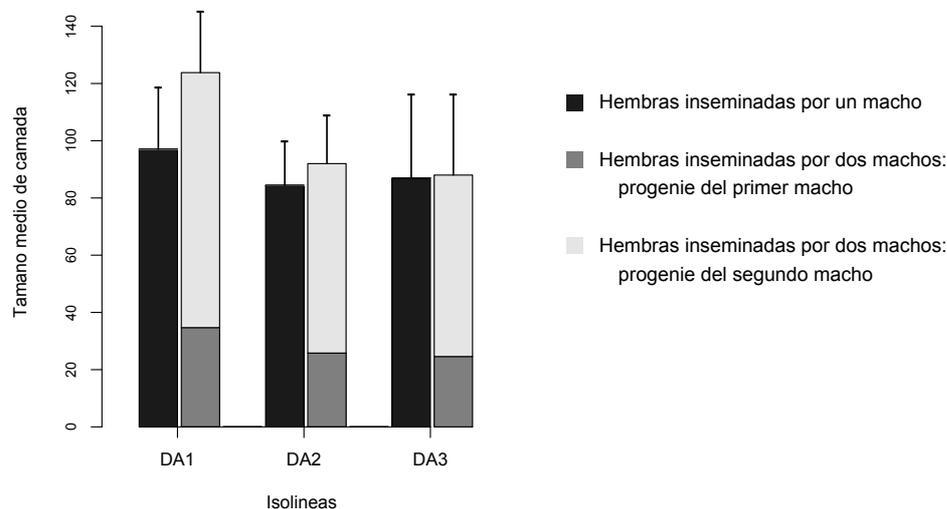


Figura 7.5. Capacidad reproductiva de hembras inseminadas por uno y dos machos en *D. antonietae*. Se muestra, por cada isolínea, el tamaño medio de camada con su error estándar, calculado a partir de la progenie producida por 5 hembras. En cada isolínea, la barra de la izquierda representa a las hembras inseminadas por un macho y la de la derecha a las hembras inseminadas por dos machos. La porción inferior y superior de las barras de la derecha distinguen a la progenie que se espera provenga del primer y segundo macho, respectivamente, asumiendo que la proporción de la progenie prohijada por el segundo macho ($P2$) no difiere entre las isolíneas y es igual al parámetro β (para una descripción de la relación entre $P2$ y β ver la [sección 7.2.5](#)).

7.4. Referencias

Birkhead TR, Møller AP, eds. (1998) Sperm Competition and Sexual Selection. Academic Press, London.

Birkhead TR, Pizzari T (2002) Postcopulatory sexual selection. *Nature Reviews Genetics*, **3**, 262–273.

Hamilton MB, Pincus EL, Di Fiore A, Fleischer RC (1999) Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques*, **3**, 500–507.

Hothorn T, Bretz F, Westfall P (2008) Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal*, **50(3)**, 346-363.

Jones B, Clark AG (2003) Bayesian sperm competition estimates. *Genetics*, **163**, 1193–1199.

Lawrence MA (2012) ez: Easy analysis and visualization of factorial experiments. R package (version 4.1-1). <http://CRAN.R-project.org/package=ez>.

Lipko P (2013) ¿Qué historias nos cuentan el ADN mitochondrial y los microsatellites sobre la estructura poblacional de *Drosophila koepferae* y sue especie Hermana *Drosophila buzzatii* en Argentina? Tesis doctoral, FCEN, UBA.

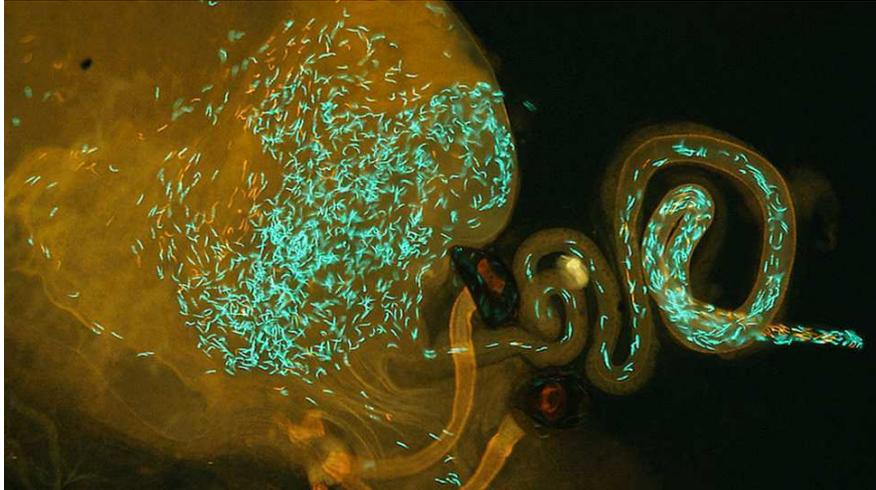
Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, the R Development Core Team (2012) nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-104. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

R Development Core Team (2012) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

Tidon-Sklorz R, Sene FM (2001) Two new species of the *Drosophila serido* sibling set (Diptera, Drosophilidae). *Iheringia (Série Zoologia)*, **90**, 141-146.

CAPÍTULO 8

Discusión general



Competencia espermática en acción. Los espermias de dos machos en el tracto reproductivo de una hembra de *D. simulans*. Los machos fueron genéticamente modificados para que sus espermatozoides puedan ser advertidos y distinguidos. Las cabezas de los espermatozoides de uno de los machos expresan proteína de fluorescencia verde y la del otro roja. Aquí se aprecian espermatozoides en el útero, en el receptáculo seminal y en las espermatecas. Imagen de Manier *et al.* (2013).

8.1. Integración e interpretación de resultados

8.1.1. Promiscuidad de las hembras y propensión al re-apareamiento

En el [capítulo 2](#) (en *D. buzzatii* y *D. koepferae*) y en el [capítulo 7](#) (en *D. antonietae*) estudiamos cuánto tarda una hembra, después de aparear, en recuperar el 50% de la propensión a re-aparear relativo a la propensión a aparear de una hembra virgen de la misma edad. Usamos para ello una variable compuesta que llamamos la Razón entre la probabilidad de Re-apareamiento y la de Apareamiento (RRA). Nuestros resultados mostraron que RRA aumenta en función del tiempo transcurrido desde el tiempo zero (T0), cuando el grupo de hembras apareadas apareó por primera vez. Dado que la propensión a aparear de las hembras vírgenes no cambió con el tiempo transcurrido desde T0 ([Figs. 2.4](#) y [7.1](#)), podemos concluir que el incremento de RRA ([Figs. 2.5](#) y [7.2A](#)) se debe solamente al aumento o recuperación de la propensión al re-apareamiento de las hembras apareadas.

Se podría argumentar que la recuperación de la propensión al re-apareamiento depende tanto de la recuperación del atractivo como de la receptividad de la hembra. Nuestros resultados indican, sin embargo, que al menos en *D. buzzatii* y *D. koepferae* el apareamiento no parece reducir el atractivo de las hembras, dado que la proporción de hembras cortejadas no se afectó por el estatus de las hembras (i.e. las hembras vírgenes y apareadas fueron igualmente cortejadas) ([Fig. 2.3](#)). Por tanto, a pesar de no haber evaluado directamente los cambios en la receptividad postapareamiento de las hembras, nuestros resultados sugieren que es la reducción de la receptividad la que da cuenta de la reducción observada en la propensión al re-apareamiento después del primer apareamiento. Curiosamente, se ha visto que las hembras de *D. melanogaster* sufren alteraciones fisiológicas y comportamentales dramáticas después del apareamiento, las cuales son inicialmente inducidas por las proteínas seminales de las glándulas accesorias (Acps) y luego persisten a causa de la presencia del esperma almacenado (Aigaki *et al.*, 1991; Chapman *et al.*, 2003; Wolfner, 2002). Por tanto, una explicación plausible para nuestras observaciones es que los espermatozoides transferidos durante la cópula y/o algún componente del líquido seminal, por ejemplo las Acps, modifican el estado fisiológico de las hembras provocando un efecto negativo sobre la receptividad.

En la especie modelo *D. melanogaster* se han estudiado las consecuencias de la cópula sobre diversos aspectos reproductivos. Por ejemplo, se ha visto que, en respuesta al apareamiento, las hembras disminuyen la producción de feromonas estimuladoras de cortejo y liberan feromonas inhibidoras de cortejo que conjuntamente declinan su *sex appeal* por varios días induciendo menor número de cortejos en presencia de machos (Tompkins, 1984). En este trabajo, no encontramos evidencias de tales efectos. Nuestros resultados muestran que el estatus de las hembras no afecta la proporción de hembras cortejadas por algún macho durante los ensayos. Sin embargo, como cada hembra fue colocada con dos machos en un tubo de 3 cm³, las condiciones impuestas durante los ensayos distan de las naturales. Por ejemplo, cualquier feromona saturaría la atmósfera mucho más fácilmente dentro de los tubos que en la naturaleza. Además, en los ensayos no permitimos la presencia de más de una hembra por tubo, en tanto que la presencia de hembras que actúan como potenciales “competidoras” es muy probable en la naturaleza. Por estas razones, aunque el estatus de las hembras no resultó un buen predictor de la proporción de hembras cortejadas, podrían existir componentes del atractivo de las hembras, no contemplados en nuestro estudio, que son alterados por el apareamiento. De todos modos, nuestros resultados sugieren que en *D. buzzatii* y *D. koepferae* existen algunos componentes del atractivo de las hembras que no se ven afectados por el apareamiento.

Aunque no encontramos evidencia de que el atractivo de las hembras depende del estatus sexual, observamos que depende del momento del día o de la edad. En *D. buzzatii*, el atractivo de las hembras cambió a lo largo del día durante las primeras 24 h luego de T0. De hecho, las hembras fueron más cortejadas cerca del amanecer (8 am) y del atardecer (8 pm) que en cualquier otro momento de los ensayos (Fig. 2.3). Es sabido que el ritmo circadiano de actividad locomotora tiene un pico cerca del amanecer y otro cerca del atardecer tanto en *D. melanogaster* (Klarsfeld *et al.*, 2003) como en *D. buzzatii* (Dahlgaard *et al.*, 2001). Entonces, teniendo en cuenta que el atractivo en esta última fue medido alrededor del mediodía (9:30 am - 2:00 pm) para los primeros tres puntos ensayados y a las 8 pm y am para los últimos dos puntos, el efecto positivo que observamos del tiempo sobre el atractivo de las hembras probablemente obedezca al ritmo circadiano de actividad locomotora.

El comportamiento de cortejo de los machos y la propensión al apareamiento de las hembras también exhiben ritmos circadianos en *D. melanogaster* (Hardeland, 1972;

Sakai & Ishida, 2001). Estos ritmos son gobernados por diferentes neuronas reloj (Grima *et al.*, 2004; Hamasaka *et al.*, 2010) cuyas neuronas homólogas del grupo *repleta* también podrían ser responsables de la relación encontrada entre el tiempo transcurrido desde T0 y el atractivo de las hembras durante las primeras 24 h en *D. buzzatii*. En *D. koepferae*, en cambio, evaluamos cómo cambia el atractivo de las hembras a lo largo de un periodo de cinco días tras T0. En este caso observamos un tenue incremento temporal del atractivo de las hembras (Fig. 2.3). Dado que todos los ensayos fueron realizados a las 8 am (con la excepción del primer punto que fue a las 8 pm), el efecto del tiempo sobre la proporción de hembras cortejadas no podría ser mediado por un efecto de ritmo circadiano. Luego, el efecto encontrado sugiere que las hembras de mayor edad son ligeramente más atractivas para los machos al menos en *D. koepferae*. En este sentido, un estudio reciente reveló que la composición de hidrocarburos cuticulares, que actúan como feromonas sexuales, depende de la edad en *D. melanogaster* (Kuo *et al.*, 2011). Los autores mostraron que los cambios relacionados con la edad en los perfiles de hidrocarburos cuticulares son responsables de una reducción significativa del atractivo sexual. Entonces, el patrón temporal del atractivo sexual exhibido por las hembras de *D. koepferae* podría atribuirse a cambios fisiológicos asociados a la edad o al envejecimiento, como la secreción de feromonas sexuales.

Como se esperaba, RRA aumentó con el tiempo transcurrido después de T0 hasta valores que rondan la unidad en todas las isolíneas (Figs. 2.5 y 7.2A). Esto indica que, eventualmente, la propensión de las hembras a re-aparear alcanza a la propensión al apareamiento de las hembras vírgenes a medida que se desvanecen los efectos del apareamiento sobre la receptividad, i.e. una vez que termina el periodo refractario. Para valorar la duración del periodo refractario estimamos el tiempo que necesitan las hembras apareadas de cada isolínea para recobrar el 50% de la propensión al apareamiento (R50) luego del primer apareamiento. Dado que el grado de certeza de la estimación de R50 fue significativamente menor cuando se supuso que todas las isolíneas de *D. buzzatii* o *D. koepferae* tenían el mismo valor, pudimos inferir que la variación de la duración del periodo refractario tiene base genética en ambas especies. De hecho encontramos dos pares de isolíneas en cada especie en los cuales los intervalos de confianza al 95% de R50 no se solaparon (Fig. 2.6). En *D. antonietae*, por el contrario, el hecho de suponer un único valor de R50 para las tres isolíneas estudiadas no modificó significativamente el grado de certeza de la estimación de R50 y los

intervalos de confianza se solaparon entre las tres isolíneas ([Fig. 7.2B](#)). Sin embargo, la falta de variación entre tres isolíneas particulares no puede ser interpretada como evidencia de falta de variación en esta especie.

Para investigar si la variación entre las Isolíneas Rápidas y Lentas de *D. buzzatii* y *D. koepferae* puede atribuirse al genotipo (isolínea de origen) del primer macho, del segundo macho o de la propia hembra, estimamos el efecto de la isolínea de cada una de estas moscas sobre R50. La isolínea de origen de la hembra dio cuenta de las diferencias entre las Isolíneas Rápida y Lenta en *D. buzzatii*, mientras que tanto la isolínea del primer macho como la de la hembra dieron cuenta del patrón en *D. koepferae* ([Tabla 2.1](#)). Estos hallazgos sugieren que el genotipo de las hembras afecta la latencia al re-apareamiento entre las isolíneas de ambas especies y que el genotipo del macho afecta su habilidad para retardar el re-apareamiento de las hembras con las que copula al menos entre las isolíneas de *D. koepferae*. Sin embargo, dado que las diferencias entre dos isolíneas puede depender del particular par de isolíneas elegidas, nuestros resultados no necesariamente son extrapolables al nivel de especie.

La contribución de los machos y las hembras a la variación genética de la duración del periodo refractario de las hembras ha sido evaluada en la exhaustivamente estudiada *D. melanogaster*. En esta especie, se estudiaron las bases genéticas de la duración del periodo refractario aplicando regímenes de selección artificial separadamente en las hembras, en los primeros machos y en los segundos machos en aparear con las hembras (Gromko & Newport, 1988). Los resultados mostraron una respuesta rápida sólo cuando la selección fue aplicada sobre las hembras. Lo cual sugiere que en *D. melanogaster*, y en coincidencia con los resultados obtenidos en esta tesis en *D. buzzatii*, el genotipo de las hembras, pero no el de los machos, contribuye a la varianza aditiva del carácter (Gromko & Newport, 1988).

Más allá de la variación intraespecífica observada en R50 detectamos diferencias interespecíficas conspicuas. La duración del periodo refractario resultó, en promedio, 33 y 14 veces más corta en *D. antonietae* (1,5 h) y *D. buzzatii* (3,5 h), respectivamente, que en *D. koepferae* (49,7 h). En base a estos resultados, predecimos una mayor promiscuidad y tasa de re-apareamiento en *D. antonietae* y *D. buzzatii* que en *D. koepferae*.

8.1.2. Patrón temporal del consumo del esperma almacenado

Las especies estudiadas consumieron el esperma almacenado, fertilizando sus óvulos, de manera diferente. En general, las hembras de *D. koepferae* fueron las que consumieron sus reservas más rápidamente, seguidas por las de *D. buzzatii* y las de *D. antonietae*, en ese orden. Ninguna de las hembras de *D. antonietae* utilizó esperma durante el primer día luego de la inseminación (Fig. 7.3A). En tanto que para muchas de las hembras de *D. buzzatii*, y para la mayoría de las hembras de *D. koepferae*, el primer día luego de la inseminación fue el día en que más gastaron sus reservas de esperma (Fig. 3.3). Al segundo día tras la inseminación, las hembras de *D. antonietae* consumieron cerca del 20% de sus reservas de esperma (Fig. 7.3), las de *D. buzzatii* alrededor del 30%, mientras que las de *D. koepferae* agotaron entre el 60 y el 90% de las mismas (Fig. 3.2). En conclusión, la menor Velocidad de Consumo de Esperma (VCE) exhibida por *D. antonietae* y *D. buzzatii* sugiere que el riesgo de CE es mayor en estas especies que en *D. koepferae*.

8.1.3. Riesgo de competencia espermática

Hasta aquí, nuestros resultados indican que la Frecuencia con que las Hembras Re-aparean (FHR) es mayor en *D. antonietae* y *D. buzzatii*, en tanto que VCE muestra una tendencia opuesta: *D. koepferae* consume más rápidamente sus reservas de esperma. Por tanto, podemos afirmar que la variación interespecífica en VCE o FHR apunta en la misma dirección señalando que el riesgo de CE debería ser mayor en *D. antonietae* y *D. buzzatii* que en *D. koepferae*. Entonces, las determinaciones de VCE y FHR arrojan la misma predicción: mayor incidencia de paternidad múltiple en *D. antonietae* y *D. buzzatii* que en *D. koepferae*. Luego, comparando la incidencia de paternidad múltiple entre las especies, no podemos decidir cuál, si VCE o FHE, es el principal determinante del riesgo de CE. De todos modos, los experimentos de incidencia de paternidad múltiple en la naturaleza confirmaron la predicción indicando que el número medio de padres por camada o la proporción de hembras inseminadas por más de un macho (y, por tanto, el riesgo de CE) es mayor en *D. antonietae* y *D. buzzatii* que en *D. koepferae*. Si consideramos la proporción media de huevos que fueron fertilizados al momento en que las hembras apareadas recuperaron su receptividad

sexual (R50), podemos calcular la carga efectiva de esperma que aún permanece almacenada en el tracto reproductivo de la hembras y es susceptible a la CE. Esta carga efectiva de esperma fue 100% en las tres isolíneas de *D. antonietae*, varió desde 57-84% (dependiendo de la isolínea) hasta 100% en *D. buzzatii* y desde 5-17% hasta 13-26% en *D. koepferae* (Fig. 8.1). Estos cálculos son compatibles con los resultados del estudio de paternidad obtenidos a partir del análisis genético de hembras inseminadas en la naturaleza y sus progenies. La proporción de estas camadas que no pudo tener menos de dos padres diferentes (presentaron más de dos alelos no maternos en algún locus) fue del 93% (14/15) en *D. antonietae*, del 95% (19/20) en *D. buzzatii* y del 36% (5/14) en *D. koepferae*. Por tanto, ambas variables juntas, VCE y FHR, podrían explicar la variación interespecífica de la incidencia de paternidad múltiple. No obstante, es importante considerar otros factores del sistema de apareamiento, no evaluados en este trabajo, que podrían explicar las diferencias interespecíficas, por ejemplo, la cantidad de espermatozoides transferidos por cópula.

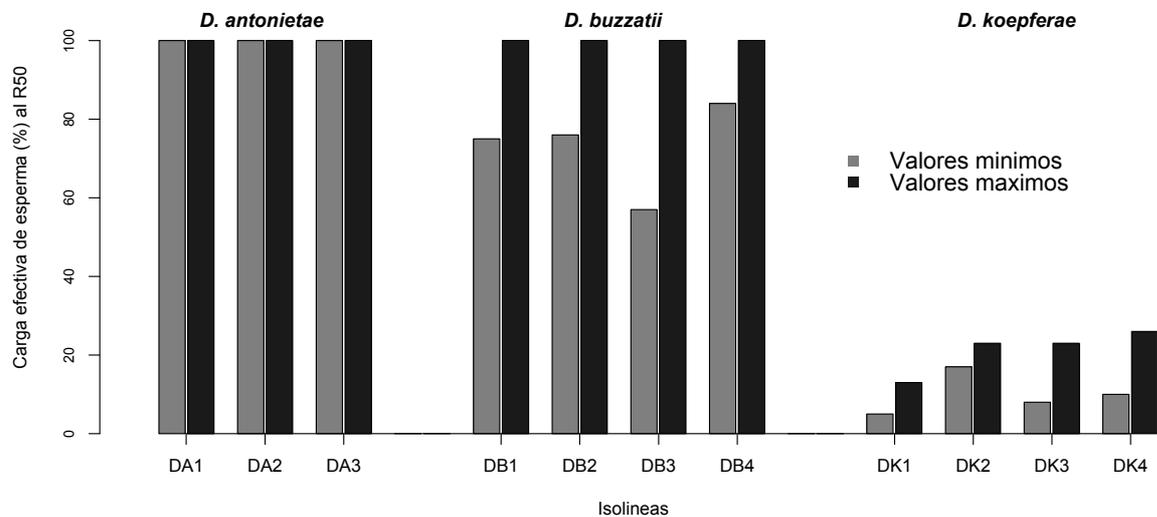


Figura 8.1. Porcentaje del esperma susceptible a la CE. En cada isolínea se muestra la carga efectiva de esperma aún almacenado por las hembras al momento que recuperan el 50% de la receptividad para re-aparear (R50). Los valores mínimos fueron calculados a partir del porcentaje medio de huevos aún por fertilizar al primer día anterior a R50. Los valores máximos fueron obtenidos a partir del porcentaje medio de huevos aún por fertilizar al primer día posterior a R50.

8.1.4. Órganos de almacenamiento de esperma

Dado que un prerrequisito de la CE es que la hembra re-aparee antes de agotar sus reservas de esperma, es de esperar que el riesgo de CE dependa de FHR en cualquier especie. De hecho, en las especies estudiadas en este trabajo FHR parece funcionar como predictor del riesgo de CE pues en *D. antonietae* y *D. buzzatii*, cuyo R50 fue mucho menor al de *D. koepferae*, lo que indica mayor FHR, observamos mayor incidencia de paternidad múltiple. Probablemente, entonces, el riesgo de CE esté fuertemente determinado por FHR. Pero, ¿qué determina FHR? ¿Acaso la cantidad de esperma que las hembras pueden almacenar y/o la cantidad de esperma que los machos transfieren durante la cópula pueden dar cuenta de FHR? Según la hipótesis que llamamos “la hipótesis del almacén siempre lleno”, cuanto mayor es el número de eyaculados necesarios para colmar la cantidad de esperma que las hembras son capaces de almacenar, mayor es FHR.

En el [capítulo 5](#) pusimos a prueba “la hipótesis del almacén siempre lleno” explorando la capacidad de almacenamiento de esperma en *D. buzzatii* (que mostró alta tasa de re-apareamiento) y *D. koepferae* (que mostró baja tasa de re-apareamiento). Descubrimos que el esperma es almacenado exclusivamente en el receptáculo seminal en ambas especies. Además, desde el punto de vista morfológico, no encontramos diferencias interespecíficas en el tamaño de los órganos de almacenamiento de esperma ([Fig. 5.2](#)). Por tanto, argüimos que la capacidad de almacenamiento de esperma en estas especies no difiere y no explica las grandes diferencias interespecíficas halladas respecto a FHR. Si esto fuera verdaderamente así, es decir, si no hubiera diferencias interespecíficas en cuanto a la capacidad de las hembras de almacenar esperma, la “hipótesis del almacén siempre lleno” predice que la cantidad de esperma transferido por cópula debe ser menor en *D. buzzatii* (la especie con mayor FHR) que en *D. koepferae*. Lamentablemente, debido a dificultades metodológicas, no conseguimos cuantificar el esperma transferido o almacenado por cópula.

8.1.5. Incidencia de paternidad múltiple en la naturaleza

La incidencia de paternidad múltiple fue muy similar en *D. antonietae* y *D. buzzatii* y mayor en estas que en *D. koepferae* ([Figs. 4.1A, B](#) y [7.4A](#)). El número estimado

de padres por camada fue 3,47 en *D. antonietae*, 3,57 en *D. buzzatii* y 1,95 en *D. koepferae*. En consecuencia, la proporción esperada de hembras inseminadas naturalmente por más de un macho fue 0,88 en *D. antonietae*, 0,89 en *D. buzzatii* y 0,58 en *D. koepferae*.

El análisis de paternidad realizado con SCARE ([capítulo 4](#)) reveló que α medio fue significativamente mayor en *D. buzzatii* (3,46) que en *D. koepferae* (1,53). Por tanto, podemos inferir que la incidencia de poliandria en hembras inseminadas naturalmente fue significativamente mayor en *D. buzzatii* que en *D. koepferae*. Luego, las chances de que espermias de diferentes machos coocurran dentro de una hembra (i.e. el riesgo de CE) son mayores en *D. buzzatii*. Cuando incorporamos a *D. antonietae* al estudio ([capítulo 7](#)) encontramos un comportamiento muy similar al de *D. buzzatii* ($\alpha = 3,35$). De hecho, los intervalos de credibilidad al 90% del parámetro α muestran un gran solapamiento entre *D. antonietae* (2,29 – 4,62) y *D. buzzatii* (2,70 - 4,31) pero no entre cualquiera de estas especies y *D. koepferae* (0,89 - 2,29).

Para evaluar el comportamiento del modelo implementado en los análisis de paternidad, corrimos SCARE con los datos de los ensayos de precedencia o prioridad de esperma en los cuales fijamos experimentalmente en 2 el número de padres. Los resultados de estas simulaciones se muestran en la [figura 8.2](#). Todas las moscas involucradas fueron homocigóticas para uno de cuatro alelos de un marcador citogenético. En consecuencia, las frecuencias genotípicas de estas muestras no se ajustan a las esperadas según el equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que es una suposición del modelo para la asignación de los genotipos parentales (Jones & Clark 2003). De todos modos, esperábamos que el número estimado de padres por camada no se apartara marcadamente de 2 ($\alpha = 1,60$). También esperábamos que la estimación de β resultara similar a nuestras estimaciones de la proporción de la progenie prohijada por el segundo macho (P2), que fue, en promedio, 0,82 en *D. buzzatii* y 0,64 en *D. koepferae*. En *D. buzzatii*, α medio fue 2,02 con un intervalo de credibilidad al 90% de 1,04 – 3,35, y β medio fue 0,85 con un intervalo de credibilidad al 90% de 0,77 – 0,92. Claramente, las estimaciones se ajustan a lo esperado en *D. buzzatii*. En *D. koepferae*, α medio fue 3,16 con un intervalo de credibilidad al 90% de 1,50 – 5,49, y β medio fue 0,88 con un intervalo de credibilidad al 90% de 0,81 – 0,93. Si bien α no se apartó significativamente de lo esperado en *D. koepferae*, la estimación resultó sorprendentemente alta con un intervalo de credibilidad muy amplio. Más aún, la estimación de β fue marcadamente

mayor que P2. El modelo implementado en el análisis de SCARE supone que el último macho en aparear con la hembra es siempre el macho que prohija la mayor proporción de la progenie. Este supuesto se cumple en la gran mayoría (90%) de las camadas de *D. buzzatii* obtenidas en el laboratorio. En *D. koepferae*, sin embargo, muchas de las camadas (37%) fueron mayormente prohijadas por el primer macho. Este hecho puede explicar tanto la sobreestimación de β en relación a P2 así como la aplanada distribución posterior obtenida para α en *D. koepferae* (Fig. 8.2). Creemos que este hecho no representó un problema en los análisis de paternidad múltiple en la naturaleza porque, para ambas especies, β medio (0,57) fue muy cercano a 0,5 (el mínimo valor posible para este parámetro) y la distribución posterior de α fue bastante curtótica.

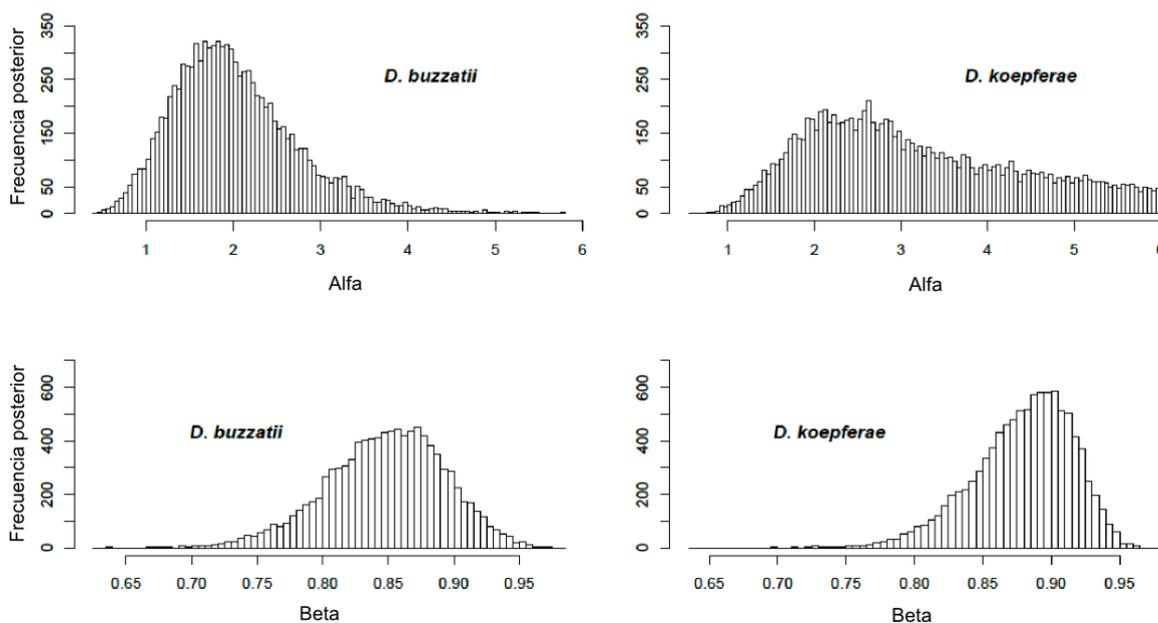


Figura 8.2. Histogramas de la distribución posterior de α (arriba) y β (abajo) obtenidos a partir de las camadas de los ensayos de laboratorio realizados para estudiar la precedencia de esperma, en *D. buzzatii* (izquierda) y *D. koepferae* (derecha). Los gráficos están basados en 10000 muestras obtenidas de la distribución posterior conjunta de ambos parámetros, mediante Cadenas de Markov de Monte Carlo.

El modelo que utilizamos para analizar la incidencia de paternidad múltiple en la naturaleza había sido previamente implementado en otros estudios. En algunos de ellos,

α fue interpretado como el número medio de padres por camada (Frentiu & Chenoweth 2008; Bundgaard *et al.*, 2004). Esta interpretación sería correcta si la densidad de probabilidad del número de padres por camada no fuera truncada, sin embargo, dado que las hembras no pueden ser inseminadas por cero machos, el modelo supone que la densidad de probabilidad del número de parejas por hembra es una distribución de Poisson truncada (Jones & Clark 2003). Luego, el número medio de padres responde a $\alpha/(1 - \exp(-\alpha))$ que sólo se acerca a α cuando el valor del parámetro es grande. Por esta razón, recalculamos el número medio de padres por camada a partir de los valores de α previamente estimados para comparar la incidencia de paternidad múltiple entre distintas especies de *Drosophila* (Tabla 8.1). Nuestra estimación del número de padres por camada en *D. buzzatii* (3,57) está entre las más altas cuando se la compara con las estimaciones obtenidas por medio de aproximaciones similares en otras especies del género (Tabla 8.1). En contraste, el número medio de padres por camada en *D. koepferae* (1,95) está entre los menores. Esto pone de manifiesto que *D. buzzatii* y *D. koepferae*, aunque cercanamente emparentadas, exhiben marcadas diferencias en sus sistemas de apareamiento, lo que hace a estas especies hermanas un modelo atractivo para el estudio de los mecanismos y las consecuencias evolutivas de la CE.

Tabla 8.1. Número estimado de padres por camada en poblaciones naturales de *Drosophila*. Todas las estimaciones fueron inferidas de modo similar recuperando la variación genética de la progenie de hembras inseminadas y capturadas en la naturaleza usando loci microsatélites polimórficos.

Especie	Sitio de colecta	Padres/camada	Camadas	Referencias
<i>D. serrata</i>	Brisbane, Australia	8,7 ($\alpha = 8,7$)	19	Frentiu & Chenoweth, 2008
<i>D. melanogaster</i>	Vienna, Austria	4-6	4	Imhof <i>et al.</i> , 1998
<i>D. buzzatii</i>	La Rioja, Argentina	3,6 ($\alpha = 3,5$)	20	Presente trabajo
<i>D. antonietae</i>	I. M. G., Argentina	3,5 ($\alpha = 3,4$)	15	Presente trabajo
<i>D. mojavensis</i>	Arizona, USA	2,7 ($\alpha = 2,4$)	19	Good <i>et al.</i> , 2006
<i>D. melanogaster</i>	California, USA	2,7 ($\alpha = 2,4$)	19	Harshman & Clark, 1998; Jones & Clark, 2003
<i>D. buzzatii</i>	Queensland, Australia	2,4 - 2,5 ($\alpha = 2,1 - 2,2$)	18	Bundgaard <i>et al.</i> , 2004
<i>D. koepferae</i>	La Rioja, Argentina	2,0 ($\alpha = 1,5$)	14	Presente trabajo
<i>D. simulans</i>	Kisoro, Uganda	1,9 ($\alpha = 1,4$)	11	Schlötterer <i>et al.</i> , 2005
<i>D. simulans</i>	Schabs, Italy	1,8 ($\alpha = 1,3$)	10	Schlötterer <i>et al.</i> , 2005

El fenómeno de paternidad múltiple en *D. buzzatii* había sido estudiado por Bundgaard *et al.* (2004) en una población introducida en Australia en los 1930s (Barker, 1982). Bundgaard *et al.* (2004) reportaron un valor de $\alpha = 2,1 - 2,2$ (2,4 - 2,5 padres por camada). Dicha estimación parece bastante menor a la que obtuvimos en este trabajo en una población argentina nativa. Aunque ahora sería meramente especulativo argüir las razones de esta diferencia entre una población nativa y otra introducida, factores tanto históricos como ecológicos podrían explicarla. Por ejemplo, la disponibilidad de diferentes plantas hospedadoras, que son más diversas en las poblaciones nativas (Barker, 1982; Hasson *et al.*, 1992), podría afectar el riesgo de CE determinando las oportunidades de oviposición y apareamiento.

8.1.6. Consecuencias de la competencia espermática

Nuestros estudios de paternidad en hembras inseminadas en la naturaleza revelaron que las hembras de las tres especies son promiscuas y posibilitan la coexistencia de espermatozoides de varios machos en su tracto reproductivo. Como vimos, la incidencia de paternidad múltiple fue mayor en *D. antonietae* y *D. buzzatii* que en *D. koepferae*. Sin embargo, esto no necesariamente implica que la CE es más intensa en *D. antonietae* y *D. buzzatii* que en *D. koepferae* ya que la paternidad múltiple no necesariamente implica costos para alguno de los padres que inseminan a la misma hembra. Con el objeto de evaluar esta cuestión, comparamos el costo relativo de la CE entre las especies midiendo la reducción de la fertilidad de un macho cuando la hembra re-aparea con un segundo macho. Para ello primero fue necesario estimar el grado de precedencia o prioridad de espermatozoides en cada especie.

La precedencia de espermatozoides en la naturaleza la evaluamos estimando el parámetro β , que da una medida de la proporción de la progenie procreada por el último macho en aparear con cada hembra capturada (Figs. 4.1C, D y 7.4B). Además, en *D. buzzatii* y *D. koepferae*, también evaluamos la precedencia de espermatozoides en el laboratorio estimando P2, la proporción de la progenie procreada por el segundo macho en hembras inseminadas por dos machos.

P2 resultó mayor que β en ambas especies sugiriendo que el resultado de la CE depende de las condiciones ambientales. Por otra parte, P2 fue mayor en *D. buzzatii*

(0,82) que en *D. koepferae* (0,64), mientras que β no difirió entre estas especies (0,57). Este patrón sugiere cierta discrepancia cualitativa en el comportamiento postcopulatorio del esperma entre las condiciones experimentales y las naturales. Sin embargo, P2 y β son variables diferentes que responden de manera diferente cuando, por ejemplo, las hembras no hacen un consumo aleatorio del esperma almacenado a lo largo del tiempo. Si las hembras inseminadas por más de un macho usaran primero el esperma del último macho con el que copularon, no sería sorprendente que β fuera menor que P2, ya que las hembras salvajes, al momento de ser capturadas, habrían agotado parcial pero preponderadamente el esperma proporcionado por el último macho. Los patrones de precedencia de esperma también podrían depender del número de parejas por hembra inseminada, el cual fue fijado experimentalmente en dos en el laboratorio pero fue variable en la naturaleza.

La precedencia de esperma no sólo fue sensible a las condiciones de apareamiento sino que también dependió de la especie. P2 fue significativamente mayor en *D. buzzatii* que en *D. koepferae*. Una posible explicación de estos resultados es que el desplazamiento e incapacitación que el esperma recientemente transferido provoca sobre el previamente almacenado, ambas probables adaptaciones promovidas por una CE intensa (Price *et al.*, 1999), son más fuertes en *D. buzzatii*. Aunque el valor medio de β no difirió entre *D. buzzatii* y *D. koepferae*, su distribución posterior fue mucho más pronunciada y curtótica en *D. buzzatii* que en *D. koepferae* ([Fig. 7.4C y D](#)). Esto puede atribuirse a una mayor variación del grado de precedencia de esperma entre las camadas de *D. koepferae*. Además, β fue significativamente mayor en *D. antonietae* (0,72) que en *D. buzzatii* o *D. koepferae* (0,57). Nuevamente, esto podría deberse a diferencias en el grado de desplazamiento o incapacitación del esperma previamente almacenado pero, alternativamente, también podría ser consecuencia de los distintos modos en que las hembras de estas especies consumen las reservas de esperma. Supongamos, por ejemplo, que las hembras de *D. buzzatii* y *D. koepferae* (pero no las de *D. antonietae*), al momento de ser capturadas, ya hubieran consumido parcial pero preponderantemente el esperma del último macho. En tal caso, esperaríamos que el valor medio de β resulte para *D. buzzatii* y *D. koepferae* (pero no para *D. antonietae*) una subestimación de la proporción de la progenie prohijada por el último macho, lo cual explicaría las diferencias interespecíficas de β encontradas en nuestros análisis. Como

sea, se necesitarían nuevas investigaciones para entender las causas de los patrones de precedencia de espermatozoides observados en este trabajo.

A partir de las estimaciones de la precedencia de espermatozoides y de la fecundidad de hembras inseminadas por uno y dos machos pudimos valorar el costo que la CE impone sobre los machos rivales. Según nuestros cálculos, cuando una hembra inseminada apareó con un segundo macho, la capacidad reproductiva del primer macho disminuyó en las tres especies (Figs. 6.2 y 7.5). En promedio, la fertilidad del primer macho se redujo 68,7% en *D. antonietae*, 71,4% en *D. buzzatii* y 33,3% en *D. koepferae*. Lo cual indica que en las dos primeras tanto el riesgo de CE como el costo reproductivos que esta impone son mayores que en *D. koepferae*.

El re-apareamiento no sólo afecta el éxito reproductivo de los machos. En las hembras de *D. melanogaster*, por ejemplo, se han documentado costos sobre la longevidad y sobrevivencia asociados al re-apareamiento. Por estos motivos, aún es enigmático por qué las hembras copulan con múltiples machos (Singh *et al.*, 2002). El re-apareamiento de las hembras es todavía más difícil de explicar en especies en las que los huevos que produce una hembra pueden ser fertilizados por el espermatozoides de un único eyaculado. Sin embargo, encontramos que al menos en *D. buzzatii* y *D. koepferae* el re-apareamiento con un segundo macho causa un incremento en la fecundidad de las hembras. Las proteínas seminales del segundo macho podrían causar este incremento de la fecundidad induciendo, por ejemplo, la ovogénesis (Heifetz *et al.*, 2001). En tal caso, el re-apareamiento conllevaría el beneficio de recibir proteínas seminales que aumentarían el éxito reproductivo de las hembras. Alternativamente, el número de espermatozoides funcionales que son transferidos durante el apareamiento podría ser considerado como el factor limitante de la fecundidad de las hembras inseminadas por un macho. En tal caso, el incremento en la fecundidad de las hembras, causado por el re-apareamiento, expresaría que un único eyaculado es insuficiente para fertilizar todos los huevos. Por tanto, una explicación plausible para el re-apareamiento en las especies estudiadas es que el re-apareamiento les permite a las hembras recargar las reservas no llenas de espermatozoides y aumentar así la capacidad reproductiva. Si la recarga de las reservas de espermatozoides fuera la causa principal del re-apareamiento (y suponiendo además que la cantidad de espermatozoides almacenado por cópula no varíe entre las especies), las especies con mayor VCE deberían exhibir mayor FHR. Sin embargo, encontramos lo opuesto: *D. antonietae* muestra mayor FHR (menor R50) que *D. buzzatii* la que, a su vez,

muestra mayor FHR que *D. koepferae*, pero *D. antonietae* muestra menor VCE que *D. buzzatii* la que, a su vez, muestra menor VCE que *D. koepferae*. Por tanto, causas diferentes a la recarga de esperma deben promover el re-apareamiento de las hembras en estas especies. Por ejemplo, las hembras podrían re-aparear para obtener regalos nupciales (e.g. proteínas seminales que incrementan la capacidad reproductiva) o beneficios indirectos (genéticos) a través de la CE (Singh *et al.*, 2002).

Pese a que nuestros experimentos permitieron inferir las consecuencias de la CE sobre la capacidad reproductiva del primer macho en aparear con una hembra inseminada por dos machos, nada podríamos concluir acerca de los mecanismos responsables de los patrones observados. En este contexto, estudios recientes utilizando cepas transgénicas de *D. melanogaster*, *D. simulans* y *D. mauritiana*, en las cuales se expresó proteína fluorescente verde o roja en la cabeza de los espermatozoides, permitieron dilucidar algunos mecanismos involucrados en la precedencia de esperma (Manier *et al.*, 2010; Avila *et al.*, 2011; Manier *et al.*, 2013). Según estos estudios la CE ocurre a través de mecanismos que involucran la interacción entre caracteres de la hembra y del macho durante los siguientes eventos: (1) la transferencia de esperma durante el apareamiento, (2) el desplazamiento e incapacitación que el esperma (espermatozoides y Acps) entrante provoca sobre el esperma “residente” en los órganos de almacenamiento, (3) la eyección no aleatoria de los espermias almacenados, por parte de la hembra y (4) el consumo para la fertilización no aleatorio de los espermias almacenados, por parte de la hembra. Cualquiera de estos mecanismos es compatible con nuestras observaciones.

8.1.7. Intensidad de la competencia espermática

La CE puede generar conflictos entre los machos rivales pero también entre los machos y las hembras por controlar el consumo de esperma y la duración del periodo refractario. Supongamos que la CE representara, para las partes en conflicto (intra o intersexual), agentes selectivos que imponen costos reproductivos elevados pero genéticamente afrontables (i.e. costos que puedan ser reducidos por los portadores de variantes genéticas factibles de emerger). En tal caso, esperaríamos el surgimiento de adaptaciones que aumenten las chances de que cada una de las partes en conflicto pueda “ganar la batalla espermática”. Pero entonces, las adaptaciones “útiles” para una

de las partes en conflicto representarían un nuevo o renovado y más severo agente selectivo para la otra parte. De modo que podría generarse, a causa de la CE, una coevolución antagonista o carrera armamentista que, debido a la continua renovación de los agentes selectivos, conduzca al permanente desarrollo de adaptaciones. Este escenario predice que la CE debería implicar siempre un desafío considerable, un filtro muy selectivo, al menos para alguna de las partes en conflicto, es decir, para alguno de los machos rivales. Entonces, para poner a prueba que la CE es una fuerza selectiva que se renueva y promueve sostenidamente el desarrollo de adaptaciones, es necesario valorar la intensidad de los desafíos impuestos por la CE para alguno de los machos rivales. Una forma de valorar qué tan considerable es el desafío o qué tan selectivo es el filtro impuesto por la CE sobre los machos rivales es cuantificar la proporción de espermatozoides que no consiguen la fecundación a causa de la CE. Pudimos estimar esta proporción en cada especie integrando los resultados de los experimentos que empleamos para investigar: (1) la propensión al re-apareamiento, (2) la velocidad de consumo de esperma almacenado y (3) el costo reproductivo de la CE. En el siguiente párrafo exponemos el modo en el que integramos estos resultados en cada especie.

Las hembras de *D. antonietae* recuperaron el 50% de su receptividad sexual luego de 1,5 h tras el primer apareamiento. Por ello, y considerando que en la naturaleza ocurren varios encuentros diarios entre machos y hembras, el re-apareamiento de las hembras seguramente ocurre antes de las 24 h después de aparear. Según nuestras estimaciones, las hembras de esta especie no consumen esperma almacenado durante las primeras 24 h luego del apareamiento. Por tanto, al momento del re-apareamiento, se espera que el 100% de la carga de esperma funcional almacenado sea expuesto a la CE. Con esperma funcional, nos referimos a los espermatozoides que alcanzarían ciertamente la fecundación a menos que sean expuestos a la CE. Además, estimamos que cuando una hembra re-aparea, el 69% del esperma funcional que está almacenado es desplazado o incapacitado por la llegada del nuevo esperma. Entonces, podemos inferir que en *D. antonietae* el 69% del esperma transferido durante la cópula no conseguirá la fecundación a causa de la CE.

Podemos aplicar el mismo razonamiento en *D. buzzatii* y *D. koepferae*. En la primera podemos suponer que las hembras, luego de aparear, re-aparearán antes de transcurridas 24 h ya que nuestros análisis indicaron que las hembras de esta especie recuperan el 50% de la receptividad a las 3,5 h del apareamiento. En cambio, los

mismos análisis en *D. koepferae*, indicaron que las hembras de esta especie no recuperan el 50% de la receptividad hasta transcurridas cerca de 50 h desde el apareamiento. Por tanto, podemos suponer que en la naturaleza, las hembras de *D. koepferae* re-aparearán entre el segundo y tercer día a partir de un dado apareamiento. Nuestros estudios de consumo de esperma revelaron que las hembras de *D. buzzatii* retienen al primer día del apareamiento el 73-100% del esperma funcional almacenado mientras que las de *D. koepferae*, al segundo-tercer día del apareamiento, sólo retienen el 10-19%. A su vez, estimamos que cuando una hembra de *D. buzzatii* o *D. koepferae* re-aparea el 71% o 33% del esperma funcional que está almacenado, respectivamente, es desplazado o incapacitado por la llegada del nuevo esperma. Podemos calcular entonces, que el 52-71% (71% del 73-100%) del esperma transferido durante la cópula no conseguirá la fecundación a causa de la CE en *D. buzzatii* y que sólo el 3-6% (33% del 10-19%) no lo hará en *D. koepferae*.

Promediando los valores de las tres especies estudiadas en este trabajo, estimamos que hasta el 49% de los espermatozoides son excluidos de la fecundación a causa de la CE. Por tanto, consideramos que la CE representa una fuerza selectiva intensa en estas especies. Si suponemos que pueden emerger variantes genéticas capaces de conferir a sus portadores la habilidad de aumentar las chances de que sus espermatozoides funcionales consigan la fecundación, también proponemos que la CE tiene un gran potencial para promover la evolución de adaptaciones.

8.2. Conclusiones

Nuestros experimentos de laboratorio y análisis de paternidad en hembras inseminadas en la naturaleza revelaron que las hembras de las tres especies son promiscuas y posibilitan la coexistencia de esperma de varios machos en su tracto reproductivo. El grado de promiscuidad de las hembras dependió de la especie siendo mayor en *D. antonietae* y *D. buzzatii* que en *D. koepferae*. En particular, el número estimado de padres por camada fue 3,47 en *D. antonietae*, 3,57 en *D. buzzatii* y 1,95 en *D. koepferae*. En consecuencia, la proporción esperada de hembras inseminadas naturalmente por más de un macho fue 0,88 en *D. antonietae*, 0,89 en *D. buzzatii* y 0,58 en *D. koepferae*.

Encontramos que las hembras de las tres especies, después de aparear, atraviesan un periodo refractario en el cual tienden a rechazar nuevos intentos de apareamiento cuando son cortejadas, reduciendo la propensión a aparear en comparación con hembras vírgenes de la misma edad. Nuestros resultados indican que esta reducción es explicada por una caída en la receptividad de las hembras luego de aparear y que no está mediada por efectos del apareamiento sobre el atractivo de las hembras. De hecho, no encontramos evidencia de que el atractivo de las hembras dependa del estatus sexual, al menos en *D. buzzatii* y *D. koepferae* ya que no evaluamos este aspecto en *D. antonietae*.

Los experimentos de propensión al re-apareamiento revelaron diferencias notables entre las especies respecto a la duración del periodo refractario, el cual estimamos es 33 y 14 veces más largo en *D. koepferae* que en *D. antonietae* y *D. buzzatii*, respectivamente. En base a estos resultados, esperamos que la tasa de re-apareamiento sea mayor en *D. antonietae* y *D. buzzatii* que en *D. koepferae*, lo cual puede explicar las diferencias encontradas respecto al riesgo de CE o grado de promiscuidad entre las especies.

Encontramos evidencia de variación genética para la duración del periodo refractario en *D. buzzatii* y en *D. koepferae*. Nuestros hallazgos sugieren que el genotipo de las hembras afecta la latencia al re-apareamiento entre las aislíneas de ambas especies y que el genotipo del macho afecta su habilidad para retardar el re-apareamiento de las hembras con las que copula al menos entre las aislíneas de *D. koepferae*.

La velocidad a la que las hembras inseminadas consumen el esperma almacenado también puede dar cuenta del riesgo de CE ya que las hembras de *D. antonietae* consumen el esperma almacenado más lentamente que las de *D. buzzatii* las que, a su vez, lo hacen más lentamente que las de *D. koepferae*. Asimismo, demostramos que las hembras de *D. koepferae* consumen sus reservas de esperma tan rápidamente que el encuentro de espermias rivales en su tracto reproductivo sería menos probable que en las otras dos especies.

Cuando una hembra inseminada re-apareó con un segundo macho, la capacidad reproductiva del primer macho disminuyó en las tres especies, indicando que la coexistencia de esperma de dos machos implica un costo reproductivo para el primer macho. En promedio, la fertilidad del primer macho se redujo 69% en *D. antonietae*, 71% en *D. buzzatii* y 33% en *D. koepferae*.

Entonces, podemos concluir que la CE representa una fuerza selectiva más intensa en *D. antonietae* y *D. buzzatii* que en *D. koepferae* ya que tanto el riesgo de CE como los costos reproductivos que esta impone son mayores en *D. antonietae* y *D. buzzatii* que en *D. koepferae*,

Pero, ¿qué tan intensa es la CE en cada una de estas tres especies? Nuestros cálculos permitieron inferir que la proporción de espermatozoides que perecen a causa de la CE es 69% en *D. antonietae*, hasta 71% en *D. buzzatii* y hasta 6% en *D. koepferae*. En promedio hasta uno de cada dos espermatozoides que podría alcanzar la fecundación no lo hace a causa de la CE. Por tanto, concluimos que la CE representa una fuerza selectiva intensa en estas especies. Si suponemos que los costos impuestos por la CE son genéticamente afrontables, también podemos concluir que la CE tiene un gran potencial para promover la evolución de adaptaciones.

La evolución rápida de las proteínas reproductivas y de la morfología genital de los machos es uno de los patrones más intrigantes en biología evolutiva que aún se encuentra poco comprendido. La CE ha sido propuesta como un potente disparador de la evolución adaptativa rápida en estos caracteres sexuales (Arnqvist, 1998; Hosken & Stockley, 2004). De acuerdo a esta hipótesis, la tasa de evolución de la morfología genital de los machos sería mayor en especies en las cuales la CE es más intensa. Entonces, teniendo en cuenta nuestros hallazgos, la hipótesis de la CE predice que la morfología genital de los machos debería evolucionar más rápidamente en *D. antonietae* y *D. buzzatii* que en *D. koepferae*. Aunque recientemente se detectó una rápida

divergencia de la morfología de estructuras genitales de los machos entre poblaciones de *D. buzzatii* y *D. koepferae* (Soto *et al.*, 2007; 2013; resultados no publicados), serían necesarios nuevos estudios comparando las tasas de evolución de la genitalia del macho entre *D. antonietae*, *D. buzzatii* y *D. koepferae* que complementarían los resultados presentados en este trabajo posibilitando poner a prueba la hipótesis de que la CE conduce a una rápida evolución de caracteres reproductivos.

8.4. Referencias

Aigaki T, Fleischmann I, Chen PS, Kubli E (1991) Ectopic expression of sex peptide alters reproductive behavior of female *Drosophila melanogaster*. *Neuron*, **7**, 557-563.

Arnqvist G (1998) Comparative evidence for the evolution of genitalia by sexual selection. *Nature*, **393**, 784–786.

Avila FW, Sirot LK, LaFlamme BA, Rubinstein CD, Wolfner MF. Insect seminal fluid proteins: identification and function. *Annual Review of Entomology*, **56**, 21-40.

Barker JSF, Starmer WT (1982) *Ecological Genetics and Evolution: The Cactus-yeast-Drosophila Model System*. Academic Press, Sydney, Australia.

Bundgaard J, Barker JSF, Frydenberg J, Clark AG (2004) Remating and sperm displacement in a natural population of *Drosophila buzzatii* inferred from mother–offspring analysis of microsatellite loci. *Journal of Evolutionary Biology*, **17**, 376–381.

Chapman T, Bangham J, Vinti G, Seifried B, Lunch O, Wolfner MF, Smith HK, Partridge L (2003) The sex peptide of *Drosophila melanogaster*: female post-mating responses analysed by using RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 9923–9928.

Dahlgaard J, Hasson E, Loeschcke V (2001) Behavioral differentiation in oviposition activity in *Drosophila buzzatii* from highland and lowland populations in Argentina: plasticity or thermal adaptation? *Evolution*, **55**, 738–747.

Frentiu FD, Chenoweth SF (2008) Polyandry and paternity skew in natural and experimental populations of *Drosophila serrata*. *Molecular Ecology*, **17(6)**, 1589–1596.

Good JM, Ross Charles L, Markow TA (2006) Multiple paternity in wild-caught *Drosophila mojavensis*. *Molecular Ecology*, **15**, 2253–2260.

Grima B, Chelot E, Xia R, Rouyer F (2004) Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature*, **431**, 869-873.

- Gromko MH, Newport MEA (1988) Genetics basis for remating in *Drosophila melanogaster*. II. Response to selection based on the behavior of one sex. *Behavior Genetics*, **18**, 621-632.
- Hamasaka Y, Suzuki T, Hanai S, Ishida N (2010) Evening circadian oscillator as the primary determinant of rhythmic motivation for *Drosophila* courtship behavior. *Genes to Cells*, **15**, 1240-1248.
- Hardeland R (1972) Species differences in the diurnal rhythmicity of courtship behavior within the melanogaster group of the genus *Drosophila*. *Animal Behaviour*, **20**, 170-174.
- Harshman L, Clark AG (1998) Inference of sperm competition from broods of field-caught *Drosophila*. *Evolution*, **52**, 1334–1341.
- Hasson E, Naveira H, Fontdevila A (1992) The breeding sites of the Argentinian species of the *Drosophila mulleri* complex (subgenus *Drosophila-repleta* group). *Revista Chilena de Historia Natural*, **65**, 319–326.
- Heifetz Y, Tram U, Wolfner MF (2001) Male contributions to egg production: the role of accessory gland products and sperm in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **268**, 175–180.
- Hosken DJ, Stockley P (2004) Sexual selection and genital evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, **19**, 87–93.
- Imhof M, Harr B, Brem G, Schlötterer C (1998) Multiple mating in wild *Drosophila melanogaster* revisited by microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, **7**, 915–917.
- Jones B, Clark AG (2003) Bayesian sperm competition estimates. *Genetics*, **163**, 1193–1199.
- Klarsfeld A, Leloup JC, Rouyer F (2003) Circadian rhythms of locomotor activity in *Drosophila*. *Behavioural Processes*, **64(2)**, 161-175.
- Kuo TH, Yew JY, Fedina TY, Dreisewerd K, Dierick HA, Pletcher SD (2012) Aging modulates cuticular hydrocarbons and sexual attractiveness in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Experimental Biology*, **215**, 814-821.

Manier MK, Belote JM, Berben KS, Novikov D, Stuart WT, Pitnick S (2010) Resolving mechanisms of competitive fertilization success in *Drosophila melanogaster*. *Science*, **328**, 354–357.

Manier MK, Lüpold S, Pitnick S, Starmer WT (2013) An analytical framework for estimating fertilization bias from multiple sperm storage organs during sperm competition. *American Naturalist*, **182**, 552–561.

Price CSC, Dyer KA, Coyne JA (1999) Sperm competition between *Drosophila* males involves both displacement and incapacitation. *Nature*, **400**, 449–452.

Sakai T, Ishida N (2001) Circadian rhythms of female mating activity governed by clock genes in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 9221–9225.

Schlötterer C, Reiss M, Schneider A, Imhof M (2005) Similar mating and sperm displacement patterns in two highly divergent *D. simulans* populations in Africa and Europe. *Molecular Ecology*, **14**, 1511–1515.

Singh SR, Singh BN, Hoenigsberg HF (2002) Female remating, sperm competition and sexual selection in *Drosophila*. *Genetics and Molecular Research*, **1(3)**, 178–215.

Soto IM, Carreira VP, Fanara JJ, Hasson E (2007) Evolution of male genitalia: Environmental and genetic factors affect genital morphology in two *Drosophila* sibling species and their hybrids. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 77.

Soto IM, Carreira VP, Soto EM, Márquez F, Lipko P, Hasson E (2013) Rapid Divergent Evolution of Male Genitalia Among Populations of *Drosophila buzzatii*. *Evolutionary Biology*, doi:10.1007/s11692-013-9223-x.

Tompkins L (1984) Genetic analysis of sex appeal in *Drosophila*. *Behavior Genetics*, **14**, 411–440.

Wolfner MF (2002) The gifts that keep on giving: physiological functions and evolutionary dynamics of male seminal proteins in *Drosophila*. *Heredity*, **88**, 85–93.

Material suplementario

Tabla 9.1. Número de huevos fértiles depositados por día desde el apareamiento por cada hembra incluida en los análisis de consumo de esperma.

Especie	Isolínea	Individuo	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
<i>D. antonietae</i>	DA1	1	0	0	0	0	0	2	52	0
<i>D. antonietae</i>	DA1	2	0	38	66	0	28	5	40	0
<i>D. antonietae</i>	DA1	3	0	95	0	0	0	0	0	0
<i>D. antonietae</i>	DA1	4	0	4	22	36	12	21	0	2
<i>D. antonietae</i>	DA1	5	0	0	13	36	7	0	6	0
<i>D. antonietae</i>	DA2	1	0	19	5	31	2	0	1	0
<i>D. antonietae</i>	DA2	2	0	20	39	0	10	21	0	0
<i>D. antonietae</i>	DA2	3	3	24	11	0	0	6	0	0
<i>D. antonietae</i>	DA2	4	0	0	58	33	8	2	0	0
<i>D. antonietae</i>	DA2	5	0	47	29	31	0	15	0	7
<i>D. antonietae</i>	DA3	1	0	41	59	22	18	3	10	7
<i>D. antonietae</i>	DA3	2	0	4	0	7	0	0	0	0
<i>D. antonietae</i>	DA3	3	0	28	3	0	0	0	0	0
<i>D. antonietae</i>	DA3	4	0	72	29	32	0	4	0	0
<i>D. antonietae</i>	DA3	5	0	20	42	28	4	2	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB1	1	6	13	18	6	4	3	1	0
<i>D. buzzatii</i>	DB1	2	2	5	7	0	0	3	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB1	3	4	1	15	12	1	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB1	4	32	21	23	6	14	9	2	2
<i>D. buzzatii</i>	DB1	5	0	7	6	0	5	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB1	6	2	16	11	8	9	6	1	1
<i>D. buzzatii</i>	DB1	7	5	5	10	6	0	4	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB1	8	9	27	1	0	0	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB1	9	33	31	14	12	4	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB1	10	66	27	5	41	4	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB1	11	0	6	6	0	0	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB1	12	43	20	14	0	1	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB1	13	8	14	0	22	4	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB1	14	28	45	26	7	12	3	0	1
<i>D. buzzatii</i>	DB1	15	18	5	2	10	0	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB1	16	0	15	25	0	0	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB1	17	3	3	7	0	7	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB1	18	0	8	2	24	10	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB1	19	19	3	8	80	8	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB1	20	1	5	2	5	8	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB2	1	77	56	29	51	13	31	2	1
<i>D. buzzatii</i>	DB2	2	23	6	0	0	3	6	1	0
<i>D. buzzatii</i>	DB2	3	11	18	44	9	0	59	45	16
<i>D. buzzatii</i>	DB2	4	75	42	5	54	16	22	10	2

<i>D. buzzatii</i>	DB2	5	33	55	18	42	14	1	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB2	6	56	42	8	20	7	5	2	0
<i>D. buzzatii</i>	DB2	7	17	49	21	30	44	46	2	2
<i>D. buzzatii</i>	DB2	8	18	25	10	13	0	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB2	9	29	46	25	47	13	21	30	0
<i>D. buzzatii</i>	DB2	10	7	43	12	37	21	6	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB2	11	52	71	21	54	3	24	5	0
<i>D. buzzatii</i>	DB2	12	57	29	34	7	21	6	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB2	13	49	7	5	2	1	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB2	14	42	40	25	22	9	18	3	2
<i>D. buzzatii</i>	DB2	15	56	28	11	29	9	0	1	1
<i>D. buzzatii</i>	DB2	16	0	46	38	47	20	54	44	1
<i>D. buzzatii</i>	DB2	17	18	45	25	36	9	11	3	0
<i>D. buzzatii</i>	DB2	18	10	4	0	0	0	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB2	19	75	36	37	7	9	1	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB2	20	14	19	15	13	5	17	4	0
<i>D. buzzatii</i>	DB3	1	33	8	0	0	0	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB3	2	0	25	1	4	13	1	2	0
<i>D. buzzatii</i>	DB3	3	20	19	0	0	0	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB3	4	68	10	0	0	0	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB3	5	0	33	2	6	0	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB3	6	0	3	29	2	2	2	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB4	1	13	41	3	0	0	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB4	2	28	10	9	1	0	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB4	3	36	52	19	21	3	11	15	1
<i>D. buzzatii</i>	DB4	4	6	5	0	1	1	1	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB4	5	0	4	11	0	0	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB4	6	9	7	0	0	0	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB4	7	10	32	11	11	46	25	4	0
<i>D. buzzatii</i>	DB4	8	8	19	52	23	3	3	1	0
<i>D. buzzatii</i>	DB4	9	9	49	2	0	0	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB4	10	6	4	3	2	0	0	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB4	11	13	12	43	21	2	1	0	0
<i>D. buzzatii</i>	DB4	12	0	12	43	31	29	10	12	5
<i>D. koepferae</i>	DK1	1	37	2	0	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK1	2	22	0	0	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK1	3	0	30	0	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK1	4	5	6	0	5	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK1	5	30	6	0	3	8	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK1	6	21	13	0	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK1	7	37	5	0	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK1	8	7	23	0	1	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK1	9	31	9	1	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK1	10	13	0	1	8	0	0	0	0

<i>D. koepferae</i>	DK1	11	30	7	0	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK1	12	0	19	0	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK1	13	2	13	0	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK1	14	31	4	4	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK1	15	1	6	14	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK1	16	23	21	22	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK2	1	19	33	3	5	2	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK2	2	61	6	0	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK2	3	8	29	0	11	6	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK2	4	47	2	11	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK2	5	28	0	0	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK2	6	39	13	0	1	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK2	7	11	24	0	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK2	8	0	14	3	10	7	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK2	9	11	30	4	30	12	3	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK2	10	55	6	0	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK2	11	19	7	0	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK2	12	8	9	7	5	4	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK2	13	14	33	13	10	3	4	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK3	1	23	12	30	3	7	0	2	0
<i>D. koepferae</i>	DK3	2	13	23	15	4	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK3	3	47	21	20	7	0	1	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK3	4	58	14	5	3	3	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK3	5	39	11	3	1	0	1	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK3	6	18	5	0	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK3	7	39	19	3	8	2	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK3	8	20	3	7	2	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK3	9	14	5	2	0	1	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK3	10	39	16	2	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK3	11	47	23	10	1	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK3	12	8	19	2	8	2	0	1	0
<i>D. koepferae</i>	DK4	1	21	9	7	2	0	1	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK4	2	22	25	12	3	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK4	3	59	12	34	6	0	2	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK4	4	44	23	11	3	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK4	5	31	14	6	0	2	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK4	6	5	5	0	2	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK4	7	13	4	0	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK4	8	19	2	7	0	0	1	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK4	9	33	12	2	2	5	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK4	10	51	20	15	10	9	2	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK4	11	23	40	16	5	4	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	DK4	12	40	13	7	7	3	0	1	0

Tabla 9.2. Genotipos multilocus de los microsatélites de todas las moscas incluidas en los análisis de paternidad múltiple.

Especie	Camada	Individuo	Locus 1		Locus 2		Locus 3		Locus 4		Locus 5	
<i>D. antonietae</i>	1	Madre	182	190	457	461	164	164	186	186		
<i>D. antonietae</i>	1	1	182	190	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	1	2	180	182	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	1	3	182	190	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	1	4	182	190	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	1	5	180	190	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	1	6	182	190	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	1	7	182	182	457	457	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	1	8	182	190	457	457	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	1	9	180	182	461	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	1	10	180	190	457	457	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	1	11	174	182	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	1	12	182	190	457	457	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	1	13	180	182	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	1	14	182	190	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	1	15	180	182	461	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	1	16	182	190	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	1	17	182	184	457	457	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	1	18	180	182	457	457	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	1	19	182	182	457	457	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	1	20	180	182	461	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	2	Madre	182	196	457	457	180	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	2	1	182	190	457	457	180	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	2	2	188	196	457	461	178	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	2	3	182	196	457	457	180	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	2	4	180	196	457	461	178	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	2	5	180	196	457	457	178	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	2	6	190	196	457	461	180	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	2	7	190	196	457	461	180	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	2	8	182	196	457	457	180	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	2	9	182	196	457	461	180	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	2	10	196	196	457	457	180	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	2	11	180	196	457	457	178	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	2	12	180	182	457	457	178	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	2	13	182	196	457	461	180	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	2	14	180	182	457	461	178	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	2	15	180	196	457	461	178	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	2	16	182	188	457	457	178	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	2	17	196	196	457	461	180	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	2	18	182	188	457	461	178	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	2	19	196	196	457	461	180	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	2	20	180	196	457	461	178	180	184	186		

<i>D. antonietae</i>	2	21	196	196	457	461	180	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	3	Madre	188	198	461	461	174	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	3	1	188	192	457	461	174	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	3	2	180	198	457	461	174	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	3	3	180	188	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	3	4	192	198	457	461	174	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	3	5	180	198	457	461	174	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	3	6	192	198	457	461	180	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	3	7	180	198	457	461	164	174	186	186		
<i>D. antonietae</i>	3	8	188	192	457	461	164	174	186	186		
<i>D. antonietae</i>	3	9	180	198	457	461	180	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	3	10	180	188	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	3	11	180	198	457	461	180	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	3	12	188	192	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	3	13	188	192	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	3	14	180	188	457	461	164	174	186	186		
<i>D. antonietae</i>	3	15	180	198	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	3	16	180	198	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	3	17	180	198	457	461	174	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	3	18	192	198	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	3	19	188	192	457	461	180	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	3	20	180	198	457	461	164	174	186	186		
<i>D. antonietae</i>	3	21	180	198	457	461	164	174	186	186		
<i>D. antonietae</i>	3	22	192	198	457	461	180	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	4	Madre	198	198	457	461	164	164	184	186		
<i>D. antonietae</i>	4	1	198	198	457	461	164	170	186	186		
<i>D. antonietae</i>	4	2	198	198	461	461	164	170	184	186		
<i>D. antonietae</i>	4	3	198	198	457	457	164	170	186	186		
<i>D. antonietae</i>	4	4	182	198	457	461	164	184	184	186		
<i>D. antonietae</i>	4	5	190	198	457	461	164	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	4	6	198	198	461	461	164	170	186	186		
<i>D. antonietae</i>	4	7	198	198	457	461	164	170	184	184		
<i>D. antonietae</i>	4	8	182	198	457	461	164	184	184	186		
<i>D. antonietae</i>	4	9	190	198	457	461	164	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	4	10	190	198	457	461	164	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	4	11	198	198	457	461	164	184	184	186		
<i>D. antonietae</i>	4	12	182	198	457	461	164	170	186	186		
<i>D. antonietae</i>	5	Madre	180	182	457	461	180	184	186	192		
<i>D. antonietae</i>	5	1	182	198	457	461	178	184	186	192		
<i>D. antonietae</i>	5	2	182	182	457	457	178	184	186	192		
<i>D. antonietae</i>	5	3	182	182	457	457	178	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	5	4	182	182	457	461	178	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	5	5	182	182	457	457	178	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	5	6	180	198	457	457	178	184	186	192		
<i>D. antonietae</i>	5	7	180	182	457	461	170	180	186	192		

<i>D. antonietae</i>	5	8	180	180	457	457	178	184	186	192		
<i>D. antonietae</i>	5	9	180	182	457	461	180	180	192	192		
<i>D. antonietae</i>	5	10	182	182	457	457	178	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	5	11	180	180	457	461	178	184	186	192		
<i>D. antonietae</i>	5	12	182	198	457	457	178	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	5	13	182	182	457	457	178	180	186	192		
<i>D. antonietae</i>	5	14	182	198	457	461	178	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	5	15	182	182	457	461	178	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	5	16	182	182	457	461	178	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	5	17	0	0	0	0	178	184	0	0		
<i>D. antonietae</i>	5	18	180	182	461	461	170	180	190	192		
<i>D. antonietae</i>	5	19	182	182	457	461	178	184	186	192		
<i>D. antonietae</i>	5	20	182	198	457	457	178	184	186	192		
<i>D. antonietae</i>	5	21	182	182	457	457	0	0	186	186		
<i>D. antonietae</i>	5	22	182	198	457	457	178	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	6	Madre	180	180	457	457	178	178	186	192		
<i>D. antonietae</i>	6	1	180	188	457	457	174	178	186	192		
<i>D. antonietae</i>	6	2	180	182	0	0	174	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	6	3	180	198	457	461	178	180	186	192		
<i>D. antonietae</i>	6	4	180	188	457	457	174	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	6	5	180	182	457	457	174	178	186	192		
<i>D. antonietae</i>	6	6	180	188	457	457	174	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	6	7	180	182	457	457	174	178	186	192		
<i>D. antonietae</i>	6	8	180	188	457	457	174	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	6	9	180	182	457	457	174	178	186	192		
<i>D. antonietae</i>	6	10	180	188	457	457	174	178	186	192		
<i>D. antonietae</i>	6	11	180	198	457	461	178	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	6	12	180	188	457	457	174	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	6	13	180	188	457	457	174	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	6	14	180	182	457	457	174	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	6	15	180	182	457	457	174	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	6	16	180	182	457	457	174	178	186	192		
<i>D. antonietae</i>	6	17	180	182	457	457	174	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	6	18	180	188	457	457	174	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	6	19	180	188	457	457	174	178	186	192		
<i>D. antonietae</i>	6	20	180	190	457	461	178	180	186	192		
<i>D. antonietae</i>	6	21	180	188	457	457	174	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	6	22	180	188	457	457	174	178	186	192		
<i>D. antonietae</i>	6	23	180	188	457	457	174	178	186	192		
<i>D. antonietae</i>	7	Madre	182	188	457	457	178	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	7	1	188	188	457	457	178	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	7	2	180	182	457	457	174	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	7	3	182	182	457	461	174	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	7	4	188	220	457	457	180	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	7	5	188	198	457	457	178	184	186	192		

<i>D. antonietae</i>	7	6	182	196	457	461	178	180	186	192		
<i>D. antonietae</i>	7	7	182	188	457	457	174	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	7	8	182	182	457	461	174	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	7	9	180	188	457	457	174	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	7	10	180	182	457	457	174	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	7	11	188	220	457	457	180	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	7	12	182	188	457	457	180	180	186	192		
<i>D. antonietae</i>	7	13	182	188	457	461	174	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	7	14	180	188	457	461	174	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	7	15	188	198	457	457	174	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	7	16	180	188	457	461	174	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	7	17	180	182	457	461	174	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	7	18	182	188	457	457	178	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	7	19	188	188	457	457	174	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	7	20	180	182	457	457	174	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	7	21	182	188	457	461	174	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	7	22	180	182	457	457	174	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	8	Madre	196	198	457	457	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	8	1	196	198	457	461	164	174	184	186		
<i>D. antonietae</i>	8	2	196	198	457	461	164	174	184	186		
<i>D. antonietae</i>	8	3	180	198	457	457	164	174	184	186		
<i>D. antonietae</i>	8	4	198	198	457	461	164	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	8	5	180	198	457	457	174	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	8	6	180	198	457	457	164	174	186	186		
<i>D. antonietae</i>	8	7	196	198	457	461	164	174	186	186		
<i>D. antonietae</i>	8	8	180	198	457	461	164	174	186	186		
<i>D. antonietae</i>	8	9	180	198	457	457	164	174	184	186		
<i>D. antonietae</i>	8	10	196	198	457	461	164	174	184	186		
<i>D. antonietae</i>	8	11	180	198	457	461	180	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	8	12	196	198	457	461	174	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	8	13	180	198	457	461	164	174	184	186		
<i>D. antonietae</i>	8	14	196	198	457	457	164	174	186	186		
<i>D. antonietae</i>	8	15	180	198	457	457	174	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	8	16	180	198	457	457	174	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	8	17	196	198	457	457	174	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	9	Madre	182	188	461	461	164	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	9	1	182	198	457	461	178	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	9	2	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>D. antonietae</i>	9	3	182	198	457	461	178	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	9	4	182	188	457	461	164	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	9	5	182	182	457	461	164	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	9	6	182	182	461	461	178	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	9	7	188	190	461	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	9	8	182	182	461	461	164	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	9	9	182	188	461	461	164	178	186	186		

<i>D. antonietae</i>	9	10	188	198	461	461	178	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	9	11	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>D. antonietae</i>	9	12	182	198	457	461	178	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	9	13	182	182	457	461	178	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	9	14	182	182	457	461	178	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	9	15	182	198	461	461	164	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	9	16	182	188	457	461	164	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	9	17	182	182	461	461	164	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	9	18	188	198	461	461	164	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	9	19	182	182	461	461	178	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	9	20	182	198	457	461	178	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	9	21	182	182	457	461	164	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	9	22	182	198	457	461	164	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	9	23	182	190	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	9	24	182	188	461	461	178	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	10	Madre	198	198	461	461	178	182	186	186		
<i>D. antonietae</i>	10	1	180	198	457	461	178	182	186	192		
<i>D. antonietae</i>	10	2	182	198	461	461	178	184	184	186		
<i>D. antonietae</i>	10	3	198	198	461	461	180	182	186	186		
<i>D. antonietae</i>	10	4	188	198	457	461	178	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	10	5	180	198	457	461	182	184	186	192		
<i>D. antonietae</i>	10	6	182	198	461	461	178	184	186	192		
<i>D. antonietae</i>	10	7	198	198	457	461	180	182	186	186		
<i>D. antonietae</i>	10	8	198	198	0	0	178	182	186	186		
<i>D. antonietae</i>	10	9	180	198	457	461	178	182	184	186		
<i>D. antonietae</i>	10	10	182	198	457	461	178	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	10	11	188	198	457	461	178	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	10	12	182	198	457	461	178	182	186	192		
<i>D. antonietae</i>	10	13	188	198	461	461	180	182	186	186		
<i>D. antonietae</i>	11	Madre	180	182	457	457	178	182	186	194		
<i>D. antonietae</i>	11	1	180	182	457	461	178	184	184	194		
<i>D. antonietae</i>	11	2	180	180	457	461	182	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	11	3	180	190	457	461	164	178	184	186		
<i>D. antonietae</i>	11	4	182	190	457	461	182	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	11	5	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>D. antonietae</i>	11	6	180	182	457	457	182	184	192	194		
<i>D. antonietae</i>	11	7	182	190	457	461	182	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	11	8	180	190	457	461	164	182	184	186		
<i>D. antonietae</i>	11	9	182	190	457	461	178	184	184	194		
<i>D. antonietae</i>	11	10	180	180	457	461	164	178	184	194		
<i>D. antonietae</i>	11	11	180	180	457	461	178	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	11	12	180	180	457	461	182	184	184	186		
<i>D. antonietae</i>	11	13	180	180	457	461	182	184	184	186		
<i>D. antonietae</i>	11	14	180	182	457	461	164	182	186	186		
<i>D. antonietae</i>	11	15	180	190	457	461	164	182	184	186		

<i>D. antonietae</i>	11	16	180	182	457	461	178	184	184	186		
<i>D. antonietae</i>	11	17	180	180	457	461	182	184	186	194		
<i>D. antonietae</i>	11	18	182	190	457	461	164	178	184	186		
<i>D. antonietae</i>	11	19	180	190	457	461	164	178	186	194		
<i>D. antonietae</i>	11	20	180	190	457	461	182	184	184	194		
<i>D. antonietae</i>	11	21	180	180	457	461	164	178	184	194		
<i>D. antonietae</i>	11	22	180	182	457	461	164	178	184	186		
<i>D. antonietae</i>	12	Madre	182	188	461	461	164	174	184	186		
<i>D. antonietae</i>	12	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>D. antonietae</i>	12	2	180	188	457	461	174	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	12	3	188	198	457	461	174	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	12	4	180	188	457	461	174	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	12	5	182	198	457	461	164	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	12	6	182	198	457	461	164	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	12	7	188	198	457	461	164	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	12	8	180	182	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	12	9	182	188	457	461	164	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	12	10	180	182	457	461	174	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	12	11	180	182	457	461	174	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	12	12	180	188	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	12	13	182	198	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	12	14	180	182	457	461	164	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	12	15	182	198	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	12	16	180	188	457	461	174	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	12	17	180	188	457	461	164	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	12	18	180	182	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	12	19	180	182	457	461	174	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	12	20	188	198	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	12	21	188	188	457	461	174	184	184	186		
<i>D. antonietae</i>	12	22	182	198	457	461	174	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	12	23	182	198	457	461	164	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	13	Madre	182	190	461	461	164	180	186	192		
<i>D. antonietae</i>	13	1	182	188	457	461	164	164	184	192		
<i>D. antonietae</i>	13	2	182	198	457	461	174	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	13	3	182	188	461	461	164	174	186	186		
<i>D. antonietae</i>	13	4	188	190	457	461	164	164	186	192		
<i>D. antonietae</i>	13	5	182	188	457	461	164	180	192	192		
<i>D. antonietae</i>	13	6	190	198	457	461	164	180	192	192		
<i>D. antonietae</i>	13	7	182	188	461	461	164	164	184	186		
<i>D. antonietae</i>	13	8	188	190	461	461	174	180	186	192		
<i>D. antonietae</i>	13	9	190	198	457	461	164	164	184	192		
<i>D. antonietae</i>	13	10	190	198	457	461	164	174	184	192		
<i>D. antonietae</i>	13	11	182	188	461	461	164	164	184	186		
<i>D. antonietae</i>	13	12	188	190	457	461	174	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	13	13	182	188	461	461	164	164	184	192		

<i>D. antonietae</i>	13	14	182	188	461	461	174	180	184	192		
<i>D. antonietae</i>	13	15	188	190	457	461	164	164	186	192		
<i>D. antonietae</i>	13	16	190	198	461	461	164	164	186	186		
<i>D. antonietae</i>	13	17	182	198	457	461	174	180	184	192		
<i>D. antonietae</i>	13	18	182	188	461	461	174	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	13	19	188	190	461	461	164	164	186	192		
<i>D. antonietae</i>	13	20	190	198	457	461	164	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	13	21	182	188	457	461	164	180	192	192		
<i>D. antonietae</i>	13	22	182	188	457	461	164	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	14	Madre	188	198	457	461	178	180	186	192		
<i>D. antonietae</i>	14	1	196	198	457	461	180	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	14	2	196	198	457	461	180	180	184	192		
<i>D. antonietae</i>	14	3	196	198	457	457	178	180	184	186		
<i>D. antonietae</i>	14	4	182	188	461	461	180	180	186	192		
<i>D. antonietae</i>	14	5	188	190	457	461	180	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	14	6	188	196	457	457	180	180	192	192		
<i>D. antonietae</i>	14	7	182	188	461	461	180	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	14	8	188	196	457	457	178	180	184	192		
<i>D. antonietae</i>	14	9	188	190	457	457	174	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	14	10	196	198	457	457	180	180	186	186		
<i>D. antonietae</i>	14	11	190	198	461	461	174	180	186	192		
<i>D. antonietae</i>	14	12	180	188	457	461	180	180	186	192		
<i>D. antonietae</i>	14	13	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>D. antonietae</i>	14	14	188	190	457	461	174	180	192	192		
<i>D. antonietae</i>	14	15	182	188	461	461	174	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	14	16	182	188	457	461	178	180	186	192		
<i>D. antonietae</i>	14	17	182	198	457	461	178	180	186	192		
<i>D. antonietae</i>	14	18	188	192	461	461	178	180	186	192		
<i>D. antonietae</i>	14	19	182	188	457	461	178	180	186	192		
<i>D. antonietae</i>	14	20	182	188	457	461	178	180	186	192		
<i>D. antonietae</i>	14	21	182	188	0	0	174	180	186	192		
<i>D. antonietae</i>	14	22	188	196	457	457	178	180	192	192		
<i>D. antonietae</i>	15	Madre	182	196	457	457	178	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	15	1	180	196	457	461	178	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	15	2	180	182	457	461	178	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	15	3	188	196	457	457	184	184	186	194		
<i>D. antonietae</i>	15	4	182	198	457	461	178	184	186	186		
<i>D. antonietae</i>	15	5	196	198	457	461	178	178	186	186		
<i>D. antonietae</i>	15	6	182	198	457	461	178	184	186	186		
<i>D. buzzatii</i>	1	Madre	190	194	219	231	156	164	200	202		
<i>D. buzzatii</i>	1	1	188	190	217	219	156	156	200	210		
<i>D. buzzatii</i>	1	2	176	194	219	219	164	164	200	202		
<i>D. buzzatii</i>	1	3	176	194	229	231	164	164	200	202		
<i>D. buzzatii</i>	1	4	176	194	217	219	164	164	200	210		
<i>D. buzzatii</i>	1	5	188	194	217	231	156	164	202	210		

<i>D. buzzatii</i>	1	6	188	194	217	231	156	156	200	210		
<i>D. buzzatii</i>	1	7	188	190	229	231	156	156	200	202		
<i>D. buzzatii</i>	1	8	190	194	217	231	158	164	194	202		
<i>D. buzzatii</i>	1	9	178	194	219	219	164	164	188	202		
<i>D. buzzatii</i>	1	10	0	0	0	0	164	164	0	0		
<i>D. buzzatii</i>	1	11	184	194	217	231	164	164	202	210		
<i>D. buzzatii</i>	1	12	176	194	217	231	164	164	200	210		
<i>D. buzzatii</i>	1	13	188	194	217	219	156	164	200	210		
<i>D. buzzatii</i>	1	14	188	190	217	231	156	156	202	210		
<i>D. buzzatii</i>	1	15	188	194	217	231	156	164	202	210		
<i>D. buzzatii</i>	1	16	184	194	217	231	164	164	194	202		
<i>D. buzzatii</i>	1	17	188	190	217	231	156	156	200	210		
<i>D. buzzatii</i>	1	18	176	190	229	231	164	164	202	202		
<i>D. buzzatii</i>	1	19	176	190	229	231	164	164	200	202		
<i>D. buzzatii</i>	1	20	188	190	217	231	156	156	202	210		
<i>D. buzzatii</i>	1	21	188	194	219	219	156	164	200	202		
<i>D. buzzatii</i>	2	Madre	180	190	211	217	162	164	184	190		
<i>D. buzzatii</i>	2	1	180	190	211	221	164	164	184	194		
<i>D. buzzatii</i>	2	2	180	184	211	221	164	168	184	194		
<i>D. buzzatii</i>	2	3	188	190	211	219	164	164	184	204		
<i>D. buzzatii</i>	2	4	180	184	211	217	162	168	184	200		
<i>D. buzzatii</i>	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>D. buzzatii</i>	2	6	182	190	211	217	162	168	190	200		
<i>D. buzzatii</i>	2	7	180	188	217	217	162	164	182	190		
<i>D. buzzatii</i>	2	8	188	190	217	219	162	164	184	204		
<i>D. buzzatii</i>	2	9	190	190	217	221	162	164	190	194		
<i>D. buzzatii</i>	2	10	184	190	217	221	162	168	190	194		
<i>D. buzzatii</i>	2	11	180	184	217	217	162	168	190	200		
<i>D. buzzatii</i>	2	12	180	184	211	217	164	168	184	200		
<i>D. buzzatii</i>	2	13	180	184	217	221	162	168	190	194		
<i>D. buzzatii</i>	2	14	188	190	217	219	164	164	184	204		
<i>D. buzzatii</i>	2	15	180	184	217	221	162	168	184	194		
<i>D. buzzatii</i>	2	16	184	190	211	221	164	168	184	194		
<i>D. buzzatii</i>	2	17	180	184	217	217	162	168	190	200		
<i>D. buzzatii</i>	2	18	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>D. buzzatii</i>	2	19	184	190	217	221	164	168	190	194		
<i>D. buzzatii</i>	2	20	180	190	217	217	162	164	184	200		
<i>D. buzzatii</i>	2	21	188	190	207	217	162	162	190	202		
<i>D. buzzatii</i>	2	22	190	190	217	217	164	164	190	200		
<i>D. buzzatii</i>	3	Madre	186	186	217	219	162	162	184	190		
<i>D. buzzatii</i>	3	1	186	192	219	219	162	162	184	184		
<i>D. buzzatii</i>	3	2	186	192	219	219	162	162	184	184		
<i>D. buzzatii</i>	3	3	186	192	219	219	162	162	184	184		
<i>D. buzzatii</i>	3	4	186	186	219	219	162	162	184	190		
<i>D. buzzatii</i>	3	5	184	186	215	217	162	162	178	190		

<i>D. buzzatii</i>	3	6	186	192	219	219	162	162	184	190		
<i>D. buzzatii</i>	3	7	186	192	203	219	162	162	184	200		
<i>D. buzzatii</i>	3	8	180	186	217	217	162	164	184	196		
<i>D. buzzatii</i>	3	9	180	186	219	219	160	162	178	184		
<i>D. buzzatii</i>	3	10	180	186	219	219	162	164	178	184		
<i>D. buzzatii</i>	3	11	186	192	203	219	162	162	184	200		
<i>D. buzzatii</i>	3	12	186	192	203	219	162	162	184	200		
<i>D. buzzatii</i>	3	13	184	186	219	219	162	162	178	184		
<i>D. buzzatii</i>	3	14	186	192	203	219	162	162	184	200		
<i>D. buzzatii</i>	3	15	186	192	219	219	162	162	184	190		
<i>D. buzzatii</i>	3	16	186	192	203	219	162	162	184	200		
<i>D. buzzatii</i>	3	17	180	186	203	219	160	162	190	200		
<i>D. buzzatii</i>	3	18	180	186	219	219	160	162	184	190		
<i>D. buzzatii</i>	3	19	180	186	219	219	160	162	184	184		
<i>D. buzzatii</i>	3	20	186	192	219	219	162	162	184	190		
<i>D. buzzatii</i>	4	Madre	184	188	219	221	162	166	186	206		
<i>D. buzzatii</i>	4	1	182	184	197	221	166	166	176	206		
<i>D. buzzatii</i>	4	2	182	184	219	219	162	162	186	192		
<i>D. buzzatii</i>	4	3	182	188	219	219	156	162	186	192		
<i>D. buzzatii</i>	4	4	182	184	197	221	156	162	176	206		
<i>D. buzzatii</i>	4	5	182	188	197	219	166	166	176	186		
<i>D. buzzatii</i>	4	6	182	184	197	221	162	162	176	186		
<i>D. buzzatii</i>	4	7	182	184	219	219	162	162	186	192		
<i>D. buzzatii</i>	4	8	182	184	219	219	162	162	186	192		
<i>D. buzzatii</i>	4	9	182	188	219	219	162	162	186	192		
<i>D. buzzatii</i>	4	10	182	188	197	221	166	166	176	206		
<i>D. buzzatii</i>	4	11	182	188	219	219	156	166	186	192		
<i>D. buzzatii</i>	4	12	182	188	197	219	166	166	176	186		
<i>D. buzzatii</i>	4	13	182	188	197	221	156	162	176	206		
<i>D. buzzatii</i>	4	14	182	184	219	219	156	162	186	192		
<i>D. buzzatii</i>	4	15	182	184	197	221	166	166	176	206		
<i>D. buzzatii</i>	4	16	182	184	219	219	162	162	192	206		
<i>D. buzzatii</i>	4	17	182	188	197	221	166	166	176	206		
<i>D. buzzatii</i>	4	18	182	184	197	221	156	166	176	206		
<i>D. buzzatii</i>	4	19	182	188	219	219	166	166	186	192		
<i>D. buzzatii</i>	4	20	184	186	215	219	164	166	186	216		
<i>D. buzzatii</i>	5	Madre	182	182	207	209	164	168	188	198		
<i>D. buzzatii</i>	5	1	182	190	207	219	162	168	188	188		
<i>D. buzzatii</i>	5	2	182	182	209	219	164	164	198	204		
<i>D. buzzatii</i>	5	3	182	192	205	207	164	164	178	198		
<i>D. buzzatii</i>	5	4	182	192	205	207	164	168	178	198		
<i>D. buzzatii</i>	5	5	182	192	207	211	164	164	194	198		
<i>D. buzzatii</i>	5	6	182	182	205	209	168	168	178	188		
<i>D. buzzatii</i>	5	7	182	182	207	211	164	164	188	194		
<i>D. buzzatii</i>	5	8	182	182	205	207	168	168	178	198		

<i>D. buzzatii</i>	5	9	182	182	207	211	164	164	188	194		
<i>D. buzzatii</i>	5	10	182	182	207	211	168	168	194	198		
<i>D. buzzatii</i>	5	11	182	192	207	211	164	164	194	198		
<i>D. buzzatii</i>	5	12	182	192	205	207	164	168	178	198		
<i>D. buzzatii</i>	5	13	182	182	205	207	156	168	178	198		
<i>D. buzzatii</i>	5	14	182	192	209	211	164	164	194	198		
<i>D. buzzatii</i>	5	15	182	192	205	209	164	168	178	188		
<i>D. buzzatii</i>	5	16	182	184	209	221	156	164	184	188		
<i>D. buzzatii</i>	5	17	182	182	205	209	168	168	178	198		
<i>D. buzzatii</i>	5	18	182	190	197	209	162	164	196	198		
<i>D. buzzatii</i>	5	19	182	192	207	211	164	168	194	198		
<i>D. buzzatii</i>	5	20	182	182	207	211	168	168	194	198		
<i>D. buzzatii</i>	5	21	182	182	209	211	168	168	188	194		
<i>D. buzzatii</i>	6	Madre	178	180	207	215	164	164	190	196		
<i>D. buzzatii</i>	6	1	180	182	211	215	162	164	186	196		
<i>D. buzzatii</i>	6	2	178	180	197	215	158	164	188	190		
<i>D. buzzatii</i>	6	3	180	180	197	207	158	164	188	196		
<i>D. buzzatii</i>	6	4	178	182	211	215	162	164	186	190		
<i>D. buzzatii</i>	6	5	178	180	207	211	158	164	186	196		
<i>D. buzzatii</i>	6	6	180	180	207	211	158	164	186	196		
<i>D. buzzatii</i>	6	7	178	182	197	207	162	164	188	190		
<i>D. buzzatii</i>	6	8	180	180	197	207	158	164	188	196		
<i>D. buzzatii</i>	6	9	180	182	211	215	162	164	186	196		
<i>D. buzzatii</i>	6	10	180	182	207	211	162	164	186	196		
<i>D. buzzatii</i>	6	11	180	180	197	215	158	164	188	196		
<i>D. buzzatii</i>	6	12	178	182	207	211	162	164	186	196		
<i>D. buzzatii</i>	6	13	178	180	207	211	158	164	186	196		
<i>D. buzzatii</i>	6	14	180	182	207	211	162	164	186	190		
<i>D. buzzatii</i>	6	15	178	182	211	215	162	164	186	190		
<i>D. buzzatii</i>	6	16	178	182	197	207	162	164	188	190		
<i>D. buzzatii</i>	6	17	178	180	211	215	158	164	186	190		
<i>D. buzzatii</i>	6	18	180	182	197	207	162	164	188	190		
<i>D. buzzatii</i>	6	19	178	182	207	211	162	164	186	196		
<i>D. buzzatii</i>	6	20	178	180	211	215	158	164	186	196		
<i>D. buzzatii</i>	6	21	178	180	197	207	158	164	188	196		
<i>D. buzzatii</i>	7	Madre	190	190	211	215	164	164	188	206		
<i>D. buzzatii</i>	7	1	190	192	215	221	154	164	190	206		
<i>D. buzzatii</i>	7	2	184	190	215	215	160	164	184	206		
<i>D. buzzatii</i>	7	3	178	190	197	215	156	164	184	188		
<i>D. buzzatii</i>	7	4	180	190	209	215	164	166	186	206		
<i>D. buzzatii</i>	7	5	178	190	215	215	156	164	184	188		
<i>D. buzzatii</i>	7	6	188	190	209	211	164	166	186	188		
<i>D. buzzatii</i>	7	7	188	190	215	219	164	166	196	206		
<i>D. buzzatii</i>	7	8	184	190	211	211	160	164	184	206		
<i>D. buzzatii</i>	7	9	188	190	209	215	164	166	186	206		

<i>D. buzzatii</i>	7	10	190	192	211	221	154	164	188	190		
<i>D. buzzatii</i>	7	11	184	190	215	221	158	164	188	190		
<i>D. buzzatii</i>	7	12	180	190	215	219	164	166	196	206		
<i>D. buzzatii</i>	7	13	190	192	211	221	154	164	188	190		
<i>D. buzzatii</i>	7	14	178	190	211	211	156	164	184	206		
<i>D. buzzatii</i>	7	15	184	190	205	215	160	164	184	206		
<i>D. buzzatii</i>	7	16	184	190	205	215	160	164	184	188		
<i>D. buzzatii</i>	7	17	184	190	197	211	160	164	184	188		
<i>D. buzzatii</i>	7	18	180	190	209	215	164	166	186	206		
<i>D. buzzatii</i>	7	19	180	190	211	219	164	166	188	196		
<i>D. buzzatii</i>	7	20	180	190	215	219	164	166	196	206		
<i>D. buzzatii</i>	7	21	180	190	211	219	164	166	188	196		
<i>D. buzzatii</i>	8	Madre	182	190	205	219	156	158	190	216		
<i>D. buzzatii</i>	8	1	186	190	205	219	158	164	216	218		
<i>D. buzzatii</i>	8	2	182	186	205	219	158	164	190	190		
<i>D. buzzatii</i>	8	3	176	190	219	219	158	164	216	218		
<i>D. buzzatii</i>	8	4	182	186	205	219	158	164	190	218		
<i>D. buzzatii</i>	8	5	176	190	205	219	158	164	190	218		
<i>D. buzzatii</i>	8	6	176	182	219	219	156	164	190	216		
<i>D. buzzatii</i>	8	7	176	190	219	219	158	164	190	216		
<i>D. buzzatii</i>	8	8	182	186	219	219	158	164	216	218		
<i>D. buzzatii</i>	8	9	186	190	205	219	158	164	190	218		
<i>D. buzzatii</i>	8	10	176	182	205	219	158	164	190	218		
<i>D. buzzatii</i>	8	11	182	186	205	219	156	164	190	218		
<i>D. buzzatii</i>	8	12	176	182	205	219	158	164	214	216		
<i>D. buzzatii</i>	8	13	176	190	219	219	158	164	190	216		
<i>D. buzzatii</i>	8	14	176	190	205	219	158	164	214	216		
<i>D. buzzatii</i>	8	15	186	190	205	219	158	164	190	216		
<i>D. buzzatii</i>	8	16	176	182	219	219	158	164	214	216		
<i>D. buzzatii</i>	8	17	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>D. buzzatii</i>	8	18	182	186	219	219	156	164	190	216		
<i>D. buzzatii</i>	8	19	176	190	205	219	158	164	216	218		
<i>D. buzzatii</i>	8	20	186	190	205	219	158	164	216	218		
<i>D. buzzatii</i>	8	21	186	190	219	219	158	164	214	216		
<i>D. buzzatii</i>	8	22	182	186	205	219	156	164	190	216		
<i>D. buzzatii</i>	9	Madre	184	188	211	223	166	166	206	210		
<i>D. buzzatii</i>	9	1	186	188	211	211	166	166	200	210		
<i>D. buzzatii</i>	9	2	188	192	211	223	158	166	200	206		
<i>D. buzzatii</i>	9	3	184	192	211	223	158	166	204	206		
<i>D. buzzatii</i>	9	4	184	192	211	223	158	166	200	210		
<i>D. buzzatii</i>	9	5	182	188	211	219	158	166	204	210		
<i>D. buzzatii</i>	9	6	188	192	211	223	158	166	200	206		
<i>D. buzzatii</i>	9	7	184	186	211	223	166	166	200	210		
<i>D. buzzatii</i>	9	8	184	186	211	223	166	166	200	210		
<i>D. buzzatii</i>	9	9	184	192	211	211	158	166	204	210		

<i>D. buzzatii</i>	9	10	188	192	211	211	158	166	204	210		
<i>D. buzzatii</i>	9	11	184	186	211	211	166	166	204	210		
<i>D. buzzatii</i>	9	12	184	186	211	211	166	166	204	206		
<i>D. buzzatii</i>	9	13	188	192	211	211	158	166	204	206		
<i>D. buzzatii</i>	9	14	184	186	211	211	166	166	200	210		
<i>D. buzzatii</i>	9	15	184	192	211	211	166	168	206	210		
<i>D. buzzatii</i>	9	16	184	184	211	211	156	166	190	210		
<i>D. buzzatii</i>	9	17	186	188	211	223	166	166	204	206		
<i>D. buzzatii</i>	9	18	188	192	211	211	158	166	200	210		
<i>D. buzzatii</i>	9	19	184	192	211	223	158	166	200	210		
<i>D. buzzatii</i>	9	20	184	192	211	223	158	166	200	206		
<i>D. buzzatii</i>	9	21	188	192	211	211	158	166	204	210		
<i>D. buzzatii</i>	10	Madre	184	184	205	215	160	164	202	228		
<i>D. buzzatii</i>	10	1	184	184	215	223	156	164	194	228		
<i>D. buzzatii</i>	10	2	184	184	205	223	156	160	194	202		
<i>D. buzzatii</i>	10	3	184	184	215	223	156	160	194	228		
<i>D. buzzatii</i>	10	4	184	184	197	215	160	164	176	202		
<i>D. buzzatii</i>	10	5	176	184	205	221	156	164	196	228		
<i>D. buzzatii</i>	10	6	184	190	205	223	164	164	194	202		
<i>D. buzzatii</i>	10	7	184	184	215	221	156	160	198	228		
<i>D. buzzatii</i>	10	8	184	184	205	221	156	160	198	202		
<i>D. buzzatii</i>	10	9	184	184	197	205	160	160	176	202		
<i>D. buzzatii</i>	10	10	184	184	205	221	156	164	198	202		
<i>D. buzzatii</i>	10	11	184	184	215	223	156	164	194	228		
<i>D. buzzatii</i>	10	12	184	184	205	223	156	160	194	202		
<i>D. buzzatii</i>	10	13	184	184	205	209	160	164	186	202		
<i>D. buzzatii</i>	10	14	184	184	197	205	160	160	176	202		
<i>D. buzzatii</i>	10	15	184	190	205	221	160	164	198	228		
<i>D. buzzatii</i>	10	16	184	184	205	209	160	164	186	202		
<i>D. buzzatii</i>	10	17	184	190	205	223	164	164	194	202		
<i>D. buzzatii</i>	10	18	184	184	197	205	160	164	176	202		
<i>D. buzzatii</i>	10	19	184	190	205	223	160	166	194	228		
<i>D. buzzatii</i>	10	20	184	184	215	223	156	164	194	228		
<i>D. buzzatii</i>	10	21	184	184	205	223	156	160	194	202		
<i>D. buzzatii</i>	10	22	184	190	215	221	160	166	198	228		
<i>D. buzzatii</i>	10	23	184	190	205	223	164	164	194	202		
<i>D. buzzatii</i>	11	Madre	180	184	219	225	162	166	180	200		
<i>D. buzzatii</i>	11	1	180	184	219	219	158	162	198	200		
<i>D. buzzatii</i>	11	2	180	184	219	225	162	162	180	198		
<i>D. buzzatii</i>	11	3	180	184	215	225	158	166	198	200		
<i>D. buzzatii</i>	11	4	180	184	215	225	162	166	180	198		
<i>D. buzzatii</i>	11	5	184	184	215	225	162	162	198	200		
<i>D. buzzatii</i>	11	6	184	184	219	219	162	162	180	198		
<i>D. buzzatii</i>	11	7	184	184	215	225	158	166	180	198		
<i>D. buzzatii</i>	11	8	180	184	215	219	158	162	180	198		

<i>D. buzzatii</i>	11	9	184	184	219	219	158	162	180	198		
<i>D. buzzatii</i>	11	10	180	184	219	219	162	166	180	198		
<i>D. buzzatii</i>	11	11	180	184	215	219	158	166	180	198		
<i>D. buzzatii</i>	11	12	180	184	215	225	158	166	198	200		
<i>D. buzzatii</i>	11	13	180	184	215	219	158	166	180	198		
<i>D. buzzatii</i>	11	14	184	184	219	219	158	162	180	198		
<i>D. buzzatii</i>	11	15	180	184	215	219	162	166	180	198		
<i>D. buzzatii</i>	11	16	184	184	215	215	158	162	198	200		
<i>D. buzzatii</i>	11	17	184	186	219	219	162	166	180	196		
<i>D. buzzatii</i>	11	18	180	182	225	225	162	164	196	200		
<i>D. buzzatii</i>	11	19	184	186	219	219	162	166	180	196		
<i>D. buzzatii</i>	11	20	180	184	219	225	158	162	198	200		
<i>D. buzzatii</i>	11	21	180	186	219	219	162	166	180	196		
<i>D. buzzatii</i>	11	22	184	184	215	225	158	162	180	198		
<i>D. buzzatii</i>	12	Madre	190	198	211	215	164	164	200	208		
<i>D. buzzatii</i>	12	1	190	190	211	215	160	164	186	210		
<i>D. buzzatii</i>	12	2	184	190	211	219	160	164	200	202		
<i>D. buzzatii</i>	12	3	198	198	215	219	160	164	202	210		
<i>D. buzzatii</i>	12	4	190	198	211	215	160	164	186	210		
<i>D. buzzatii</i>	12	5	184	198	209	211	160	164	200	204		
<i>D. buzzatii</i>	12	6	182	198	197	215	160	164	192	208		
<i>D. buzzatii</i>	12	7	182	198	197	211	160	164	192	200		
<i>D. buzzatii</i>	12	8	184	198	215	219	160	164	202	208		
<i>D. buzzatii</i>	12	9	196	198	211	219	160	164	200	202		
<i>D. buzzatii</i>	12	10	190	198	209	215	160	164	200	204		
<i>D. buzzatii</i>	12	11	182	198	215	215	160	164	208	210		
<i>D. buzzatii</i>	12	12	186	198	215	215	158	164	208	210		
<i>D. buzzatii</i>	12	13	190	198	209	215	160	164	204	210		
<i>D. buzzatii</i>	12	14	186	198	0	0	158	164	0	0		
<i>D. buzzatii</i>	12	15	196	198	211	219	160	164	202	210		
<i>D. buzzatii</i>	12	16	178	190	215	217	160	164	184	210		
<i>D. buzzatii</i>	12	17	190	198	211	217	164	164	184	210		
<i>D. buzzatii</i>	12	18	178	190	215	219	156	164	200	200		
<i>D. buzzatii</i>	12	19	178	198	211	217	164	164	184	210		
<i>D. buzzatii</i>	12	20	190	190	215	217	164	164	184	210		
<i>D. buzzatii</i>	12	21	190	190	211	211	164	164	186	200		
<i>D. buzzatii</i>	12	22	190	198	215	219	160	164	200	202		
<i>D. buzzatii</i>	13	Madre	184	196	221	221	162	168	190	200		
<i>D. buzzatii</i>	13	1	184	190	221	231	164	168	186	190		
<i>D. buzzatii</i>	13	2	190	196	221	221	164	168	188	190		
<i>D. buzzatii</i>	13	3	190	196	221	221	164	168	188	200		
<i>D. buzzatii</i>	13	4	192	196	221	231	160	162	186	200		
<i>D. buzzatii</i>	13	5	190	196	221	231	164	168	188	200		
<i>D. buzzatii</i>	13	6	184	190	221	221	164	168	188	190		
<i>D. buzzatii</i>	13	7	184	192	221	231	160	162	186	200		

<i>D. buzzatii</i>	13	8	190	196	221	231	164	168	186	200		
<i>D. buzzatii</i>	13	9	184	196	197	221	164	168	190	190		
<i>D. buzzatii</i>	13	10	186	196	197	221	162	164	190	190		
<i>D. buzzatii</i>	13	11	192	196	221	231	160	162	186	200		
<i>D. buzzatii</i>	13	12	184	192	211	221	160	162	188	200		
<i>D. buzzatii</i>	13	13	190	196	217	221	162	166	184	200		
<i>D. buzzatii</i>	13	14	184	196	221	223	162	168	190	196		
<i>D. buzzatii</i>	13	15	184	192	211	221	160	162	188	200		
<i>D. buzzatii</i>	13	16	184	192	211	221	160	162	188	190		
<i>D. buzzatii</i>	13	17	192	196	221	221	160	162	188	200		
<i>D. buzzatii</i>	13	18	184	190	221	221	162	164	188	190		
<i>D. buzzatii</i>	13	19	184	196	221	239	164	168	190	190		
<i>D. buzzatii</i>	13	20	190	196	211	221	164	168	190	200		
<i>D. buzzatii</i>	13	21	184	196	217	221	164	168	200	210		
<i>D. buzzatii</i>	14	Madre	184	184	213	215	156	166	184	196		
<i>D. buzzatii</i>	14	1	182	184	211	213	156	164	194	196		
<i>D. buzzatii</i>	14	2	184	190	205	213	156	160	190	196		
<i>D. buzzatii</i>	14	3	184	190	205	213	156	160	190	196		
<i>D. buzzatii</i>	14	4	182	184	205	213	156	164	190	196		
<i>D. buzzatii</i>	14	5	184	190	205	213	156	160	190	196		
<i>D. buzzatii</i>	14	6	182	184	205	215	156	164	190	196		
<i>D. buzzatii</i>	14	7	184	190	211	213	160	166	194	196		
<i>D. buzzatii</i>	14	8	184	184	211	213	164	166	184	194		
<i>D. buzzatii</i>	14	9	184	190	205	213	160	166	184	190		
<i>D. buzzatii</i>	14	10	182	184	211	213	164	166	184	194		
<i>D. buzzatii</i>	14	11	182	184	205	213	156	164	190	196		
<i>D. buzzatii</i>	14	12	182	184	205	215	164	166	184	190		
<i>D. buzzatii</i>	14	13	184	190	205	213	156	160	190	196		
<i>D. buzzatii</i>	14	14	182	184	211	215	156	164	184	194		
<i>D. buzzatii</i>	14	15	182	184	211	213	164	166	194	196		
<i>D. buzzatii</i>	14	16	184	190	205	213	156	160	190	196		
<i>D. buzzatii</i>	14	17	184	190	205	213	156	160	190	196		
<i>D. buzzatii</i>	14	18	184	190	205	215	160	166	184	190		
<i>D. buzzatii</i>	14	19	184	190	205	213	160	166	184	190		
<i>D. buzzatii</i>	14	20	184	190	205	213	156	160	190	196		
<i>D. buzzatii</i>	14	21	184	190	211	213	160	166	194	196		
<i>D. buzzatii</i>	15	Madre	182	188	187	221	162	162	190	194		
<i>D. buzzatii</i>	15	1	182	188	221	225	162	164	186	194		
<i>D. buzzatii</i>	15	2	180	188	187	225	162	164	186	194		
<i>D. buzzatii</i>	15	3	182	188	187	219	162	164	190	198		
<i>D. buzzatii</i>	15	4	180	182	221	225	162	164	186	190		
<i>D. buzzatii</i>	15	5	182	188	219	221	162	164	190	198		
<i>D. buzzatii</i>	15	6	182	182	187	219	162	164	194	198		
<i>D. buzzatii</i>	15	7	180	182	219	221	162	164	194	198		
<i>D. buzzatii</i>	15	8	182	182	187	225	162	164	186	194		

<i>D. buzzatii</i>	15	9	182	188	221	225	162	164	186	190		
<i>D. buzzatii</i>	15	10	180	188	187	225	162	164	186	194		
<i>D. buzzatii</i>	15	11	182	188	187	219	162	164	194	198		
<i>D. buzzatii</i>	15	12	182	188	219	221	162	164	190	198		
<i>D. buzzatii</i>	15	13	182	188	219	221	162	164	190	198		
<i>D. buzzatii</i>	15	14	180	182	221	225	162	164	186	190		
<i>D. buzzatii</i>	15	15	180	188	187	225	162	164	186	194		
<i>D. buzzatii</i>	15	16	182	182	219	221	162	164	190	198		
<i>D. buzzatii</i>	15	17	180	182	219	221	162	164	190	198		
<i>D. buzzatii</i>	15	18	182	182	221	225	162	164	186	190		
<i>D. buzzatii</i>	15	19	180	182	187	219	162	164	194	198		
<i>D. buzzatii</i>	15	20	180	188	187	225	162	164	186	190		
<i>D. buzzatii</i>	15	21	180	182	219	221	162	164	190	198		
<i>D. buzzatii</i>	16	Madre	180	184	207	227	156	162	196	208		
<i>D. buzzatii</i>	16	1	180	184	209	227	156	162	184	208		
<i>D. buzzatii</i>	16	2	180	188	209	227	156	164	184	196		
<i>D. buzzatii</i>	16	3	184	188	207	225	162	164	186	208		
<i>D. buzzatii</i>	16	4	184	188	209	227	162	164	184	196		
<i>D. buzzatii</i>	16	5	180	188	207	209	162	164	184	208		
<i>D. buzzatii</i>	16	6	182	184	197	207	162	166	184	196		
<i>D. buzzatii</i>	16	7	180	188	209	227	156	164	184	208		
<i>D. buzzatii</i>	16	8	180	184	225	227	156	162	186	196		
<i>D. buzzatii</i>	16	9	180	188	207	225	156	164	186	196		
<i>D. buzzatii</i>	16	10	180	182	197	207	156	156	184	196		
<i>D. buzzatii</i>	16	11	180	188	209	227	156	164	184	196		
<i>D. buzzatii</i>	16	12	182	184	211	227	162	166	192	196		
<i>D. buzzatii</i>	16	13	180	184	209	227	162	162	184	196		
<i>D. buzzatii</i>	16	14	182	184	207	211	156	162	192	208		
<i>D. buzzatii</i>	16	15	184	184	207	225	162	162	186	196		
<i>D. buzzatii</i>	16	16	184	184	225	227	162	162	186	196		
<i>D. buzzatii</i>	16	17	180	182	197	207	156	166	184	208		
<i>D. buzzatii</i>	16	18	182	184	197	207	156	162	184	208		
<i>D. buzzatii</i>	16	19	180	180	227	255	162	166	190	196		
<i>D. buzzatii</i>	16	20	184	184	207	209	162	162	184	208		
<i>D. buzzatii</i>	16	21	180	184	207	209	162	162	184	208		
<i>D. buzzatii</i>	17	Madre	180	186	209	211	164	164	184	190		
<i>D. buzzatii</i>	17	1	186	202	209	215	164	164	190	190		
<i>D. buzzatii</i>	17	2	186	202	211	215	164	164	190	190		
<i>D. buzzatii</i>	17	3	186	202	209	215	164	164	184	184		
<i>D. buzzatii</i>	17	4	176	186	211	215	164	164	184	184		
<i>D. buzzatii</i>	17	5	186	202	209	215	164	164	190	190		
<i>D. buzzatii</i>	17	6	186	202	209	211	164	164	186	190		
<i>D. buzzatii</i>	17	7	186	202	211	211	164	164	184	186		
<i>D. buzzatii</i>	17	8	178	186	211	211	164	164	186	190		
<i>D. buzzatii</i>	17	9	180	202	209	211	164	164	186	190		

<i>D. buzzatii</i>	17	10	186	202	211	215	164	164	190	190		
<i>D. buzzatii</i>	17	11	180	186	211	211	164	164	184	186		
<i>D. buzzatii</i>	17	12	178	186	209	215	164	164	190	190		
<i>D. buzzatii</i>	17	13	180	186	209	211	164	164	186	190		
<i>D. buzzatii</i>	17	14	186	202	209	215	164	164	190	190		
<i>D. buzzatii</i>	17	15	180	202	211	215	164	164	190	190		
<i>D. buzzatii</i>	17	16	186	202	209	215	164	164	190	190		
<i>D. buzzatii</i>	17	17	180	202	209	211	164	164	186	190		
<i>D. buzzatii</i>	17	18	186	202	211	215	164	164	184	184		
<i>D. buzzatii</i>	17	19	186	202	211	211	164	164	184	186		
<i>D. buzzatii</i>	17	20	180	202	211	215	164	164	190	190		
<i>D. buzzatii</i>	17	21	180	186	209	215	164	164	190	190		
<i>D. buzzatii</i>	18	Madre	182	188	205	229	158	162	190	204		
<i>D. buzzatii</i>	18	1	180	188	219	229	158	164	188	190		
<i>D. buzzatii</i>	18	2	180	188	197	205	162	166	184	190		
<i>D. buzzatii</i>	18	3	180	188	219	229	158	166	188	204		
<i>D. buzzatii</i>	18	4	180	188	197	205	158	162	184	190		
<i>D. buzzatii</i>	18	5	180	182	197	229	162	164	184	204		
<i>D. buzzatii</i>	18	6	180	182	197	205	162	166	184	190		
<i>D. buzzatii</i>	18	7	180	182	197	229	158	166	184	190		
<i>D. buzzatii</i>	18	8	180	188	205	219	162	164	188	190		
<i>D. buzzatii</i>	18	9	180	188	197	205	162	164	184	190		
<i>D. buzzatii</i>	18	10	180	188	197	229	158	166	184	204		
<i>D. buzzatii</i>	18	11	180	188	219	229	158	166	188	190		
<i>D. buzzatii</i>	18	12	180	182	205	219	162	164	188	190		
<i>D. buzzatii</i>	18	13	180	182	197	229	158	166	184	190		
<i>D. buzzatii</i>	18	14	180	182	219	229	162	164	188	204		
<i>D. buzzatii</i>	18	15	180	182	197	205	158	164	184	204		
<i>D. buzzatii</i>	18	16	180	188	197	205	162	164	184	204		
<i>D. buzzatii</i>	18	17	180	182	205	219	162	166	188	190		
<i>D. buzzatii</i>	18	18	180	182	197	205	162	164	184	190		
<i>D. buzzatii</i>	18	19	180	188	197	205	158	166	184	204		
<i>D. buzzatii</i>	19	Madre	180	188	209	211	166	168	186	200		
<i>D. buzzatii</i>	19	1	188	188	209	225	166	168	200	204		
<i>D. buzzatii</i>	19	2	184	188	211	219	158	168	186	200		
<i>D. buzzatii</i>	19	3	180	184	211	225	158	168	186	204		
<i>D. buzzatii</i>	19	4	180	182	205	211	164	168	188	200		
<i>D. buzzatii</i>	19	5	188	188	211	225	166	166	186	204		
<i>D. buzzatii</i>	19	6	180	184	211	225	158	166	186	204		
<i>D. buzzatii</i>	19	7	184	188	209	219	158	168	200	200		
<i>D. buzzatii</i>	19	8	188	188	209	225	166	168	200	204		
<i>D. buzzatii</i>	19	9	184	188	209	225	158	168	200	204		
<i>D. buzzatii</i>	19	10	184	188	209	219	158	166	200	200		
<i>D. buzzatii</i>	19	11	180	184	211	219	158	168	186	200		
<i>D. buzzatii</i>	19	12	178	188	209	219	166	166	200	200		

<i>D. buzzatii</i>	19	13	184	188	211	225	158	168	200	204		
<i>D. buzzatii</i>	19	14	178	188	209	225	166	166	186	204		
<i>D. buzzatii</i>	19	15	184	188	211	225	158	168	186	204		
<i>D. buzzatii</i>	19	16	188	188	211	219	166	166	186	200		
<i>D. buzzatii</i>	19	17	180	188	209	225	166	166	200	204		
<i>D. buzzatii</i>	19	18	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>D. buzzatii</i>	20	Madre	188	188	205	219	156	160	192	196		
<i>D. buzzatii</i>	20	1	182	188	205	211	160	164	184	196		
<i>D. buzzatii</i>	20	2	188	190	219	219	160	164	196	206		
<i>D. buzzatii</i>	20	3	188	188	205	215	156	156	190	196		
<i>D. buzzatii</i>	20	4	182	188	219	219	160	164	194	196		
<i>D. buzzatii</i>	20	5	188	190	219	219	156	164	194	196		
<i>D. buzzatii</i>	20	6	182	188	219	219	160	164	196	206		
<i>D. buzzatii</i>	20	7	188	190	205	219	156	164	196	206		
<i>D. buzzatii</i>	20	8	188	190	205	219	156	164	192	194		
<i>D. buzzatii</i>	20	9	182	188	205	219	160	164	192	194		
<i>D. buzzatii</i>	20	10	188	190	205	219	160	164	192	206		
<i>D. buzzatii</i>	20	11	182	188	219	219	156	164	194	196		
<i>D. buzzatii</i>	20	12	178	188	205	219	156	162	192	198		
<i>D. buzzatii</i>	20	13	182	188	219	219	160	164	194	196		
<i>D. buzzatii</i>	20	14	188	190	219	219	156	164	194	196		
<i>D. buzzatii</i>	20	15	182	188	205	219	156	164	194	196		
<i>D. buzzatii</i>	20	16	188	190	205	219	156	164	192	194		
<i>D. buzzatii</i>	20	17	182	188	219	219	156	164	196	206		
<i>D. koepferae</i>	1	Madre	184	184	217	221	170	180	166	200	457	457
<i>D. koepferae</i>	1	1	184	184	217	221	170	182	200	210	457	457
<i>D. koepferae</i>	1	2	184	184	217	221	170	176	200	210	457	457
<i>D. koepferae</i>	1	3	184	184	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	1	4	184	184	217	221	176	180	200	210	453	457
<i>D. koepferae</i>	1	5	184	184	209	221	176	180	200	220	457	457
<i>D. koepferae</i>	1	6	184	184	209	221	180	182	200	220	453	457
<i>D. koepferae</i>	1	7	184	184	209	217	180	182	166	220	457	457
<i>D. koepferae</i>	1	8	184	184	209	221	180	182	200	220	453	457
<i>D. koepferae</i>	1	9	184	184	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	1	10	184	184	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	1	11	184	184	209	221	170	182	200	220	453	457
<i>D. koepferae</i>	1	12	184	184	217	221	180	182	200	210	457	457
<i>D. koepferae</i>	1	13	184	184	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	1	14	184	184	209	217	180	182	166	220	453	457
<i>D. koepferae</i>	1	15	184	184	209	217	180	182	166	220	453	457
<i>D. koepferae</i>	1	16	184	184	0	0	170	182	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	1	17	184	184	209	217	170	182	166	220	453	457
<i>D. koepferae</i>	1	18	184	184	209	221	170	182	200	220	457	457
<i>D. koepferae</i>	1	19	184	184	209	221	180	182	200	220	453	457
<i>D. koepferae</i>	1	20	184	184	217	221	180	182	200	210	453	457

<i>D. koepferae</i>	2	Madre	184	184	201	217	176	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	2	1	184	184	201	217	170	180	166	208	453	453
<i>D. koepferae</i>	2	2	184	184	199	201	180	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	2	3	184	184	199	217	180	180	166	166	0	0
<i>D. koepferae</i>	2	4	184	184	201	217	180	180	166	208	457	457
<i>D. koepferae</i>	2	5	184	184	201	217	170	180	166	208	457	457
<i>D. koepferae</i>	2	6	184	184	201	217	176	178	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	2	7	184	184	201	217	170	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	2	8	184	184	217	217	170	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	2	9	184	184	201	217	170	180	166	166	453	453
<i>D. koepferae</i>	2	10	184	184	201	217	170	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	2	11	184	184	199	217	176	178	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	2	12	184	184	217	217	178	180	166	190	453	453
<i>D. koepferae</i>	2	13	184	184	201	217	170	180	166	208	453	453
<i>D. koepferae</i>	2	14	184	184	201	217	170	180	166	208	453	453
<i>D. koepferae</i>	2	15	184	184	217	217	180	180	166	208	457	457
<i>D. koepferae</i>	2	16	184	184	199	217	180	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	2	17	184	184	217	217	178	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	2	18	184	184	201	217	170	180	166	208	453	453
<i>D. koepferae</i>	2	19	184	184	217	217	180	180	166	190	457	457
<i>D. koepferae</i>	2	20	184	184	201	217	176	178	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	2	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	2	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>D. koepferae</i>	2	23	184	184	201	217	170	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	3	Madre	184	184	217	221	176	178	166	198	453	457
<i>D. koepferae</i>	3	1	184	184	217	221	176	178	166	198	453	453
<i>D. koepferae</i>	3	2	142	184	217	217	178	186	166	166	453	453
<i>D. koepferae</i>	3	3	184	184	201	221	176	176	198	204	453	453
<i>D. koepferae</i>	3	4	184	184	201	217	176	176	166	204	453	457
<i>D. koepferae</i>	3	5	184	184	201	217	176	186	166	204	453	453
<i>D. koepferae</i>	3	6	184	184	201	217	176	176	166	204	453	453
<i>D. koepferae</i>	3	7	184	184	201	221	178	186	198	204	453	453
<i>D. koepferae</i>	3	8	184	184	217	221	176	176	166	198	453	453
<i>D. koepferae</i>	3	9	184	184	201	221	176	176	198	204	453	457
<i>D. koepferae</i>	3	10	184	184	201	221	176	176	198	204	453	453
<i>D. koepferae</i>	3	11	184	184	217	221	176	176	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	3	12	184	184	201	217	176	176	166	204	453	457
<i>D. koepferae</i>	3	13	184	184	201	217	176	176	166	204	453	457
<i>D. koepferae</i>	3	14	184	184	217	217	178	186	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	3	15	142	184	217	217	178	186	166	166	453	453
<i>D. koepferae</i>	3	16	184	184	201	221	176	176	198	204	453	457
<i>D. koepferae</i>	3	17	184	184	217	217	176	178	166	166	453	453
<i>D. koepferae</i>	3	18	184	184	201	221	176	176	198	204	453	453
<i>D. koepferae</i>	3	19	184	184	201	217	176	186	166	204	453	457
<i>D. koepferae</i>	3	20	184	184	201	217	176	176	166	204	453	453

<i>D. koepferae</i>	3	21	142	184	217	217	176	186	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	3	22	184	184	217	221	176	178	166	204	453	457
<i>D. koepferae</i>	4	Madre	142	174	207	209	180	182	202	204	457	457
<i>D. koepferae</i>	4	1	142	184	207	209	178	180	198	202	457	457
<i>D. koepferae</i>	4	2	174	184	209	209	178	182	198	202	453	457
<i>D. koepferae</i>	4	3	142	184	207	209	180	182	166	202	457	457
<i>D. koepferae</i>	4	4	174	184	207	217	178	180	166	204	453	457
<i>D. koepferae</i>	4	5	142	184	209	217	178	182	166	202	457	457
<i>D. koepferae</i>	4	6	142	184	207	209	178	180	198	202	453	457
<i>D. koepferae</i>	4	7	142	184	209	217	178	180	166	202	453	457
<i>D. koepferae</i>	4	8	142	184	207	217	178	180	166	204	457	457
<i>D. koepferae</i>	4	9	174	184	207	209	176	180	198	204	453	457
<i>D. koepferae</i>	4	10	174	184	207	209	176	182	198	202	457	457
<i>D. koepferae</i>	4	11	174	184	207	209	176	180	198	204	457	457
<i>D. koepferae</i>	4	12	142	184	209	217	178	182	166	204	457	457
<i>D. koepferae</i>	4	13	142	184	209	209	178	182	198	204	453	457
<i>D. koepferae</i>	4	14	174	184	209	217	178	182	166	204	457	457
<i>D. koepferae</i>	4	15	174	184	207	207	176	180	198	204	457	457
<i>D. koepferae</i>	4	16	174	184	209	209	178	180	198	202	457	457
<i>D. koepferae</i>	4	17	142	184	209	217	178	182	166	202	453	457
<i>D. koepferae</i>	4	18	142	184	209	217	176	180	166	204	457	457
<i>D. koepferae</i>	4	19	174	184	207	217	176	180	166	204	457	457
<i>D. koepferae</i>	4	20	142	184	209	209	176	182	198	202	453	457
<i>D. koepferae</i>	4	21	142	184	209	209	178	182	198	204	457	457
<i>D. koepferae</i>	4	22	142	184	209	217	176	182	166	204	457	457
<i>D. koepferae</i>	4	23	142	184	207	209	178	182	198	204	457	457
<i>D. koepferae</i>	5	Madre	184	184	217	217	178	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	5	1	174	184	207	217	178	178	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	5	2	174	184	217	221	178	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	5	3	174	184	217	221	180	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	5	4	184	184	217	221	178	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	5	5	184	184	207	217	178	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	5	6	174	184	217	221	178	178	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	5	7	184	184	207	217	180	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	5	8	184	184	217	221	178	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	5	9	174	184	207	217	178	178	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	5	10	174	184	217	221	178	178	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	5	11	184	184	207	217	180	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	5	12	174	184	217	221	178	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	5	13	184	184	217	221	178	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	5	14	174	184	207	217	178	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	5	15	184	184	217	221	178	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	5	16	184	184	207	217	180	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	5	17	174	184	207	217	178	178	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	5	18	174	184	207	217	180	180	166	166	457	457

<i>D. koepferae</i>	5	19	174	184	217	221	178	178	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	6	Madre	184	184	217	217	162	176	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	6	1	184	184	217	217	162	164	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	6	2	184	184	205	217	162	164	166	200	453	457
<i>D. koepferae</i>	6	3	184	184	217	217	162	164	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	6	4	184	184	205	217	176	176	166	200	457	457
<i>D. koepferae</i>	6	5	184	184	205	217	164	176	166	200	457	457
<i>D. koepferae</i>	6	6	184	184	205	217	162	164	166	200	453	457
<i>D. koepferae</i>	6	7	184	184	217	217	162	164	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	6	8	184	184	217	217	176	176	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	6	9	184	184	217	217	162	176	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	6	10	184	184	217	217	162	164	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	6	11	184	184	205	217	164	176	166	200	453	457
<i>D. koepferae</i>	6	12	184	184	217	217	176	176	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	6	13	184	184	217	217	176	176	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	6	14	184	184	217	217	162	176	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	6	15	184	184	217	217	162	164	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	6	16	184	184	217	217	164	176	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	6	17	184	184	205	217	162	164	166	200	457	457
<i>D. koepferae</i>	6	18	184	184	217	217	162	176	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	6	19	184	184	217	217	164	176	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	6	20	184	184	205	217	164	176	166	200	0	0
<i>D. koepferae</i>	7	Madre	184	184	217	217	178	180	166	208	457	457
<i>D. koepferae</i>	7	1	184	184	217	217	180	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	7	2	184	184	217	217	178	180	166	208	457	459
<i>D. koepferae</i>	7	3	184	184	209	217	176	180	166	208	457	457
<i>D. koepferae</i>	7	4	184	184	217	217	176	180	166	208	457	459
<i>D. koepferae</i>	7	5	184	184	217	217	180	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	7	6	184	184	209	217	176	180	166	166	457	459
<i>D. koepferae</i>	7	7	184	184	217	217	180	180	166	208	457	459
<i>D. koepferae</i>	7	8	184	184	217	217	178	180	166	166	457	459
<i>D. koepferae</i>	7	9	184	184	209	217	178	180	166	166	457	459
<i>D. koepferae</i>	7	10	184	184	217	217	176	180	166	166	457	459
<i>D. koepferae</i>	7	11	184	184	217	217	176	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	7	12	184	184	209	217	176	178	166	166	457	459
<i>D. koepferae</i>	7	13	184	184	209	217	180	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	7	14	184	184	209	217	180	180	166	208	457	457
<i>D. koepferae</i>	7	15	184	184	209	217	176	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	7	16	184	184	217	217	178	180	166	166	457	459
<i>D. koepferae</i>	7	17	184	184	209	217	178	180	166	208	457	457
<i>D. koepferae</i>	7	18	184	184	209	217	176	178	166	208	457	459
<i>D. koepferae</i>	7	19	184	184	209	217	176	180	166	166	457	459
<i>D. koepferae</i>	7	20	184	184	209	217	176	178	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	7	21	184	184	209	217	180	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	7	22	184	184	217	217	178	180	166	208	457	457

<i>D. koepferae</i>	8	Madre	184	184	217	217	176	176	166	166	453	461
<i>D. koepferae</i>	8	1	184	184	209	217	176	176	166	206	453	461
<i>D. koepferae</i>	8	2	184	184	211	217	176	176	166	198	461	461
<i>D. koepferae</i>	8	3	184	184	209	217	176	180	166	206	461	461
<i>D. koepferae</i>	8	4	184	184	209	217	176	180	166	206	453	461
<i>D. koepferae</i>	8	5	184	184	211	217	176	180	166	198	461	461
<i>D. koepferae</i>	8	6	184	184	209	217	176	180	166	206	453	461
<i>D. koepferae</i>	8	7	184	184	211	217	176	176	166	198	461	461
<i>D. koepferae</i>	8	8	184	184	211	217	176	180	166	198	461	461
<i>D. koepferae</i>	8	9	184	184	211	217	176	176	166	198	461	461
<i>D. koepferae</i>	8	10	184	184	209	217	176	176	166	206	453	461
<i>D. koepferae</i>	8	11	184	184	209	217	176	180	166	206	453	461
<i>D. koepferae</i>	8	12	184	184	217	221	176	176	166	166	453	461
<i>D. koepferae</i>	8	13	184	184	211	217	176	176	166	198	453	461
<i>D. koepferae</i>	8	14	184	184	211	217	176	176	166	198	461	461
<i>D. koepferae</i>	8	15	184	184	211	217	176	176	166	198	461	461
<i>D. koepferae</i>	8	16	184	184	211	217	176	180	166	198	453	461
<i>D. koepferae</i>	8	17	184	184	209	217	176	176	166	206	461	461
<i>D. koepferae</i>	9	Madre	184	184	207	213	176	180	166	202	457	457
<i>D. koepferae</i>	9	1	184	184	213	215	176	176	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	9	2	184	184	207	215	176	176	202	202	457	457
<i>D. koepferae</i>	9	3	184	184	207	207	176	180	202	206	457	457
<i>D. koepferae</i>	9	4	184	184	213	217	180	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	9	5	184	184	207	213	176	176	166	206	453	457
<i>D. koepferae</i>	9	6	184	184	207	213	176	176	166	206	453	457
<i>D. koepferae</i>	9	7	184	184	213	217	176	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	9	8	184	184	213	221	176	180	166	216	457	457
<i>D. koepferae</i>	9	9	184	184	207	207	176	176	202	206	453	457
<i>D. koepferae</i>	9	10	184	184	207	217	176	180	166	202	453	457
<i>D. koepferae</i>	9	11	184	184	207	215	176	176	202	202	453	457
<i>D. koepferae</i>	9	12	184	184	213	215	176	176	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	9	13	184	184	207	215	176	180	202	202	453	457
<i>D. koepferae</i>	9	14	184	184	207	207	176	180	202	206	453	457
<i>D. koepferae</i>	9	15	184	184	207	221	180	180	202	216	457	457
<i>D. koepferae</i>	9	16	184	184	207	207	176	176	202	206	457	457
<i>D. koepferae</i>	9	17	184	184	213	215	176	176	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	9	18	184	184	207	213	176	176	166	206	453	457
<i>D. koepferae</i>	9	19	184	184	213	221	176	180	166	216	453	457
<i>D. koepferae</i>	9	20	184	184	213	221	176	180	166	216	453	457
<i>D. koepferae</i>	9	21	184	184	213	215	176	176	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	10	Madre	184	184	217	217	176	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	10	1	174	184	217	217	174	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	10	2	174	184	217	217	176	176	166	166	453	453
<i>D. koepferae</i>	10	3	174	184	217	217	176	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	10	4	174	184	217	217	174	176	166	166	453	457

<i>D. koepferae</i>	10	5	174	184	217	217	174	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	10	6	174	184	217	217	174	180	166	166	453	453
<i>D. koepferae</i>	10	7	174	184	217	217	176	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	10	8	174	184	217	217	176	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	10	9	174	184	217	217	174	180	166	166	453	453
<i>D. koepferae</i>	10	10	174	184	217	217	176	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	10	11	174	184	217	217	174	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	10	12	174	184	217	217	176	176	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	10	13	174	184	217	217	176	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	10	14	174	184	217	217	176	176	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	10	15	174	184	217	217	174	180	166	166	453	453
<i>D. koepferae</i>	10	16	174	184	217	217	174	176	166	166	0	0
<i>D. koepferae</i>	10	17	174	184	217	217	176	180	166	166	453	453
<i>D. koepferae</i>	10	18	174	184	217	217	176	180	166	166	453	453
<i>D. koepferae</i>	10	19	174	184	217	217	174	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	10	20	174	184	217	217	174	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	10	21	174	184	217	217	174	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	10	22	174	184	217	217	174	176	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	11	Madre	184	184	209	217	176	180	166	216	453	457
<i>D. koepferae</i>	11	1	184	184	207	209	180	180	202	216	457	457
<i>D. koepferae</i>	11	2	184	184	209	217	176	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	11	3	184	184	207	209	176	176	202	216	453	455
<i>D. koepferae</i>	11	4	184	184	207	209	176	180	202	216	457	457
<i>D. koepferae</i>	11	5	184	184	209	217	176	180	166	216	455	457
<i>D. koepferae</i>	11	6	184	184	209	217	176	180	166	216	453	455
<i>D. koepferae</i>	11	7	184	184	209	217	180	180	166	216	457	457
<i>D. koepferae</i>	11	8	184	184	207	209	176	176	202	216	457	457
<i>D. koepferae</i>	11	9	184	184	207	209	180	180	202	216	453	455
<i>D. koepferae</i>	11	10	184	184	207	217	176	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	11	11	184	184	207	217	176	176	166	166	453	455
<i>D. koepferae</i>	11	12	184	184	209	217	176	176	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	11	13	184	184	209	217	176	180	166	216	455	457
<i>D. koepferae</i>	11	14	184	184	209	217	176	180	166	216	453	455
<i>D. koepferae</i>	11	15	184	184	207	217	176	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	11	16	184	184	209	217	176	180	166	216	453	457
<i>D. koepferae</i>	11	17	184	184	207	209	176	176	202	216	453	455
<i>D. koepferae</i>	11	18	184	184	209	217	180	180	166	216	455	457
<i>D. koepferae</i>	11	19	184	184	207	217	176	176	166	202	453	455
<i>D. koepferae</i>	11	20	184	184	207	217	176	180	166	202	455	457
<i>D. koepferae</i>	11	21	184	184	207	217	180	180	166	202	453	457
<i>D. koepferae</i>	11	22	184	184	207	209	176	176	202	216	457	457
<i>D. koepferae</i>	11	23	184	184	207	217	180	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	12	Madre	184	184	205	217	180	180	166	210	453	457
<i>D. koepferae</i>	12	1	184	184	207	217	180	180	166	204	453	457
<i>D. koepferae</i>	12	2	184	184	205	207	180	180	204	210	457	457

<i>D. koepferae</i>	12	3	184	184	205	217	180	180	166	210	453	453
<i>D. koepferae</i>	12	4	184	184	207	217	180	180	166	204	453	453
<i>D. koepferae</i>	12	5	184	184	207	217	180	180	166	204	457	457
<i>D. koepferae</i>	12	6	184	184	205	217	180	180	166	210	453	453
<i>D. koepferae</i>	12	7	184	184	207	217	180	180	166	204	453	457
<i>D. koepferae</i>	12	8	184	184	207	217	180	180	166	204	453	457
<i>D. koepferae</i>	12	9	184	184	217	217	180	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	12	10	184	184	207	217	180	180	166	204	457	457
<i>D. koepferae</i>	12	11	184	184	205	217	180	180	166	210	457	457
<i>D. koepferae</i>	12	12	184	184	209	217	178	180	166	224	453	453
<i>D. koepferae</i>	12	13	184	184	205	209	178	180	210	224	453	457
<i>D. koepferae</i>	12	14	184	184	207	217	180	180	166	204	453	453
<i>D. koepferae</i>	12	15	184	184	217	217	180	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	12	16	184	184	205	207	180	180	204	210	453	457
<i>D. koepferae</i>	12	17	184	184	217	217	180	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	12	18	184	184	207	217	180	180	166	204	457	457
<i>D. koepferae</i>	13	Madre	184	184	207	217	176	178	166	226	453	457
<i>D. koepferae</i>	13	1	184	184	217	217	176	176	166	166	453	453
<i>D. koepferae</i>	13	2	184	184	215	217	178	182	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	13	3	184	184	207	217	176	182	202	226	457	461
<i>D. koepferae</i>	13	4	184	184	215	217	176	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	13	5	184	184	217	217	176	180	166	166	453	453
<i>D. koepferae</i>	13	6	184	184	207	215	176	180	166	226	453	457
<i>D. koepferae</i>	13	7	184	184	207	217	176	180	166	226	453	457
<i>D. koepferae</i>	13	8	184	184	217	217	176	176	166	166	453	453
<i>D. koepferae</i>	13	9	184	184	207	217	176	176	202	226	453	457
<i>D. koepferae</i>	13	10	184	184	217	217	178	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	13	11	184	184	217	217	176	176	166	166	453	461
<i>D. koepferae</i>	13	12	184	184	207	217	176	178	166	202	453	457
<i>D. koepferae</i>	13	13	184	184	215	217	176	180	166	166	453	453
<i>D. koepferae</i>	13	14	184	184	215	217	176	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	13	15	184	184	207	215	176	182	166	226	453	457
<i>D. koepferae</i>	13	16	184	184	217	217	178	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	13	17	184	184	207	215	176	182	166	226	453	453
<i>D. koepferae</i>	13	18	184	184	207	217	176	182	166	226	457	461
<i>D. koepferae</i>	13	19	184	184	207	217	176	176	166	226	453	457
<i>D. koepferae</i>	13	20	184	184	207	217	176	182	202	226	457	461
<i>D. koepferae</i>	13	21	184	184	207	217	178	182	166	226	453	457
<i>D. koepferae</i>	13	22	184	184	217	217	176	182	166	166	457	461
<i>D. koepferae</i>	13	23	184	184	217	217	178	182	166	166	457	461
<i>D. koepferae</i>	14	Madre	184	184	207	217	152	176	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	14	1	184	184	207	217	176	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	14	2	184	184	207	217	176	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	14	3	184	184	217	217	176	176	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	14	4	184	184	217	217	152	176	166	166	453	457

<i>D. koepferae</i>	14	5	184	184	207	217	176	180	166	204	457	457
<i>D. koepferae</i>	14	6	184	184	217	217	152	176	166	204	457	457
<i>D. koepferae</i>	14	7	184	184	207	217	152	180	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	14	8	184	184	217	217	152	176	166	204	453	457
<i>D. koepferae</i>	14	9	184	184	207	217	152	176	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	14	10	184	184	207	217	152	180	166	204	453	457
<i>D. koepferae</i>	14	11	184	184	207	217	152	176	166	204	457	457
<i>D. koepferae</i>	14	12	184	184	217	217	176	176	166	204	457	457
<i>D. koepferae</i>	14	13	184	184	217	217	152	176	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	14	14	184	184	207	217	176	180	166	204	457	457
<i>D. koepferae</i>	14	15	184	184	217	217	176	180	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	14	16	184	184	217	217	176	176	166	204	457	457
<i>D. koepferae</i>	14	17	184	184	217	217	176	176	166	166	457	457
<i>D. koepferae</i>	14	18	184	184	207	217	152	176	166	204	453	457
<i>D. koepferae</i>	14	19	184	184	207	217	176	176	166	166	453	457
<i>D. koepferae</i>	14	20	184	184	207	217	176	180	166	204	453	457
<i>D. koepferae</i>	14	21	184	184	207	217	176	176	166	166	453	457

Tabla 9.3. Fecundidad de cada hembra inseminada por uno y dos machos incluida en los análisis de costo de la competencia espermática.

Especie	Isolínea	Apareamientos	Individuo	Fecundidad
<i>D. antonietae</i>	DA1	2	1	89
<i>D. antonietae</i>	DA1	2	2	132
<i>D. antonietae</i>	DA1	2	3	121
<i>D. antonietae</i>	DA1	2	4	199
<i>D. antonietae</i>	DA1	2	5	78
<i>D. antonietae</i>	DA1	1	1	54
<i>D. antonietae</i>	DA1	1	2	177
<i>D. antonietae</i>	DA1	1	3	95
<i>D. antonietae</i>	DA1	1	4	97
<i>D. antonietae</i>	DA1	1	5	62
<i>D. antonietae</i>	DA2	2	1	111
<i>D. antonietae</i>	DA2	2	2	130
<i>D. antonietae</i>	DA2	2	3	33
<i>D. antonietae</i>	DA2	2	4	107
<i>D. antonietae</i>	DA2	2	5	79
<i>D. antonietae</i>	DA2	1	1	58
<i>D. antonietae</i>	DA2	1	2	90
<i>D. antonietae</i>	DA2	1	3	44
<i>D. antonietae</i>	DA2	1	4	101
<i>D. antonietae</i>	DA2	1	5	129

<i>D. antonietae</i>	DA3	2	1	95
<i>D. antonietae</i>	DA3	2	2	148
<i>D. antonietae</i>	DA3	2	3	34
<i>D. antonietae</i>	DA3	2	4	14
<i>D. antonietae</i>	DA3	2	5	149
<i>D. antonietae</i>	DA3	1	1	160
<i>D. antonietae</i>	DA3	1	2	11
<i>D. antonietae</i>	DA3	1	3	31
<i>D. antonietae</i>	DA3	1	4	137
<i>D. antonietae</i>	DA3	1	5	96
<i>D. buzzatii</i>	DB1	2	1	210
<i>D. buzzatii</i>	DB1	2	2	160
<i>D. buzzatii</i>	DB1	2	3	89
<i>D. buzzatii</i>	DB1	2	4	72
<i>D. buzzatii</i>	DB1	2	5	188
<i>D. buzzatii</i>	DB1	2	6	184
<i>D. buzzatii</i>	DB1	2	7	95
<i>D. buzzatii</i>	DB1	2	8	125
<i>D. buzzatii</i>	DB1	2	9	55
<i>D. buzzatii</i>	DB1	2	10	97
<i>D. buzzatii</i>	DB1	2	11	75
<i>D. buzzatii</i>	DB1	2	12	32
<i>D. buzzatii</i>	DB1	1	1	51
<i>D. buzzatii</i>	DB1	1	2	17
<i>D. buzzatii</i>	DB1	1	3	33
<i>D. buzzatii</i>	DB1	1	4	109
<i>D. buzzatii</i>	DB1	1	5	18
<i>D. buzzatii</i>	DB1	1	6	54
<i>D. buzzatii</i>	DB1	1	7	30
<i>D. buzzatii</i>	DB1	1	8	37
<i>D. buzzatii</i>	DB1	1	9	94
<i>D. buzzatii</i>	DB1	1	10	143
<i>D. buzzatii</i>	DB1	1	11	12
<i>D. buzzatii</i>	DB1	1	12	78
<i>D. buzzatii</i>	DB1	1	13	48
<i>D. buzzatii</i>	DB1	1	14	122
<i>D. buzzatii</i>	DB1	1	15	35
<i>D. buzzatii</i>	DB1	1	16	40
<i>D. buzzatii</i>	DB1	1	17	20

<i>D. buzzatii</i>	DB1	1	18	44
<i>D. buzzatii</i>	DB1	1	19	118
<i>D. buzzatii</i>	DB1	1	20	21
<i>D. buzzatii</i>	DB2	2	1	183
<i>D. buzzatii</i>	DB2	2	2	122
<i>D. buzzatii</i>	DB2	2	3	98
<i>D. buzzatii</i>	DB2	2	4	214
<i>D. buzzatii</i>	DB2	2	5	242
<i>D. buzzatii</i>	DB2	2	6	44
<i>D. buzzatii</i>	DB2	2	7	143
<i>D. buzzatii</i>	DB2	2	8	178
<i>D. buzzatii</i>	DB2	2	9	167
<i>D. buzzatii</i>	DB2	2	10	189
<i>D. buzzatii</i>	DB2	2	11	223
<i>D. buzzatii</i>	DB2	1	1	260
<i>D. buzzatii</i>	DB2	1	2	39
<i>D. buzzatii</i>	DB2	1	3	202
<i>D. buzzatii</i>	DB2	1	4	226
<i>D. buzzatii</i>	DB2	1	5	163
<i>D. buzzatii</i>	DB2	1	6	140
<i>D. buzzatii</i>	DB2	1	7	211
<i>D. buzzatii</i>	DB2	1	8	66
<i>D. buzzatii</i>	DB2	1	9	211
<i>D. buzzatii</i>	DB2	1	10	126
<i>D. buzzatii</i>	DB2	1	11	230
<i>D. buzzatii</i>	DB2	1	12	154
<i>D. buzzatii</i>	DB2	1	13	64
<i>D. buzzatii</i>	DB2	1	14	161
<i>D. buzzatii</i>	DB2	1	15	135
<i>D. buzzatii</i>	DB2	1	16	250
<i>D. buzzatii</i>	DB2	1	17	147
<i>D. buzzatii</i>	DB2	1	18	14
<i>D. buzzatii</i>	DB2	1	19	165
<i>D. buzzatii</i>	DB2	1	20	87
<i>D. buzzatii</i>	DB3	2	1	99
<i>D. buzzatii</i>	DB3	2	2	40
<i>D. buzzatii</i>	DB3	2	3	46
<i>D. buzzatii</i>	DB3	2	4	120
<i>D. buzzatii</i>	DB3	2	5	57

<i>D. buzzatii</i>	DB3	2	6	38
<i>D. buzzatii</i>	DB3	2	7	80
<i>D. buzzatii</i>	DB3	2	8	101
<i>D. buzzatii</i>	DB3	2	9	66
<i>D. buzzatii</i>	DB3	2	10	72
<i>D. buzzatii</i>	DB3	1	1	41
<i>D. buzzatii</i>	DB3	1	2	46
<i>D. buzzatii</i>	DB3	1	3	39
<i>D. buzzatii</i>	DB3	1	4	78
<i>D. buzzatii</i>	DB3	1	5	41
<i>D. buzzatii</i>	DB3	1	6	38
<i>D. buzzatii</i>	DB4	2	1	133
<i>D. buzzatii</i>	DB4	2	2	101
<i>D. buzzatii</i>	DB4	2	3	164
<i>D. buzzatii</i>	DB4	2	4	204
<i>D. buzzatii</i>	DB4	2	5	98
<i>D. buzzatii</i>	DB4	2	6	70
<i>D. buzzatii</i>	DB4	2	7	17
<i>D. buzzatii</i>	DB4	2	8	122
<i>D. buzzatii</i>	DB4	2	9	223
<i>D. buzzatii</i>	DB4	2	10	106
<i>D. buzzatii</i>	DB4	2	11	111
<i>D. buzzatii</i>	DB4	2	12	86
<i>D. buzzatii</i>	DB4	1	1	57
<i>D. buzzatii</i>	DB4	1	2	48
<i>D. buzzatii</i>	DB4	1	3	158
<i>D. buzzatii</i>	DB4	1	4	14
<i>D. buzzatii</i>	DB4	1	5	15
<i>D. buzzatii</i>	DB4	1	6	16
<i>D. buzzatii</i>	DB4	1	7	139
<i>D. buzzatii</i>	DB4	1	8	109
<i>D. buzzatii</i>	DB4	1	9	60
<i>D. buzzatii</i>	DB4	1	10	15
<i>D. buzzatii</i>	DB4	1	11	92
<i>D. buzzatii</i>	DB4	1	12	142
<i>D. koepferae</i>	DK1	2	1	78
<i>D. koepferae</i>	DK1	2	2	121
<i>D. koepferae</i>	DK1	2	3	136
<i>D. koepferae</i>	DK1	2	4	65

<i>D. koepferae</i>	DK1	2	5	135
<i>D. koepferae</i>	DK1	2	6	107
<i>D. koepferae</i>	DK1	2	8	53
<i>D. koepferae</i>	DK1	2	9	132
<i>D. koepferae</i>	DK1	2	10	128
<i>D. koepferae</i>	DK1	2	11	48
<i>D. koepferae</i>	DK1	2	12	44
<i>D. koepferae</i>	DK1	2	13	105
<i>D. koepferae</i>	DK1	1	1	39
<i>D. koepferae</i>	DK1	1	2	22
<i>D. koepferae</i>	DK1	1	3	30
<i>D. koepferae</i>	DK1	1	4	16
<i>D. koepferae</i>	DK1	1	5	47
<i>D. koepferae</i>	DK1	1	6	34
<i>D. koepferae</i>	DK1	1	7	42
<i>D. koepferae</i>	DK1	1	8	31
<i>D. koepferae</i>	DK1	1	9	41
<i>D. koepferae</i>	DK1	1	10	22
<i>D. koepferae</i>	DK1	1	11	37
<i>D. koepferae</i>	DK1	1	12	19
<i>D. koepferae</i>	DK1	1	13	15
<i>D. koepferae</i>	DK1	1	14	39
<i>D. koepferae</i>	DK1	1	15	21
<i>D. koepferae</i>	DK1	1	16	66
<i>D. koepferae</i>	DK2	2	1	100
<i>D. koepferae</i>	DK2	2	2	97
<i>D. koepferae</i>	DK2	2	3	24
<i>D. koepferae</i>	DK2	2	4	76
<i>D. koepferae</i>	DK2	2	5	136
<i>D. koepferae</i>	DK2	2	6	111
<i>D. koepferae</i>	DK2	2	7	67
<i>D. koepferae</i>	DK2	2	8	82
<i>D. koepferae</i>	DK2	2	9	90
<i>D. koepferae</i>	DK2	2	10	91
<i>D. koepferae</i>	DK2	2	11	109
<i>D. koepferae</i>	DK2	1	1	62
<i>D. koepferae</i>	DK2	1	2	67
<i>D. koepferae</i>	DK2	1	3	54
<i>D. koepferae</i>	DK2	1	4	60

<i>D. koepferae</i>	DK2	1	5	28
<i>D. koepferae</i>	DK2	1	6	53
<i>D. koepferae</i>	DK2	1	7	35
<i>D. koepferae</i>	DK2	1	8	34
<i>D. koepferae</i>	DK2	1	9	90
<i>D. koepferae</i>	DK2	1	10	61
<i>D. koepferae</i>	DK2	1	11	26
<i>D. koepferae</i>	DK2	1	12	33
<i>D. koepferae</i>	DK2	1	13	77
<i>D. koepferae</i>	DK3	2	1	19
<i>D. koepferae</i>	DK3	2	2	85
<i>D. koepferae</i>	DK3	2	3	114
<i>D. koepferae</i>	DK3	2	4	75
<i>D. koepferae</i>	DK3	2	5	61
<i>D. koepferae</i>	DK3	2	6	92
<i>D. koepferae</i>	DK3	2	7	90
<i>D. koepferae</i>	DK3	2	8	110
<i>D. koepferae</i>	DK3	2	9	38
<i>D. koepferae</i>	DK3	1	1	77
<i>D. koepferae</i>	DK3	1	2	55
<i>D. koepferae</i>	DK3	1	3	96
<i>D. koepferae</i>	DK3	1	4	83
<i>D. koepferae</i>	DK3	1	5	55
<i>D. koepferae</i>	DK3	1	6	23
<i>D. koepferae</i>	DK3	1	7	71
<i>D. koepferae</i>	DK3	1	8	32
<i>D. koepferae</i>	DK3	1	9	22
<i>D. koepferae</i>	DK3	1	10	57
<i>D. koepferae</i>	DK3	1	11	81
<i>D. koepferae</i>	DK3	1	12	40
<i>D. koepferae</i>	DK4	2	1	137
<i>D. koepferae</i>	DK4	2	2	90
<i>D. koepferae</i>	DK4	2	3	49
<i>D. koepferae</i>	DK4	2	4	92
<i>D. koepferae</i>	DK4	2	5	86
<i>D. koepferae</i>	DK4	2	6	122
<i>D. koepferae</i>	DK4	2	7	51
<i>D. koepferae</i>	DK4	2	8	77
<i>D. koepferae</i>	DK4	2	9	83

<i>D. koepferae</i>	DK4	2	10	84
<i>D. koepferae</i>	DK4	1	1	40
<i>D. koepferae</i>	DK4	1	2	62
<i>D. koepferae</i>	DK4	1	3	113
<i>D. koepferae</i>	DK4	1	4	81
<i>D. koepferae</i>	DK4	1	5	53
<i>D. koepferae</i>	DK4	1	6	12
<i>D. koepferae</i>	DK4	1	7	17
<i>D. koepferae</i>	DK4	1	8	29
<i>D. koepferae</i>	DK4	1	9	54
<i>D. koepferae</i>	DK4	1	10	107
<i>D. koepferae</i>	DK4	1	11	88
<i>D. koepferae</i>	DK4	1	12	71

Tabla 9.4. Número de descendientes, obtenidos de cada camada de los ensayos de precedencia de esperma, prolijada por el primer y segundo padre.

Especie	Isolínea			Progenie	
	Hembra	1er macho	2do macho	1er macho	2do macho
<i>D. buzzatii</i>	DB1	DB1	DB2	2	6
<i>D. buzzatii</i>	DB1	DB1	DB2	1	7
<i>D. buzzatii</i>	DB1	DB1	DB2	0	8
<i>D. buzzatii</i>	DB1	DB1	DB2	3	8
<i>D. buzzatii</i>	DB1	DB1	DB2	2	8
<i>D. buzzatii</i>	DB1	DB1	DB2	0	8
<i>D. buzzatii</i>	DB2	DB1	DB2	1	7
<i>D. buzzatii</i>	DB2	DB1	DB2	2	6
<i>D. buzzatii</i>	DB2	DB1	DB2	3	8
<i>D. buzzatii</i>	DB2	DB1	DB2	2	6
<i>D. buzzatii</i>	DB2	DB1	DB2	3	7
<i>D. buzzatii</i>	DB2	DB1	DB2	0	9
<i>D. buzzatii</i>	DB1	DB2	DB1	0	11
<i>D. buzzatii</i>	DB1	DB2	DB1	2	8
<i>D. buzzatii</i>	DB1	DB2	DB1	1	9
<i>D. buzzatii</i>	DB1	DB2	DB1	0	9
<i>D. buzzatii</i>	DB1	DB2	DB1	5	4
<i>D. buzzatii</i>	DB1	DB2	DB1	0	10

<i>D. buzzatii</i>	DB2	DB2	DB1	1	9
<i>D. buzzatii</i>	DB2	DB2	DB1	3	7
<i>D. buzzatii</i>	DB2	DB2	DB1	1	8
<i>D. buzzatii</i>	DB2	DB2	DB1	0	11
<i>D. buzzatii</i>	DB2	DB2	DB1	0	8
<i>D. buzzatii</i>	DB2	DB2	DB1	4	5
<i>D. buzzatii</i>	DB3	DB3	DB4	2	8
<i>D. buzzatii</i>	DB3	DB3	DB4	5	7
<i>D. buzzatii</i>	DB3	DB3	DB4	0	9
<i>D. buzzatii</i>	DB3	DB3	DB4	0	8
<i>D. buzzatii</i>	DB3	DB3	DB4	0	10
<i>D. buzzatii</i>	DB3	DB3	DB4	1	8
<i>D. buzzatii</i>	DB4	DB3	DB4	0	12
<i>D. buzzatii</i>	DB4	DB3	DB4	10	4
<i>D. buzzatii</i>	DB4	DB3	DB4	6	2
<i>D. buzzatii</i>	DB4	DB3	DB4	0	15
<i>D. buzzatii</i>	DB4	DB3	DB4	0	10
<i>D. buzzatii</i>	DB4	DB3	DB4	2	7
<i>D. buzzatii</i>	DB3	DB4	DB3	2	7
<i>D. buzzatii</i>	DB3	DB4	DB3	1	9
<i>D. buzzatii</i>	DB3	DB4	DB3	0	13
<i>D. buzzatii</i>	DB3	DB4	DB3	0	10
<i>D. buzzatii</i>	DB3	DB4	DB3	8	0
<i>D. buzzatii</i>	DB3	DB4	DB3	0	11
<i>D. buzzatii</i>	DB4	DB4	DB3	0	11
<i>D. buzzatii</i>	DB4	DB4	DB3	9	0
<i>D. buzzatii</i>	DB4	DB4	DB3	0	8
<i>D. buzzatii</i>	DB4	DB4	DB3	0	9
<i>D. koepferae</i>	DK1	DK1	DK2	10	0
<i>D. koepferae</i>	DK1	DK1	DK2	7	1
<i>D. koepferae</i>	DK1	DK1	DK2	7	6
<i>D. koepferae</i>	DK1	DK1	DK2	8	0
<i>D. koepferae</i>	DK1	DK1	DK2	6	5
<i>D. koepferae</i>	DK1	DK1	DK2	6	2

<i>D. koepferae</i>	DK2	DK1	DK2	0	9
<i>D. koepferae</i>	DK2	DK1	DK2	3	6
<i>D. koepferae</i>	DK2	DK1	DK2	0	8
<i>D. koepferae</i>	DK2	DK1	DK2	1	17
<i>D. koepferae</i>	DK2	DK1	DK2	0	10
<i>D. koepferae</i>	DK2	DK1	DK2	3	5
<i>D. koepferae</i>	DK1	DK2	DK1	0	9
<i>D. koepferae</i>	DK1	DK2	DK1	1	7
<i>D. koepferae</i>	DK1	DK2	DK1	4	7
<i>D. koepferae</i>	DK1	DK2	DK1	4	4
<i>D. koepferae</i>	DK1	DK2	DK1	1	10
<i>D. koepferae</i>	DK1	DK2	DK1	0	10
<i>D. koepferae</i>	DK2	DK2	DK1	1	7
<i>D. koepferae</i>	DK2	DK2	DK1	15	1
<i>D. koepferae</i>	DK2	DK2	DK1	11	2
<i>D. koepferae</i>	DK2	DK2	DK1	7	7
<i>D. koepferae</i>	DK2	DK2	DK1	18	6
<i>D. koepferae</i>	DK2	DK2	DK1	1	8
<i>D. koepferae</i>	DK1	DK1	DK2	5	3
<i>D. koepferae</i>	DK1	DK1	DK2	8	0
<i>D. koepferae</i>	DK1	DK1	DK2	0	9
<i>D. koepferae</i>	DK1	DK1	DK2	0	9
<i>D. koepferae</i>	DK1	DK1	DK2	2	10
<i>D. koepferae</i>	DK1	DK1	DK2	0	11
<i>D. koepferae</i>	DK1	DK1	DK2	0	9
<i>D. koepferae</i>	DK2	DK1	DK2	2	6
<i>D. koepferae</i>	DK2	DK1	DK2	0	11
<i>D. koepferae</i>	DK2	DK1	DK2	0	9
<i>D. koepferae</i>	DK2	DK1	DK2	6	2
<i>D. koepferae</i>	DK1	DK2	DK1	0	13
<i>D. koepferae</i>	DK1	DK2	DK1	5	6
<i>D. koepferae</i>	DK1	DK2	DK1	0	11
<i>D. koepferae</i>	DK3	DK3	DK4	8	0
<i>D. koepferae</i>	DK3	DK3	DK4	4	6

<i>D. koepferae</i>	DK3	DK3	DK4	1	9
<i>D. koepferae</i>	DK3	DK3	DK4	2	13
<i>D. koepferae</i>	DK3	DK3	DK4	5	3
<i>D. koepferae</i>	DK3	DK3	DK4	0	12
<i>D. koepferae</i>	DK4	DK3	DK4	3	5
<i>D. koepferae</i>	DK4	DK3	DK4	0	10
<i>D. koepferae</i>	DK4	DK3	DK4	13	0
<i>D. koepferae</i>	DK4	DK3	DK4	1	9
<i>D. koepferae</i>	DK4	DK3	DK4	0	9
<i>D. koepferae</i>	DK4	DK3	DK4	4	4
<i>D. koepferae</i>	DK3	DK4	DK3	1	7
<i>D. koepferae</i>	DK3	DK4	DK3	7	2