



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Territorialidad, pigmentación alar, sistema inmune y reservas de grasa en machos de la libélula *Hetaerina titia* Drury (Odonata: Calopterygidae)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

ANA CRISTINA LESHER TREVIÑO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ALEJANDRO CÓRDOBA AGUILAR



FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Lesher
Treviño
Ana Cristina
53388105
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
402048707

2. Datos del tutor

Dr
Alejandro
Córdoba
Aguilar

3. Datos del sinodal 1

Dr
Carlos Rafael
Cordero
Macedo

4. Datos del sinodal 2

Dr
Cuauhtémoc Juan Humberto
Lanz
Mendoza

5. Datos del sinodal 3

Dr
Amando
Bautista
Ortega

6. Datos del sinodal 4

Dr
Carlos Alberto
Lara
Rodríguez

7. Datos del trabajo escrito

Territorialidad, pigmentación alar, sistema inmune y reservas de grasa en machos de la libélula
Hetaerina titia Drury (Odonata: Calopterygidae).

44 p
2007

Agradecimientos

A la UNAM, porque es una maravillosa casa de estudios, porque me abrió los ojos a miles de realidades distintas, por enseñarme que el estudio es un placer.

A mi director de tesis, por tener confianza en mí como alumna, por compartir sus conocimientos conmigo y guiarme en la realización de este trabajo, pero en especial le agradezco por la amistad.

A los sinodales por tomarse el tiempo de revisar mi trabajo y por sus buenos consejos.

A todos los del labo, en especial a Migue, Karla y Esteban por la ayuda en el campo y en el laboratorio. También a los Jorges, Martín, Memo, Vivian y Haydée.

A la gente que trabaja en la estación de biología tropical de Los Tuxtlas (UNAM), que hizo de mi trabajo de campo una experiencia increíble.

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo financiero del proyecto PAPIIT (UNAM) #211506.

Agradecimientos personales

A mi mamá por ser un gran ejemplo de lo que es una mujer fuerte, inteligente, hermosa, talentosa, valiente y amorosa. Gracias por todo lo que me das, por el amor y la comprensión y el tiempo que hemos pasado juntas. Este trabajo va dedicado a ti...

A mis hermanos Luis y Xavi porque son lo más preciado y cercano que tengo. Gracias por su amor, por los juegos y por las peleas. Haber crecido juntos ha sido maravilloso.

A mi papá por todo el cariño y el apoyo que me ha dado.

A mi numerosa familia, a los Titos, a mis tíos Ana, Beto, Jorge, Moni, Gaby, a Carlos, a mis primos Xime, Rock, Emilia y Sebastián, y a la Maroma que también es parte. Gracias porque siempre me han dado todo su apoyo, confianza y cariño. Son la mejor familia que pudiera desear.

A mis amigos Andrés, Julián, Alvaro, Pit, Gabino, Betoks, Diego, Carlo, Fer, Xumer, Yurdi, Roy, por ser grandes compañeros, por las risas, las pláticas, los consejos, las borracheras y los bailes.

A las chicas hermosas Pal, Jime, Yvs, Karli, María, Dione, Mica, Dai, Lety, Adny, porque su presencia llena mis días de luz.

A Leo por ser mi pedacito personal del paraíso. Te amo...

ÍNDICE

Resumen/ Abstract.....	3
1. Introducción	
1.1 La Teoría de la Selección Sexual.....	4
1.2. Caracteres Sexuales Secundarios y Respuesta Inmune en Insectos.....	6
1.3. Selección Sexual en Libélulas de la Familia Calopterygidae.....	7
1.4. Competencia Masculina, Elección Femenina y Pigmentación Alar en Calopterygidae.....	10
1.5. La Especie de Estudio: <i>Hetaerina titia</i>	12
2. Objetivos.....	14
3. Predicciones.....	14
4. Materiales y Métodos	
4.1. El Sitio de Estudio.....	15
4.2. Observaciones Generales de Conducta Sexual y Supervivencia.....	17
4.3. Medición de la Respuesta Inmune vía Melanización.....	18
4.4. Cantidad de Parásitos.....	19
4.5. Medición de Grasa Corporal.....	20
4.6. Medición de la Pigmentación Alar.....	20
4.7. Análisis Estadístico.....	21
5. Resultados	
5.1. Conducta Sexual.....	23
5.2. Pigmentación Alar en Machos Territoriales y No Territoriales.....	23
5.3. Pigmentación Alar y Número de Días de Permanencia en el Sitio de Estudio.....	24
5.4. Pigmentación Alar y Respuesta Inmune en Machos Territoriales y No Territoriales.....	25
5.5. Pigmentación Alar y Carga Parasitaria.....	28
5.6. Grasa Corporal en Machos Territoriales y No Territoriales.....	29
5.7. Pigmentación Alar y Grasa Corporal en Machos Territoriales y No Territoriales.....	30
6. Discusión.....	32
6.1. La Evolución de la Pigmentación en <i>Calopteryx</i> y <i>Hetaerina</i>	35
7. Conclusiones.....	39
8. Referencias	40

RESUMEN

Se ha propuesto que la expresión de los caracteres extravagantes masculinos podrían ser utilizados por las hembras como indicadores honestos de la condición del macho, más específicamente de su capacidad inmune. Un ejemplo de tales caracteres es la pigmentación alar de algunas especies de libélulas, el cual es un carácter bajo selección sexual. El pigmento que da el color alar en estos animales está hecho de melanina, la cual se deposita cuando el animal alcanza su madurez sexual. De manera interesante, la melanina también es usada en el sistema inmune para encapsular y eliminar parásitos. En este estudio se investigó una posible correlación entre la cantidad de pigmentación alar, la respuesta inmune (vía melanización), la presencia de parásitos gregarinos y la cantidad de grasa corporal en machos territoriales y no territoriales de dos poblaciones de la libélula *Hetaerina titia*, en el río La Palma y río Otapa en Los Tuxtlas, Veracruz. Los machos de esta especie poseen una pigmentación alar muy conspicua con patrones negros y rojos. Se investigó si: (a) los machos territoriales tienen alas más pigmentadas (negra y roja), una mejor respuesta inmune y mayores reservas energéticas que los no territoriales, (b) la pigmentación se relacionaba positivamente con la inmunidad, las reservas energéticas y supervivencia en el sitio de estudio y (c) si existe alguna relación entre la pigmentación y la presencia de parásitos gregarinos. Los resultados indican que: (1) Los machos territoriales tenían mayor área pigmentada color negro en las alas, mejor respuesta inmune y mayores reservas energéticas que los no territoriales, (2) el área relativa pigmentada color negro correlaciona positivamente con la inmunidad, (3) los machos más pigmentados sobreviven más en el sitio de estudio y (4) los machos más pigmentados tienen menos presencia de parásitos gregarinos. Sin embargo, se encontró que el pigmento rojo no correlaciona con ningún aspecto de la condición masculina, y hasta correlaciona positivamente con la presencia de parásitos. Se interpretan estos resultados en términos de la evolución de la pigmentación dentro de la familia Calopterygidae. Nuestros resultados sugieren que *Hetaerina titia* tiene una posición intermedia entre *Calopteryx*, un género menos derivado, que el resto de las *Hetaerina*, el género basal de la familia.

ABSTRACT

According to sexual selection theory, the expression of courting traits is an honest indicator of male condition, more specifically male immune ability. Wing pigmentation in some damselfly species is a character under sexual selection. The underlying wing pigment is made of melanine, a protein which is also used by the immune system to encapsulate and kill parasites. Here we investigated if there is a correlation between immune ability (via melanization), wing pigmentation, fat reserves and number of parasites in *Hetaerina titia*, a calopterygid damselfly whose males show a conspicuous wing pigmentation pattern with red and black colors. We tested whether: (a) territorial males had more pigmented wings (red and black), more intense melanine-based immune response (encapsulation response to a nylon filament implant) and higher fat reserves than non-territorial males; (b) pigmentation is related to immunity, fat reserves and survival in the study site; (c) there is a relation between the parasite load and pigmentation. Our results indicate that (1) territorial males had more wing pigmentation (black), higher immune responses and fat reserves than non-territorial males; (2) black pigmentation was also correlated with immunity, (3) more pigmented males survived more days in the study site and (4) more pigmented males had fewer parasites. However, the red color did not correlate with any aspect of male condition. We interpret these results in relation to the evolution of pigmentation in the Calopterygidae family. Our results suggest that *Hetaerina titia* may have an intermediate position between *Calopteryx*, a less derived genus, and *Hetaerina*, a more basal one in the family.

INTRODUCCIÓN

La Teoría de la Selección Sexual

Uno de los grandes problemas que enfrentó la teoría de la selección natural cuando fue propuesta por Darwin en 1859 fue explicar el origen y mantenimiento de caracteres conspicuos en los machos de una gran variedad de especies animales. Ejemplos de estos caracteres son los colores llamativos del plumaje de ciertas aves, cantos y despliegues de cortejo extravagantes también presentes en estos animales, así como las astas en ungulados y escarabajos (revisado por Andersson, 1994). Estos caracteres tendrían varias desventajas, pues al ser más llamativos, podrían hacer a sus portadores más susceptibles de ataques por depredadores lo que finalmente llevaría a una reducción de la supervivencia de éstos.

Darwin pensó que estos caracteres habían evolucionado y se mantenían gracias a un mecanismo totalmente distinto al de selección natural, al cual llamó selección sexual. Este tipo de selección, a diferencia de la natural, se centra sólo en la reproducción, en específico por el éxito en la fertilización. Darwin denominó a los caracteres conspicuos favorecidos por este tipo de selección caracteres sexuales secundarios (CSS), ya que su relación con la reproducción es menos directa que otros caracteres como son los genitales, a los cuales les consideró caracteres sexuales primarios (Darwin, 1871).

Asimismo, Darwin mencionó además que la evolución y mantenimiento de los CSS se debe a cualquiera de dos procesos; el primero se refiere a la competencia entre machos, también llamada selección intrasexual. En este proceso, los individuos de un mismo sexo se enfrentan directa o indirectamente para tener acceso al sexo opuesto. Por ejemplo, los machos de elefantes marinos (*Mirounga angustirostris*) (Le Boeuf, 1974) y de algunas especies de cérvidos como el ciervo rojo (*Cervus elaphus*) (Clutton-Brock *et al.*, 1979) pelean directamente por el acceso a hembras. El otro proceso es la elección

femenina, también llamado selección intersexual, donde los individuos de un sexo, usualmente las hembras, discriminan entre machos para aparearse. Por ejemplo en la golondrina de mar (*Sterna fuscata*) los machos ofrecen comida a la hembra durante el cortejo y éstas los eligen con respecto a la cantidad de alimento ofrecida (Nisbet, 1977).

Ya sea en el proceso de selección intra o intersexual, la presencia de CSS más elaborados o más conspicuos confieren a sus portadores mayores ventajas en la competencia por pareja: mientras más intensamente se expresen, mayor número de hijos (revisado por Andersson, 1994).

A principios del siglo XX, Fisher (1930) propuso que los machos con CSS más conspicuos no eran necesariamente mejores en términos de condición (visto este concepto como el estado de salud o el estado energético del individuo) o supervivencia que los que no poseen estos caracteres. La única ventaja que estos machos tenían sobre otros es que las hembras los consideran atractivos y es en ese sentido que los escogen como pareja. Según Fisher, los machos atractivos consiguen más apareamientos y dejan más descendencia a las siguientes generaciones, pasando sus genes de CSS más conspicuos a sus hijos macho, mientras que las hembras pasan sus genes de escoger machos atractivos a sus hijas hembra, lo que propicia que esta característica se mantenga en la población. Esta teoría fue bien aceptada como la explicación al origen y mantenimiento de los CSS, sin embargo en los años setenta una nueva teoría desafió estas ideas (revisado por Kokko *et al.*, 2002). Zahavi (1977) propuso que los CSS podrían ser costosos de producir, por lo que funcionarían como indicadores de la condición o vigor del macho. Esta hipótesis, a diferencia de la de Fisher, sugiere que los CSS señalizan la condición del individuo de manera “honesto” ya que sólo los machos en buena condición pueden desarrollar CSS más intensos. Es poco probable, según Zahavi, tener individuos “tramposos”, es decir que su condición no sea reflejada por los

CSS, ya que si la expresión de cierto carácter aumenta con la “calidad” o condición del macho, entonces el costo de producir CSS más extravagantes debe ser mayor para individuos de menor calidad (Zahavi, 1977). Según esta idea se debe encontrar una relación positiva entre la condición del macho y la expresión de los CSS. Entonces las hembras, al elegir a los machos con CSS más elaborados habrían evaluado su condición, la cual, si tiene una base heredable, pasaría a los hijos.

Caracteres Sexuales Secundarios y Respuesta Inmune en Insectos

Una hipótesis más reciente en insectos ha propuesto una base fisiológica a las ideas de Zahavi. Esta hipótesis vincula la expresión de CSS con la capacidad inmune del individuo (Rolff y Siva-Jothy, 2003; Schmid-Hempel, 2005). Uno de los ejemplos de este vínculo, es el caso de la defensa inmunológica vía melanización en insectos. Los daños mecánicos o la presencia de cuerpos extraños como parásitos u otros patógenos metazoarios dentro del cuerpo de un insecto resulta en la deposición de melanina alrededor del cuerpo extraño o del tejido dañado. El depósito de este pigmento, que es un polímero formado por muchas unidades de indolequinonas, aísla al cuerpo extraño, lo que puede impedir o retardar el crecimiento de éste último para, eventualmente, matarlo de inoia, hambre o intoxicación (Cerenius y Söderhall, 2004). De manera interesante, la melanina se utiliza para otras funciones fundamentales. Una de éstas es que es la base del pigmento alar en algunos insectos, lo que puede dar lugar a un uso compartido de recursos, así como a posibles conflictos en el uso de este polímero si es que la melanina es limitante para el individuo. Hooper y colaboradores (1999) sugieren que efectivamente esta última premisa es cierta, ya que la melanina, al ser sintetizada a partir de un aminoácido esencial, la fenilalanina, la cual sólo se obtiene de la dieta, sugiere que sólo aquellos individuos con mejor capacidad competitiva por obtener

alimento, podrían fabricar melanina suficiente para las distintas funciones. Algunos estudios, de hecho, apoyan el supuesto de que al usar melanina en la respuesta inmune, el animal enfrenta compromisos (del inglés “trade off”) al no poder asignar este polímero a otras funciones (Siva-Jothy, 1999, 2000). Esto hace a la melanina un compuesto ideal para poner a prueba ideas sobre conflictos en el uso de recursos entre sistema inmune y producción de CSS.

Selección Sexual en Libélulas de la Familia Calopterygidae

Los insectos del orden Odonata (libélulas y caballitos del diablo) han sido muy utilizados en estudios de selección sexual (revisado por Corbet, 1999). En particular, una familia que ha llamado mucho la atención es la Calopterygidae (revisado por Córdoba-Aguilar y Cordero Rivera, 2005). Los machos adultos de la mayoría de especies de esta familia poseen patrones específicos de pigmentación alar (Silsby, 2000; Figura 1).



Fig. 1. Muestra de machos de calopterígidos con diferentes patrones de pigmentación alar, a) *Calopteryx virgo*, b) *Calopteryx splendens*, c) *Mnais pruinosa*, d) *Hetaerina americana* (Fotos cortesía de J. Contreras Garduño y G. Jimenez)

Después del estado larvario y la emergencia como adulto, la libélula entra en un período llamado teneral, donde su cuerpo es muy frágil, el pigmento alar no se ha producido ni fijado y su vuelo es errático y débil. Esta etapa dura normalmente 24 hrs desde la emergencia (Corbet, 1999) y es durante este período y algunos días subsecuentes (hasta 7 días; Córdoba-Aguilar, 1993) que el animal se dedica a alimentarse para acumular reservas energéticas antes de la maduración sexual (Plaistow y Siva-Jothy, 1996). Posiblemente, los machos utilizan este alimento para acumularlo en músculos torácicos y compuestos lipídicos que están involucrados en el vuelo, así como en la pigmentación alar (Hooper *et al.*, 1999).

El depósito de pigmento en las alas en los machos culmina cuando el animal alcanza la madurez sexual (Córdoba-Aguilar, 1993) permaneciendo invariable en cantidad el resto de la vida del individuo (Córdoba-Aguilar, 2002; Siva-Jothy, 2000). Algunos ejemplos de estos patrones de pigmentación se puede encontrar en los dos géneros más representativos de esta familia: un pigmento alar rojo en la base de las alas que es típico del género *Hetaerina* (Figura 1d), y un pigmento negro o café oscuro cubriendo casi toda el ala que es típico del género *Calopteryx* (Córdoba-Aguilar y Cordero-Rivera, 2005; Figura 1 a y b). Curiosamente, es durante la etapa pre-madura que el adulto se encuentra más expuesto a infecciones por parásitos gregarinos (Protozoa), los cuales son ingeridos a través de las presas, usualmente mosquitos, los cuales sirven como vectores, de las que la libélula se alimenta (Åbro 1987, 1990). Las gregarinas se adhieren a la parte interna y posterior del intestino del adulto, donde se alimentan a expensas de la comida que ingiere la libélula (Siva-Jothy y Plaistow, 1999). Åbro (1987, 1990) propone dos maneras en las que las gregarinas pueden afectar a los odonatos. La primera es que al utilizar el alimento ingerido por hospedero, el parásito reduce el aporte energético a obtener por la libélula. Una segunda vía es que al adherirse

el parásito a la pared del intestino, éste cause una herida que permita la entrada de otros agentes patógenos como bacterias y hongos al resto del cuerpo. Siva-Jothy (2000) y Córdoba-Aguilar (2002) proponen que la presión por gregarinas resulta además en que las libélulas se vean obligadas a destinar más recursos al sistema inmune, lo que hace que otras funciones vitales, que comparten usos en común con el sistema inmune se descuiden. Estos parásitos han sido señalados como una fuerte presión de selección de muchas especies, ya que al parecer tienen un alto impacto en la reducción de la adecuación de las libélulas, como es la supervivencia (Åbro, 1990; Contreras Garduño *et al.*, 2005), la defensa de territorios (Córdoba-Aguilar, 2002) y la elección de pareja (Siva-Jothy, 1999; Córdoba-Aguilar *et al.*, 2003, Córdoba-Aguilar, 2002), así como en la cantidad de grasa corporal utilizada por el macho en la actividad de vuelo durante encuentros agresivos por territorios con otros machos (Siva-Jothy y Plaistow, 1999).

Una vez maduros sexualmente, los machos calopterígididos se dirigen a cuerpos de agua corriente como arroyos y ríos, para tratar de obtener y defender un sitio de oviposición. Las hembras se acercan a estos lugares sólo cuando han madurado huevos (Corbet, 1999). Sin embargo, no todos los machos pueden obtener un territorio. Algunos de los factores más importantes que influyen en la adquisición de un territorio son la cantidad de masa muscular y la grasa (Marden y Waage, 1990; Plaistow y Siva-Jothy 1996; Koskimäki *et al.*, 2004; Contreras-Garduño *et al.*, 2006; Serrano-Meneses *et al.*, 2007), ya que para la obtención y defensa de territorios los machos deben sostener enfrentamientos en vuelo con otros machos, lo que les demanda gran cantidad de reservas energéticas. Tener un territorio es de suma importancia, ya que las hembras se aparean casi exclusivamente con machos territoriales (e.g. Waage, 1973, 1979; Plaistow y Siva-Jothy, 1996; Córdoba-Aguilar, 2000). Por ejemplo, se ha sugerido que el éxito reproductivo de machos territoriales puede llegar a ser mil veces mayor que en machos

no territoriales en *Calopteryx splendens* (Plaistow y Siva Jothy, 1996).

Durante las peleas por defensa de los territorios los machos vuelan en círculos, desde unos minutos hasta varias horas, donde ocasionalmente se golpean con las alas (e.g. Plaistow y Siva-Jothy, 1996, 1999). Los machos que son territoriales o resultan victoriosos en las peleas por territorios tienen más grasa corporal que los perdedores o no territoriales. (Plaistow y Siva Jothy, 1996; Marden y Waage, 1990; Contreras-Garduño *et al.*, 2006; Serrano-Meneses *et al.*, 2007). Una situación interesante es que estos machos exitosos (es decir, con mayores reservas energéticas) también tienen a menudo mayor pigmentación alar (Contreras-Garduño *et al.*, 2006) por lo que se ha sugerido que la pigmentación puede servir como un indicador de la condición energética del animal (Koskimäki, 2004; Contreras-Garduño *et al.*, 2006; Serrano-Meneses *et al.*, 2007).

La pigmentación alar también está relacionada con otros aspectos de la condición del individuo. Por ejemplo, Grether (1996) encontró en *Hetaerina americana* que aquellos machos con mayor pigmentación defienden territorios por más tiempo y tienen una tasa de supervivencia más alta. Parte de la base de esta capacidad quizás radique en una mejor capacidad inmunológica, ya que se ha visto que los machos con más pigmentación también tienen menos parásitos eugregarinos (Siva-Jothy, 2000; Córdoba-Aguilar, 2002; Tsubaki y Hooper, 2004), así como respuestas inmunes más intensas (Rantala *et al.*, 2000; Siva-Jothy, 2000; Contreras-Garduño *et al.*, 2006).

Competencia masculina, Elección Femenina y Pigmentación Alar en Calopterygidae

Estudios en el género *Hetaerina* han mostrado que la pigmentación alar y las reservas de grasa están estrechamente relacionadas, por lo que la pigmentación alar funciona como indicador de la condición energética del animal durante la competencia

entre machos (Contreras-Garduño *et al.*, 2006; Serrano-Meneses *et al.*, 2007). El hecho de que en el género *Hetaerina* no se tiene ninguna evidencia de que exista cortejo precopulatorio (Grether, 1996) ha llevado a pensar que la pigmentación alar sólo se mantiene por competencia entre machos.

Por otro lado, en el caso del género *Calopteryx*, la pigmentación alar está moldeada por procesos tanto de selección intra como intersexual. Intrasexual, ya que los machos más pigmentados son los que resultan ganadores en contiendas por territorios (Córdoba-Aguilar, 2002). Intersexual, ya que previo a la cópula los machos cortejan a las hembras y éstas podrían elegir en base al pigmento alar de éstos. Durante el cortejo el macho vuela alrededor de la hembra, manteniendo las alas posteriores inmóviles, mientras que el vuelo es sostenido con las alas anteriores (Pajunen, 1966; Krumar y Prasad, 1977; Higashi, 1981; Siva-Jothy, 1999; Córdoba-Aguilar, 2000). No todos los eventos de cortejo culminan en la cópula y se ha visto que machos que poseen más pigmentación alar son más exitosos en la obtención de cópulas (Siva-Jothy, 1999; Córdoba-Aguilar, 2002). Posiblemente, los machos muestren a las hembras su condición a través del cortejo (Siva-Jothy, 1999; Córdoba-Aguilar, 2002) y las hembras elijan a los machos con base en la pigmentación alar. Los aspectos de la condición que probablemente se indiquen a las hembras son la resistencia a parásitos (Siva-Jothy, 1999, 2000; Córdoba-Aguilar, 2002) y/o la capacidad inmunológica (Siva-Jothy, 1999). Esto se ha visto en estudios en *Calopteryx* que muestran una correlación positiva entre la cantidad de pigmento alar y la cantidad de melanización (Rantala *et al.*, 2000, Siva-Jothy, 2000) y una correlación negativa entre el pigmento y el número de gregarinas (Siva-Jothy y Plaistow, 1999; Siva-Jothy, 2000; Córdoba-Aguilar, 2002; Córdoba-Aguilar *et al.*, 2003; Tsubaki y Hooper, 2004).

Contreras-Garduño y colaboradores (2006) han planteado una hipótesis al

respecto de la evolución del pigmento alar en la familia. Dado que *Hetaerina* es un género más basal en la familia Calopterygidae, del cual derivó *Calopteryx* (Dumont *et al.*, 2005; Figura 2), probablemente la pigmentación alar roja se vio inicialmente favorecida en esta familia a través de procesos de competencia entre machos para comunicar las reservas de grasa a machos coespecíficos. La pigmentación negra se había visto favorecida posteriormente debido a procesos de elección femenina en *Calopteryx*, gracias a la presión por parásitos (Siva-Jothy, 2000). Un argumento a favor de esta hipótesis es la presencia de parásitos eugregarinos en *Calopteryx*, lo cual no ocurre en la mayoría de especies de *Hetaerina* (Córdoba-Aguilar, datos sin publicar). El hecho de que el cortejo precopulatorio sólo se dé en *Calopteryx* y no se presente en *Hetaerina* sugiere que esta conducta no ha evolucionado como una forma de los machos de mostrar su resistencia a parásitos gregarinos, dada la ausencia de éstos en *Hetaerina*.

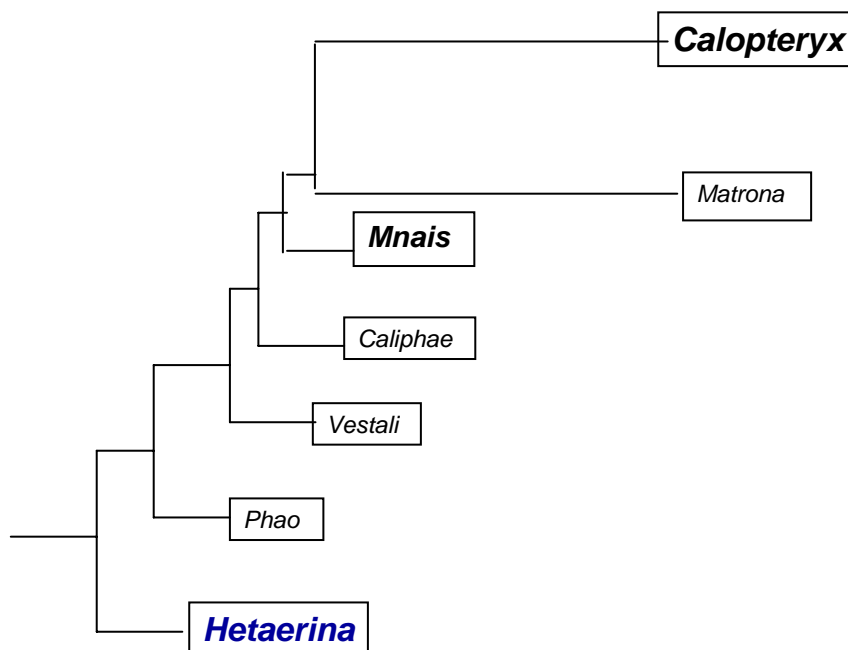


Fig. 2. Filogenia de la familia Calopterygidae donde se muestran los géneros de esta familia (según Dumont *et al.*, 2005)

La Especie de Estudio: Hetaerina titia

Hetaerina titia es una especie de la familia Calopterygidae que se distribuye desde el sureste de los Estados Unidos de Norteamérica, México y se extiende hasta Costa Rica (Abbot, 2005). La temporada de vuelo va de marzo a noviembre y se encuentra en hábitats como arroyos y ríos (Abbot, 2005). En los machos la cabeza es de color café oscuro a negro, mientras que el pterotorax varía desde rojo iridiscente a negro, con regiones laterales de color café verdusco. Las alas de los machos son altamente variables, pero el cuarto basal de ambas alas es rojo. El resto de las alas puede variar de color claro a negro y generalmente las alas posteriores tienen más extendido el color negro (Figura 3). Las hembras son similares a los machos, pero la cabeza es más clara. En estas, el pterotorax es verde iridiscente y el abdomen varía de verde iridiscente a café. Las alas varían de color ámbar a café claro (Abbot, 2005).

Esta especie resulta muy interesante, ya que los machos comparten patrones de pigmentación alar de los dos grandes géneros de la familia Calopterygidae y que han evolucionado por diferentes procesos: rojo, típico de *Hetaerina*, favorecido por competencia entre machos (Grether, 1996) y negro, típico de *Calopteryx*, favorecido por elección femenina y competencia entre machos (Siva-Jothy, 2000; Córdoba-Aguilar, 2002).

En *H. titia* aún no se han hecho estudios sobre conducta reproductiva, pigmentación alar y estatus social por lo que este estudio se enfocará en esos aspectos en esta especie. Se pretende poner a prueba la idea de que la pigmentación refleja la condición del individuo entendida como la supervivencia, las reservas de grasa, así como la respuesta inmune. Se pretende saber cómo estos diferentes pigmentos correlacionan con los aspectos de condición arriba mencionados. Además de ayudar a

entender la conducta sexual de esta especie, los resultados ayudarán a entender la posible evolución de los patrones de pigmentación alar en la familia Calopterygidae, donde *H. titia* podría ser una especie que muestre la transición evolutiva entre *Hetaerina* y *Calopteryx* al tener presente ambos pigmentos alares.



Fig. 3. Macho sexualmente maduro de *Hetaerina titia* mostrando los patrones negros y rojos de pigmentación alar.

OBJETIVOS

- Investigar si hay una diferencia en la cantidad de la pigmentación alar roja y negra en machos territoriales y no territoriales.
- Investigar si hay una relación positiva entre la cantidad de pigmentación alar roja y negra con la respuesta inmune vía melanización en machos territoriales y no territoriales.
- Investigar si existe una relación positiva entre la pigmentación alar roja y negra y la grasa corporal en machos territoriales y no territoriales.
- Conocer si la pigmentación roja y negra correlaciona positivamente con la supervivencia.
- Investigar si existe una relación entre la carga parasitaria y la pigmentación alar roja y negra en machos territoriales y no territoriales.

PREDICCIONES

- Dado que en otras especies del género *Hetaerina* no se presenta cortejo precopulatorio (Grether, 1996), se espera que en esta especie tampoco se presente.
- Debido a que en especies del género *Hetaerina* se ha observado que los machos territoriales están más pigmentados que los no territoriales (Contreras-Garduño *et al.*, 2006), se espera que en esta especie los machos territoriales posean más pigmento negro y rojo que los no territoriales.
- Dado que se ha observado una correlación positiva entre la pigmentación alar y la intensidad de la respuesta inmune en especies de la familia Calopterygidae (Rantala *et al.*, 2000; Siva Jothy, 2000; Contreras-Garduño *et al.*, 2006), se espera que en *Hetaerina titia* se presente esta correlación positiva entre la cantidad de pigmento rojo y negro y la capacidad de la respuesta inmune vía melanización en machos

territoriales y no territoriales. Se espera además, que los territoriales monten una respuesta inmune más intensa.

- Dado que se ha encontrado que la capacidad inmune está relacionada con la expresión de CSS en invertebrados (revisado por Lawniczak *et al.*, 2007), se esperaría que los machos con mayor pigmentación alar roja y negra tengan menor carga parasitaria.
- Dado que en especies del género *Hetaerina* se ha observado que existe una correlación positiva entre la cantidad de pigmento y las reservas de grasa corporal (Contreras-Garduño *et al.*, 2006; Serrano-Meneses *et al.*, en prensa), se espera que en *H. titia* se presente esta misma correlación tanto con el pigmento rojo como con el negro. Se espera también que los territoriales tengan más grasa y más pigmento.
- Debido a que se ha observado una correlación positiva entre los días de supervivencia en el sitio de estudio y la pigmentación alar en machos del género *Hetaerina* (Grether, 1996), se espera que en esta especie se de esta misma correlación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El Sitio de Estudio

Durante todo el mes de julio de 2005 se estudió una población de *H. titia* en el río La Palma en la Reserva de la Biosfera de Los Tuxtlas, la cual se localiza en la parte sur de la llanura del Golfo, en la porción sureste del estado de Veracruz (Figura 4). El río La Palma (18°33'42.69 N 95°03'35.05 W) se encuentra en el poblado homónimo, ubicado a unos pocos kilómetros al sureste de la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se colectaron muestras de este río en julio de 2005 (territoriales N=18, no territoriales N=18), así como en julio de 2006 (territoriales N=20, no territoriales N=20).

Durante los días 18 al 26 de mayo de 2006 se colectaron 33 machos de *Hetaerina titia* del río Otapa (18° 41' N 96° 23' W), que se encuentra también en la Reserva de la Biosfera de Los Tuxtlas (Fig. 4), unos kilómetros al norte de la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

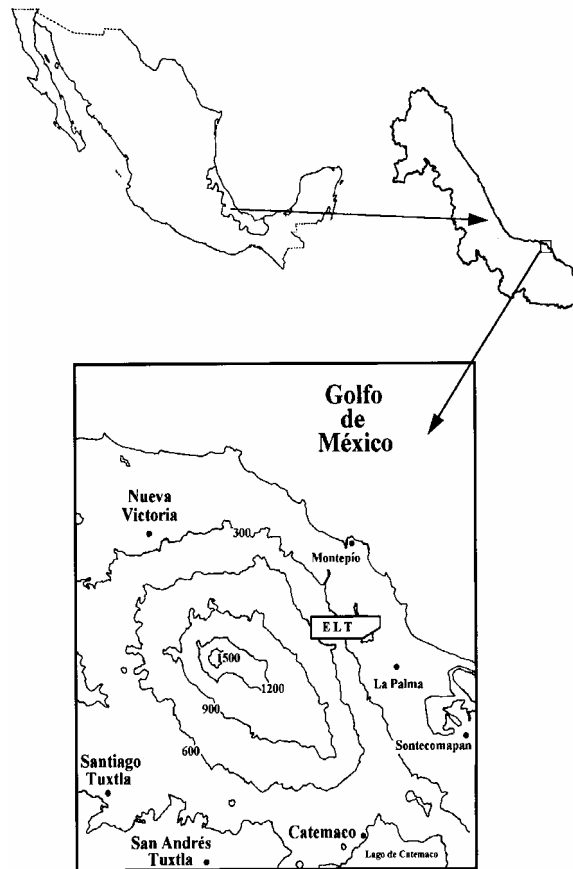


Fig. 3. Mapa de la Reserva de los Tuxtlas en Veracruz, México.

Observaciones Generales de Conducta Sexual y Supervivencia

En el río La Palma, durante cuatro días de julio de 2005 se marcaron 57 machos con dos puntos de colores (no tóxicos) en el tórax (cada macho con una combinación diferente de colores), lo que permitió distinguirlos de manera individual. Junto con el marcaje, se tomaron fotos digitales de las alas de cada individuo (cámara Canon Powershot A80). Se manipularon los animales por aproximadamente 2 minutos, sumando el tiempo de marcaje y la foto. Es poco probable que este método de marcaje afecte el comportamiento de estos animales, especialmente por tres razones: a) en caso de que la información sobre la habilidad territorial se transmita a los coespecíficos en *Hetaerina*, esto sería a través de la pigmentación alar y no corporal; b) resultados de estudios con otras especies en donde se utiliza el mismo protocolo de marcaje, muestran

que no se tienen efectos en el comportamiento natural de las libélulas (e.g. en *Calopteryx haemorrhoidalis*; Córdoba-Aguilar, 2002); c) después de la manipulación los animales tardaron de 1 a 4 minutos en volver a sus actividades normales (e.g. defensa de territorios).

Se registró también la edad de los individuos marcados según los criterios morfológicos de Córdoba-Aguilar (1994) dividiendo a los machos en tres categorías: 1) juveniles, con colores intensos y brillantes y alas transparentes, 2) maduros, con colores menos brillantes e intensos en el cuerpo y alas pigmentadas, 3) viejos, con coloración corporal oscura y opaca y alas papiráceas (es decir frágiles y quebradizas) y usualmente con las puntas rotas. En este estudio se utilizaron solamente machos de la categoría 2, para que la edad no representara una diferencia en el desempeño de los machos para defender un territorio o montar la respuesta inmune, (e.g. podría ser que los machos de categorías 1 y 3 tuvieran muy pocas reservas de grasa o respuesta inmune pobre; Contreras-Garduño *et al.*, 2006).

De aproximadamente 0900 a 1100 hrs de cada día se llevó a cabo un censo por los 20 días que duró el estudio. Estos censos permitieron construir una relación entre pigmentación y supervivencia de los machos en el sitio de estudio. Después de cada censo, entre las 1100 y hasta las 1500 hrs aproximadamente, se hicieron observaciones focales de cada animal para asignar el estatus social (territorial o no territorial) y el comportamiento sexual (peleas y cópulas). Se observaron aproximadamente 4 machos por día. Para la asignación del status se siguieron los criterios utilizados por Córdoba-Aguilar (2000) donde aquellos machos que permanecieron en el mismo sitio por más de un día y mostraron conducta agresiva hacia otros coespecíficos (vuelos de frente) regresando al mismo sitio después de cada enfrentamiento se clasificaron como machos territoriales, mientras que los que no lo hicieron se designaron como machos no

territoriales.

Medición de la Respuesta Inmune vía Melanización

Para investigar la capacidad de la respuesta inmune y su relación con la cantidad de pigmento alar se aplicó un reto artificial que simuló la infección por patógenos (ver Siva-Jothy, 1999; Yourth *et al.*, 2002; Contreras-Garduño *et al.*, 2006). Para esto se utilizó la inserción de implantes de nylon en el abdomen, lo cual ha sido usado ampliamente para investigar la intensidad de la respuesta inmune celular en insectos. (ver Wiesner, 1991; Contreras-Garduño *et al.*, 2006). Un reto como éste induce la agregación de hemocitos y el aislamiento del implante por depósito de melanina (Gillespie *et al.*, 1997) En particular para el caso de odonatos, este método resulta conveniente porque la respuesta inmune celular es la que se desencadena después de un ataque por parásitos gregarinos (J. Contreras-Garduño, com. pers.).

Usando los criterios de asignación de estatus y edad, se colectaron 18 machos territoriales y 18 no territoriales de categoría de edad 2 del río La Palma en julio de 2005 al final del estudio a los cuales se les insertó un implante de nylon cilíndrico en los primeros segmentos del abdomen. Este implante era de aproximadamente 3 mm de largo y 0.5 mm de diámetro y fue previamente desinfectado en etanol al 100%. El implante se insertó de la siguiente manera: se tomó al animal de manera cuidadosa y con unas pinzas entomológicas de disección se colocó el nylon en la parte ventral del abdomen (entre el segundo y tercer segmento). El implante se insertó totalmente.

Después de la inserción del implante, los machos se mantuvieron vivos y separados de manera individual en tubos de ensaye con aproximadamente 2 mm de agua y una percha, por 8 horas, tiempo mínimo para completar la respuesta inmune celular en *Hetaerina* (Contreras-Garduño *et al.*, 2006). Los tubos se colocaron a temperatura

ambiente dentro de una caja en un cuarto oscuro, esto último para reducir la actividad física que pudiera afectar la intensidad de la respuesta inmune. Durante este tiempo los animales no pudieron volar ni alimentarse. Una vez pasadas las 8 horas, los animales se preservaron en etanol al 70 %. Ya en el laboratorio, los implantes se extrajeron con pinzas entomológicas haciendo una disección bajo un microscopio estereoscópico (Olympus SZH10) con un lente 1.5x. Para esto se retiró el exoesqueleto del lugar donde se había insertado el implante y éste se retiró del cuerpo. Se tomaron fotografías de los implantes utilizando el mismo microscopio estereoscópico con un lente 1.5x y una cámara digital (Olympus C-5050, 3x de zoom óptico). Dado que la melanina se distribuye de manera irregular en el implante, cada uno fue fotografiado tres veces en diferentes posiciones y se midió la cantidad de melanina alrededor del mismo usando el programa *UTHSCA Image Tool for Windows* (versión 3.0) a partir de fotos digitales. Este programa permite delimitar con el cursor la superficie con melanina depositada en cada foto, midiendo el área de pigmentación en píxeles. Se consideró la proporción de melanina por implante sacando un promedio de las tres fotografías, lo cual podría controlar las diferencias en melanina según la foto.

Cantidad de Parásitos

Se colectaron 33 machos del río Otapa entre los días 18 y 29 de Mayo de 2006 y se conservaron en alcohol. Con pinzas entomológicas se disectó la parte posterior del intestino, que es el lugar donde se encuentran las gregarinas (Åbro, 1996), y se cuantificó el número de gregarinas encontradas en cada animal.

Medición de Grasa Corporal

Basándose en la técnica utilizada por Plaistow y Siva-Jothy (1996), se desecaron dos muestras: a) los mismos 18 machos territoriales y 18 no territoriales descritos

anteriormente que se colectaron en el río La Palma en julio de 2005 y se utilizaron para la medición de respuesta inmune y b) un muestra adicional de 20 machos territoriales y 20 no territoriales colectados en el mismo río en julio de 2006.

Todos los machos se pusieron a desecar en una estufa a 60 °C durante 24 horas. Posteriormente, se pesaron en una balanza analítica (Scientech SA 120) con una precisión de 0.0001g. Después, cada animal se colocó en un tubo Eppendorf con abundante cloroformo por espacio de 24 horas. El cloroformo penetra en el cuerpo y se adhiere al contenido lipídico del animal. Posteriormente los animales se colocaron en la estufa a 60 °C durante 24 horas para que el cloroformo se evaporara completamente junto con la grasa corporal. Finalmente se tomó la medición de peso con la misma balanza analítica después del tratamiento. La diferencia de peso es el contenido de grasa que el animal poseía.

Medición de la Pigmentación Alar

Para la medición de la pigmentación se separó a los individuos en cuatro grupos: a) los que se marcaron y fotografiaron y fueron observados durante el mes de julio de 2005 en el río La Palma (N= 57), b) aquellos individuos capturados al final del período de observación en el río La Palma en julio del 2005 (N= 18 territoriales y N= 18 no territoriales), c) los individuos colectados en el río Otapa en mayo de 2006 utilizados para medir la carga parasitaria (N= 33), d) aquellos individuos capturados para medir las reservas de grasa, en el río La Palma en julio 2006 (N=20 territorial y N=20 no territorial). Para el primer grupo, se midió la pigmentación a partir de las fotografías tomadas en campo. Para la medición alar de los otros tres grupos se cortaron las cuatro alas de cada uno de los individuos territoriales y no territoriales desde la base, posteriormente las alas se pegaron a un acetato tamaño carta y se escanearon (escáner

HP ScanJet 3400C). Utilizando el mismo programa para medir la melanización, se cuantificó la cantidad de pigmento del ala anterior y posterior izquierdas de cada individuo, tomando en cuenta el porcentaje de pigmentación (pigmentos rojo y negro) tanto en el ala anterior como posterior. Este programa se utilizó para medir la pigmentación en los cuatro grupos. Para los análisis se utilizó el porcentaje de pigmentación en relación al tamaño del ala. Se tomó esta medida relativa para controlar la diferencia del tamaño de ala de los diferentes individuos, de manera que nuestras mediciones pudieran medir cuánto pigmento han producido los individuos (ver Córdoba-Aguilar, 2002; Serrano-Meneses *et al.*, en prensa).

Análisis Estadístico

Los datos de tasas de parasitismo fueron los únicos que se transformaron, usando la fórmula $\log(x+1)$. Con esto, para todos los análisis se utilizaron pruebas paramétricas. Se hicieron las siguientes pruebas: se comparó la pigmentación de los territoriales y no territoriales, la respuesta inmune y la carga parasitaria se correlacionaron con la pigmentación tanto para machos territoriales como no territoriales. Debido a que los datos de pigmentación y reservas de grasa vienen de dos muestras de años diferentes (2005 y 2006), se compararon primero las muestras entre sí para ver si mostraban diferencias y, en caso de que no las tuvieran, pudieran ser analizadas conjuntamente. No se encontraron diferencias en reservas de grasa en machos del mismo estatus territorial en los dos años (análisis de varianza de dos vías $F_{3,75} = 44.82$, $P < 0.0001$; prueba *post hoc* de Tukey: para machos territoriales de ambos años $P < 0.05$; para machos no territoriales de ambos años $P < 0.05$; $N = 18$ territoriales y $N = 18$ no territoriales para 2005; $N = 20$ territoriales y $N = 20$ no territoriales para 2006). Tampoco se encontraron diferencias en la pigmentación de alas anteriores (análisis de

varianza de dos vías $F_{3,75} = 4.32$, $P < 0.0001$; prueba *post hoc* de Tukey: para machos territoriales de ambos años $P < 0.05$; para machos no territoriales de ambos años $P < 0.05$; $N = 18$ territoriales y $N = 18$ no territoriales para 2005; $N = 20$ territoriales y $N = 20$ no territoriales para 2006), así como en la pigmentación de las alas posteriores (análisis de varianza de dos vías $F_{3,75} = 0.94$, $P = 0.39$; prueba *post hoc* de Tukey: para machos territoriales de ambos años $P < 0.05$; para machos no territoriales de ambos años $P < 0.05$; $N = 18$ territoriales y $N = 18$ no territoriales para 2005; $N = 20$ territoriales y $N = 20$ no territoriales para 2006). En el caso de la pigmentación roja tampoco se encontraron diferencias entre las dos muestras de los dos años (análisis de varianza de dos vías $F_{3,75} = 1.37$, $P = 0.25$; Prueba *post hoc* de Tukey: para machos territoriales de ambos años $P < 0.05$; para machos no territoriales de ambos años $P < 0.05$; $N = 18$ territoriales y $N = 18$ no territoriales para 2005; $N = 20$ territoriales y $N = 20$ no territoriales para 2006). Dado que los resultados obtenidos muestran que no hay diferencias significativas entre las muestras de machos territoriales y no territoriales tomadas en 2005 y 2006, analicé los datos de manera conjunta para el caso del análisis de pigmentación y reservas de grasa en comparación con el estatus territorial.

Los resultados se indican como medias \pm desviaciones estándar a menos que se indique lo contrario. Se utilizó el programa JMP® para el análisis estadístico.

RESULTADOS

Conducta Sexual

De la muestra de machos marcados y observados en el río La Palma en julio de 2005 (N= 57), se observó a 33 machos durante más de un día. De estos machos se encontró que 17 individuos tenían un territorio establecido. La defensa de los territorios se da mediante contiendas ritualizadas en donde los contendientes vuelan en forma circular con trayectorias ascendentes y descendentes, alrededor de los sitios de percha del territorio.

Las cópulas observadas (N= 13) sucedieron sin un cortejo conspicuo, la hembra era atrapada por el macho mientras ella pasaba cerca del territorio que éste se encontraba defendiendo. La pareja no copula en los territorios, sino que vuelan lejos del río; la oviposición también sucede fuera del territorio del macho. En todos los casos observados, el macho que se encontraba copulando era un macho territorial.

Pigmentación Alar en Machos Territoriales y No Territoriales.

Usando los datos de los machos colectados al final del período de observación en julio de 2005 del río La Palma (N= 18 territorial, N= 18 no territorial) y aquellos capturados para mediciones de grasa en 2006 en el río La Palma (N= 20 territorial, N= 20 no territorial), se encontraron diferencias entre ambos grupos de diferente estatus territorial (análisis de varianza de dos vías $F_{5,227} = 7477.32$, $P < 0.0001$), en donde los machos territoriales tienen mayor pigmentación en las alas anteriores (57.67 ± 0.57 %, N= 38) que los machos no territoriales (54.82 ± 0.53 %, N= 38; Prueba *post hoc* de Tukey: $P < 0.05$; Figura 5). Sin embargo, en el ala posterior no hubo diferencias (machos territoriales: 99.19 ± 0.41 %, N= 38; machos no territoriales 98.04 ± 0.68 %, N= 38; Prueba *post hoc* de Tukey: $P > 0.05$, Figura 5). En cuanto al pigmento rojo, no se

encontraron diferencias entre machos territoriales y no territoriales (machos territoriales: $8.55 \pm 0.18\%$, $N=38$; machos no territoriales: $8.37 \pm 0.19\%$, $N= 38$; Prueba *post hoc* de Tukey: $P < 0.05$).

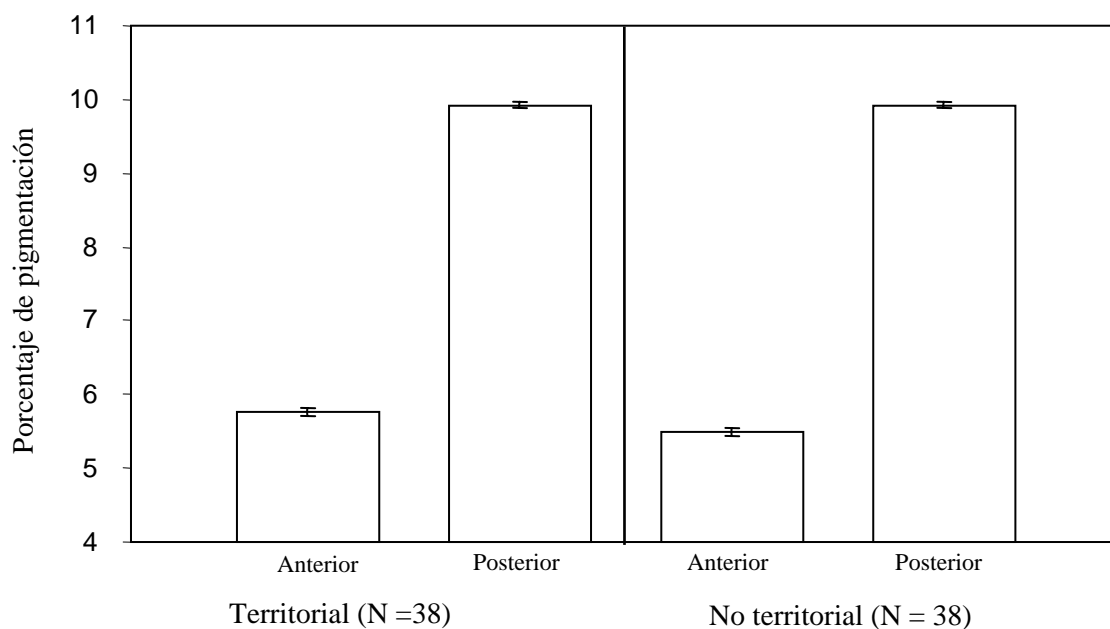


Fig. 5. Diferencias en el porcentaje de pigmentación negra en el ala anterior y posterior en machos territoriales y no territoriales (media \pm 1EE).

Pigmentación Alar y Número de Días de Permanencia en el Sitio de Estudio

Se utilizó la muestra de 57 machos que se marcaron en el río La Palma durante el período de observación en julio de 2005. De esta muestra se registraron 33 machos durante más de un día (en 10 casos, de machos no territoriales, los datos obtenidos en el censo no nos permitieron saber si los individuos habían muerto o simplemente no se encontraban en el sitio de estudio, el resto de los machos $N= 14$ no se tomó en cuenta para el análisis ya que no se les volvió a ver después del día de marcaje). Se encontró una correlación positiva entre el pigmento alar anterior y el número de días que se observó a los individuos en el sitio de estudio ($r_{\text{pearson}} = 0.88$, $P < 0.0001$, $N = 33$, Figura 6). Sin embargo, esto no fue así para el pigmento alar negro posterior ($r_{\text{pearson}} = 0.24$, $P = 0.18$, $N = 33$), ni el pigmento rojo ($r_{\text{pearson}} = -0.05$, $P = 0.76$, $N = 33$)

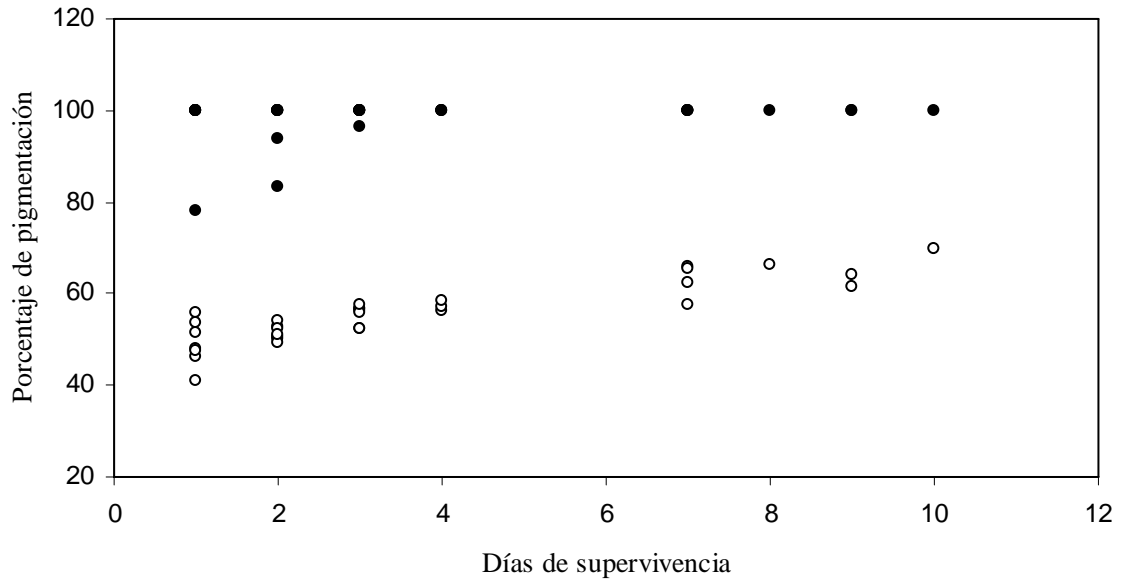


Fig. 6. Relación entre el número de días en que los individuos fueron observados en el sitio de estudio y el porcentaje de pigmentación tanto en alas anteriores (círculos blancos) como en alas posteriores (círculos negros).

Pigmentación Alar y Respuesta Inmune en Machos Territoriales y No Territoriales

Utilizando la muestra de machos colectados al final del período de estudio en julio de 2005 se encontró que los machos territoriales tuvieron más altos valores de melanización en el implante ($11.18 \pm 0.88\%$, N= 18) que los no territoriales ($11.18 \pm 1.24\%$, N= 18; t de student= 2.25, P= 0.031; Figura 7).

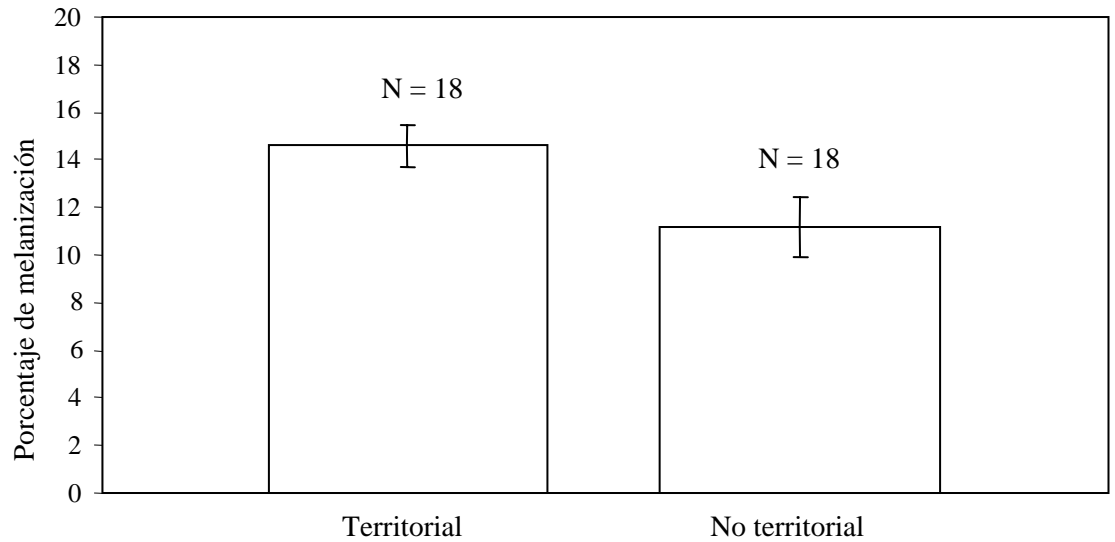


Fig. 7. Diferencias en el porcentaje de melanización en el implante en machos territoriales y no territoriales (media \pm 1EE).

Los machos territoriales, los cuales mostraron más pigmentación negra en las alas anteriores, depositaron también más cantidad de melanina en el implante ($r_{\text{pearson}} = 0.65$, $P < 0.00035$, $N = 18$; Figura 8). Esta relación también se observó entre la cantidad de pigmentación negra en alas posteriores y la cantidad de melanina depositada ($r_{\text{pearson}} = 0.47$, $P = 0.046$, $N = 18$; Figura 8). Sin embargo, no se observó relación alguna entre la melanización y el pigmento rojo ($r_{\text{pearson}} = -0.14$, $P = 0.56$, $N = 18$).

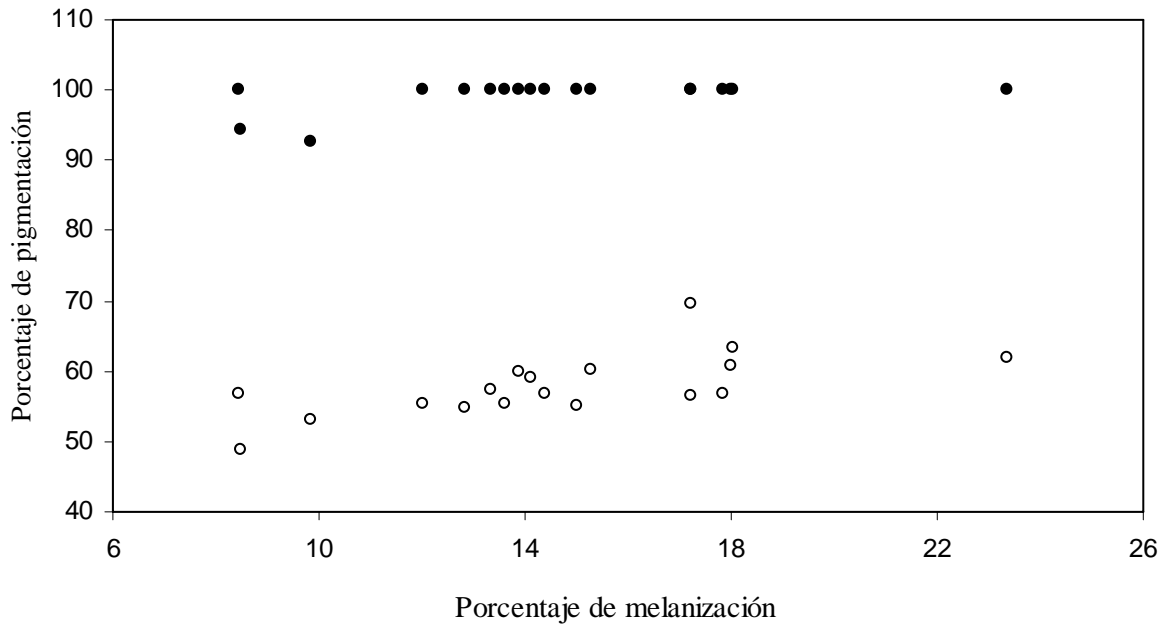


Fig. 8. Porcentaje de pigmentación en alas anteriores (círculos blancos) y posteriores (círculos negros) y porcentaje de melanización en el implante en machos territoriales

En los machos no territoriales, se encontró también una relación positiva entre la melanina en el implante y la cantidad de pigmento negro del ala anterior ($r_{\text{pearson}} = 0.56$, $P = 0.014$, $N = 18$; Figura 9), así como con la cantidad de pigmento negro en el ala posterior ($r_{\text{pearson}} = 0.54$, $P = 0.019$, $N = 18$; Figura 9). Sin embargo, al igual que en los machos territoriales, tampoco se encontró una correlación entre la cantidad de pigmento rojo y la melanización ($r_{\text{pearson}} = -0.17$, $P = 0.58$, $N = 18$).

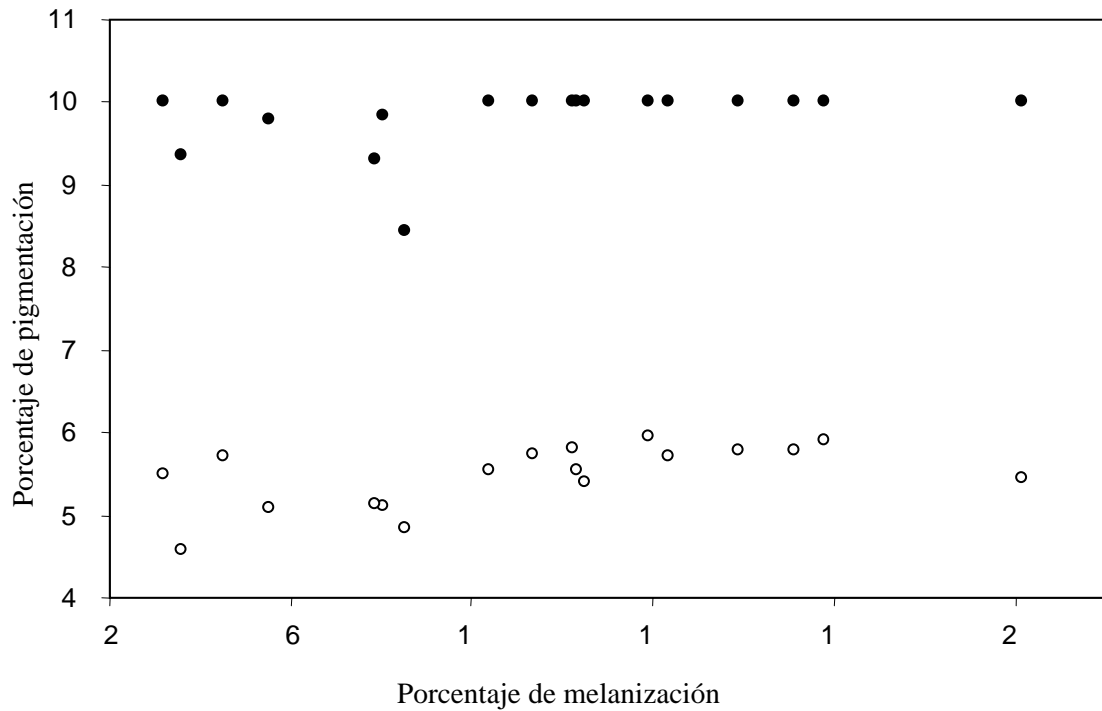


Fig. 9. Porcentaje de pigmentación en alas anteriores (círculos blancos) y posteriores (círculos negros) y porcentaje de melanización en el implante en machos no territoriales.

Pigmentación Alar y Carga Parasitaria

Utilizando la muestra colectada en julio de 2006 en el río Otapa se encontró una relación negativa entre la cantidad de pigmentación negra en ambas alas y la carga parasitaria (alas anteriores, $r_{\text{pearson}} = -0.47$, $P = 0.037$; alas posteriores, $r_{\text{pearson}} = -0.47$, $P = 0.032$; para ambos pares $N = 33$; Figura 10). Se encontró también una relación positiva entre la pigmentación roja y la carga parasitaria ($r_{\text{pearson}} = 0.47$, $P = 0.032$, $N = 33$; Figura 10)

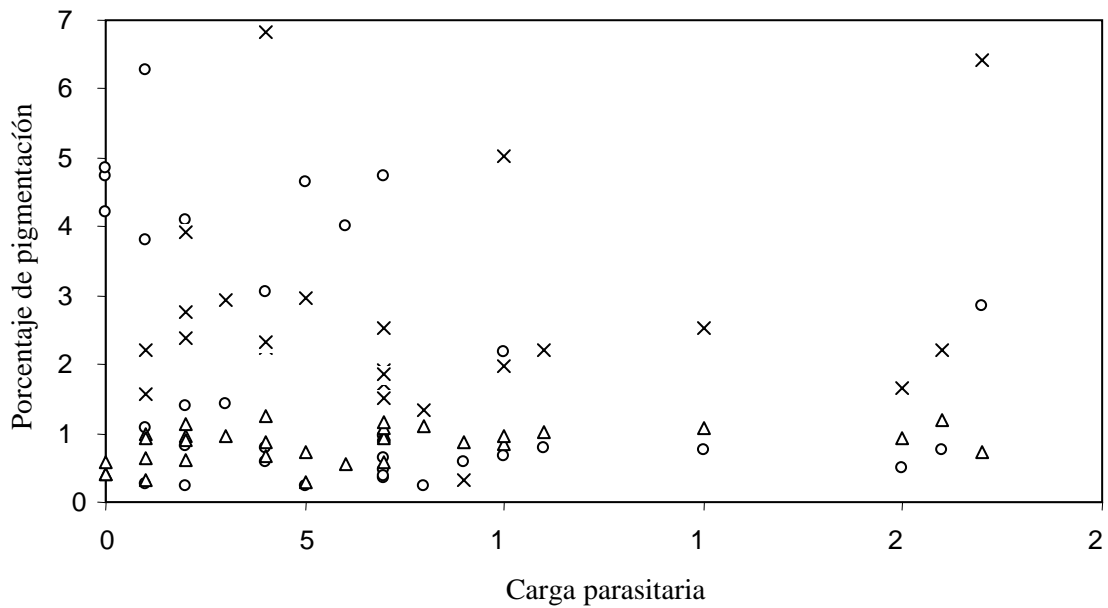


Fig. 10. Relación entre pigmentación negra de alas anteriores (círculos) y alas posteriores (cruces), así como pigmentación roja (triángulos) con la carga parasitaria.

Grasa Corporal en Machos Territoriales y No Territoriales

Utilizando dos muestras, la que se colectó al final del estudio en el río La Palma en julio de 2005 y la que se colectó en el mismo río en julio de 2006, se encontró que los machos territoriales tuvieron una mayor cantidad de grasa corporal (2.48 ± 0.09 mg, N= 38) que los no territoriales (1.11 ± 0.09 mg, N= 38; t de student = 11.39, $P < 0.0001$, Figura 11).

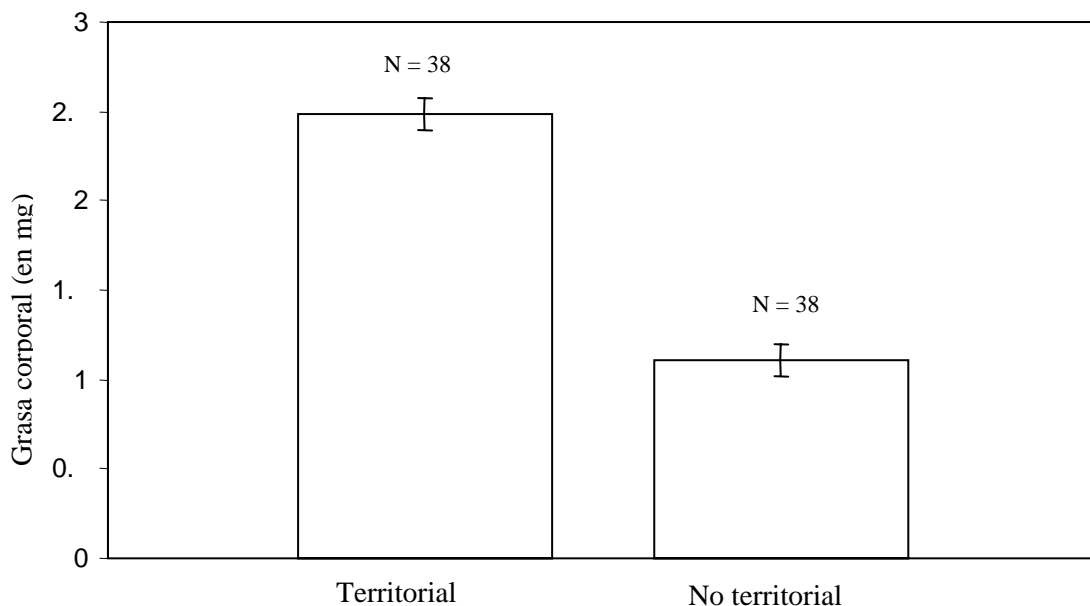


Fig. 11. Diferencias en grasa corporal en machos territoriales y no territoriales (media \pm 1 EE).

Pigmentación Alar y Grasa Corporal en Machos Territoriales y No Territoriales

Utilizando las mismas muestras mencionadas en el inciso anterior se encontró una correlación positiva entre las reservas de grasa y la pigmentación negra de alas anteriores en machos territoriales ($r_{\text{pearson}} = 0.46$, $P = 0.004$, $N = 38$; Figura 12). Sin embargo, no se encontró ninguna relación entre las reservas de grasa y las alas posteriores ($r_{\text{pearson}} = -0.11$, $P = 0.052$, $N = 38$; Figura 12). En machos no territoriales, las reservas de grasa también correlacionaron positivamente con la pigmentación negra de alas anteriores ($r_{\text{pearson}} = 0.54$, $P = 0.001$, $N = 38$; Figura 13), pero no mostraron ninguna relación entre las reservas de grasa y la pigmentación en alas posteriores ($r_{\text{pearson}} = 0.20$, $P = 0.42$, $N = 38$; Figura 13).

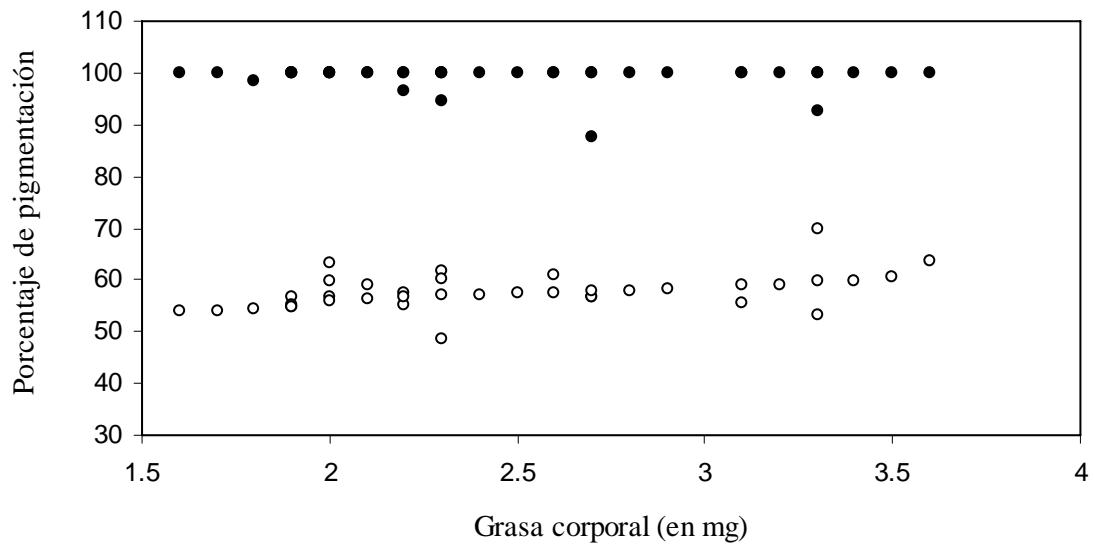


Fig. 12 Relación entre grasa corporal y pigmentación en alas anteriores (círculos blancos) y alas posteriores (círculos negros) en machos territoriales.

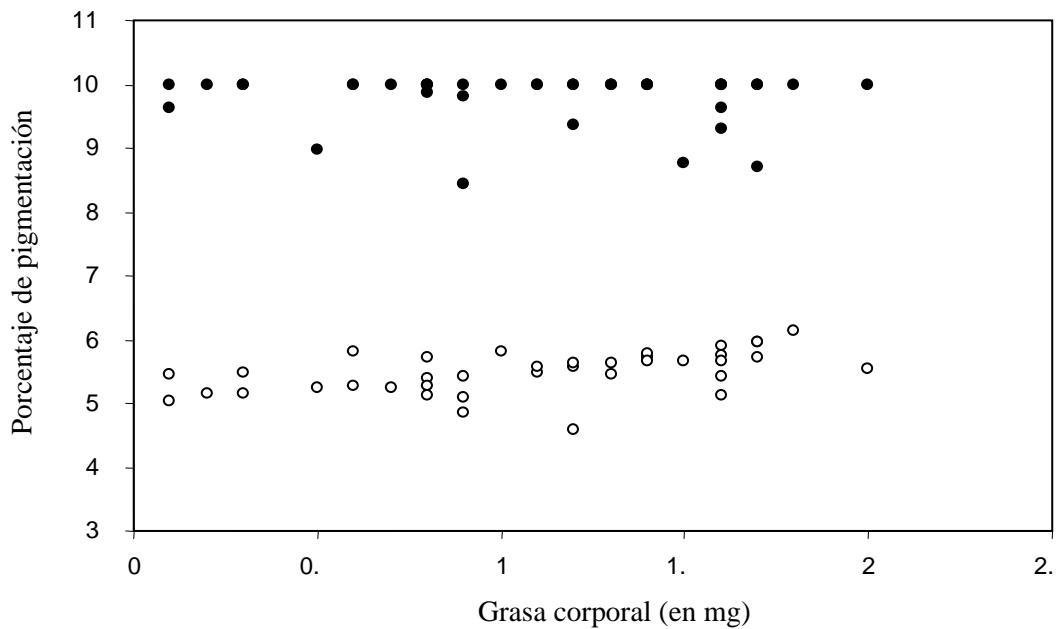


Fig. 13 Relación entre grasa corporal y pigmentación en alas anteriores (círculos blancos) y alas posteriores (círculos negros) en machos no territoriales.

DISCUSIÓN

Distintos estudios han apoyado la hipótesis de que la pigmentación alar de machos de la familia Calopterygidae puede funcionar como un indicador de la condición de los individuos, medida con parámetros como la intensidad de la respuesta inmune, la cantidad de grasa corporal y la supervivencia, tanto en la elección femenina como en la competencia masculina (Siva-Jothy, 1999, 2000; Córdoba-Aguilar, 2002; Rantala *et al.*, 2000, Siva-Jothy y Plaistow, 1999; Córdoba-Aguilar *et al.*, 2003; Tsubaki y Hooper, 2004; Contreras-Garduño *et al.*, 2006; Serrano-Meneses *et al.*, 2007). Los resultados de este estudio apoyan esta hipótesis, ya que muestran que los machos territoriales montan una mejor respuesta inmune (medida como la capacidad de melanización), tienen mayores reservas de grasa corporal, y una mejor supervivencia (medida como número de días en el sitio de estudio) que los machos no territoriales. Esto sugiere que los machos que logran hacerse de un territorio tienen generalmente mejor condición energética representada por la grasa corporal, así como mejor respuesta inmune. Se ha sugerido que la adquisición y defensa de un territorio está relacionada con las reservas de grasa de los individuos, es decir, que los machos más pigmentados son los que tienen más altas reservas energéticas y los que, a su vez, pueden defender por más tiempo un territorio (Contreras-Garduño *et al.*, 2006). Esta podría ser la base de porque en este estudio se encontró que los machos territoriales, con más grasa, tenían mayor pigmento que los no territoriales.

Varios estudios han sugerido que la adquisición de un territorio es de suma importancia para la reproducción, ya que las hembras se aparean casi exclusivamente con machos territoriales (Waage 1973, 1979; Plaistow y Siva-Jothy, 1996; Córdoba-Aguilar, 2000), por lo que el éxito reproductivo de machos territoriales es mucho mayor que el de machos que no poseen un territorio (Plaistow y Siva Jothy, 1996). En este

estudio no se observaron suficientes eventos de cópula como para hacer un análisis, sin embargo todos los eventos de cópula observados (N= 13) involucraban machos territoriales. Este resultado, aunado a los datos arrojados por los estudios recién mencionados podrían sugerir que este mismo fenómeno pasa también con *H. titia*.

Los resultados de este estudio muestran que la pigmentación negra de las alas anteriores correlaciona con cinco aspectos clave de la condición masculina: estatus territorial (y por lo tanto éxito reproductivo), supervivencia, habilidad inmune, carga parasítica y reservas de grasa. La pigmentación negra del ala posterior correlaciona solamente con la habilidad inmune y carga parasítica. Sin embargo, dados los resultados obtenidos para la pigmentación negra de alas anteriores, la explicación posible es que las alas posteriores, junto con las anteriores, sirven también para comunicar el estatus energético del macho. Probablemente durante la etapa de producción y depósito de pigmento en la maduración del individuo, el pigmento comienza a fijarse primero en el ala posterior y una vez que ésta se ha cubierto completamente o casi en su totalidad, el ala anterior comienza a llenarse. En caso de que los recursos sean escasos y se produzca poco pigmento, ambos pares de alas presentan bajos valores de pigmentación. Algunos análisis extras muestran evidencias a favor de esta hipótesis: a) la mayoría de los machos tienen las alas con 100% de pigmento (5 de 38 machos territoriales y 9 de 38 machos no territoriales no tenían la totalidad del ala posterior pigmentada), b) de estos machos se observó una menor cantidad de machos territoriales (N= 5) con alas posteriores poco pigmentadas, los machos territoriales son los que poseen mayores reservas de grasa. Con estos resultados se podría plantear la hipótesis de que el pigmento negro posterior no tiene una función en términos de selección sexual, sin embargo no se puede afirmar que si algunos machos no tuvieran el pigmento en alas posteriores se desempeñarían de igual manera en términos de selección sexual que los

que sí tuvieran, por lo que no se puede descartar alguna posible función que este pigmento tenga en la selección sexual.

El depósito de grasa en los calopterígidos se da tanto en etapa larval (Siva-Jothy y Plaistow, 1999), como en la teneral (justo después de la emergencia y antes de la maduración sexual) (Plaistow y Siva-Jothy, 1996). En la etapa teneral, que en *H. titia* dura aproximadamente de 8 a 14 días (Córdoba-Aguilar, datos sin publicar), los individuos se dedican casi exclusivamente a alimentarse (e.g. Higashi *et al.*, 1979) por lo que es muy posible que la mayoría de la grasa corporal se acumule durante esta etapa. Una hipótesis de sobre lo que se comunica a los otros machos coespecíficos durante las peleas por territorios es que, durante las contiendas, los machos evalúan la habilidad energética del contendiente de sostener el vuelo lo cual se ha visto en especies como *H. americana* (Contreras-Garduño *et al.*, 2006). Esta hipótesis opera en el contexto de competencia entre machos, ya que no se observa un cortejo precopulatorio conspicuo tal como ocurre en *Calopteryx*, en donde otros aspectos de la condición masculina se comunican (e.g. resistencia a parásitos y habilidad inmune; Siva-Jothy, 1999, 2000). Más específicamente, lo que podría estarse comunicando a otros machos son las reservas de grasa. De acuerdo con estas ideas, (Plaistow y Siva Jothy, 1996; Koskimäki *et al.*, 2004; Contreras-Garduño *et al.*, 2006; Serrano-Meneses *et al.*, 2007), en este estudio se encontró una relación positiva entre la cantidad de grasa corporal y la pigmentación alar.

Algunos estudios (Grether, 1996; Contreras-Garduño *et al.*, 2006,) indican que en machos de *H. americana* existe una relación entre la cantidad de pigmento alar rojo y la condición del macho. Contreras-Garduño y colaboradores (1996), encontraron que los

machos territoriales de esta especie tienen más pigmentación alar, además de que los machos más pigmentados montan una mejor respuesta inmune y tienen mayores reservas de grasa que los machos con menos pigmento, es decir, los machos no territoriales. Mi investigación utilizó la misma metodología que en el estudio de Contreras-Garduño y colaboradores (2006), sin embargo, no encontré esta relación en *H. titia*. Paradójicamente, mis resultados no muestran que la cantidad de pigmento rojo se relacione con ningún aspecto de la condición, entendida como respuesta inmune, reservas energéticas y días de permanencia en el sitio de estudio. Esto puede deberse a varias razones, la primera es que la función indicadora de condición del pigmento rojo se haya perdido en esta especie, siendo ahora el pigmento negro el indicador de la condición del macho. Esta hipótesis resulta difícil de comprender, dado que el pigmento rojo es costoso para sus portadores (Grether y Grey, 1996). Sin embargo, de igual manera que con el pigmento negro de las alas posteriores, no podemos suponer que los individuos que hipotéticamente no posean este pigmento se desempeñarían de igual manera que los que no lo tuvieran, por lo que no podemos descartar que este pigmento tenga alguna función en términos de selección sexual. Podría ser también que no se encontrara una relación debido al tamaño de muestra, sin embargo, esto es poco probable, ya que con el mismo tamaño de muestra si se encontró una relación entre el pigmento negro y la respuesta inmune.

La evolución de la pigmentación en *Calopteryx* y *Hetaerina*.

Como se había mencionado anteriormente, dentro de los calopterígididos se encuentran los géneros *Hetaerina* y *Calopteryx*, en donde los machos poseen patrones específicos de pigmentación. El género *Hetaerina* es el basal en esta familia (Figura 2) y los machos presentan una coloración roja en las bases de las cuatro alas, mientras que

el género *Calopteryx* es más derivado y presenta una coloración negra o café oscuro cubriendo total o casi totalmente las cuatro alas (Córdoba-Aguilar y Cordero-Rivera, 2005).

En el género *Hetaerina* no se ha observado ninguna conducta de cortejo precopulatorio de la manera en la que se ha observado en el género *Calopteryx*, en donde se observa un cortejo precopularorio muy conspicuo, en el cual la pigmentación alar tiene aparentemente una función en la elección femenina, ya que las hembras se aparean con los machos más pigmentados (Siva-Jothy, 1999; Córdoba-Aguilar, 2002). Varios estudios han documentado que hay presión por parásitos gregarinos en *Calopteryx*, lo que tiene un efecto negativo sobre la adecuación de las libélulas (Siva Jothy y Plaistow 1999; Siva-Jothy, 2000; Córdoba-Aguilar, 2002; Córdoba-Aguilar *et al.*, 2003), y el número de parásitos correlaciona negativamente con la cantidad de pigmento alar. La presencia de cortejo precopulatorio en especies de *Calopteryx* puede deberse probablemente a que evolucionó como un mecanismo masculino para comunicar la condición inmunológica a las hembras (resistencia a parásitos y mejor respuesta inmune; Siva-Jothy, 1999, 2000; Córdoba-Aguilar, 2002).

De acuerdo a lo observado en el campo, esta especie no presenta ningún tipo de cortejo precopulatorio tal como se observa en especies de *Calopteryx*, por lo que no pareciera que su coloración alar estuviera sido moldeada por procesos de elección femenina, sino probablemente por procesos de competencia entre machos. Sin embargo, se debe admitir que el cortejo podría existir y no ser tan conspicuo, sino más sutil, situación que me fue imposible detectar. Aún así, en la manera de los *Calopteryx*, no existe una conducta masculina precopulatoria parecida en *H. titia*.

En este sentido resulta importante resaltar que no es necesario que exista un cortejo conspicuo para que las hembras tengan herramientas con las cuales evaluar a los

machos, sino que se podrían estar dando procesos de elección femenina indirecta en donde las hembras estarían evaluando a los machos, a través de otros indicadores, que no incluyen el cortejo conspicuo (Haven-Wiley y Poston, 1996).

De manera interesante, se encontró que *H. titia*, a diferencia de otras especies de *Hetaerina* (e.g. *H. americana*, *H. cruentata*, *H. macropus* y *H. vulnerata*, Córdoba-Aguilar, datos sin publicar), sí presenta infección por gregarinas, lo cual resulta similar a lo que ocurre con especies del género *Calopteryx* (e.g. *C. virgo*, Åbro, 1996; *C. maculata*, Taylor y Merriam, 1996; *C. splendens xantostoma*, Siva Jothy, 1999; *C. haemorrhoidalis*, Córdoba-Aguilar, 2002). La carga parasitaria mostró una relación negativa con la pigmentación negra tanto en alas anteriores como posteriores. Esta relación se esperaba, ya que existe una relación positiva entre la cantidad de pigmentación negra de ambos pares de alas con la habilidad inmune. Este resultado también coincide con otros estudios previos que relacionan la habilidad inmune con la expresión de CSS (revisado por Lawniczak *et al.*, 2007). Paradójicamente, la pigmentación roja mostró una relación positiva con la carga parasitaria, lo que resulta novedoso, ya que en especies como *H. americana* se ha observado que los machos con mayor área de pigmento rojo montan una mejor respuesta inmune y, aunque en esta especie no se presenta infección por gregarinas (Córdoba-Aguilar *et al.*, 2006), los machos con más pigmento rojo mostraron una mayor resistencia a infección por bacterias (Contreras-Garduño *et al.*, 2007). Una hipótesis para la posible relación de la pigmentación roja y la habilidad inmune, es que el pigmento rojo significa un costo para el individuo, vía la reducción a la resistencia a parásitos.

Estos datos apoyan la hipótesis de que los CSS conspicuos de esta especie podrían estar indicando la capacidad inmune de los individuos a sus coespecíficos. Lo

paradójico es que esto sucedería en ausencia de elección femenina (asumiendo que la falta de cortejo conspicuo anule elección femenina precopulatoria), lo cual no tiene sentido. Sin embargo, si esta fue la manera en que la pigmentación evolucionó en *Calopteryx*, sugeriría que la relación parásito-pigmento fue anterior a la evolución del cortejo masculino y la preferencia de las hembras por machos más pigmentados. Si es esto, entonces seguramente la coloración roja no funcionaba para comunicar resistencia a parásitos y por esto fue necesaria la pigmentación negra. Dados los costos de producción de esta última resulta difícil pensar porque en ausencia de cortejo los machos evolucionaron este rasgo. Si esto es cierto, entonces cabe suponer que la pigmentación negra ha evolucionado a la par de la infección por gregarinas, lo cual habría sido el paso que siguieron los *Calopteryx*. *H. titia* podría ser ese “eslabón” entre dos géneros donde el pigmento rojo, aunque retenido, ya ha perdido su función en selección sexual, ganado ahora por el pigmento negro.

Contreras Garduño y colaboradores (2005) sugieren que dado que el cortejo precopulatorio está ausente en el género *Hetaerina*, es muy poco probable que se den procesos de elección femenina precopulatoria en este género de la manera en que se presenta en *Calopteryx*, por lo que la pigmentación en estas especies es solamente un indicador de la capacidad de defender y mantener un territorio, visto en términos de reservas energéticas. Existen otras maneras de elección femenina precopulatoria, sin embargo, en Calopteryidae sólo se conoce el despliegue alar. Es decir, la pigmentación en *H. titia* podría ser un indicador entre machos de las reservas energéticas. De manera que, dado que las reservas energéticas son las responsables del éxito en las contiendas por territorios y participan además en la respuesta inmune, la habilidad inmune resulta indirectamente seleccionada. Si esto es cierto, utilizando los resultados aquí obtenidos, podemos suponer que la elección femenina en *Calopteryx* por manchas más

pigmentados podría haber evolucionado en un principio debido a la relación energética entre pigmentación y reservas de grasa durante la competencia entre machos, en donde la habilidad inmune se seleccionó indirectamente una vez que las infecciones por gregarinas aparecieron en estas poblaciones.

CONCLUSIONES

Se confirmó la hipótesis de que existe una relación positiva entre la pigmentación alar negra de los machos de *H. titia* y aspectos de la condición masculina como lo son la respuesta inmune, la supervivencia, las reservas de grasa y la carga parasitaria. Esta relación sólo toma en cuenta a la pigmentación negra del ala anterior; la pigmentación del ala posterior sólo correlaciona con la intensidad de la respuesta inmune y la carga parasitaria.

Los resultados muestran que la cantidad de pigmento rojo no se relaciona con la respuesta inmune, grasa corporal y supervivencia. La hipótesis que puede explicar esto es que la función indicadora de condición del pigmento rojo se haya perdido en esta especie.

Se encontró una relación positiva entre la cantidad de grasa corporal y la pigmentación alar, por lo que se podría especular que, durante las contiendas por territorios, mediante la cantidad del pigmento alar los machos podrían estar evaluando la habilidad energética del contendiente.

La pigmentación alar negra presente en este grupo es una novedad en el género *Hetaerina* y dado que no se presenta cortejo precopulatorio pero sí hay parásitos gregarinos, el pigmento negro pudo haber evolucionado como un indicador de la condición masculina pero en términos de selección intrasexual.

CONCLUSIONES

Se confirmó la hipótesis de que existe una relación positiva entre la pigmentación alar negra de los machos de *H. titia* y aspectos de la condición masculina como lo son la respuesta inmune, la supervivencia, las reservas de grasa y la carga parasitaria. Esta relación sólo toma en cuenta a la pigmentación negra del ala anterior; la pigmentación del ala posterior sólo correlaciona con la intensidad de la respuesta inmune y la carga parasitaria.

Los resultados muestran que la cantidad de pigmento rojo no se relaciona con la respuesta inmune, grasa corporal y supervivencia. La hipótesis que puede explicar esto es que la función indicadora de condición del pigmento rojo se haya perdido en esta especie.

Se encontró una relación positiva entre la cantidad de grasa corporal y la pigmentación alar, por lo que se podría especular que, durante las contiendas por territorios, mediante la cantidad del pigmento alar los machos podrían estar evaluando la habilidad energética del contendiente.

La pigmentación alar negra presente en este grupo es una novedad en el género *Hetaerina* y dado que no se presenta cortejo precopulatorio pero sí hay parásitos gregarinos, el pigmento negro pudo haber evolucionado como un indicador de la condición masculina pero en términos de selección intrasexual.

REFERENCIAS

- Abbot, J.C. 2005. Dragonflies and Damselflies of Texas and the South-Central United States: Texas, Louisiana, Arkansas , Oklahoma and New Mexico. Princeton University Press.
- Åbro, A. 1987. Gregarine Infection of Zygoptera in Diverse Habitats. Odonatologica, 16: 119-128.
- Åbro, A. 1990. The Impact of Parasites in Adult Populations of Zygoptera. Odonatologica, 19:223-233.
- Åbro, A. 1996. Gregarine Infection of Adult *Calopteryx virgo* (Odonata: Zygoptera). Journal of Natural History, 30: 855-859.
- Andersson, M. 1994. Sexual Selection. Princeton University Press.
- Cerenius, L. y K. Söderhäll. 2004. The Prophenoloxidase-Activating System in Invertebrates. Immunological Reviews, 198:116-126.
- Clutton Brock, T.H. y S.D. Albon, 1979. The Roaring of Red Deer and the Evolution of Honest Advertisement. Behaviour, 69: 145-160.
- Corbet P.S. 1999. Dragonflies: Behaviour and Ecology of Odonata. Cornell University Press.
- Contreras-Garduño J., Canales-Lazcano J., y A. Córdoba Aguilar. 2006. Wing Pigmentation, Immune Ability and Fat Reserves in Males of the Rubyspot Damselfly, *Hetaerina americana*. Journal of Ethology, 24:165-173.
- Contreras-Garduño, J., Lanz-Mendoza, H. y A. Córdoba-Aguilar. (2007). The Expression of a Sexually Selected Trait Correlates with Different Immune Defense Components and Survival in Males of the American Rubyspot, Journal of Insect Physiology, 53:612-621.