



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

**EFFECTO DE LA CONDUCTA DEL MACHO DURANTE LA
CÓPULA SOBRE SU ÉXITO REPRODUCTIVO
EN LA CHINCHE *Stenomacra marginella* (HETEROPTERA:
LARGIDAE)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)

PRESENTA

BIÓL. NUBIA CABALLERO MENDIETA

DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS RAFAEL CORDERO MACEDO

MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.


Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 6 de noviembre del 2006, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Ambiental) de la alumna **Caballero Mendieta Nubia** con número de cuenta **96023053** con la tesis titulada: **"Efecto de la conducta del macho durante la cópula sobre su éxito reproductivo en la chinche *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae)"** bajo la dirección del **Dr. Carlos Rafael Cordero Macedo**.

Presidente:	Dr. Alejandro Córdoba Aguilar
Vocal:	Dra. Roxana Torres Avilés
Secretario:	Dr. Carlos Rafael Cordero Macedo
Suplente:	Dr. Raúl Cueva del Castillo Mendoza
Suplente:	Dra. María Marcela Osorio Beristain

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 5 de marzo del 2007


Dr. Juan Nuñez Farfán
Coordinador del Programa

Agradezco:

Muy especialmente el apoyo económico otorgado por CONACYT (No. de becario 189253), DGEP y PAPIIT (IN208806-2) a lo largo de todo el presente proyecto (septiembre de 2004 a julio de 2006), porque sin su financiamiento simplemente no hubiera sido posible realizarlo.

Igualmente un agradecimiento a los miembros de mi Comité Tutorial: la Dra. Roxana Torres Avilés y la Dra. María Marcela Osorio Beristain por haberme procurado comentarios, sugerencias y sobre todo otorgarme tiempo valioso para la revisión de este manuscrito.

Hice un acuerdo de coexistencia pacífica con el tiempo:

ni él me perseguiría....

ni yo huiría de él...

un día nos encontraríamos...

y el día llegó!

AGRADEZCO:

A mi tutor el Dr. Carlos Cordero por haberme brindado toda su asesoría, apoyo económico y sobre todo otorgarme su confianza infinita a lo largo de todos estos meses de la maestría, gracias por la paciencia hacia mi persona y a este proyecto.

Muy especialmente a la Dra. Blanca Hernández Baños por el apoyo económico, logístico y sobre todo por haberme otorgado tiempo valioso hacia con este proyecto y mi persona, y que sin ningún compromiso se esforzó por quitar cualquier traba que se pudo presentar en mi camino.

Al Biól. Rubén Pérez Ishiwara por haberme enseñado las bases de lo molecular: “pipetear”, marcar tubitos, etc., etc., cosas fundamentales para este proyecto.

Y sobre todo un especial agradecimiento por el apoyo técnico a la M. en C. Fabiola Ramírez Corona que sin conocerme me brindó todo su confianza y apoyo incondicional, gracias por enseñarme desde “sopletear” con alta tecnología los ADN, hasta la ayuda infinita para el montaje de la técnica utilizada en el presente trabajo, por estar ahí en momentos míos de desesperación y que siempre confío en que iba a salir la técnica y así fue... mil gracias.

Al Biol. Raúl Iván Martínez Becerril por su apoyo técnico a lo largo de este proyecto, gracias por entrar a esa área que aunque muchas veces nos rehusamos a abarcar (lo molecular) al final hay que entrarle... gracias por la realización de PCR, geles y fotos interminables.

Al Dr. Alejandro Córdoba Aguilar y al Dr. Raúl Cueva del Castillo Mendoza, miembros del jurado por la revisión de este manuscrito, mil gracias por sus sugerencias y comentarios tan valiosos y que finalmente enriquecieron este proyecto.

A mis papis queridos y adorados, que me han apoyado y soportado en mis neurosis de finales de cada semestre, gracias por entender que la mitad del congelador sea para chinches y la otra para lo que quieran, por sembrar Tepozanes en mi jardín, por cambiarle el nombre a la casa por el de Laboratorio, por entender que si se perdía alguna ninfa (mis hijas) no debían ni de respirar, por todo eso y mucho mas, gracias mis padres queridos.

A Arturo por comprenderme, apoyarme y amarme incondicionalmente, por manejar todas esas horas en medio del tráfico, sol, diluvios, llantas ponchadas, etc., por consolar a esta mujer en momentos de angustia y locura y hacerme entender que existen momentos en la vida que hay que parar unas horas, para retomar después el trabajo con todas las ganas del mundo, con todo mi corazón mil gracias.

A Mona, la beba, Mela y Vic por ayudarme a coleccionar esas chinches fugitivas, a sabiendas que a las tres primeras no les agradan del todo mis hijas y sobre todo gracias por llevarme a comer muchas veces aún en mi contra, gracias por su amistad.

A todos mis amigos de la Universidad y CCH que aunque omito nombres, no los omitiré nunca en mi corazón mil gracias por brindarme su apoyo y no dejarme caer en esos momentos que realmente pensé que lo molecular no era para mí, por presentarme a mi amorcito, por llevarme a bailar (muy sacrificadamente), por hacerme tía y sobre todo por su amor.

A todos los miembros del Laboratorio de Ecología de la Conducta de Artrópodos, por echarme porras y no olvidar que aunque no estuviera en el lab., era parte de ese equipo de trabajo. Igualmente muchas gracias a Cecilia Cuatianquiz por haberme prestado algunas de las fotos que en este trabajo se muestran y por ser parte del grupo de los “chinchologos” del laboratorio.

Al Instituto de Ecología y a la Facultad de Ciencias ambas de la UNAM, por el apoyo de sus instalaciones y el financiamiento a lo largo de toda mi tesis, gracias UNAM por ser parte de mis sueños que hoy se están realizando.

Y sobre todo muchas gracias a mi ángel de la guardia, que en esos momentos de desesperación le dije “¡Como que *no* te estas poniendo las pilas para iluminarme”.....gracias Aarón porque sé me cuidas y me cuidarás toda la vida.....Y ahora se unen a ti otros dos ángeles que estuvieron toda una vida juntos y no se quisieron ir uno sin el otro, y sé que justo a ti estarán cuidándome por siempre.

“Nunca andes por el camino trazado...
pues él te conduce únicamente hacia donde otros ya fueron”
(Graham Bell)

ÍNDICE	<i>Página</i>
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
Hipótesis, predicción y objetivos.....	5
ESPECIE ESTUDIADA.....	5
Sistema de apareamiento.....	6
Conducta Durante la Cópula.....	6
MATERIAL Y MÉTODOS	
Colecta y Mantenimiento en el Laboratorio de los Organismos.....	10
Manipulación de la <i>CCM</i>	10
Diseño del Experimento	12
Análisis Estadísticos.....	14
Análisis de Paternidad.....	17
RESULTADOS	
1. Variables no controladas: Tamaño de los organismos y parasitismo.....	17
2. Efecto de la manipulación experimental de la <i>CCM</i> sobre la conducta del macho y la hembra durante la cópula.....	18
3. Efecto de la manipulación experimental de la <i>CCM</i> sobre los componentes de adecuación medidos.....	19
4. Efecto de la manipulación experimental de la <i>CCM</i> sobre la paternidad.....	20
DISCUSIÓN.....	25
CUADROS.....	28
APÉNDICE 1: Protocolo de Extracción de ADN de la Chinche <i>Stenomacra marginella</i> ...35	
APÉNDICE 2: Pruebas de Paternidad.....	37
LITERATURA CITADA.....	41

RESUMEN

En muchas especies de artrópodos los machos presentan conductas copulatorias que aparentemente inducen a la hembra a producir respuestas fisiológicas y conductuales que incrementen el éxito reproductivo de los machos; en el presente trabajo le denominé conducta copulatoria masculina aparentemente estimulante (*CCM*). En la chinche *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae) el macho durante la cópula frota en repetidas ocasiones la parte dorsal y lateral del cuerpo y cabeza de la hembra con patas y antenas. Se desarrolló una técnica para reducir la frecuencia de la *CCM*, mediante una barrera física que impide que el macho toque a la hembra, lo que permitió poner a prueba el supuesto antes mencionado. Se aparearon hembras vírgenes con dos machos vírgenes en días consecutivos; en un grupo de hembras se le impidió al primer macho realizar la *CCM*, pero no al segundo macho. En un segundo grupo, el procedimiento se invirtió. Se permitió que las hembras pusieran huevos y se realizó un análisis de paternidad con las ninfas resultantes utilizando la técnica ISSR (Inter simple sequence repeat).

El único efecto encontrado fue que las cópulas donde al macho se le impidió realizar la *CCM* fueron más cortas. No se encontró efecto de la manipulación de la *CCM* sobre el éxito reproductivo de los machos. En ambos grupos, el segundo macho fue el que obtuvo la mayor paternidad, lo cual sugiere que la competencia espermática es la principal fuerza de selección sexual. No obstante, el amplio rango de variación en la proporción de paternidad del segundo macho en ambos tratamientos, sugiere también un posible papel de elección críptica por la hembra en la asignación de paternidad. A pesar de esto nuestro estudio no resuelve la pregunta principal, de por qué los machos realizan esta conducta copulatoria complicada y aparentemente costosa.

ABSTRACT

Apparently stimulatory male copulatory behaviour (abbreviation in spanish = *CCM*) is widespread among arthropods and it could help males to increase male fitness by inducing behavioural and physiological changes in females. We developed a technique for reducing the frequency of *CCM* in the true bug *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae). We tested the hypothesis that males perform *CCM* to induce females to use their sperm for fertilization. Virgin females were mated with two virgin males in consecutive days. In one group of females the first male mate was prevented from performing *CCM* whereas the second was allowed; in the second group the second mate was prevented from performing *CCM* whereas the first male was allowed to do it.

We measured several behavioural and reproductive variables, and estimated the offspring proportion produced by each male by using ISSRs (Inter simple sequence repeat). The only effect found was that copulations in which the male was prevented from performing *CCM* were of shorter duration. No effect of the experimental manipulation on paternity allocation was observed. In both treatments, second mates fathered a greater proportion of offspring; these results suggest that sperm competition is the principal force of sexual selection that acts during copulation in *S. marginella*. However there was wide variation among females in this proportion which suggests that cryptic female choice might play a role; however, my results do not answer the question of why males perform the complicated and probably energetically costly *CCM*.

INTRODUCCIÓN

En muchas especies de artrópodos, los machos presentan durante la cópula conductas estereotipadas y complejas que tienen las siguientes características (Eberhard, 1996): (a) son apropiadas, al menos en apariencia, para estimular—mecánica, auditiva o químicamente—a la hembra; (b) no son mecánicamente necesarias para mantener o finalizar el acoplamiento; (c) no se utilizan en contextos que sugieran otras funciones (por ejemplo, si se presentan únicamente cuando hay machos solitarios cerca, podrían servir para mantener la vigilancia o ahuyentar a posibles usurpadores); (d) se repiten varias veces durante una misma cópula, y (e) las muestran todos los machos de una población, o al menos varios de ellos. Eberhard (1991, 1994, 1996, 1997) denomina “Cortejo Copulatorio” a la conducta que reúne estas características, ya que supone que ha evolucionado como resultado de la “elección críptica femenina” (Thornhill, 1983; Eberhard, 1985, 1996). De acuerdo con esta hipótesis, el “Cortejo Copulatorio” es utilizado por el macho para exhibir sus cualidades fenotípicas y/o genéticas, permitiendo a la hembra evaluar estas características y seleccionar al mejor macho disponible como padre de sus hijos (Eberhard, 1991, 1994, 1996). En contraparte, las ideas sobre coevolución sexual antagonista de Holland y Rice (1998) permiten plantear una hipótesis alternativa para explicar la evolución de esta conducta. De acuerdo con esta hipótesis, los machos utilizan su conducta durante la cópula para inducir respuestas conductuales y fisiológicas en las hembras, tales como una reducción en su receptividad sexual post-cópula e incremento en la tasa de oviposición, que les son favorables debido a que les reducen la intensidad de la competencia espermática y les incrementan su tasa reproductiva, pero que pueden disminuir la adecuación de las hembras al re-aparearse en un momento que no es el más adecuado y/o se re-aparean a una tasa menor a la óptima, y producen huevos a una tasa superior a la óptima. En este caso, la conducta de los machos sería un ejemplo de “Seducción Antagonista” durante la cópula (Holland y Rice, 1998). Para determinar cuál tipo de selección ha actuado (elección críptica femenina vs. selección sexual antagonista) y, por lo tanto, la función de la conducta del macho, es necesario determinar experimentalmente las consecuencias de dicha conducta para las hembras, es decir, evaluar si esta conducta induce en las hembras cambios fisiológicos y/o conductuales que promuevan la adecuación de los machos, pero que resultan en un costo para la adecuación de la hembra (selección sexual antagonista), o si por el contrario, que la hembra de igual forma obtenga algún beneficio para su adecuación al efectuar los machos dicha conducta (elección críptica femenina). Además, es posible que ambos tipos de selección hayan actuado en diferentes momentos durante la evolución de esta

conducta (Cordero y Eberhard, 2005; Macías-García y Ramírez, 2005). Siguiendo la sugerencia de Cuatianquiz y Cordero (2006), en este trabajo se utilizará un término “neutral” con respecto al efecto de la conducta sobre la adecuación femenina: “conducta copulatoria masculina aparentemente estimulante” (“apparently stimulatory male copulatory behaviour”), a la cual me referiré de ahora en adelante como *CCM*.

Independientemente del efecto de la *CCM* sobre la adecuación de las hembras, las dos hipótesis arriba mencionadas están basadas en la idea de que esta conducta induce respuestas conductuales y fisiológicas en las hembras que son favorables a los machos. A pesar del gran interés que existe por tratar de determinar cuál es la principal fuerza de selección que ha generado la evolución de este comportamiento (Eberhard, 1991, 1994, 1996, 1997, 2003), la mayor parte de la evidencia a favor de esta suposición es indirecta o correlativa y existen pocos trabajos en los que se haya manipulado experimentalmente la conducta masculina (ver revisión en el Cuadro 1). Por ejemplo, en algunas especies se ha visto que la rapidez (en la araña *Pholcus phalangioides*; Schäfer y Uhl, 2002), disminución (en el coleóptero *Psilothrix viridicoeruleus*; Shuker *et al.*, 2002) o ausencia (en las moscas *Drosophila serrata* y *D. birchi*; Hoikkala *et al.*, 2000) de la *CCM* afecta la duración de las cópulas, lo cual podría afectar la cantidad de eyaculado transferido por los machos (Simmons, 2001). En otros casos, las variables afectadas son distintas. En el escarabajo *Diabrotica undecimpunctata howardi*, la *CCM* contribuye a que la cópula sea exitosa, ya que los machos golpean con sus antenas las antenas, ojos y patas delanteras de la hembra, y estos golpes relajan los músculos vaginales de la hembra permitiendo la penetración completa del edeago (órgano intromitente del macho) y la transferencia exitosa del espermátforo (“paquete” transferido por el macho durante la cópula que contiene, además de espermatozoides, varios compuestos químicos (Boggs, 1990; Cordero, 1995). Además, se ha observado que los machos que golpean más rápido tienen mayor número de hijos y la probabilidad de éstos para sobrevivir hasta adulto es más alta (Tallamy *et al.*, 2003).

La escasez de estudios experimentales del efecto de la *CCM* sobre la conducta y fisiología reproductiva de las hembras es entendible, ya que la propia naturaleza compleja de la *CCM* hace sumamente complicado manipularla experimentalmente. Además, en la mayoría de los estudios experimentales realizados, las manipulaciones generalmente involucran perturbaciones mayores (tales como la amputación de las patas o antenas que utilizan los machos para tocar a las hembras; ver Cuadro 1) que podrían introducir artefactos difíciles de discriminar en los experimentos. En el Laboratorio de Ecología de la Conducta de Artrópodos (Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de

México [UNAM]) se ha desarrollado una técnica que permite impedir, total o parcialmente, que los machos de la chinche polígama *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae) ejecuten su CCM (Oliver, 2004; Cuatianquiz y Cordero, 2006). En esta tesis se presentan los resultados de un estudio experimental cuya finalidad principal fue poner a prueba la **hipótesis** de que, mediante su CCM, los machos de *S. marginella* inducen cambios conductuales y fisiológicos en las hembras que resultan en un incremento en el número de huevos que fertilizan. Concretamente, realicé un experimento donde impedí que un grupo de machos efectuara la CCM y documenté la proporción de hijos que obtenían al aparearlos con hembras que, copularon con otro macho al que sí se le permití realizar la CCM. La predicción que se evaluó fue que el impedirles a los machos realizar la CCM provoca un decremento en la proporción de hijos que tienen con las hembras. Adicionalmente, se midió varios “componentes de adecuación”, tales como la duración de la cópula (Stratton *et al.*, 1996; Hoikkala *et al.*, 2000; Shuker *et al.*, 2002; Schäfer y Uhl, 2002; Zsemlye *et al.*, 2005; Cuatianquiz y Cordero, 2006), el número (Rodríguez, 1998; Tallamy *et al.*, 2003) y viabilidad de huevos (Rodríguez, 1998; Schäfer y Uhl, 2002; Tallamy *et al.*, 2003), variables reproductivas utilizadas en otros estudios como estimadores de la adecuación de los individuos, en ausencia de medidas de paternidad. Estas variables reproductivas pueden ayudar a explorar los posibles factores causales del patrón de paternidad observado en nuestro experimento, como por ejemplo, en algunos estudios se ha encontrado una relación directa entre la duración de la cópula y la cantidad de eyaculado transferido (McLain, 1989; Rubenstein, 1989; Arnqvist y Danielsson, 1999b).

OBJETIVOS

1.- Determinar si existe algún efecto al manipular la frecuencia de la conducta copulatoria del macho sobre algunas variables que pudieran estar correlacionados con el éxito reproductivo de éstos.

2.- Determinar si la conducta copulatoria del macho es un medio por el cual los machos tratan de inducir a las hembras a utilizar sus espermatozoides para fertilizar sus huevos.

ESPECIE ESTUDIADA

Stenomacra marginella es una especie univoltina (*i.e.*, presenta una sola generación por año) muy abundante en diversas localidades del Distrito Federal y Tlaxcala (Cuatianquiz *et al.*, 2003). En el Pedregal de San Ángel (Distrito Federal), los adultos están presentes desde finales de marzo hasta septiembre (Cuatianquiz *et al.*, 2003) y tardan

aproximadamente mes y medio, después de alcanzar la etapa adulta, para empezar a tener actividad sexual, lo que permite recolectar individuos vírgenes en el campo. Las hembras son capaces de poner varias puestas a lo largo de su vida, aunque en el laboratorio la mayoría (>90%) producen una o dos puestas. Después del apareamiento las hembras tardan de una a dos semanas para poner huevos (Cuatianquiz, 2002; Oliver, 2004; Cuatianquiz, 2005; Cuatianquiz y Cordero, 2006). Las puestas generalmente tienen entre 30 y 40 huevos (Cibrián-Tovar *et al.*, 1995; Muñoz, 2001; Cuatianquiz 2002, 2005; Cuatianquiz y Cordero, 2006).

Sistema de Apareamiento

El sistema de apareamiento masculino de esta especie es “poliginia por competencia por rebatiña” (“scramble competition polygyny”; Thornhill y Alcock, 1983), ya que los machos buscan activamente a las hembras y las cortejan sin interactuar agresivamente con otros machos (Cuatianquiz *et al.*, 2003). Una proporción substancial de las hembras copulan con más de un macho (Cuatianquiz y Cordero, 2005). De acuerdo con la información que se cuenta hasta el momento, el sistema de apareamiento femenino podría ser “poliandria por beneficios materiales” (Cuatianquiz, 2005; Thornhill y Alcock, 1983). La duración de la cópula es relativamente larga y muy variable. Cuando se trata de la primera cópula de una hembra, la mediana de su duración es de 96 min ($Q_{25\%}-Q_{75\%} = 60-155$), pero tiende a incrementarse cuando se trata de la segunda cópula, en cuyo caso la mediana de su duración es de 232 min ($Q_{25\%}-Q_{75\%} = 166-272$) (Cuatianquiz y Cordero, 2006).

Conducta Durante la Cópula

Durante la cópula, los machos presentan una *CCM* compleja (Cuatianquiz, 2002; Oliver, 2004; Cuatianquiz, 2005; Cuatianquiz y Cordero, 2006). En repetidas ocasiones durante la cópula (rango 12—58 eventos; Cuatianquiz y Cordero, 2006), cuando la pareja se encuentra en la típica posición de apareamiento “cola con cola” (Fig. 1e), el macho levanta una de sus patas posteriores y gira en la dirección de dicha pata hacia la hembra (Fig. 1a). Cuando alcanza a la hembra, el macho frota durante varios segundos la parte dorsal y lateral del cuerpo y la cabeza de la hembra con patas y antenas (Fig. 1c), para posteriormente soltarla y volver a la posición “cola con cola”. Algunas veces el macho gira hacia la hembra y regresa a la posición “cola con cola” sin haberla tocado. Estos intentos “fallidos” pueden ser al menos de dos tipos: en el primer caso, la hembra detiene al macho mientras él va girando hacia ella con una de sus patas traseras levantadas (a esto le denominé *Intento Impedido por la Hembra*; Fig. 1a); en el segundo caso el macho

nunca llega a realizar el contacto a pesar de que no parece haber nada que se lo impida (a esto le denominé *Intento Fallido del Macho*).

También se observan al menos tres variantes de la conducta de frotamiento de las hembras. En la primera variante (a la que denominé *Toqueteo*; Fig. 1b), el cuerpo del macho no entra en contacto con el de la hembra y sólo toca con sus patas la parte lateral del tórax y la cabeza de la hembra, mientras sus antenas continuamente entran en contacto con la cabeza de la hembra. En la segunda variante (a la que denominé *Abrazo*; Fig. 1c) el macho toma a la hembra con sus patas y la jala hacia él, estableciendo un contacto entre la zona abdominal del macho y la parte lateral del cuerpo de la hembra. Mientras la sujeta, las patas del macho frotan el cuerpo de la hembra con movimientos hacia adelante y hacia atrás, a la vez que sus antenas tocan continuamente la cabeza de la hembra. Finalmente, en la última variante (a la que denominé *Monta*; Fig. 1d), el macho realiza un *Toqueteo* y posteriormente se monta sobre el dorso de la hembra (en esta posición el abdomen del macho está en contacto con el dorso de la hembra), abrazándola y frotándola con las patas de adelante hacia atrás, mientras las antenas de ambos se mantienen en contacto (Fig. 1d); la mayoría de las veces la pareja se sacude presentando movimientos pendulares bruscos. El *Toqueteo* es la conducta copulatoria masculina que se observa con mayor frecuencia, seguida de la *Monta* y el *Abrazo*, mientras que los *Intentos* de ambos tipos (ver arriba) son las conductas que ocurren menos frecuentemente (Cuatianquiz, 2002; Oliver, 2004).

Es posible que en *S. marginella* los movimientos del edeago (Eberhard, 1994; Oliver, 2004) y otros órganos genitales (Moreno y Cordero, en revisión) formen parte de la CCM. Desgraciadamente, la cuantificación de esta conducta no fue posible debido a que los movimientos del edeago ocurren dentro del cuerpo de la hembra y la observación de otros órganos genitales, (por ejemplo, los parámetros que realizan movimientos durante la cópula) es muy difícil porque se encuentran por debajo de la pareja (Moreno, 2005).

Durante la cópula las hembras no se mantienen inmóviles y pasivas, sino que realizan al menos dos tipos de conducta (además de su participación activa en los *Intentos Impedidos por la Hembra* antes mencionados). En la conducta denominada *Patadas*, la hembra golpea y empuja con su último par de patas el abdomen de su pareja, muy cerca del punto de acoplamiento con la hembra (Fig. 1e). En la conducta denominada *Jaloneo*, la hembra levanta una de sus patas posteriores y gira en la dirección de dicha pata hacia el macho (Fig. 1f). La hembra cuando alcanza al macho, lo toma con sus patas por el tórax (ocasionalmente con el primer par de patas logra atrapar las antenas del macho) y lo jala hacia ella, provocando que él se mantenga inmóvil por

unos segundos, mientras ella se coloca por encima de él y lo presiona contra el sustrato. En algunas ocasiones, cuando la hembra se mueve en dirección al macho previo a un *Jaloneo*, el macho gira rápidamente en la misma dirección dando la apariencia de que trata de evitar ser alcanzado por la hembra (Fig. 1f). Este último hecho, junto con la presión que parece ejercer la hembra sobre el cuerpo del macho al “montarlo” sugiere que esta conducta es percibida como una agresión por el macho. Dos líneas de evidencia sugieren que estas dos conductas están relacionados con la finalización de la cópula: (a) un experimento realizado por Oliver (2004), en el cual comparó la duración de las cópulas de hembras intactas y hembras a las que se les amputó el tercer par de patas (con lo cual se les impidió realizar *Patadas* y, muy posiblemente, se les redujo la capacidad de realizar *Jaloneos*), mostró que la duración de las cópulas de las hembras amputadas se incrementó significativamente, y (b) aunque estas conductas se pueden presentar en cualquier momento durante la cópula, su frecuencia se incrementa hacia el final de la misma (Cuatianquiz, 2002; Oliver, 2004; N. Caballero, observación personal).

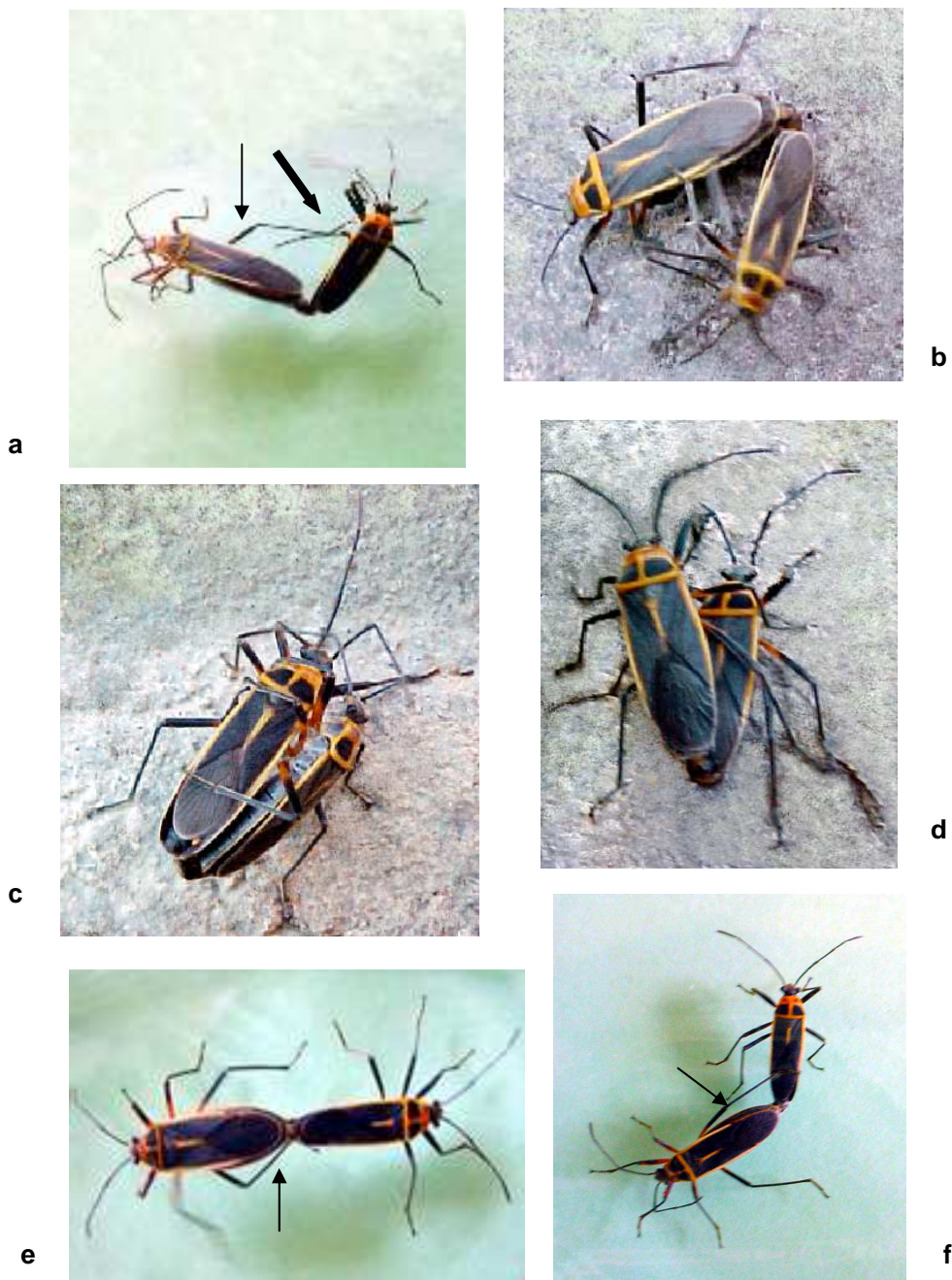


Fig. 1. Conducta copulatoria de *Stenomacra marginella*: **a)** *Intento Impedido por la Hembra*: La hembra detiene al macho con algunas de sus patas traseras (flecha delgada), mientras él va girando hacia ella con una de sus patas traseras levantadas (flecha gruesa) para tratar de efectuar la conducta copulatoria masculina; **b)** *Toqueteo*: El macho toca la parte lateral de la hembra con las patas y antenas; **c)** *Abrazo*: El macho abraza a la hembra frotando el cuerpo de la hembra con sus patas y antenas; **d)** *Monta*: El macho se sube sobre la hembra y la abraza, frotando con sus patas el cuerpo de ella; **e)** *Patadas* y **f)** *Jaloneos* de la hembra hacia el macho durante la cópula (las flechas indican la conducta de la hembra al macho con cualquiera de su tercer par de patas). El macho se encuentra a la derecha de todas las fotografías, excepto Fig. d.

MATERIAL Y MÉTODOS

Colecta y Mantenimiento de los Organismos en el Laboratorio

Se colectaron individuos adultos a finales del mes de abril de 2004 y 2005, cuando los animales son vírgenes y sexualmente inactivos, los individuos se tomaron de árboles de tepozán (*Buddleia chordata*: Loganiaceae) de los jardines aledaños al Instituto de Ecología de la UNAM (ubicado en el Pedregal de San Ángel, Distrito Federal), así como de los jardines localizados en la Facultad de Ciencias (Distrito Federal) y la Facultad de Estudios Superiores de Iztacala (Estado de México), ambas pertenecientes a la UNAM. Los organismos fueron llevados al insectario del Instituto de Ecología, UNAM, donde se separaron por sexos en cajas de tela de tul con soportes de madera (55.5 x 25 x 30 cm) y se mantuvieron a temperatura ambiente, con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, hasta que se volvieron sexualmente activos, lo cual se determinó observando diariamente la actividad de los individuos silvestres, momento en que se inició el experimento. Los animales dentro de las cajas se alimentaron con una dieta consistente de hojas de tepozán y una solución elaborada con 20 gr de azúcar, ocho gotas de Jugo Maggi^{MR} y la albúmina de un huevo (aproximadamente 37 ml), aforados a 100 ml con agua, estos líquidos estuvieron embebidos en pedazos de algodón (Cuatianquiz, 2002). El alimento se cambió cada tercer día agregándose algunos cadáveres de grillos (*Acheta domesticus*) criados en condiciones de laboratorio.

Manipulación de la CCM

Se usó una técnica para impedir que los machos de *S. marginella* ejecuten su CCM con un mínimo de disturbio para la pareja (Oliver, 2004; Cuatianquiz y Cordero, 2006). Esta manipulación involucra que, cuando el macho levanta una de sus patas posteriores y empieza a girar hacia la hembra, lentamente se coloca entre la pareja, sin tocar a ninguno de los dos, un rectángulo de acetato transparente de 3 x 1 cm que se encuentra sujeto a un palito de plástico transparente. El acetato actúa como barrera física que impide que el macho toque a la hembra (Fig. 2). Cuando el macho llega a la barrera, éste actúa como si tratara de cruzarla por algunos segundos; posteriormente, regresa a la típica postura de cópula “cola con cola”, momento en el cual se retira la barrera lentamente.



Fig. 2. Manipulación de la conducta copulatoria masculina (CCM): Cuando el macho levanta una pata posterior y empieza a girar hacia la hembra, para efectuar la conducta copulatoria, se coloca entre el macho y la hembra una barrera física (acetato transparente) que impide que el macho toque a la hembra.

Diseño del Experimento

El experimento se realizó en dos años consecutivos (2004 y 2005), y consistió en aparear a cada hembra con un macho virgen y al día siguiente volverla a aparear con un segundo macho virgen. En un primer tratamiento (al que denominé *Interrupción 1er macho*; $N_{2004} = 24$, $N_{2005} = 31$, $N_{\text{total}} = 55$ hembras) se impidió que el primer macho efectuara la CCM, mientras que al segundo se le permitió efectuarla; en un segundo tratamiento (al que denominé *Interrupción 2do macho*; $N_{2004} = 32$, $N_{2005} = 34$, $N_{\text{total}} = 66$ hembras) se impidió que el segundo macho efectuara la CCM, mientras que al primero se le permitió efectuarla. Una hembra del primer tratamiento y tres del segundo pusieron huevos antes de aparearse por segunda ocasión, por lo que fueron excluidas de los análisis.

Los individuos fueron elegidos y asignados a cada uno de los tratamientos, por el método de muestreo "haphazard" (ver Martin y Bateson, 1993), ya que, aunque se trató de evitar "elegir" individuos con alguna característica en particular (por ejemplo, de tamaño, tipo y cantidad de actividad), no se utilizó ningún método para aleatorizar la muestra de individuos experimentales. Los apareamientos se realizaron entre junio y agosto, de las 9AM hasta las 8PM. Se colocaron dos machos y una hembra vírgenes dentro de una caja petri de vidrio de 100 mm de diámetro x 20 mm de alto, para imitar las condiciones naturales, donde las hembras están expuestas a altas densidades de machos sexualmente activos. Los individuos se observaron hasta que inició la cópula, momento en el cual se extrajo de la caja al macho que no se había apareado. Se cuantificó la duración de la cópula y la conducta copulatoria de machos y hembras fue registrada con una minigrabadora marca *Samsung* modelo *SVR-S820*. Las cópulas fueron observadas continuamente para estimar las frecuencias de cada una de las conductas descritas en la sección *Comportamiento Durante la Cópula*. La única excepción fue que no se distinguió entre las cópulas que finalizaron precedidas de un evento de Patadas y las precedidas por un evento de Jaloneos, puesto que en la práctica resultaba complicado, ya que en ocasiones se efectuaban ambas conductas conjuntamente. En el caso de estas conductas, se midió el tiempo en que se efectuaron ambas—sin distinguir entre ellas—durante cada cópula. Al terminar la primera cópula, las hembras se mantuvieron aisladas en cajas petri de plástico de 100 mm de diámetro x 10 mm de alto (con la alimentación antes mencionada) y al día siguiente, se repitió el mismo procedimiento con las hembras ya apareadas y otros dos machos vírgenes.

Dos días después de su primer apareamiento, se realizó un control de fertilidad en los machos, que consistió en re-aparearlos con hembras vírgenes. Estas hembras se mantuvieron individualmente en cajas petri de plástico de 100 mm de diámetro x 10 mm

de alto, con la dieta arriba mencionada, hasta que pusieron huevos, momento en que fueron sacrificadas en etanol al 70%. Se contó el número de ninfas emergidas de la primera puesta para descartar que los machos pudieran ser infértiles. Después de esta segunda cópula, los machos fueron mantenidos individualmente en cajas petri de plástico de 100 mm de diámetro x 10 mm de alto, alimentados durante dos días con una solución sacarosa al 20%, para eliminar de su cuerpo cualquier resto de tejido vegetal que pudiera afectar la extracción de ADN. Posteriormente fueron sacrificados en tubos eppendorf con etanol al 70% y almacenados en un ultracongelador a -80°C.

Después de su segunda cópula, las hembras experimentales fueron mantenidas aisladas en cajas petri de plástico de 100 mm de diámetro x 10 mm de alto, con la alimentación descrita anteriormente, hasta que pusieran huevos o murieran (en este último caso no fueron consideradas en el análisis). Después de haber puesto huevos, las hembras se trataron igual que los machos para la extracción de ADN.

Las puestas de huevos fueron mantenidas de manera individual según la hembra en cajas de petri de plástico de 100 mm de diámetro x 10 mm de alto hasta la eclosión, en algunos casos los huevos no eclosionaron, pero no se pudo determinar la causa (no fertilizados, fracaso en las primeras fases de desarrollo o ataque por virus, bacterias u hongos). Las ninfas fueron mantenidas en grupos familiares (hermanas [os] y medias hermanas [os]) en frascos de plástico transparente de 7 cm de diámetro x 7 cm de altura, y se alimentaron con la misma dieta que los adultos (ver arriba), la cual les fue proporcionada embebida en "bolitas" de algodón cubiertas con una delgada malla de tela de tul que impedía que las ninfas pudieran quedar pegadas al algodón o que el alimento escurriera, factores que podían ocasionar la muerte de las ninfas de primer estadio (observación personal). La crianza se mantuvo hasta el segundo estadio ninfal, momento en el cual se les retiraron las hojas de tepozán y se les alimentó únicamente con la dieta artificial y agua. Para sustituir el resguardo natural y lugar de percha que proporcionan las hojas de tepozán, se colocaron pedazos de cartón en forma de cono. Las ninfas presentan una alta mortalidad en el laboratorio durante los primeros estadios (C. Cuatianquiz, L. Muñoz y N. Caballero, datos no publicados), probablemente debido a que no se les permite formar las enormes agregaciones de ninfas que se forman en el campo al unirse muchas camadas de ninfas, por lo que, fue necesario monitorearlas diariamente para recolectar y preservar los individuos muertos recientemente. Cuando fue posible, las ninfas se sacrificaron cuando alcanzaron el tercer estadio. Para sacrificarlas o, cuando murieron naturalmente, se sumergieron en etanol al 70% y se almacenaron, individualmente en tubos eppendorf, en un ultracongelador a -80°C.

El procedimiento anterior me permitió cuantificar las siguientes variables reproductivas por cada hembra: (a) duración de la cópula (en minutos), (b) probabilidad de la hembra de aparearse por segunda ocasión, (c) probabilidad de poner huevos, (d) tiempo transcurrido hasta la puesta de huevos (en días), (e) tamaño de la puesta (= número de huevos puestos), (f) tiempo transcurrido hasta la eclosión de los huevos (en días) y (g) éxito de eclosión (= proporción de huevos que eclosionaron). En las réplicas del año 2005 también se midió la latencia al inicio de la cópula en la segunda cópula de la hembra (en segundos), la cual se definió como el tiempo entre el momento en que se colocaron la hembra y los dos machos en la caja petri y el momento de inicio de la cópula. Además se cuantificó el número total de eventos de la CCM en las cópulas donde no hubo interrupción experimental (a esto le llamé *Frecuencia de Eventos de la CCM*), mientras que en las cópulas donde se impidió al macho realizar la CCM, se contó las veces que el macho intentó realizar dicha conducta (a esto le llamé *Frecuencia de Intentos de la CCM*). Asimismo se cuantificó la duración de *Patadas* y *Jaloneos* efectuados por las hembras. Para la medición de estas variables se usó un cronómetro digital (marca *Learning Resources®*). Estas variables fueron comparadas estadísticamente entre tratamientos.

Se tomaron fotografías de las hembras y machos experimentales con una cámara digital (*Sony*, modelo *CyberShot DSC-P50*). Utilizando el programa *ImageTool 3.00* se estimó el tamaño de los individuos con el área (mm²) de su cuerpo en vista dorsal.

Análisis Estadísticos

Evaluación de las Variables No Controladas (Tamaño de los Organismos y Parasitismo).

Como el experimento fue realizado en dos años consecutivos (2004 y 2005) y se ha documentado en otras especies de insectos que el tamaño puede variar entre generaciones por factores como la calidad del alimento (por ejemplo, las hojas de tepozán incluidas en la dieta fueron recolectadas del Pedregal de San Ángel al mismo tiempo que se desarrollaba el experimento) o la temperatura (la cual probablemente varió entre años en el campo y tampoco fue controlada en el insectario); se comparó el tamaño de los individuos en los dos años. Se compararon por separado las hembras (H), los machos que copularon primero con ellas (M1) y los machos que copularon después (M2). Se realizaron análisis de varianza (ANDEVA) utilizando como factores el año (2004 / 2005) y el tratamiento (*Interrupción 1er macho / Interrupción 2do macho*).

En años recientes se ha observado un incremento en el ataque de insectos parasitoides sobre adultos de *S. marginella* (los parasitoides se han detectado durante las disecciones de los adultos y en individuos adultos recolectados en el campo y mantenidos en cautiverio; sin embargo es posible que los ataques hayan sido originalmente en alguna de las fases ninfales). Mientras que hasta hace pocos años solo se habían detectado moscas parasitoides de la familia Tachinidae en Tlaxcala y los porcentajes de individuos parasitados eran bajos (Cuatianquiz *et al.*, 2003), en los últimos años se han detectado avispas de la familia Encyrtidae con un incremento notable en el porcentaje de individuos atacados (V. Méndez, N. Caballero y C. Oliver, datos no publicados). Por esta razón, se comparó mediante una Prueba de la probabilidad exacta de Fisher el nivel de parasitoides de los individuos experimentales utilizados en los dos años.

Evaluación del Efecto de la Manipulación Experimental de la CCM sobre la Conducta del Macho y la Hembra Durante la Cópula.

Se evaluó si impedir la CCM afecta el número de veces que los machos intentaron realizar la CCM (*Frecuencia de Intentos de la CCM*), mediante la comparación de esta frecuencia, con la *Frecuencia de Eventos de la CCM* efectuados por los machos a los que no se les impidió realizar la CCM. Para esta comparación se realizó un ANDEVA para evaluar el “tratamiento” (*Interrupción del 1er macho vs. Interrupción del 2do macho*), el “año” (2004 vs. 2005), la “cópula” (primera vs. segunda cópula de la hembra) y todas las interacciones, sobre la *Frecuencia de Intentos de la CCM* y *Frecuencia de Eventos de la CCM*. Además se evaluó si impedir que los machos efectúen la CCM afecta la conducta de la hembra, particularmente aquélla que parece estar asociada a la finalización de la cópula (ver sección *Comportamiento Durante la Cópula*): las *Patadas* y los *Jaloneos*. Para esta comparación se realizó un ANDEVA para evaluar el efecto del “tratamiento”, el “año”, la “cópula” (primera o segunda cópula de la hembra) y todas sus interacciones, sobre la duración de las [*Patadas* y *Jaloneos*] (en el análisis se sumó la duración de las dos conductas; ver justificación en Material y Métodos). Debido al diseño del experimento y al análisis estadístico aplicado a la conducta del macho y de la hembra durante la cópula, los posibles efectos del tratamiento se esperaban detectar en la interacción [tratamiento X cópula], aunque las diferencias entre años en el tamaño de los individuos me llevaron a explorar también las interacciones de este factor con el “tratamiento” y la “cópula”.

Se comparó mediante una prueba de Chi cuadrada, entre las cópulas de los machos a los que se les impidió realizar la CCM y las de los machos a los que se les permitió realizar la CCM, la frecuencia con que terminaron espontáneamente o

inmediatamente después de un evento de Patadas y/o Jaloneos (en el análisis no se distingue entre estos dos tipos de finales; ver justificación en Material y Métodos).

Evaluación del Efecto de la Manipulación Experimental de la CCM sobre los Componentes de Adecuación.

Para evaluar el efecto de impedir que el macho efectuará la CCM sobre la duración de la cópula, se realizó un ANDEVA en el que se midió el efecto del “tratamiento”, el “año”, la “cópula” y todas las interacciones, sobre dicha variable. Debido al diseño del experimento y al análisis estadístico aplicado, los posibles efectos del tratamiento se esperaban detectar en la interacción [tratamiento X cópula], aunque las diferencias entre años en el tamaño de los individuos me llevaron a explorar también las interacciones de este factor con el “tratamiento” y la “cópula”.

Para evaluar el efecto de impedir que el macho efectuará la CCM sobre las demás variables reproductivas medidas, se realizaron ANDEVAs, utilizando como factores el “año” y el “tratamiento” y como variable dependiente los componentes de adecuación (*Latencia a la Segunda Cópula*; *Tiempo Transcurrido hasta la Puesta de Huevos* - consideradas en el análisis solo las hembras que pusieron huevos; *Número de Huevos Puestos* - en un primer análisis se incluyeron las hembras que no pusieron huevos y en un segundo análisis sólo se utilizaron las hembras que pusieron huevos; *Número de Huevos Eclosionados* - sólo se incluyeron las hembras cuyas puestas tuvieron al menos un huevo que eclosionó y *Porcentaje de Huevos Eclosionados* - sólo se incluyeron las hembras cuyas puestas tuvieron al menos un huevo que eclosionó). Para evaluar si el tratamiento afectó el porcentaje de hembras que pusieron huevos, se realizó una prueba de Chi cuadrada; y finalmente para evaluar si el tratamiento afectó la cantidad de ninfas que murieron antes de ser sacrificadas (ver sección Diseño del experimento), se utilizó una prueba de Mann-Whitney.

Evaluación del Efecto de la Manipulación Experimental de la CCM sobre la Paternidad.

Inicialmente se evaluó si el número de descendientes que fueron utilizados en los análisis de paternidad difirió entre las hembras de los dos tratamientos mediante una prueba de Mann-Whitney. Posteriormente, se puso a prueba la hipótesis que plantea que la CCM induce cambios fisiológicos y conductuales en las hembras, que resultan benéficos para los machos, mediante una evaluación de su principal predicción que dice que el impedirles a los machos realizar la CCM provocará un decremento en la proporción de

hijos que procrean con las hembras (ver Introducción). Para esto se comparó el valor de P_2 (= proporción de hijos que corresponden al segundo macho que copuló con la hembra; Boorman y Parker, 1976) entre los tratamientos, mediante una prueba de Mann-Whitney.

Debido a que existieron casos en ambos tratamientos donde la P_2 se estimó a partir de un número muy reducido de hijos, se hizo un segundo análisis sólo con hembras con paternidad determinada a 10 o más hijos. El límite de 10 hijos se estableció tomando en cuenta que las hembras generalmente ponen entre 30 y 40 huevos por puesta, por lo que 10 hijos representan entre una cuarta y una tercera parte de los huevos de una puesta típica.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa STATISTICA 6.0™.

Análisis de Paternidad

La técnica para determinar la paternidad, fue desarrollada en la Facultad de Ciencias, UNAM, con la asesoría de la Dra. Blanca Hernández Baños y la M. en C. Fabiola Ramírez Corona. Se utilizaron los marcadores moleculares conocidos como ISSR's ("Intersimple Sequence Repeats"). Estos son marcadores dominantes generados de una reacción de PCR con un sólo oligonucleótido, donde la región amplificada representa la secuencia de nucleótidos entre dos sitios de anclaje de los microsatélites, orientados en cadenas opuestas del ADN (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Wolfe *et al.*, 1998; Haig *et al.*, 2003). Estos marcadores se caracterizan porque las regiones amplificadas están dispersas equitativamente por todo el genoma. Aunque se probaron varios marcadores, se utilizaron tres que presentaron el patrón de bandeo más polimórfico, que son los más adecuados para realizar los análisis de paternidad. Los detalles metodológicos de la extracción del ADN se presentan en el Apéndice 1, mientras que la técnica para la obtención de paternidad se describe en el Apéndice 2.

RESULTADOS

1. Variables No Controladas: Tamaño de los Organismos y Parasitismo

Los tres ANDEVAS para comparar el tamaño resultaron significativos (H: $F_{3, 37} = 6.18$, $P = 0.0016$; M1: $F_{3, 37} = 5.0$, $P = 0.0052$; M2: $F_{3, 38} = 3.08$, $P = 0.039$): El tamaño de los organismos fue mayor en el 2004 que en 2005 (H: $F = 16.34$, $P = 0.0003$; M1: $F = 14.56$, $P = 0.0005$; M2: $F = 7.24$; $P = 0.01$), pero no hubo diferencia de tamaño entre tratamientos (H: $F = 1.1$, $P = 0.3$; M1: $F = 0.004$, $P = 0.95$; M2: $F = 0.15$, $P = 0.7$). En ningún caso fueron significativas las interacciones entre el año y el tratamiento (H: $F = 2.49$, $P = 0.12$;

M1: $F = 1.24$, $P = 0.27$; M2: $F = 1.22$, $P = 0.28$). Debido a las diferencias entre años, los análisis estadísticos se realizaron considerando el año como factor. En el Cuadro 2 se muestra el promedio, error estándar y tamaño de muestra de cada variable medida en el experimento.

El nivel de parasitoidismo fue relativamente alto en ambos años, pero no se detectó diferencia significativa entre años en la proporción de hembras con parasitoides (aunque la diferencia puede considerarse “marginamente” significativa) (2004: 4 de 18, 2005: 7 de 12, Prueba de la probabilidad exacta de Fisher, $P = 0.052$) ni en las de los machos (M1: 2004: 3 de 18, 2005: 2 de 12, $P = 0.68$; M2: 2004: 4 de 18, 2005: 5 de 12, $P = 0.23$). Tampoco encontré una diferencia en la proporción de parasitoidismo entre M1 y M2 agrupando los individuos de ambos años (Chi cuadrada = 1.49, $P = 0.22$).

2. Efecto de la Manipulación Experimental de la CCM sobre la Conducta del Macho y la Hembra Durante la Cópula

Al evaluar si impedir la CCM afecta el número de veces que los machos intentaron realizar la CCM, el ANDEVA resultó altamente significativo, ($F_{7, 234} = 15.27$, $P = 2.2 \times 10^{-16}$), y explicó cerca de un tercio de la variación en las frecuencias conductuales ($R^2 = 29.3\%$). Es decir los machos incrementaron (entre 2.6 y 3.6 veces, ver Cuadro 2) la frecuencia a la que intentaron realizar la CCM cuando se les impidió efectuarlo. Como se esperaba, no fueron significativos por sí solos el “año”, el “tratamiento”, la “cópula”, ni tampoco la interacción [año X tratamiento X cópula] (todas las $F < 2.61$, todas las $P > 0.108$), sin embargo las tres interacciones pareadas resultaron significativas. El efecto más significativo fue la interacción [tratamiento X cópula] ($F = 79.9$, $P = 1.1 \times 10^{-16}$), que fue resultado de que la frecuencia de intentos de la CCM de los machos impedidos de efectuar la CCM (1ª cópula del tratamiento *Interrupción 1er macho* y 2ª cópula del tratamiento *Interrupción 2do macho*; Fig. 3) fue mucho mayor que la frecuencia de CCM de los machos a los que se les permitió efectuarlo (1ª cópula del tratamiento *Interrupción 2do macho* y 2ª del tratamiento *Interrupción 1er macho*; Fig. 3). También fueron significativas las interacciones pareadas entre el año y las variables “tratamiento” ($F = 8.67$, $P = 0.0036$) y “cópula” ($F = 8.38$, $P = 0.0042$), ya que la diferencia entre *Frecuencia de Intentos de la CCM* y *Frecuencia de Eventos de la CCM* en el tratamiento *Interrupción 1er macho* fue menor en 2004 que en 2005, mientras que en el tratamiento *Interrupción 2do macho* fue mayor en 2004 que en 2005 (Fig. 3).

Al evaluar si impedir que los machos efectúen la CCM afecta la conducta de la hembra (duración de las *Patadas* y los *Jaloneos*), el ANDEVA no resultó significativo (F_7 ,

$t_{28} = 1.56$, $P = 0.15$), lo que indica que las hembras efectuaron esta conducta con la misma duración, independientemente de si fueron apareadas con machos impedidos o no de efectuar la CCM.

No se encontraron diferencias significativas entre cópulas donde se impidió y cópulas donde se permitió que los machos realizaran la CCM en el porcentaje de cópulas que terminaron espontáneamente o antecedidas por *Patadas/Jaloneos* (terminaron de manera espontánea 9 de 121 cópulas donde se permitió que el macho efectuara la CCM y 16 de 121 cópulas donde se impidió que el macho la efectuara; Chi cuadrada = 2.19, $P = 0.14$).

3. Efecto de la Manipulación Experimental de la CCM sobre los Componentes de Adecuación Medidos.

Duración de la Cópula. El ANDEVA resultó significativo ($F_{7, 234} = 2.38$, $P = 0.022$), aunque sólo explicó cerca de 4% de la variación en la duración de las cópulas ($R^2 = 3.9\%$). Únicamente fue significativo el efecto de la interacción [tratamiento X cópula] ($F = 14.21$, $P = 0.0002$; todas las demás $F < 2.2$ y $P > 0.14$), lo que indica que las cópulas con la CCM impedida duraron menos que aquellas con la CCM efectuada (Fig. 4).

Latencia a la Segunda Cópula. El ANDEVA no fue significativo ($F_{3, 71} = 0.73$, $P = 0.54$), lo que significa que la latencia a la segunda cópula no difirió entre las hembras que en su primera cópula recibieron la CCM y las que no lo recibieron.

Receptividad Sexual de las Hembras Después de la Primera Cópula. Que una hembra no recibiera la CCM durante su primera cópula no afectó su probabilidad de aparearse al día siguiente con un segundo macho, ya que todas las hembras se re-aparearon, independientemente de si en su primer cópula recibieron (66 de 66 hembras) o no (55 de 55 hembras) la CCM.

Porcentaje de Hembras que Pusieron Huevos. Se encontró que el porcentaje de hembras que pusieron huevos fue idéntico en ambos tratamientos tanto en el 2004 (43.48% vs. 43.33%; Chi cuadrada = 0, $P = 0.99$), como en el 2005 (29.03% vs. 33.33%; Chi cuadrada = 0.14, $P = 0.71$). Al agrupar ambos años se obtuvieron los mismos resultados (35.185% vs. 38.095%; Chi cuadrada = 0.11, $P = 0.75$; Fig. 5).

Tiempo Transcurrido hasta la Puesta de Huevos. Se encontró que el ANDEVA no fue significativo ($F_{3, 39} = 1.85$, $P = 0.15$), lo que indica que las hembras de ambos tratamientos tardaron el mismo tiempo en poner sus huevos.

Número de Huevos Puestos. Ninguno de los dos ANDEVAs resultó significativo (incluyendo las hembras que no pusieron huevos: $F_{3, 113} = 1.45$, $P = 0.23$, y utilizando sólo las hembras que pusieron huevos: $F_{3, 39} = 1.31$, $P = 0.28$), lo que indica que el tratamiento no afectó el número de huevos puestos por las hembras.

Tiempo Transcurrido Hasta la Eclosión de los Huevos. El ANDEVA no fue significativo ($F_{3, 34} = 1.2$, $P = 0.32$), lo que indica que los huevos puestos por las hembras de ambos tratamientos tardaron el mismo tiempo en eclosionar.

Número de Huevos Eclosionados. El ANDEVA no fue significativo ($F_{3, 39} = 1.43$, $P = 0.25$), lo que indica que el número de huevos que eclosionaron fue similar en las hembras de ambos tratamientos.

Porcentaje de Huevos Eclosionados. El ANDEVA no fue significativo ($F_{3, 39} = 0.9$, $P = 0.45$), lo que indica que el porcentaje de huevos que eclosionaron fue similar en las hembras de ambos tratamientos.

Mortalidad de las Ninfas. No existieron diferencias significativas entre las hembras de ambos tratamientos, lo que indica que la cantidad de ninfas que murieron antes de ser sacrificadas fue similar entre tratamientos ($U_{[N_1=16, N_2=17]} = 126.5$, $P = 0.73$).

4. Efecto de la Manipulación Experimental de la CCM sobre la Paternidad

No se encontró diferencias significativas entre las hembras de ambos tratamientos al comparar el número de descendientes que fueron utilizados en los análisis de paternidad ($U_{[N_1=16, N_2=17]} = 126.5$; $P = 0.73$). Posteriormente, al comparar el valor de P_2 entre los tratamientos, no se encontraron diferencias significativas ($N_{\text{Interrupción del 1er macho}} = 16$, $N_{\text{Interrupción del 2do macho}} = 17$, $U = 104$, $P = 0.25$; Fig.6a), lo que indica que impedir la CCM no afectó el número de hijos. En ambos tratamientos los machos que copularon en segundo lugar obtuvieron una mayor paternidad (Fig. 6a), aunque existió una gran variación en P_2 dentro de cada tratamiento (Fig.6A). En el Cuadro 3 se muestra la mediana, cuartil superior e inferior y tamaño de muestra de cada una de las variables medidas en las

hembras experimentales que finalmente se analizó su progenie. Al realizar el análisis sólo con hembras con paternidad determinada a 10 o más hijos (ver sección análisis estadísticos) tampoco existieron diferencias entre tratamientos en el número de descendientes por hembra que fueron utilizados en los análisis de paternidad ($U = 32$, $P = 0.51$) y no se encontraron diferencias significativas en P_2 entre los tratamientos ($N_{Interrupción\ del\ 1er\ macho} = 8$, $N_{Interrupción\ del\ 2do\ macho} = 10$, $U = 36$, $P = 0.76$; Fig 6b), lo que indica que impedir la CCM no afectó la cantidad de hijos producidos por los machos. Nuevamente se observó que en ambos tratamientos los machos que copularon en segundo lugar obtuvieron una mayor paternidad (Fig. 6b), aunque se volvió a observar una gran variación en P_2 dentro de cada tratamiento (Fig.6B).

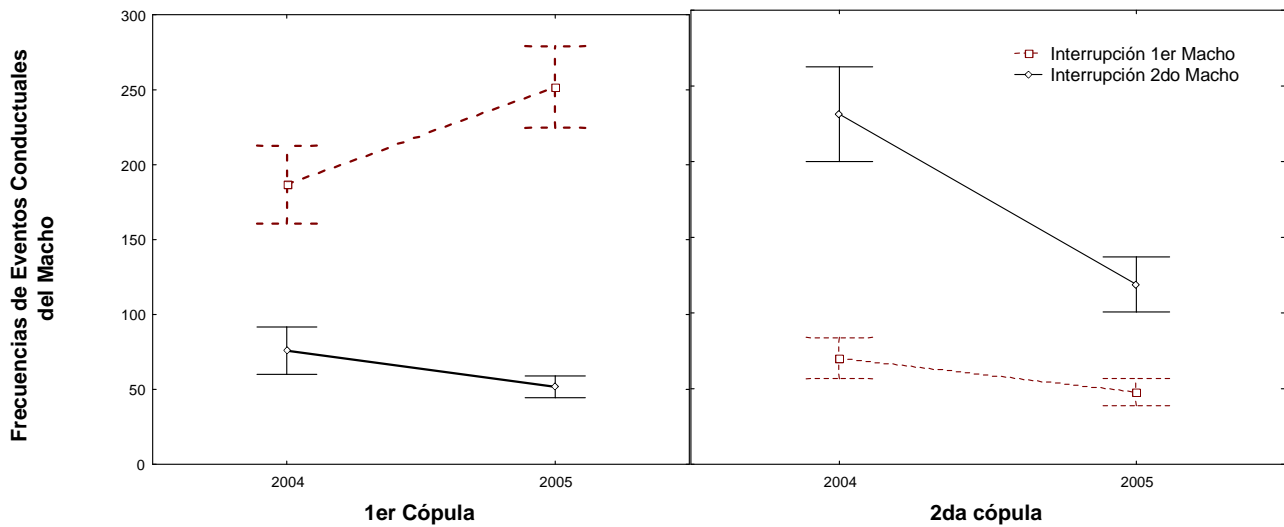


Fig. 3. Frecuencia de eventos/intentos de la CCM en la primera y segunda cópula de las hembras según el tratamiento. *Interrupción 1er macho*: Al primer macho se le impide realizar la conducta copulatoria, mientras al segundo macho se le permitió efectuarla (línea punteada); *Interrupción 2do Macho*: El procedimiento se invirtió (línea continua). Promedio y $\pm.95$ error estándar es mostrado en la figura.

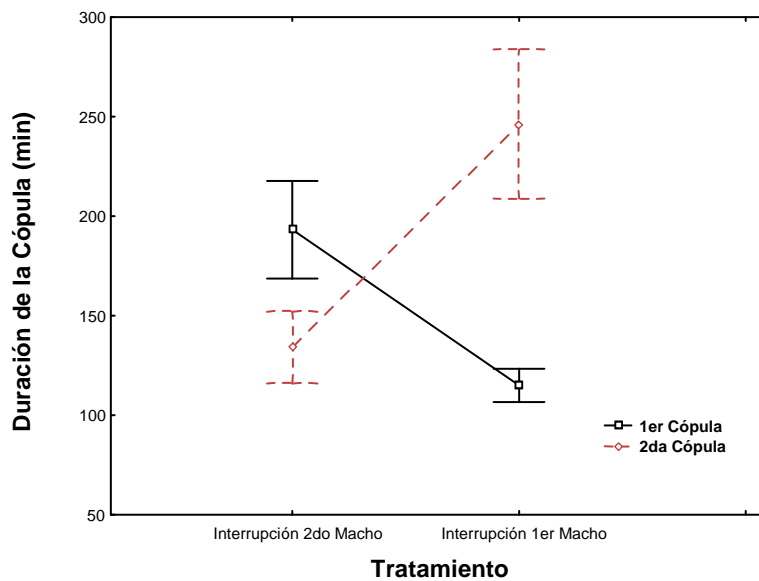


Fig. 4. Duración de la cópula. Las cópulas con la CCM impedida duraron menos que aquellas con la CCM efectuada. *Interrupción 1er macho*: Al primer macho se le impide realizar la conducta copulatoria, mientras al segundo macho se le permitió efectuarla; *Interrupción 2do Macho*: El procedimiento se invirtió. Promedio y $\pm.95$ error estándar es mostrado en la figura.

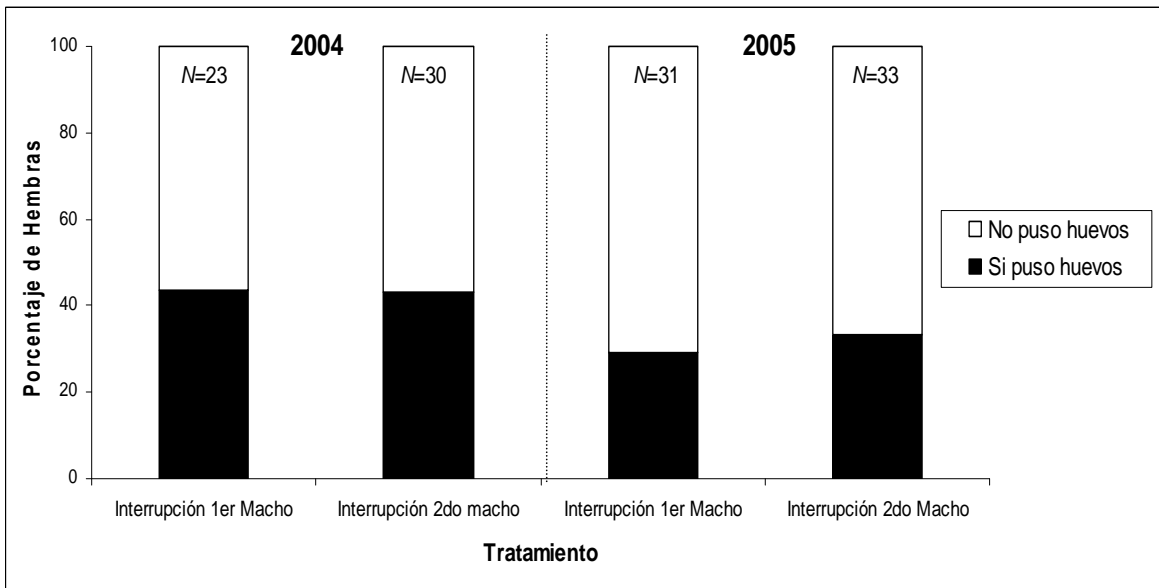


Fig. 5. Porcentaje de hembras que pusieron o no huevos según el tratamiento experimental.

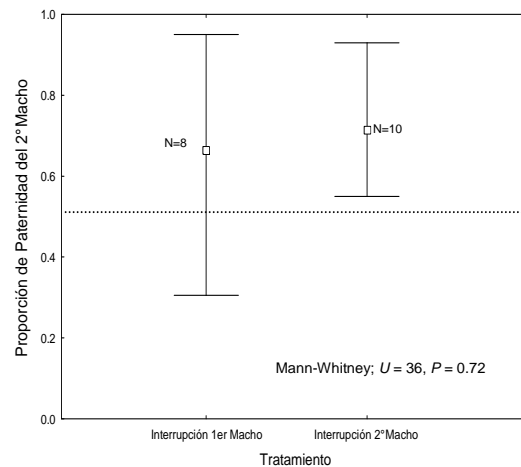
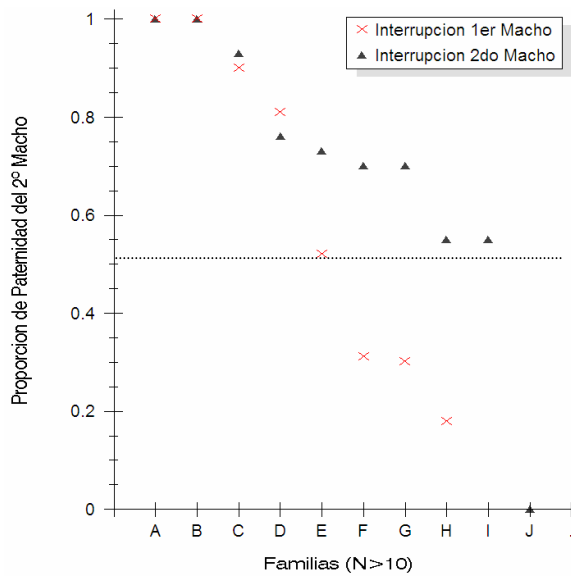
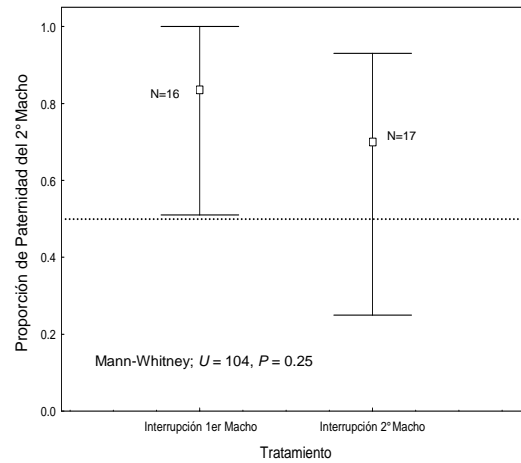
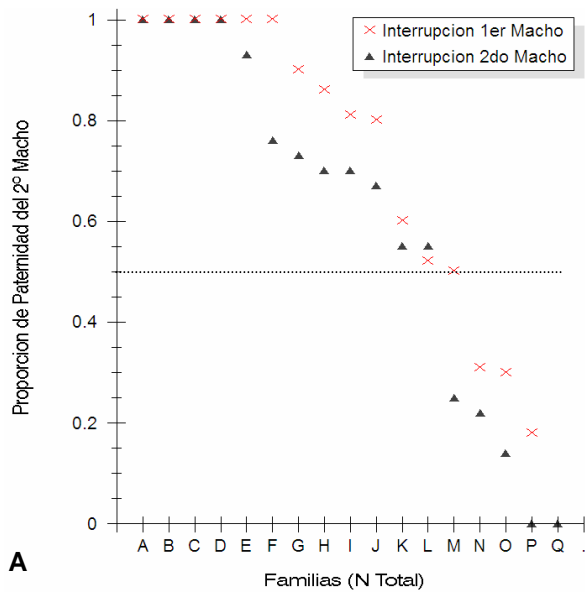


Fig. 6. Proporción de descendencia procreada por el segundo macho (P_2). Fig. **A** Se graficó la P_2 de todas las hembras experimentales (Familias A, B, C,...etc.). Fig **B**. Utilizando sólo aquellas familias con más de 10 individuos analizados. Fig. **a** Se graficó mediana y cuartil superior e inferior de P_2 para cada tratamiento, utilizando todas las hembras experimentales a las cuales les fue analizada su descendencia, Fig. **b** Utilizando sólo aquellas familias con mas 10 individuos analizados.

DISCUSIÓN

El resultado más destacado de este estudio fue que, contrario a lo que se esperaba, no hubo un efecto de la interrupción de la CCM sobre el éxito de fertilización. Se encontró que el último macho en copular, independientemente de realizar o no la CCM, tiende a obtener la mayor proporción de la progenie, lo que sugiere que la competencia espermática tiene un papel importante en esta especie. Este resultado es similar al de la gran mayoría de insectos (Fincke, 1984; Gwynne, 1984; Michiels y Dhondt, 1988; Favila *et al.*, 2005), aunque la precedencia espermática (P_2) en *S. marginella* no es particularmente alta, al igual que en la mayor parte de los heterópteros (50-70% - McLain, 1989; Rubenstein, 1989; Danielsson y Askenmo, 1999; Stutt y Siva-Jothy, 2000; García-González *et al.*, 2003). Un mecanismo congruente de competencia espermática con este patrón, es el de desplazamiento de esperma denominado *sperm flushing*, donde una sola cópula es suficiente para llenar de eyaculado la espermateca (estructura quitinosa de almacenaje de esperma- Oliver, 2004) de la hembra, por tanto subsecuentes entradas de eyaculados a esta estructura pueden forzar el desalojo de esperma previamente almacenado (Simmons, 2001).

El hecho de que los apareamientos con la CCM fueron de mayor duración, en comparación con aquellos sin la conducta masculina, podría sugerir que la función de la CCM es: 1) incrementar la duración de la cópula (Stratton *et al.*, 1996; Hoikkala *et al.*, 2000; Shuker *et al.*, 2002; Schäfer y Uhl, 2002); 2) incrementar la cantidad de esperma y/o sustancias seminales transferidas a la hembra (Simmons, 2001); 3) incrementar un mayor desplazamiento de esperma de machos previamente apareados con la hembra, si es que existiera un mecanismo por el cual desplazaría el esperma que la hembra ha obtenido de cópulas previas como ocurre en otros insectos (Simmons, 2001); o simplemente 4) evitar la competencia espermática, como por ejemplo ser parte de un "cuidado de pareja copulatorio" (McLain, 1989; Arnqvist y Danielsson, 1999a; Hosokawa y Suzuk, 2001). Sin embargo, los análisis de paternidad, no apoyan estas interpretaciones.

Es importante señalar que, aunque en general el segundo macho obtuvo la mayor proporción de la paternidad en ambos tratamientos, existió un amplio rango de variación en la paternidad del segundo macho, habiendo incluso casos donde el primer macho obtuvo la mayor parte de paternidad. Estos resultados se han presentado en otras especies de insectos (revisión en Simmons, 2001; Favila *et al.*, 2005), y se han interpretado como que las hembras podrían estar jugando un papel importante en la asignación de paternidad y posiblemente dicha variación es producto de la elección

crítica femenina (Eberhard, 1996). La ausencia de efecto de la *CCM* sobre la distribución de la paternidad entre los dos machos que copularon con las hembras es congruente con la ausencia de efectos de la *CCM* en la probabilidad de las hembras de aparearse por segunda ocasión y en la latencia a la segunda cópula. Estos resultados sugieren que en *S. marginella* la selección podría favorecer en las hembras una falta de periodo refractario post-cópula, posiblemente debido a que podrían obtener beneficios directos de cada apareamiento adicional. Los resultados experimentales de Cuatianquiz (2005) apoyan esta interpretación, ya que esta autora encontró que las hembras apareadas con dos machos vírgenes producen un mayor número de huevos, que las que se aparean una o dos veces con el mismo macho o las que se aparean con un macho virgen y otro previamente apareado, lo cual sugiere que existen sustancias en el eyaculado que incrementan la adecuación de las hembras. Otra posibilidad es que la *CCM* tenga un efecto inhibitorio sobre la receptividad sexual de las hembras, pero que este efecto funcione a muy corto plazo y no se haya detectado en mi experimento debido a que las hembras no se expusieron inmediatamente a otros machos, sino hasta 24 horas después de su primera cópula. Sin embargo, no es claro cuáles podrían ser las ventajas de inducir un periodo refractario corto, cuando las hembras colocan sus huevos de una a dos semanas después de su segunda cópula (Cuadro 2).

Que no se encontrara ningún efecto del tratamiento sobre todos los demás componentes de adecuación (*Latencia a la Segunda Cópula, Receptividad Sexual de las Hembras Después de la Primera Cópula, Porcentaje de Hembras que Pusieron Huevos, Tiempo Transcurrido Hasta la Puesta de Huevos, Número de Huevos Puestos, Tiempo Transcurrido Hasta la Eclosión de los Huevos, Número de Huevos Eclosionados, Porcentaje de Huevos Eclosionados y Mortalidad de las Ninfas*) era de esperarse de acuerdo al diseño del experimento (es decir, ambas "recibieron" la *CCM* de uno de los machos, mientras que a su otra pareja se le impidió realizarlo), ya que es muy probable que las hembras de ambos tratamientos hayan recibido cantidades totales de estimulación similares por parte de los dos machos con quienes copularon.

Por otra parte como se había mencionado las hembras realizan conductas dirigidas hacia los machos durante la cópula, principalmente hacia el final de esta (aunque pueden presentarse en menor frecuencia a lo largo de toda la cópula), que sugieren que su función es inducir (*Patadas*) o forzar (*Jaloneos*) a los machos a finalizar el apareamiento. Por tal motivo se esperaba que si la *CCM* permitía a la hembra evaluar inmediatamente a su pareja, la hembra aumentaría la frecuencia y/o duración de patadas y jaloneos en el momento de interrumpir la *CCM*. Sin embargo no fue así; la duración de

patadas y *jaloneos* fue la misma independientemente de si la hembra recibía o no la *CCM* y los porcentajes de cópulas que acabaron espontáneamente o después de un evento de *Patadas/Jaloneos* fueron similares independientemente de esta manipulación conductual.

¿Qué puedo concluir con respecto a la pregunta fundamental de este proyecto de por qué los machos de *S. marginella* efectúan la *CCM*? La ausencia de un efecto significativo sobre la paternidad encontrada en el experimento me lleva a concluir que la *CCM* actualmente no tiene una función adaptativa desde el punto de vista del macho. Sin embargo, esta conclusión no me permite explicar tres hechos: 1) La existencia de una conducta compleja, (conformada de al menos cuatro pautas-Oliver, 2004) como la *CCM*; 2) Que se presente con una frecuencia tan alta en la mayoría de las cópulas, donde además del tiempo gastado, la alta frecuencia con que se presenta podría implicar un costo energético que se evitaría si no se efectuara, y 3) Que los machos hayan incrementado la frecuencia de la *CCM* (entre 2.6X y 3.6X) cuando se les impidió efectuarla.

Por estas razones, existen al menos tres explicaciones alternativas de la posible función de la *CCM*. Una primera posibilidad, es que en el pasado la *CCM* sí haya tenido la función de estimulación de la hembra, pero posteriormente el efecto de esta estimulación se haya perdido (Wiens, 2001), como por ejemplo al desarrollar las hembras una resistencia a la *CCM*. Pero a pesar de haber perdido su función posiblemente la selección natural no la ha eliminado porque no representa un costo (o es relativamente bajo) para la adecuación de los machos, o tal vez el tiempo evolutivo no la ha acabado de eliminar. Una segunda posibilidad es que la *CCM* sí tenga una función adaptativa, pero el diseño experimental realizado no me permitió identificarlo, es de destacar que la perspectiva de este proyecto fue sólo ver la importancia de la conducta copulatoria para la adecuación de los machos pero no desde una perspectiva femenina. Se podría evaluar por ejemplo si las hembras realizan asignación diferencial de recursos hacia las crías de aquellos machos que efectúen con mayor frecuencia o duración la *CCM* (Sheldon, 2000; Edvardsson y Arnqvist, 2005). Y una última posibilidad es que ni en el pasado ni el presente la *CCM* haya presentado una función, es decir, solo haberse desarrollado como un efecto colateral de la evolución del sistema nervioso de esta especie.

Cuadro 1. Cuadro comparativo en especies de artrópodos, sobre el efecto de la Conducta copulatoria masculina (*CCM*) aparentemente estimulante de la hembra, sobre distintas variables reproductivas de la hembra que puedan afectar la adecuación de los machos. Cuando la variable reproductiva evaluada se encuentra subrayada en el texto, significa que la *CCM* tuvo algún efecto, en caso contrario, significa que no tiene ningún efecto o no se encontró evidencia de que la *CCM* afectara esa variable reproductiva. Si la variable reproductiva se encuentra en cursivas, significa que depende si se manipuló o no la *CCM* y adelante se muestra en qué situación fue cuando tuvo algún efecto la *CCM*. *Abreviaciones del cuadro:* **T.E.**-Tipo de Estudio: (**C:** Correlativo.- Donde sólo se observó si existe evidencia correlativa de la *CCM* sobre alguna variable reproductiva, pero sin realizar ninguna manipulación, o **E:** *Experimental.*- Cuando se manipuló de alguna forma la *CCM*); **Componente Evaluado de la CCM** - Componente de la *CCM* que fue evaluado y que afecta o no variables reproductivas.

Especie (Orden: Familia)	Conducta Copulatoria Masculina (<i>CCM</i>)	Componente Evaluado de la <i>CCM</i>	Variable Reproductiva Evaluada	T.E. (C/E)
<i>Calopteryx haemorrhoidalis asturica</i> (Odonata: Calopterygidae)	Estimulación con movimientos de genitalia del macho a la genitalia de la hembra.	Número de movimientos de genitalia.	• <u><i>Éxito de Fertilización</i></u> (Desplazamiento de espermatozoides de la Bursa copulatrix* y espermateca* de la hembra).	C ⁽¹⁾
		Ancho de la genitalia del macho estimula las sensilas de los platos cuticulares.	• <u><i>Éxito de Fertilización</i></u> (Desplazamiento del espermatozoides de la espermateca*).	E ^{(a)(1)}
<i>Polistes dominulus</i> (Hymenoptera: Vespidae)	Vibraciones y agarra con sus antenas a la hembra.	Duración de la <i>CCM</i> .	• Cópula Exitosa.	C ⁽²⁾
<i>Ozophora baranowskii</i> (Heteroptera: Lygaeidae)	Movimientos de genitalia del macho (inserciones y repliegues), pequeños golpes a las antenas, patas, alas y vibración de sus patas.	Conjunto de toqueteos, frecuencia de vibraciones de las alas y movimiento de genitalia.	• Cópula Exitosa. • El Número y Porcentaje de huevos fértiles.	C ⁽³⁾

Especie (Orden: Familia)	Conducta Copulatoria Masculina (CCM)	Componente Evaluado de la CCM	Variable Reproductiva Evaluada	T.E. (C/E)
<i>Stenomacra marginella</i> (Heteroptera: Largidae)	El macho frota con sus patas y antenas las antenas, cabeza, tórax y patas de la hembra (toqueteo), montan y abrazan a hembra con el mismo comportamiento.	Frecuencia de toqueteos, montas y abrazos. El macho incrementa la tasa de intentos por realizar la CCM.	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Duración de Cópula.</u> 	<i>E</i> ^{(b)(4)}
<i>Drosophila serrata</i> y <i>D. birchii</i> (Diptera: Drosophilidae)	Vibran las alas y producen sonido.	Efectuarlo Efectuarlo	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Cópula Exitosa.</u> • <u>Duración de Cópula</u> (Determinado por la hembra). • Número de progenie. 	<i>C</i> ⁽⁵⁾ <i>E</i> ^{(c)(6)}
<i>Sabethes chloropterus</i> (Diptera: Culicidae)	Movimientos rítmicos de las patas medias del macho hacia la cabeza de la hembra, sacudidas del macho y movimientos de la genitalia (Inserciones).	Duración de movimientos rítmicos con las patas medias del macho.	<ul style="list-style-type: none"> • Duración de Cópula (En Cópula Exitosa y Cópula No Exitosa). • <u>Cópula no exitosa.</u> 	<i>C</i> ⁽⁷⁾
<i>Tribolium castaneum</i> (Coleptera: Tenebrionidae)	Frotan con los tarsos los bordes laterales de los hemielitros de la hembra.	Intensidad de la CCM (número de golpes dividido entre la duración de la cópula). Porcentaje de frotamiento a la hembra en padres e hijos; bajo diferentes densidades de población.	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Éxito de Fertilización</u> (precedencia espermática) = <u>Entre machos no manipulados</u>; entre machos manipulados. • Cantidad de esperma. • Beneficio Indirecto (Progenie viable y Atractiva). 	<i>E</i> ^{(d)(8)} <i>C</i> ⁽⁹⁾

Especie (Orden: Familia)	Conducta Copulatoria Masculina (CCM)	Componente Evaluado de la CCM	Variable Reproductiva Evaluada	T.E. (C/E)
<i>Tribolium castaneum</i> (Coleoptera: Tenebrionidae)	Frotan con los tarsos los bordes laterales de los hemielitros de la hembra.	Porcentaje del frotamiento a la hembra.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Número de veces que oviposita la hembra = entre machos no manipulados</i>; entre machos manipulados. • Asignación Sexual. • Duración de Cópula. 	<i>E</i> ^{(d)(10)}
<i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i> (Coleoptera: Chrysomelidae)	Golpes con las antenas del macho (anteneo) a las antenas, cabeza y patas delanteras de la hembra.	Mayor velocidad de golpeteo con las antenas.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Cópula Exitosa</i> (Completa penetración del edeago y transferencia del espermatóforo). • Beneficio Indirecto (Regalo nupcial transferido durante la cópula). 	<i>C</i> ⁽¹¹⁾
		Calidad del anteneo del macho (Se requiere movimiento antenal completo o simétrico).	<ul style="list-style-type: none"> • Cópula Exitosa. 	<i>E</i> ^{(e)(12)}
		Mayor velocidad de golpeteo con las antenas.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Cópula Exitosa.</i> • Fecundidad de la hembra. • Viabilidad de huevos. • Progenie con desarrollo rápido. • Progenie que se reproduzca rápido. • Progenie más fecunda. • Distribución diferencial de recursos a los huevos. • <i>Progenie con alta probabilidad de sobrevivir a adulto.</i> • <i>Progenie más atractiva a las hembras</i> (hijos con igual calidad de CCM que los padres). 	<i>E</i> ^{(f)(12)}

Especie (Orden: Familia)	Conducta Copulatoria Masculina (CCM)	Componente Evaluado de la CCM	Variable Reproductiva Evaluada	T.E. (C/E)
<i>Psilothrix viridicoeruleus</i> (Coleoptera: Melyridae)	Pequeños golpes con las patas del macho en el abdomen de la hembra; golpes a las antenas, cabeza y tórax de la hembra con antenas y cabeza del macho.	Mayor número de golpes en el abdomen, antenas, cabeza y tórax de la hembra.	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Cópula Exitosa</u> • <u>Duración de Cópula.</u> • <u>Permanecen más tiempo montados en la hembra.</u> 	C ⁽¹³⁾
<i>Macroductylus costulatus</i> , <i>M. sericinus</i> y <i>M. sylphis</i> . (Coleoptera: Scarabaeidae)	Movimientos de genitalia (inserciones y repliegues) del macho. Frota con su abdomen y vellosidades los élitros de la hembra, realiza vibraciones y la abraza con sus patas.	Efectuarlo	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Cópula Exitosa</u> (Completa intromisión a estructuras internas de la hembra). 	C ⁽¹⁴⁾
<i>Pholcus phalangioides</i> (Araneae: Pholcidae)	Movimientos de genitalia (inserciones rítmicas y retorcimiento de los pedipalpos especializados).	Rapidez de inserción en los primeros minutos de la cópula.	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Duración de Cópula</u> • <u>Predictor de Paternidad.</u> • Reapareamiento de la hembra. • Éxito de eclosión de huevos. 	C ⁽¹⁵⁾
<i>Schizocosa</i> sp., <i>Rabidosa</i> sp., <i>Gladicosa</i> sp., <i>Hogna</i> sp., <i>Isohogna</i> sp., <i>Trochosa</i> sp., <i>Geolycosa</i> sp., <i>Arctosa</i> sp., <i>Alopecosa</i> sp., <i>Pardosa</i> sp. (Araneae: Lycosidae)	Movimientos de genitalia del macho (inserciones de pedipalpos especializados y expansión del hematodocal.**)	Múltiple inserciones de pedipalpos especializados y expansión del hematodocal.	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Duración de Cópula.</u> 	C ⁽¹⁶⁾

Especie (Orden: Familia)	Conducta Copulatoria Masculina (CCM)	Componente Evaluado de la CCM	Variable Reproductiva Evaluada	T.E. (C/E)
<i>Schizocosa malitiosa</i> (Araneae: Lycosidae)	Movimientos de genitalia del macho (inserciones de pedipalpos especializados).	Duración y número de inserciones o cambio de pedipalpos especializados. Pero mayor CCM en la 2ª copula.	<ul style="list-style-type: none"> • Reapareamiento de la Hembra. 	C ⁽¹⁷⁾
<i>Linyphia litigiosa</i> (Araneae: Linyphiidae)	Movimientos de genitalia del macho (inserciones y repliegues repetitivos de los pedipalpos especializados)	Duración y número de inserciones durante la fase de preinseminación de la cópula.	<ul style="list-style-type: none"> • Éxito Fertilización (de la primera o segunda pareja de la hembra). 	C ⁽¹⁸⁾
		Rapidez y número de Inserciones durante la fase de preinseminación de la cópula.	<ul style="list-style-type: none"> • Éxito Fertilización de la última pareja (la hembra permite el paso del esperma). 	C ⁽¹⁹⁾
		Número y rapidez de Inserciones (asociado a la agresividad, fuerza y habilidad de combate entre machos).	<ul style="list-style-type: none"> • Beneficio Indirecto (progenie con competencia metabólica). 	C ^(19,20)
<i>Phrynus gervaisii</i> (Amplipygi: Phrynidae)	Golpes rítmicos vibratorios del macho y sacudidas con sus patas anteniformes	Efectuarlo pero en una secuencia predeterminada.	<ul style="list-style-type: none"> • Transferencia Espermática (la hembra recoge los paquetes espermáticos). 	C ⁽²¹⁾
		Aumenta en número y duración de vibraciones y sacudidas con su única pata.	<ul style="list-style-type: none"> • Cópula Exitosa. 	E ^{(9) (21)}

NOTAS: Abreviaciones dentro del cuadro; *Cópula exitosa*.- Exitosa transferencia del eyaculado; *Cópula no exitosa*.- No hay transferencia del eyaculado; *Efectuarlo*.- No evaluaron los componentes de la CCM, sólo si el macho efectuaba o no la CCM; (*).- Estructuras de almacenamiento de esperma de la hembra y (**).- Sacos membranosos que al expandirse permiten el movimientos de los escleritos palpaes (Eberhard, 2004).

Manipulación experimental de la CCM: (a).- Manipulación del tamaño de la genitalia del macho; (b).- Interrupción total o parcial de la CCM; (c).- Cepa mutada sin alas; (d).- Extirpación de tarsos; (e).- Extirpación de una antena; (f).- Machos que anteanan rápido y machos que anteanan lento y (g).- Perdida accidental de una pata anteniforme.

REFERENCIAS: (1).- Córdoba-Aguilar, 1999; (2).- Romani *et al.*, 2005; (3).- Rodríguez, 1998; (4).- Cuatianquiz y Cordero, 2006; (5).- Hoikkala y Crossley, 2000; (6).- Hoikkala *et al.*, 2000; (7).- Zsemlye *et al.*, 2005; (8).- Edvardsson y Arnqvist, 2000; (9).- Edvardsson, 2005; (10).- Edvardsson y Arnqvist, 2005; (11).- Tallamy *et al.*, 2002; (12).- Tallamy *et al.*, 2003; (13).- Shuker *et al.*, 2002; (14).- Eberhard, 1993; (15).- Schäfer y Uhl, 2002; (16).- Stratton *et al.*, 1996; (17).- Aisenberg y Costa, 2005 ; (18).- Watson, 1991a; (19).- Watson, 1991b ; (20).- Watson, 1994 y (21).- Peretti, 2002.

Cuadro 2. Variables medidas en las hembras experimentales de ambos tratamientos (*Interrupción 1er macho*: Al primer macho apareado con la hembra no se le permite realizar la CCM, pero a su segunda pareja si; *Interrupción 2do macho*: Al primer macho apareado con la hembra si se le permite realizar la CCM, mientras a su segunda pareja se le impide). Cuando el año en que se realizó el experimento mostró un efecto significativo sobre los tratamientos, se muestra el promedio \pm error estándar y tamaño de la muestra de cada uno de los tratamientos separados por año (2004/2005); pero si no afectó, fueron sumados los datos de ambos años y se mostraron como un sólo dato respectivamente en cada tratamiento.

Variable	<i>Interrupción 1er macho</i>		<i>Interrupción 2do macho</i>	
	Promedio \pm Error estándar	<i>n</i>	Promedio \pm Error estándar	<i>n</i>
Tamaño de la Hembra (mm ²)	35.42 \pm 1.62	18	33.95 \pm 0.88	23
Tamaño del 1er macho (mm ²)	23.89 \pm 0.93	18	24.02 \pm 0.81	23
Tamaño del 2º macho (mm ²)	24.62 \pm 1.2	19	24.12 \pm 0.99	23
Frecuencia de Intentos/Eventos de la CCM del 1er macho	186.39 \pm 137.29 / 251.9 \pm 160.34	23/31	71.9 \pm 91.74 / 51.79 \pm 44.44	30/33
Frecuencia de Eventos/ Intentos de la CCM del 2do macho	66.35 \pm 63.79 / 46.84 \pm 51.65	23/31	239.66 \pm 189.69 / 120.3 \pm 113	30/33
Duración de Patadas + Jaloneos en la 1er cópula (seg)	2799.02 \pm 316.84	52	2935.16 \pm 299.11	62
Duración de Patadas + Jaloneos en la 2da cópula (seg)	3480.52 \pm 614.86	52	2792.48 \pm 305.83	63
Duración de la 1er cópula (min)	114.43 \pm 8.96	54	186.71 \pm 26.44	63
Duración de la 2da cópula (min)	249.54 \pm 40.04	54	137.57 \pm 19.74	63
Latencia a la 2da cópula (seg)	1535.17 \pm 778.15	35	531.63 \pm 68.15	40
Tiempo Trascurrido Hasta la Puesta de Huevos (d)	21.316 \pm 5.19	19	20.42 \pm 3.05	24
Número de Huevos Puestos (*)	9.91 \pm 2.17	54	9.65 \pm 1.84	63
Número de Huevos Puestos (**)	28.158 \pm 3.311	19	25.333 \pm 2.568	24
Tiempo Trascurrido Hasta la eclosión de Huevos (días)	26.42 \pm 6.33	19	32.42 \pm 6.75	24
Número de huevos eclosionados	23.32 \pm 3.84	19	19.42 \pm 3.22	24
Porcentaje de huevos eclosionados	69.62 \pm 8.62	19	70.57 \pm 7.79	24

Notas: Para el análisis se utilizaron: (*) Todas las hembras experimentales, incluyendo aquellas que no pusieron huevos; (**) Se utilizaron sólo las hembras que pusieron huevos.

Cuadro 3. Variables reproductivas medidas en todas las hembras experimentales que finalmente se analizó su progenie en ambos tratamientos (*Interrupción 1er macho*: En la primer cópula al macho se le impide realizar la conducta copulatoria masculina a la hembra y en la segunda cópula si se le permite; *Interrupción 2do macho*: el procedimiento se invierte). Mediana [cuartil inferior-cuartil superior] (tamaño de muestra -*n*) son mostradas en el cuadro.

VARIABLES	Mediana (Q_i - Q_s) (<i>n</i>)		<i>U</i>	<i>p</i>
	<i>Interrupción 1er macho</i>	<i>Interrupción 2do macho</i>		
Frecuencia de Intentos/Eventos de la CCM del 1er macho	186 [111-387] (16)	37 [21-72] (17)	24	0.00005
Frecuencia de Eventos/ Intentos de la CCM del 2do macho	43.5 [19-60] (16)	141 [72-229] (17)	42.5	0.0008
Duración de la 1er cópula (min)	86 [60-145.5] (16)	105 [70-140] (17)	126	0.72
Duración de la 2da cópula (min)	119 [85-158.5] (16)	93 [53 – 125] (17)	91	0.11
Tiempo transcurrido hasta la puesta de huevos (días)	14.5 [9.5-30.5] (16)	15 [12-20] (17)	130	0.83
Tamaño de la puesta	32 [23.5-41] (16)	26 [22-34] (17)	107	0.29
Tiempo Transcurrido Hasta la eclosión de los huevos (días)	17 [14-18.5] (16)	15 [14-17] (17)	123.5	0.65
Número de huevos eclosionados	30 [19-38.5] (16)	24 [19-33] (17)	113	0.41
Porcentaje de huevos eclosionados	94.17 [69.87-98.53] (16)	97 [88.89-100] (17)	115.5	0.46
Mortalidad de las Ninfas	20 [15-29] (16)	19 [16-26] (17)	126.5	0.73
Número de Descendientes Utilizados en los Análisis de Paternidad	8.5 [4.5-16.5] (16)	11 [7-15] (17)	126.5	0.73
Proporción de Paternidad del 2do Macho (P_2)	0.84 [0.5-1] (16)	0.7 [0.25-0.93] (17)	104	0.25

APÉNDICE 1: PROTOCOLOS DE EXTRACCION DEL ADN DE LA CHINCHE *Stenomacra marginella*

Debido al tamaño tan pequeño de las ninfas de primer estadio (aproximadamente 2 mm de longitud) y a su poca cantidad de tejido, la obtención de ADN que pudiera ser amplificado en el PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) era casi nulo (problema no encontrado con los otros estadios ninfales y los adultos), por lo cual se realizaron modificaciones al Método de extracción de CTAB utilizado previamente en otra especie de chinche (Reguera, 1999) y el método "Miniprep" modificado (utilizado con éxito para otro tipo de organismos) (Chen y Ronald, 1999) hasta obtener dos protocolos de extracción de ADN, uno para las chinches adultas y otro para todos los estadios ninfales, los que a continuación se describen:

MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA CHINCHES ADULTAS

- 1.- Antes de realizar la extracción de ADN se disecta al organismo quitando el contenido estomacal y posibles parásitos.
- 2.- Moler completamente la muestra con nitrógeno líquido en el mortero.
- 3.- Añadir **400 µl** de solución amortiguadora de extracción **CTAB 2X** (100mM TRIS-HCl, pH 8.0, 20mM EDTA, 1.4 M NaCl, 2% CTAB), y mezclar bien. Posteriormente trasladar la mezcla a un tubo nuevo y estéril de 1.5 ml.
- 4.- Añadir **4 µl** de **proteínasa K** (20 mg/ml) hasta una concentración final de 0.2 mg/ml.
- 5.- Incubar durante **30 min.** a **65° C.**
- 6.- Centrifugar **6 min.** a **13000 rpm.** Trasladar el sobrenadante en tubos nuevos estériles.
- 7.- Agregar un volumen de **cloroformo: isoamílico** (24:1). Invertir suavemente un min.
- 8.- Centrifugar **3 min** a **13,000 rpm.**
- 9.- Añadir **200 µl** de **NH₄Ac** 5 M (la mitad del volumen).
- 10.- Incubar en **hielo** durante **30 min.**
- 12.- Centrifugar **20 min** a **14,000 rpm.** Trasladar el sobrenadante en tubos nuevos estériles.
- 12.- Añadir **800 µl** de **etanol** absoluto (2 volúmenes) y **80 µl** de **NaAc** 3 M, pH 5.2 (0.1 volúmenes).
- 13.- Incubar durante **20 min** a **-80° C**
- 14.- Centrifugar **10 min** a **13,000 rpm.** Eliminar el sobrenadante.
- 15.- Lavar el pellet con **200 µl** de **etanol 70° C.**
- 16.- Centrifugar durante **10 min** a **13,000 rpm.** Eliminar el sobrenadante.

17.- Dejar secar los tubos y resuspender en **50 µl TE**.

MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA LOS ESTADIOS NINFALES

- 1.- Moler completamente las muestras con nitrógeno líquido en el mortero.
- 2.- Añadir **200 µl** de solución amortiguadora de extracción **CTAB 2X** (100mM TRIS-HCl, pH 8.0, 20mM EDTA, 1.4 M NaCl, 2% CTAB) en el mismo mortero y mezclar completamente. Posteriormente trasladar la mezcla a un tubo nuevo.
- 3.- Añadir **2 µl** de **proteínasa K** (20 mg/ml) hasta una concentración final de 0.2 mg/ml
- 4.- Incubar durante **30 min.** a **65° C**.
- 5.- Centrifugar **6 min.** a **13,000 rpm**. Recoger el sobrenadante en tubos nuevos.
- 6.- Agregar **200 µl** (un volumen igual) de **cloroformo: isoamílico** (24:1).
- 7.- Centrifugar **3 min.** a **13,000 rpm**.
- 8.- En un tubo nuevo agregar **600 µl** de **isopropanol** frío y trasladar el sobrenadante.
- 9.- Incubar **12 hrs** a **-20 °C**. (se puede quedar toda la noche).
- 10.- Centrifugar **10 min** a **13,000 rpm** y eliminar el sobrenadante.
- 11.- Limpiar el DNA agregado **1 ml** de **etanol** al **70%** frío y mover con suavidad.
- 12.- Centrifugar **10 min** a **13,000 rpm** y eliminar el sobrenadante.
- 13.- Dejar secar aproximadamente durante 15 min y resuspender en **25 µl** de **TE**.

Diversas pruebas realizadas con el ADN extraído del protocolo anterior, nos mostraron que el ADN amplificaba mejor, con el siguiente protocolo de limpieza de ADN:

- 1) Precipitar el ADN $\frac{1}{2}$ volumen de **NH₄Ac 7.5 M** y 2.5 volúmenes de **Etanol** frío.
- 2) Incubar durante **30 min** a **-20 °C**.
- 3) Centrifugar **25 min** a **13,000 rpm** y decantar el sobrenadante.
- 4) Lavar el pellet con **70 µl** de **etanol** al **70%** (frío). Si se despega el pellet volver a centrifugar durante **10 min** a **13,000 rpm**.
- 5) Dejar secar aproximadamente durante 15 min y resuspender en **10 µl** de **TE** o **dH₂O**.

APÉNDICE 2: PRUEBAS DE PATERNIDAD

Para las pruebas de paternidad se utilizaron los primers ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*) son microsatélites del tipo di- y trinucleótidos (p.e. AG..., CAG...) que tienen de cuatro a diez unidades repetidas. La técnica de ISSR es idéntica a las de RAPD's ("Random Amplified Polymorphic DNA") (Esselman *et al.*, 1999; Arcade *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2002), excepto que las secuencias de los primers de ISSR son diseñadas de regiones de microsatélites y las temperaturas de alineación son más altas, reduciendo de esta forma los artefactos producidos en los RAPD's (Haig *et al.*, 2003; Wolfe *et al.*, 1998). Estas bases nos dieron fundamentos para utilizar dicha técnica en nuestra especie de estudio, por lo que después de haber extraído el ADN, se procedió a realizar el siguiente protocolo:

Después de extraer el ADN de los adultos fue diluido en una proporción 4:1 y limpiado con RNAsa, mientras que el de las ninfas no se diluyó, sólo se les aplicó 5 μ l RNAsa antes de realizar el PCR. La concentración de ADN fue determinada con relación al marcador de peso molecular lambda (25 ng/ μ l), en geles de agarosa al 0.7 % (invitrogen).

Fueron probados ISSR (de 15 a 23 nucleótidos de longitud) del conjunto de primers UBC No. 9 Biotechnology Laboratory, University British Columbia (http://www.michaelsmith.ubc.ca/services/NAPS/Primer_Sets/) y seleccionados finalmente los de mayor polimorfismo (Cuadro A). Los primer's 827 y 856 se utilizaron para determinar la paternidad de todos los organismos, solamente en aquellas donde no se logró determinar la paternidad con estos oligonucleótidos se probó con el primer 809.

Cuadro A.- Oligonucleótidos (primer's) utilizados para la determinación de paternidad en la chinche *S. marginella* y sus secuencias.

Primer	Secuencia	Temperatura de alineación (°C)
827	ACACACACACACACACG	46
856	ACACACACACACACACYA	48
809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	50

Las cantidades exactas de reactivos (Biogenica, Facultad de Veterinaria, UNAM) que se deben aplicar por individuo para el PCR se muestran en la Cuadro B.

Cuadro B. Cantidades exactas de reactivos que se deben aplicar en el PCR por individuo para una reacción de 18 μ l.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN FINAL/UNIDADES	18 μ l R X N
dd H ₂ O		4.5
Amortiguador de Reacción (10 X)	1X	2.0
dntp's (0.2 mM) (10X)	100 μ M de cada uno de los 4 dNTP's	4.0
Primer	1 μ M	2.0
MgCl ₂ (30 mM) (20X)		2.0
Amplificasa (5 U/ μ l) 500 U	0.7 U	0.5
ADN		3

Las reacciones fueron amplificadas en un termociclador (Techne-Flexigene) programado por: 1.5 min a 94°C; 40 ciclos de: 30 s a 94°C, 40 s a 94°C, 45 s a la temperatura de alineamiento específica para cada oligonucleótido (Cuadro A), 1.5 min a 72°C; finalmente 7 min a 72°C y almacenados a 10°C. Modificaciones del protocolo utilizado por Wolfe Laboratory en UBC (<http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/protocols.ISSR.html>). Siempre se utilizó un control negativo para monitorear cualquier posible contaminación.

Los productos amplificados se corrieron a 120 v en geles de agarosa al 3.5% (3:2 MetaPhor: Seaken, (Cambrex), con Buffer TBE 1X. El marcador molecular utilizado en todos los geles fue 1 Kb plus ladder (invitrogen) (100 a 1000 pb). La disposición de los individuos se muestra en la Fig. A1.

Los geles se tiñeron con Bromuro de etidio, se visualizaron con luz ultravioleta y se fotografiaron usando película Polaroid 667 blanco y negro, así como con una cámara digital Sony modelo *CyberShot DSC-P50*.

Registro y análisis de datos. Los primers ISSR son heredados de manera Mendeliana como dominantes o codominantes (Haig *et al.*, 2003; Wolfe *et al.*, 1998), pero

son interpretados como marcadores dialélicos dominantes, por tanto el alelo dominante determina la presencia de una banda como que los individuos $+/+$ y $+/-$ tiene el fenotipo (1), mientras que los individuos con $-/-$ (ausencia de banda) tiene el fenotipo (0). La ausencia de una banda es interpretada como pérdida de un locus, por delección de un sitio de ISSR o un nuevo arreglo cromosómico (Wolfe y Listons 1998).

Una banda fue definida aquí como un producto o fragmento amplificado de un tamaño particular, que puede ser identificado repetidamente. Las bandas fueron identificadas por sus pesos moleculares con respecto al marcador de peso molecular 1 Kb en cada gel (Fig. A1). Cada banda fue registrada como presente (1) o ausente (0). Las bandas que no eran claras en un individuo fueron registradas como datos faltantes (missing data). Se supuso que cada banda se considera como un locus independiente.

Para la reconstrucción de las relaciones de parentesco se generó una matriz de similitud por cada familia ($N = 33$) utilizando el coeficiente SM (Coeficiente pareado simple - Sokal y Sneath, 1963), posteriormente se agruparon mediante UPGMA (Ntsys) y se generó un dendograma utilizando el programa estadístico NTSYS-pc versión 2.01. (Fig. A2).

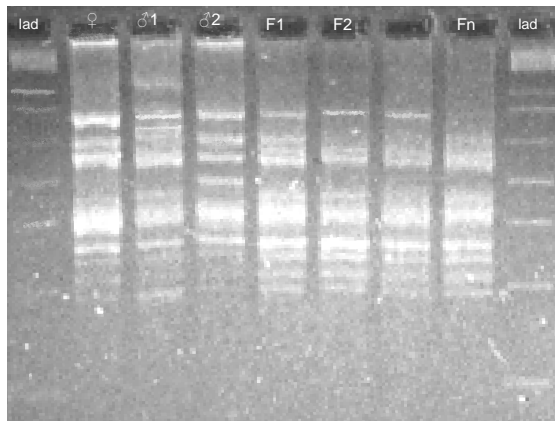


Fig. A1. Disposición de los individuos en el gel de agarosa (al 3.5%) para la determinación de paternidad de los machos. **Lad**.-Ladder 1Kb plus; ♀.- Hembra sometida al tratamiento (madre de la descendencia); ♂1.- Primer macho con el que se apareo la hembra; ♂2.- Segundo macho con el que se apareo la hembra; **F₁, F₂... F_n**.- Descendencia a determinar paternidad. La misma disposición de los individuos se utilizó en ambos tratamiento.

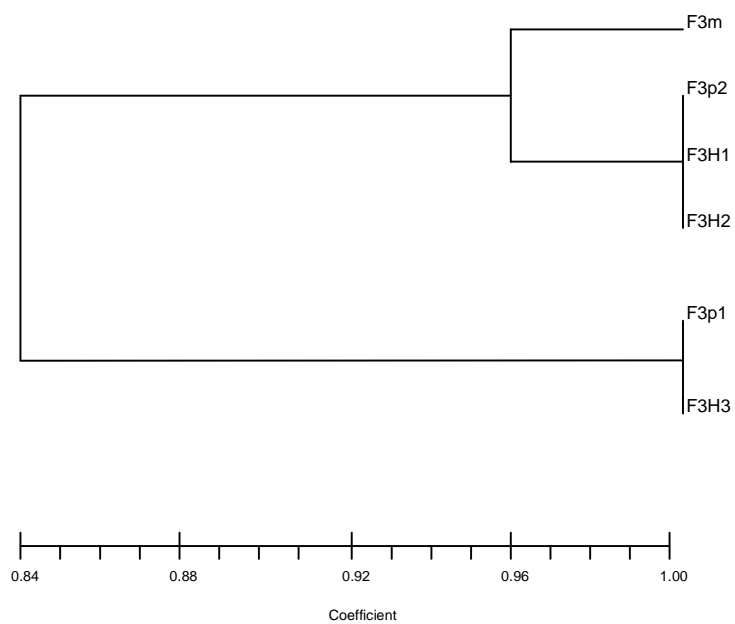


Fig. A2. Ejemplo de una familia (F3) para la reconstrucción de las relaciones de parentesco: F3m (hembra experimental), F3p1 (primer macho con el que se apareo la hembra), F3p2 (segundo macho con el que se apareo la hembra), F3H1, F3H2...F3HN (descendencia analizada). Se generó una matriz de similitud por familia, utilizando el coeficiente pareado simple (SM), posteriormente se agruparon mediante UPGMA (Ntsys) y se generó un dendograma utilizando el programa estadístico NTSYS-pc.

LITERATURA CITADA

- Aisenberg, A. y F. G. Costa. 2005. Females mated without sperm transfer maintain high sexual receptivity in the wolf spider *Schizocosa malitiosa*. *Ethology* **111**: 545-558.
- Arcade, A., F. Anselin, P. Faivre, M. C. Lesage, L. E. Pâques y D. Prat. 2000. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. *Theoretical and Applied Genetics* **100**: 299-307.
- Arnqvist, G. y I. Danielsson. 1999a. Copulatory behavior, Genital morphology, and male fertilization success in water striders. *Evolution* **53**: 147-156.
- Arnqvist, G. y I. Danielsson. 1999b. Postmating sexual selection: the effects of male body size and recovery period on paternity and egg production rate in a water strider. *Behavioral Ecology* **10**: 358-365.
- Boggs, C. L. 1990. A general model of the role of male-donated nutrients in female insects' reproduction *The American Naturalist* **136**: 598-617.
- Boorman, E., y G. A. Parker. 1976. Sperm (ejaculate) competition in *Drosophila melanogaster*, and the reproductive value of females to males in relation to female age and mating status. *Ecological Entomology* **1**: 145-155.
- Chen, D. H. y P.C. Ronald. 1999. A rapid DNA minipreparation method suitable for AFLP and other PCR applications. *Plant Molecular Biology Report* **17**: 53-57.
- Cibrián-Tovar, D., J. T. Méndez-Montiel, R. Campos-Bolaños, H. O. Yates III. y J. E. Flores-Lara. 1995. Insectos forestales de México/Forest insects of México. Publicación # 6, Universidad Autónoma de Chapingo. México. 453 pp.
- Cordero, C. 1995. Ejaculate substances that affect female insect reproductive physiology and behavior: honest or arbitrary traits? *Journal of Theoretical Biology* **174**: 453-461.
- Cordero, C. y W. G. Eberhard. 2005. Interaction between sexually antagonistic selection and mate choice in the evolution of female responses to male traits. *Evolutionary Ecology* **19**: 111-122.
- Córdoba-Aguilar, A. 1999. Male copulatory sensory stimulation induces female ejection of rival sperm in a damselfly. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* **266**: 779-784.
- Cuatianquiz, C. L. 2002. Aspectos conductuales de la biología reproductiva de la chinche *Stenomacra marginella* (Hemiptera: Heteroptera: Largidae). Tesis de Licenciatura en Biología Agropecuaria, Universidad Autónoma de Tlaxcala. 63 pp.
- Cuatianquiz, C. L., L. Muñoz, C. Oliver, M. Moreno y C. Cordero. 2003. *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae): Un modelo para estudiar la evolución de la poliandria, el cortejo durante la cópula y la conducta de oviposición. En: Martínez-Gómez, M., Cruz, Y, Hudson, R. y Lucio R.A. (coords). Fisiología, ecología y comportamiento: Una propuesta multidisciplinaria. UAT-UNAM. México.

- Cuatianquiz, C. 2005. Apareamientos múltiples en *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae): ¿poliandria adaptativa o beneficios de apareamientos repetidos?. Tesis, Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México.
- Cuatianquiz, C. y C. Cordero. 2005. Multiple mating in female *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae). *Entomological News* **116**: 331-334.
- Cuatianquiz, C. y C. Cordero. 2006. Experimental manipulation of male behaviour during copulation in *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae): effect on copula duration, female remating and oviposition. *Behavioural Processes* **73**: 222-227.
- Danielsson, I. y C. Askenmo. 1999. Male genital traits and mating interval affect male fertilization success in the water strider *Gerris lacustris*. *Behavioral Ecology Sociobiology* **46**: 149-156.
- Eberhard, W. G. 1985. Sexual selection and animal genitalia. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Eberhard, W. G. 1991. Copulatory courtship and cryptic female choice in insects. *Biological Reviews* **66**: 1-31.
- Eberhard, W. G. 1993. Copulatory courtship and genital mechanics of three species of *Macrodactylus* (Coleoptera: Scarabaeidae: Melolonthinae). *Ethology Ecology & Evolution* **5**: 19-63.
- Eberhard, W. G. 1994. Evidence for widespread courtship during copulation in 131 species of insects and arachnids, and implications for cryptic female choice. *Evolution* **48**: 711-733.
- Eberhard, W. G. 1996. Female control: sexual selection by cryptic female choice. Princeton, New Jersey: Princeton University Press. 501 pp.
- Eberhard, W. G. 1997. Sexual selection by cryptic female choice in insects and arachnids. *En: Choe, J. C. y B. J. Crespi (eds). The evolution of mating systems in insects and arachnid.* Cambridge University Press, Cambridge, pp 32-57.
- Eberhard, W. G. 2001. The functional morphology of species-specific clasping structures on the front legs of male *Archiseopsis* and *Palaeoseopsis* flies (Diptera, Sepsidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* **133**: 335-368.
- Eberhard, W. G. 2002. Physical restraint or stimulation? The function(s) of the modified front legs of male *Archiseopsis diversiformis* (Diptera, Sepsidae). *Journal of Insect Behavior* **15**: 831-850.
- Eberhard, W. G. 2003. The function of female resistance behavior: Intromission by male coercion vs. female cooperation in sepsid flies (Diptera: Sepsidae). *Revista de Biología Tropical* **50**: 485-505.
- Edvardsson, M. y G. Arnqvist. 2000. Copulatory courtship and cryptic female choice in red flour beetles *Tribolium castaneum*. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* **267**: 559-563.

- Edvardsson, M. 2005. Cryptic female choice and male mating behaviour. Sexual interactions in beetles. Acta Universitatis Upsaliensis. *Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology*. 42 pp.
- Edvardsson, M y G. Arnqvist. 2005. The effects of copulatory courtship on differential allocation in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Journal of Insects Behavior* **18**: 313-322.
- Esselman, E. J., L. Jianqiang, D. J. Crawford, J. Winduss y D. Wolfe. 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology* **8**: 443-451.
- Favila, M. E., J. Nolasco, I. Chamorro F. y M. Equihua. 2005. Sperm competition and evidence of sperm fertilization patterns in the carrion ball-roller beetle *Canthon cyanellus cyanellus* LeConte (Scarabaeidae: Scarabaeinae). *Behavioral Ecology Sociobiology* **59**: 38-43.
- Fernández, M.E., A. M. Figueiras y C. Benito. 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with know origin. *Theoretical and Applied Genetics* **104**: 845-851.
- Fincke, O. M. 1984. Sperm competition in the damselfly *Enallagma hageni* Walsh (Odonata: Coenagrionidae): benefits of multiple mating to males and females. *Behavioral Ecology Sociobiology* **14**: 235-240.
- García-González, F., Y. Núñez, F. Ponz, E. R. S. Roldán y M. Gomendio. Sperm competition mechanisms, confidence of paternity, and the evolution of paternal care in the golden egg bug (*Phyllomorpha laciniata*). *Evolution* **57**: 1078-1088.
- Gwynne, D. T. 1984. Male mating effort, confidence of paternity, and insect sperm competition. *En: R. L. Smith (ed.) Sperm competition and the evolution of animal mating systems*. Academic Press, Orlando, HL: 117-149.
- Haig S. M., T. R. Mace y T. D. Mullins. 2003. Parental and relatedness in polyandrous comb-crested jacanas using ISSRs. *Journal of Heredity* **94**: 302-309.
- Hoikkala, A. y S. Crossley. 2000. Copulatory courtship in *Drosophila*. Behavior and songs of *D. birchii* and *D. serrata*. *Journal of Insects Behavior* **13**: 71-86.
- Hoikkala, A., S. Crossley y C. Castillo-Melendez. 2000. Copulatory courtship in *Drosophila birchii* and *D. serrata*, species recognition and sexual selection. *Journal of Insects Behavior* **13**: 361- 273.
- Holland, B. y W. R. Rice. 1998. Perspective: Chase away sexual selection: antagonistic seduction versus resistance. *Evolution* **52**:1-7.
- Hosokawa, T. y N. Suzuki. 2000. Mating aggregation and copulatory success by males of the stink bug, *Megacopta punctatissima* (Heteroptera: Plataspidae). *Applied Entomology and Zoology* **35**: 93-99.

- Lai, J., W. Chen Y. y J. Hsiao. 2001. An assessment of genetic relationships in cultivated tea clones and native wild tea in Taiwan using RAPD and ISSR markers. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **42**: 93-100.
- Macías-García, C. M. y E. Ramírez. 2005. Evidence that sensory traps can evolve into honest signals. *Nature* **434**: 501-505.
- Martin, P. y P. Bateson. 1993. Measuring behaviour. An introductory guide. 2a ed., Cambridge Univ. Press, Cambridge, Inglaterra.
- McLain, D. K. 1989. Prolonged copulation as a post-insemination guarding tactic in a natural population of the ragwort seed bug. *Animal Behaviour* **38**: 659-664.
- Michiels, N. K. y A. A. Dhondt. 1988. Direct and indirect estimates of sperm precedence and displacement in the dragonfly *Sympetrum danae* (Odonata:Libellulidae). *Behavioral Ecology Sociobiology* **23**: 257-263.
- Moreno, G. M. A. 2005. Análisis morfológico y funcional de los parámetros de los genitalia masculinos de *Stenomacra marginella* (Hemiptera: Largidae). Tesis de Maestría. Instituto de Ecología, UNAM. 46 pp.
- Muñoz, L. J. 2001. Biología de la oviposición de la Chinche *Stenomacra marginella* (Hemiptera: Heteroptera: Largidae). Tesis de Licenciatura en Biología, UNAM. 48 pp.
- Oliver, C. M. 2004. Selección sexual pre y postcopulatoria en la chinche *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae). Tesis de Maestría. Instituto de Ecología, UNAM. 46 pp.
- Peretti, A. V. 2002. Courtship and sperm transfer in the whip spider *Phrynus gervaisii* (Amblypygi, Phrynidae): A complement to weygoldt's 1997 paper. *The Journal of Arachnology* **30**: 588-60.
- Reguera, P. 1999. Cuidado parental en *Phyllomorpha laciniata* (Heteroptera: Coreidae): implicaciones para la evolución del cuidado por parte de machos y hembras. Tesis Doctoral. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Rodríguez, R. L. S. 1998. Possible female choice during copulation in *Ozophora baranowskii* (Heteroptera: Lygaeidae): Female behavior, multiple copulations, and sperm transfer. *Journal of Insect Behavior* **11**: 725-741.
- Romani, R., N. Isidoro, P. Riolo, F. Bin, A. Fortunato, S. Turillazzi y L. Beani. 2005. A new role for antennation in paper wasps (Hymenoptera, Vespidae): Antennal courtship and sex dimorphic glands in antennomeres. *Insectes Sociaux* **52**: 96-102.
- Rubenstein, D. I. 1989. Sperm competition in the water strider, *Gerris remigis*. *Animal Behaviour* **38**: 631-636.
- Schaefer, M. A. y G. Uhl. 2002. Determinants of paternity success in the spider *Pholcus phalangioides* (Pholcidae: Araneae): the role of male and female mating behaviour. *Behavioral Ecology Sociobiology* **51**: 368-377.
- Simmons, L.W. 2001. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Princeton University Press, Princeton, NJ. 434 pp.

- Sheldon, B. C. 2000. Differential allocation: tests, mechanisms and implications *Trends Ecology and Evolution* **15**: 397-402.
- Shuker, D., N. Bateson, H. Breitsprecher, R. O'Donovan, H. Taylor, C. Barnard, J. Behnke, S. Collins y F. Gilbert. 2002. Mating behavior, sexual selection, and copulatory courtship in a promiscuous beetle. *Journal of Insect Behavior* **15**: 617-631.
- Sokal, R. R. y P. H. A. Sneath. 1963. Principles of numerical taxonomy. Freeman. San Francisco. 359 pp.
- Stratton, G. E., E. A. Hebets, P. R. Miller y G. L. Miller. 1996. Pattern and duration of copulation in wolf spiders (Araneae, Lycosidae). *The Journal of Arachnology* **24**: 186-200.
- Stutt, A. D. y M. T. Siva-Jothy. 2000. Traumatic insemination and sexual conflict in the bed bug *Cimex lectularius*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 5683-5687.
- Tallamy, D. W., B. E. Powell y J. A. McClafferty. 2002. Male traits under cryptic female choice in the spotted cucumber beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Behavioral Ecology* **13**: 511-518.
- Tallamy, D.W., M. B. Darlington, J. D. Pesek y B. E. Powell. 2003. Copulatory courtship signals male genetic quality in cucumber beetles. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* **270**: 77-82.
- Thornhill, R. 1983. Cryptic female choice and its implications in the scorpionfly *harpobittacus nigriceps*. *The American Naturalist* **122**: 765-788.
- Thornhill, R. y J. Alcock. 1983. The evolution of insect mating systems. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Watson, P. J. 1991a. Multiple paternity and first mate sperm precedence in the Sierra dome spider, *Linyphia litigiosa* Keyserling (Linyphiidae). *Animal Behaviour* **41**: 135-148.
- Watson, P. J. 1991b. Multiple paternity as genetic bet-hedging in female Sierra dome spiders, *Linyphia litigiosa* (Linyphiidae). *Animal Behaviour* **41**: 343-360.
- Watson, P. J. y J. R. B. Lighton. 1994. Sexual selection and energetics of copulatory courtship in the Sierra dome spider, *Linyphia litigiosa*. *Animal Behaviour* **48**: 615-626.
- Wiens, J. J. 2001. Widespread loss of sexually selected traits: how the peacock lost its spots. *Trends in Ecology and Evolution* **16**: 517-523.
- Wolfe, A.D., Q. Xiang y S. R. Khepart. 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Molecular Ecology* **7**: 1107- 1125.
- Wolfe, A. D. y A. Liston. 1998. Contributions of the polymerase chain reaction to plant systematics and evolutionary biology. *En: Soltis, D. E., P. S. Soltis y J. J. Doyle (eds.): Molecular systematics of plants II, Kluwer, pp. 43-86.*
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski y D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* **20**: 176-183.

- Zsemlye, J. L., R. G. Hancock y A. Foster. 2005. Analysis of a complex vertical copulatory-courtship display in the yellow fever vector *Sabethes chloropterus*. *Medical and Veterinary Entomology* **19**: 276-285.