



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**Costos fisiológicos y de supervivencia de los caracteres sexuales secundarios: patrones de pigmentación alar en el odonato *Hetaerina titia* (Odonata: Calopterygidae)**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**CLARA ELISA CASTAÑOS SÁNCHEZ DE LA BARQUERA**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ROBERTO EDMUNDO MUNGUÍA STEYER**  
FES Iztacala, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO CÓRDOBA AGUILAR**  
Instituto de Ecología, UNAM

**DR. RAÚL CUEVA DEL CASTILLO MENDOZA**  
FES Iztacala, UNAM

CD.MX.

DICIEMBRE, 2017



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.

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 2 de octubre de 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **CASTAÑOS SANCHEZ DE LA BARQUERA CLARA ELISA**, con número de cuenta **308021563**, con la tesis titulada "**Costos fisiológicos y de supervivencia de los caracteres sexuales secundarios: patrones de pigmentación alar en el odonato *Hetaerina titia* (Odonata: Calopterygidae)**", realizada bajo la dirección del **DR. ROBERTO EDMUNDO MUNGUÍA STEYER**:

- Presidente: DR. JOSÉ JAIME ZÚÑIGA VEGA  
Vocal: DRA. LETICIA DÍAZ CASANOVA  
Secretario: DR. ALEJANDRO CÓRDOBA AGUILAR  
Suplente: DR. ISAAC GONZÁLEZ SANTOYO  
Suplente: DR. HIBRAIM ADÁN PÉREZ MENDOZA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
CD. UNIVERSITARIA, CD. MX., A 8 DE NOVIEMBRE DE 2017.

  
DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **Agradecimientos**

Agradezco al posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por permitirme realizar mis estudios de maestría y brindarme las facilidades logísticas para el progreso de mi aprendizaje y el desarrollo en tiempo y forma de mi proyecto de investigación.

Expreso también mi gratitud al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero brindado durante el periodo escolar del semestre 2015-2 al 2017-2 que comprendió mis estudios de maestría (CVU 705967).

Agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), ya que este trabajo fue financiado por el programa como parte del proyecto No. IA204315 “Caracteres sexuales secundarios, integración fenotípica y selección natural: patrones de pigmentación alar en el odonato *Hetaerina titia*”.

Agradezco mi tutor el Dr. Roberto Munguía por su tiempo, apoyo incondicional y consejos. A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Raúl Cueva del Castillo y Dr. Alejandro Córdoba, por sus consejos, guía y revisiones que fueron indispensables para la realización de este trabajo.

Agradezco también:

A la Bióloga Rosamond Coates y a la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, por el alojamiento y las facilidades brindadas durante la realización del trabajo de campo de este proyecto.

A los miembros de mi jurado: Dr. Jaime Zúñiga, Dr. Alejandro Córdoba, Dra. Leticia Ríos, Dr. Isaac González y Dr. Hibraim Adán Pérez, por las revisiones a mi trabajo, comentarios y consejos para mejorarlo.

Al Dr. Daniel González por prestarnos su equipo de espectrofotometría en las ocasiones en lo que lo necesitamos.

A mi mamá Jossie S. de la Barquera, porque sin el apoyo incondicional que me ha dado toda mi vida no habría logrado comenzar ni concluir este proyecto.

A todos mis amigos y compañeros de laboratorio que me acompañaron a campo y me ayudaron con el trabajo de laboratorio: Martín Olvera, Adolfo Chavarría, David Schneider, Dr. Jhony Navat, Bruno Vázquez, Alfredo Villarruel, Pablo Álvarez, Eric Novelo, Erik González, Erik Aguilar, Aldo Téllez, Porfirio Berrocal, Leonardo Calzada, Rodrigo Muñoz, Tetsuya Nakamura, y los que seguramente me ha faltado mencionar, pero que de algún modo me dieron su apoyo para la realización de este trabajo.

A todos los miembros del LEEA y del LECA por acompañarme, escucharme y brindarme un agradable ambiente de trabajo.

A Don José Flores por permitirnos trabajar en el jardín de su casa y contarnos las maravillosas anécdotas de su vida.

A todas las libélulas *H. titia* que murieron en la realización de este trabajo.

Nuevamente a: mi tutor el Dr. Roberto Munguía por todas sus enseñanzas, horas de trabajo invertidas en este proyecto y por resolver todas mis dudas durante mi trayecto en la maestría, al Dr. Alex Córdoba por integrarme como un miembro más de su laboratorio y por el espacio y las facilidades brindadas y a David Schneider por su amistad y su apoyo tanto en campo como en laboratorio durante todo el transcurso de mi maestría.

Al resto de mis amigos que no he mencionado pero que de alguna manera gracias a su compañía y consejos me ayudaron en este proyecto: Pame, Ceci, Emilia, Pau, Chayo, Feri, Polo, Yaz, Héctor, Mara, Moni, Juanita y Juan.

# ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>5</b>
<b>Selección sexual y dimorfismo sexual</b> .....	<b>5</b>
Caracteres sexuales secundarios como indicadores de la condición.....	6
Pigmentación alar de calopterígidos y <i>Hetaerina titia</i> .....	7
Polifenismo estacional de <i>Hetaerina titia</i> .....	9
Pigmentación como señal honesta y costosa .....	10
Justificación.....	11
<b>Objetivos</b> .....	<b>13</b>
Objetivo General.....	13
Objetivos Particulares.....	13
<b>Capítulo I</b> Physiological condition and wing pigmentation expression in a damselfly with seasonal polyphenism .....	<b>14</b>
<b>Capítulo II</b> Supervivencia diferencial de los machos de <i>Hetaerina titia</i> en relación a la manipulación del área alar melanizada.....	<b>23</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>24</b>
<b>Material y métodos</b> .....	<b>30</b>
Sitio de estudio y temporadas de muestreo .....	30
Marcaje y recaptura de organismos.....	30
Medición de variables morfométricas.....	32
Análisis de supervivencia .....	33
Mediciones espectrofotométricas .....	37
<b>Resultados</b> .....	<b>38</b>
Probabilidades de supervivencia y recaptura 2015.....	38
Probabilidades de supervivencia y recaptura 2016.....	49
Mediciones espectrofotométricas .....	59
<b>Discusión</b> .....	<b>60</b>
<b>Referencias (del Segundo capítulo)</b> .....	<b>67</b>
<b>Apéndices</b> .....	<b>77</b>
<b>Discusión general</b> .....	<b>83</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>89</b>
<b>Referencias de introducción y discusión (las no citadas en el artículo)</b> .....	<b>90</b>

## Resumen

La expresión de caracteres sexuales secundarios brinda a los individuos un mayor éxito reproductivo, no obstante, también puede generar costos asociados a diferentes aspectos de su historia de vida, como una disminución en la tasa de supervivencia o costos fisiológicos ocasionados por la producción y/o exhibición de dichos caracteres.

Los machos de la libélula *Hetaerina titia* presentan dos pigmentaciones alares como caracteres sexuales secundarios: una roja, presente en la base de las alas anteriores y otra negra, presente en las cuatro alas. La pigmentación negra es debida a melanina y está asociada a un polifenismo estacional. Al inicio del año, los machos presentan poca o nula melanina, mientras que en verano el área melanizada es grande. Durante el presente estudio evaluamos tanto los costos fisiológicos como de supervivencia asociados al grado de melanización alar de los machos.

Con el fin de evaluar la condición de los machos y su relación con la melanización alar, comparamos la cantidad de reservas energéticas presentes en machos de las dos temporadas y encontramos que los individuos de la temporada temprana con poca melanización presentan menor cantidad de reservas energéticas que los individuos de la temporada tardía, con mayor melanización. Estas diferencias posiblemente se deban a los costos de producción del rasgo, el cual podría verse limitado por la disponibilidad de recursos en la etapa larvaria. Por lo tanto, consideramos que el polifenismo de la especie puede deberse a una limitada capacidad de los individuos de expresar el carácter debido a una restricción de recursos.



Adicionalmente, durante dos años, evaluamos el efecto de la melanización alar sobre las probabilidades de supervivencia en los machos. Los análisis de captura-recaptura usados para tal fin consideraron tres grupos: a) sin manipulación alar, b) manipulación con un plumón transparente y c) manipulación experimental aumentando el área melanizada con un plumón negro. Encontramos una menor tasa de supervivencia en el grupo experimental al compararlo con los individuos no manipulados y una tendencia no significativa al compararlo con los individuos manipulados con el plumón transparente. Estas diferencias en supervivencia las atribuimos a una mayor tasa de depredación debida a un aumento en la conspicuidad de los individuos.

Este trabajo contribuye a la hipótesis de que los dos pigmentos presentes en la especie son señales multicomponentes indicadoras de la condición, complementarias y no redundantes. El área alar melanizada posiblemente está siendo la señal indicadora de la condición de los machos en la temporada del pico reproductivo, pero la pigmentación roja estaría cumpliendo esta función en la temporada cuando hay menor abundancia de individuos en la población.

## Abstract

The expression of secondary sexual characters improves the organism reproductive success, nevertheless it can generate costs associated with animal life history features. Such costs may include a decreased rate of survival due to an increased conspicuity in organisms, as well as physiological costs modulated by stress agents.

Males of the damselfly *Hetaerina titia* present two wing pigmentations as secondary sexual characters. The first pigmentation, located at the forewings base is red. The second one is black due to melanin and is expressed in fore- and hindwings. This melanization is associated with a seasonal polyphenism. Thus, at the beginning of the year, males show smaller or absent melanized areas, whereas the melanized area is larger in the summer.

In this work, we evaluated the physiological and survival costs suffered by males due to forewings melanization. We compared the amount energetic reserves of the males of the two referred seasons. We found that individuals of the early season, with smaller melanized wing areas have less energy reserves than individuals with of the late season with larger melanized wing areas. The differences might be explained by the production costs of the trait. Therefore, we consider that the species seasonal polyphenism could be the consequence of restrained resources.

Additionally, for two years, we estimated the wing melanization cost on the survival probabilities of males. The capture-recapture analysis used for this purpose considered three groups: a) without wing manipulation, b) manipulation with a transparent ink marker and c) experimental manipulation increasing the melanized area with a black marker. We found a lower survival rate in the experimental group compared with the unmanipulated group. No significant results were found when

the experimental group and the transparent ink group were compared. These differences of survival could be caused by a higher rate of predation in the experimental group due of the increased conspicuity of individuals.

This work contributes to the hypothesis that both pigmentations of the species are complementary and non-redundant multicomponent signals. Potentially, the male melanized wing area is the condition signal during the reproductive peak season, but the red pigmentation would be fulfilling this function in the summer season, when the individuals in the population are less abundant.

## Introducción

### *Selección sexual y dimorfismo sexual*

La selección sexual se define como el éxito reproductivo diferencial existente entre los individuos de una población, como consecuencia de la variación de la habilidad por competir o elegir parejas reproductivas, copular y fertilizarlas (Andersson, 1994). Darwin propuso a la selección sexual como una explicación al dimorfismo sexual encontrado en diferentes sistemas animales (Darwin, 1859). El dimorfismo sexual se define como las diferencias morfológicas, fisiológicas y conductuales existentes entre machos y hembras (Andersson 1994; Fairbairn, 2007). Los atributos fenotípicos o patrones de comportamiento de los machos que están asociados a su éxito de apareamiento usualmente se encuentran bajo fuerte presión de selección sexual, la cual opera mediante dos mecanismos: elección de pareja y competencia intrasexual (Andersson, 1994).

En la elección de pareja, los machos desarrollan estructuras atractivas a las hembras (ornamentos), lo cual les brinda acceso a la cópula y un aumento en su éxito reproductivo (Andersson, 1994). Un ejemplo de ello, lo encontramos en muchos grupos de aves que presentan múltiples ornamentos como densos y coloridos plumajes, cantos elaborados y colores iridiscentes, todos estos ellos están sujetos a elección femenina (Moller & Pomiankowski, 1993). En artrópodos un ejemplo peculiar es de los machos de la araña pavorreal (*Maratus volans*), los cuales durante el cortejo realizan un despliegue en el que muestran a las hembras su abdomen vistoso y colorido, así como su tercer par de patas alargadas y vistosas (Girard & Endler, 2014).

La competencia intrasexual involucra interacciones agonísticas entre machos mediante el uso de estructuras (armamentos) (Berglund *et al.*, 1996; Emlen, 2008), lo cual les permite acceso reproductivo a las hembras (Andersson, 1994, Berglund *et al.*, 1996). Ejemplos de armamentos podemos encontrarlos en diferentes

especies de insectos, como los cuernos que han desarrollado los machos de distintas familias de escarabajos, los cuales presentan una gran variedad de formas y tamaños (Emlen, 2008). Otro caso puede apreciarse en el orden Thysanoptera, donde los machos utilizan sus patas delanteras en combates y los ganadores obtienen un mayor número de apareamientos. (Crespi, 1986)

En algunos casos los individuos exhiben rasgos a sus contendientes, con los cuales permiten la evaluación de su potencial de retención del recurso, lo cual puede llevar a evitar el encuentro agonístico y el gasto energético que este involucra (Andersson, 1994, Berglund *et al.*, 1996). Un ejemplo común es de las mariposas territoriales, donde los machos llevan a cabo batallas de desgaste de vuelo sin contacto físico, en las cuales los individuos evalúan la capacidad del contendiente de retener el recurso (Kemp, 2013). Otro ejemplo es el de las astas de los ciervos, las cuales funcionan como señales visuales o táctiles entre los individuos y se ha reportado que es más probable que la interacción entre rivales escale un combate con contacto físico, cuando ambos presentan tamaños de astas similares (Emlen, 2008).

#### *Caracteres sexuales secundarios como indicadores de la condición*

La “hipótesis de la desventaja” plantea que la expresión de caracteres sexuales secundarios es potencialmente costosa para los individuos, tanto en su producción como en su mantenimiento, y es debido a estos costos que no todos los individuos son capaces de expresar en la misma medida dichos caracteres exagerados (Zahavi, 1975). Únicamente los individuos que se encuentran en buena condición podrán expresarlos, siendo así el rasgo una “señal honesta” como indicadora de la condición del individuo (Stuart-Fox, 2005).

Los costos de estos caracteres pueden verse reflejados en diferentes aspectos: por ejemplo, en supervivencia, debido a factores como un aumento de la susceptibilidad a la depredación por aumento en la conspicuidad (Berglund *et al.*,

1996; Møller, 1996). Casos como estos pueden observarse en aves, donde los machos, mediante cantos y diferentes vocalizaciones atraen a las hembras, pero a su vez las mismas vocalizaciones atraen a sus depredadores (Hale, 2004; Mougeot and Bretagnolle, 2000). También existen costos fisiológicos, que pueden verse reflejados en el sistema inmune o en las reservas energéticas, como en el caso de la araña lobo *Hygrolycosa rubrofasciata*, donde los machos realizan cortejos elaborados generando con sus patas vibraciones en las hojas y a mayor actividad en el cortejo menor es su respuesta inmune (Ahtiainen *et al.*, 2005).

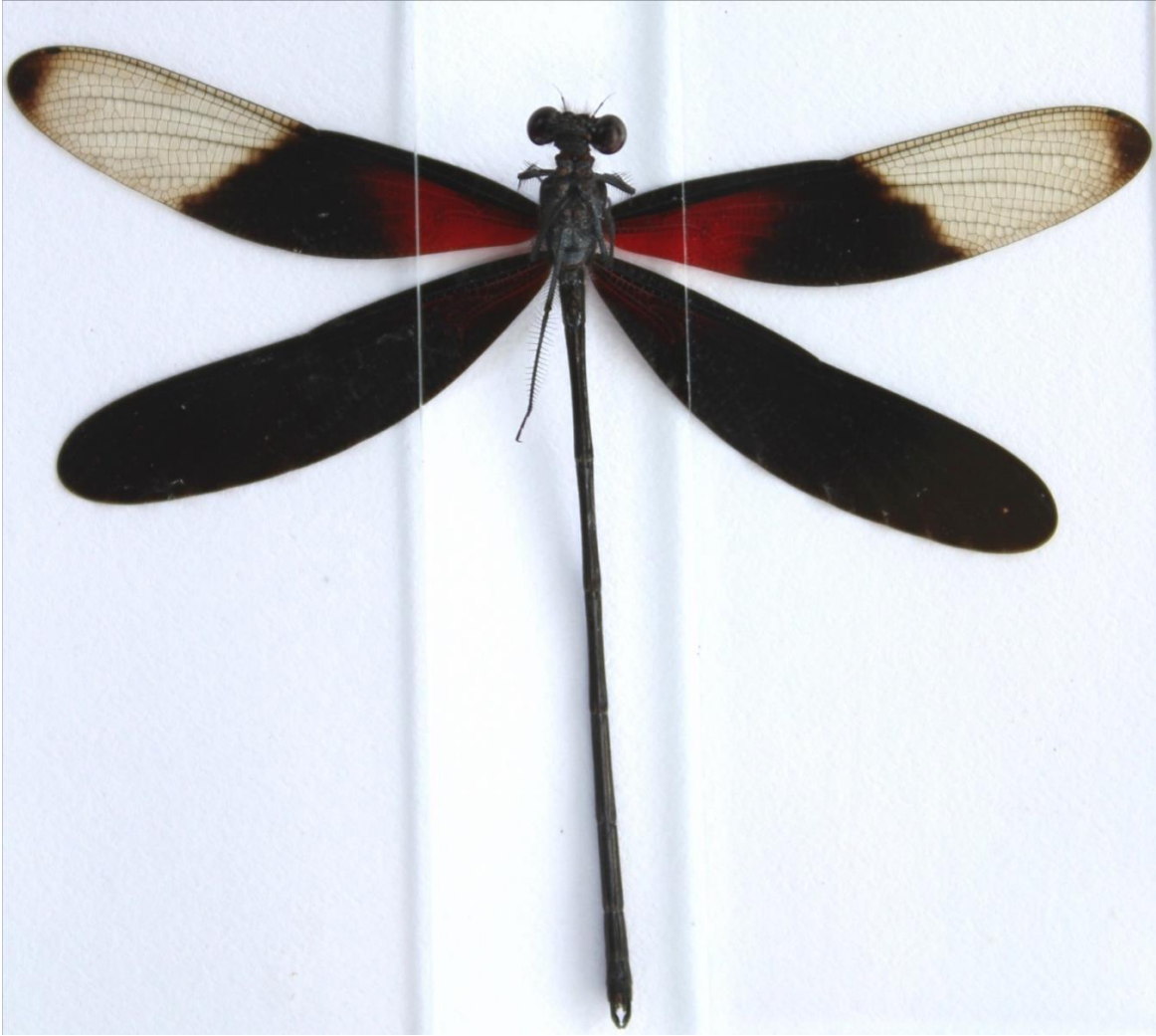
Warren y colaboradores (2013) han propuesto ciertos requisitos de como los caracteres sexuales secundarios pueden ser buenos indicadores de la condición de los machos: 1) que presenten alometría positiva, de tal forma que sean rasgos desproporcionadamente grandes en comparación con el resto del cuerpo del organismo (Green, 1992; Warton *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2013), 2) que tengan una gran variabilidad de expresión entre individuos (Bergsten *et al.*, 2001) y 3) que su expresión esté asociada a procesos fisiológico básicos del organismo, por lo que pueda verse afectada por factores de estrés como pobre nutrición o enfermedades (Folstad & Karter, 1992; Álvarez *et al.*, 2013). Por ejemplo, Folstad y Karter (1992) propusieron la hipótesis de “la desventaja por inmunocompetencia” que explica el trade-off existente entre respuesta inmune y caracteres sexuales secundarios, lo cual evidencia el gran costo fisiológico implicado en la expresión de estos últimos.

#### *Pigmentación alar de calopterígidos y Hetaerina titia*

La pigmentación puede desempeñar papeles importantes en varios aspectos de diversas especies animales, entre ellos el camuflaje, advertencia, termorregulación, la protección contra la radiación ultravioleta o la exhibición de cortejo (Osorio, D. *et al.*, 2008). En las libélulas de la familia Calopterygidae, se ha propuesto que las áreas pigmentadas alares son caracteres sexuales secundarios ya que cumplen con los requisitos señalados por Warren y colaboradores (2013)

(Siva-Jothy, 2000; Rantala *et al.*, 2000; Córdoba-Aguilar & Cordero-Rivera, 2005; Contreras-Garduño *et al.*, 2007; Anderson, & Grether 2010a, 2010b; Outomuro *et al.*, 2014).

*Hetaerina tita* es la única especie dentro del género *Hetaerina* que presenta dos coloraciones: una mancha rojiza en la base de las alas anteriores y pigmentación negra en las alas anteriores y posteriores (Córdoba-Aguilar *et al.*, 2007) (fig. 2). La coloración roja, característica del género *Hetaerina* es un carácter ancestral (Svensson & Waller, 2013; Drury *et al.*, 2015a) que parece haber evolucionado por competencia intrasexual (Grether, 1996; Contreras-Garduño *et al.*, 2006, 2007). Por otro lado, la pigmentación negra es un carácter derivado en la familia (Svensson y Waller, 2013) favorecida a través de competencia entre machos y elección femenina (Siva-Jothy, 2000; Córdoba-Aguilar, 2002).



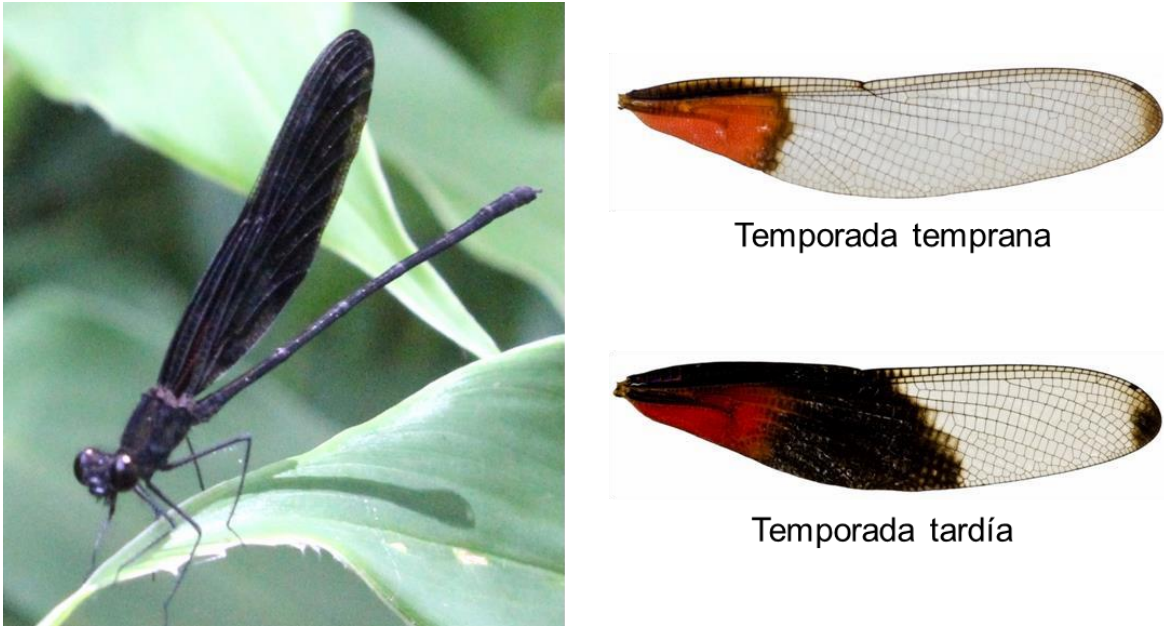
**Figura 1.** Macho de *Hetaerina titia* donde se muestra la coloración típica de las alas.

### *Polifenismo estacional de Hetaerina titia*

Los machos de *H. titia* además de presentar dos pigmentos, expresan un cambio fenológico en el que el tamaño e intensidad de la pigmentación negra varía a lo largo del año (Drury *et al.*, 2015a). El fenotipo de la temporada temprana, predominante durante el pico reproductivo, (de marzo a abril aproximadamente) tiene poco o carece de pigmento negro en los dos pares de alas. En el fenotipo predominante de la temporada tardía, cuando el número de individuos en la población es mucho menor (de agosto a septiembre aproximadamente), el área



negra cubre toda o la mayor parte de las alas posteriores y aproximadamente la mitad anterior de las alas anteriores (Drury *et al.*, 2015a).



**Figura 2.** Macho de *H. titia* y fenotipos típicos de las alas anteriores de cada temporada.

### *Pigmentación como señal honesta y costosa*

Aún no es claro el papel que juegan las dos coloraciones como señales en las interacciones de *H. titia*, pero por lo que se ha estudiado hasta ahora parece ser que se tratan de señales multicomponentes complementarias en el que cada una de los pigmentos transmiten diferente mensaje, a través de un mismo canal sensorial (Moller & Pomiankowski, 1993; Rowe, 1999). Por ejemplo, Grether y colaboradores (2015) han planteado que la mancha roja pudiese estar conservando su función ancestral de reconocimiento de género y que actualmente no esté involucrada en interacciones agonísticas entre machos.

La melanina es la que brinda la pigmentación alar negra en los machos (Chapman 1998, Hooper *et al.*, 2002). La melanina también es un compuesto precursor de la respuesta inmune de insectos (Cerenius & Söderhäll, 2004; González-Santoyo *et*

*al.*, 2010). Dada esta relación, la producción de pigmento negro podría estar siendo una señal costosa asociada a un mecanismo fisiológico, lo cual es uno de los requisitos de Warren y colaboradores (2013) para un carácter sexual secundario indicador de condición.

Por otro lado, la pigmentación negra, puede estar implicada en generar costos diferenciales asociados a la frecuencia e intensidad de interacciones agonísticas entre machos; de modo que en individuos con mayor área alar melanizada la frecuencia de estas interacciones se ve disminuida (Anderson & Grether 2010a, 2010b; Drury & Grether, 2014). De acuerdo con esto Drury y colaboradores (2015a) sugieren que el polifenismo de los machos de *H. titia* es adaptativo, debido a que comprobaron que disminuye interacciones agonísticas con individuos de otras especies del mismo género, como *H. occisa*. Sin embargo, la interrogante reside en por qué no se expresa el fenotipo obscuro durante todo el año (Drury *et al.*, 2015a) y la respuesta podría estar relacionada con la existencia de costos asociados a su producción y expresión.

### *Justificación*

Las principales macromoléculas de las reservas de energía se utilizan diferencialmente para cumplir una variedad de funciones metabólicas (Suárez *et al.*, 2005, Arrese & Soulages 2010) en períodos de tiempo diferentes de la historia de vida de los insectos (Cunningham *et al.*, 2001; Matsubara & Suzuki, 2005). Nosotros planteamos que una mayor expresión de melanización es costosa en términos energéticos y por ello no se presenta el fenotipo obscuro de *H. titia* durante todo el año. Cuantificar las reservas energéticas de machos del fenotipo temprano y tardío de *H. titia* brindará información de la relación que tiene la melanización con la condición fisiológica de los individuos. Las reservas energéticas se han estimado en trabajos previos en libélulas del género *Hetaerina* (Contreras-Garduño *et al.*, 2006; González-Santoyo *et al.*, 2010, 2014), pero mediante métodos que no permiten la estimación de más de un componente

energético y que son menos precisos que el método de Foray y colaboradores (2012) el cual permite la determinación de cuatro componentes energéticos (lípidos, proteínas, carbohidratos libres y glucógeno) en un mismo individuo.

Este análisis también contribuirá a esclarecer si el polifenismo estacional de la especie es dependiente de la condición, lo cual podría ser un indicador indirecto de los costos implicados en la producción de la mancha negra. Aunado a esto, estimar las relaciones alométricas de ambas áreas pigmentadas en cada temporada, brindará información acerca de la modularidad e integración fenotípica de estos dos caracteres sexuales.

Aumentar experimentalmente el área alar melanizada de los machos, permitiría exagerar este rasgo y evaluar de una manera directa el impacto de la melanización en la supervivencia de los individuos. Cabe destacar que para estimar la supervivencia y longevidad de los individuos en vida silvestre hace falta una buena metodología, ya que, por ejemplo, Grether (1996) hizo un estudio donde estimó la longevidad de *H. americana* considerando el último día en que observó a cada individuo como su último día de vida. Debido a esta metodología puede ser que Grether haya subestimado los valores de supervivencia y longevidad de los individuos, ya que es posible que un individuo siga vivo a pesar de no ser detectado por el observador (Lebreton *et al.*, 1992). En este estudio, nosotros empleamos métodos de captura-recaptura que consideran la detectabilidad imperfecta (Lebreton *et al.*, 1992).

Por último, al evaluar los costos de la melanización alar, se pretende hacer un acercamiento a responder la interrogante: ¿Qué función está desempeñando esta melanización como carácter sexual secundario en las señales intra e interespecíficas de *H. titia*?

## Objetivos

### *Objetivo General*

- Evaluar los costos asociados a la producción y expresión de un carácter sexual secundario, el cual es el área alar melanizada de los machos de la libélula *Hetaerina titia*.

### *Objetivos Particulares*

- Evaluar la variabilidad en la expresión de la pigmentación alar de machos de *H. titia* en dos temporadas, estableciendo relaciones alométricas entre cada una de las áreas pigmentadas y el área alar total.
- Estimar la condición fisiológica respecto a la variación natural en la pigmentación alar de dos temporadas, mediante la cuantificación de las principales reservas energéticas (proteínas, lípidos, carbohidratos libres y glucógeno).
- Evaluar los costos de melanización alar realizando manipulaciones experimentales sobre machos en vida silvestre estimando la supervivencia de los machos controles y los experimentales.

## Capítulo I

### **Physiological condition and wing pigmentation expression in a damselfly with seasonal polyphenism**

Este capítulo se presenta en forma de artículo, el cual fue aceptado en la revista *Physiological Entomology* el 21 de mayo del 2017 y publicado el 10 de agosto del mismo año.

Castaños, C. E., Córdoba-Aguilar, A. and Munguía-Steyer, R. (2017) Physiological condition and wing pigmentation expression in a damselfly with seasonal polyphenism. *Physiological Entomology*. **42**, 346-354. doi:10.1111/phen.12203.

# Physiological condition and wing pigmentation expression in a damselfly with seasonal polyphenism

CLARA E. CASTAÑOS<sup>1</sup>, ALEX CÓRDOBA-AGUILAR<sup>2</sup>  
and ROBERTO MUNGUÍA-STEYER<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Unidad de Morfología y Función, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, Mexico and <sup>2</sup>Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

**Abstract.** Secondary sexual traits can be indicators of individual condition that may present seasonal polyphenism as a result of the differential costs of expression along the season. Wing spots in male damselflies of the Calopterygidae family are secondary sexual traits associated with intrasexual competition and mate choice. *Hetaerina titia* Drury is a calopterygid damselfly where males show red and black wing spots, contrasting with other species of the genus whose males only express a red wing spot. In the present study, we evaluate the seasonal variation of the expression of male's red and black wing spots and their allometric patterns. Additionally, we measure male condition in the form of proteins, lipids, soluble carbohydrates and glycogen in early and late seasons. Black wing spots present higher variation than red wing spots and males of the late season are more pigmented. Allometry is positive for wing red spot in the early season and for black spot in the late season. Males of the late season present a higher concentration of proteins, soluble carbohydrates and glycogen, although there is no variation in the lipid content. The results of the present study suggest that, in *H. titia* males, black pigmentation replaces the function of the red pigmentation to signal condition. Both traits, however, may be heavily affected by environmental situations (e.g. food availability).

**Key words.** Allometry, condition, *Hetaerina*, seasonal polyphenism, secondary sexual traits.

## Introduction

Sexual selection via mate choice and intrasexual competition are key factors explaining the evolution of secondary sexual characters, thereby generating patterns of sexual dimorphism (Andersson, 1994; Fairbairn, 2007). Theory indicates that the maintenance of these traits is based on the fact that they are costly to produce, which grants them being 'honest' indicators of individual condition (Zahavi, 1975). Recently, Warren *et al.* (2013) proposes a set of criteria to determine whether a secondary sexual character (SSC) is good indicator of condition: (i) higher inter-individual variation in expression compared with

nonsexual traits (Bergsten *et al.*, 2001); (ii) positive allometry (larger individuals will express disproportionately larger expression in SSC compared with non-SSC) (Green, 1992; Warton *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2013); and (iii) higher sensitivity of expression, with such sensitivity being associated with basic physiological functions (e.g. immunocompetence, growth or nutritional state) (Folstad & Karter, 1992; Gotoh *et al.*, 2011).

The calopterygid damselflies comprise a particularly good group in which to study sexual selection in the field. Males of this family usually present a conspicuous wing spot whose colour can be, in general, red or black, depending on the species (Córdoba-Aguilar & Cordero-Rivera, 2005; Svensson & Waller, 2013). More remarkable than colour, in some genera of the Calopterygidae family, such as *Calopteryx*, *Hetaerina* and *Mnais*, spot size shows large inter- and intraspecific variation (Hooper *et al.*, 1999; Anderson, & Grether 2010a, b; Outomuro *et al.*, 2014; Drury *et al.*, 2015a), with very consistent hyper-allometric patterns (Outomuro *et al.*, 2014) for which

Correspondence: Roberto Munguía-Steyer, Unidad de Morfología y Función, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios 1, 54090, Tlalnepantla, Estado de México, México. Tel.: +(52) 55 5623 0222 ext. 39837; e-mail: rmunguia.steyer@gmail.com

size is positively related to mating success (Córdoba-Aguilar & Cordero-Rivera, 2005; Córdoba-Aguilar & González-Tokman, 2014). Different sources indicate that these wing spots are 'honest', condition-dependent traits because individuals with a larger expression of spots survive for longer (Grether, 1997; González-Santoyo *et al.*, 2014) and respond more strongly to immune challenges (Siva-Jothy, 2000; Rantala *et al.*, 2000; Koskimäki *et al.*, 2004; Contreras-Garduño *et al.*, 2006, 2007) and diet stress (Álvarez *et al.*, 2013) than males with smaller wing spots.

Two representative genera in Calopterygidae are *Calopteryx* and *Hetaerina*, in which males show black and red spots, respectively. Interestingly, within *Hetaerina*, only *Hetaerina titia* Drury males express two spots with the colours of both genera: a small red spot on the forewing basis surrounded by a black spot (Córdoba-Aguilar *et al.*, 2007). The expression of both wing spots can be explained as a multicomponent signal that is either redundant or complementary, indicating different aspects of condition (Møller & Pomiankowski, 1993; Rowe, 1999; Hebets & Papaj, 2005). So far, however, it is unclear whether redundancy or complementarity is the role played by both *H. titia* spot traits, and an initial approach aiming to unravel this analyzes their expression patterns in accordance with the three criteria of Warren *et al.* (2013), as indicated above. Currently, we are only aware that males with a larger red spot present a higher immune response, which is not the case for the black spot, where the result may be confounded by seasonality (González-Santoyo *et al.*, 2010; Córdoba-Aguilar *et al.*, 2007); the presence of a red spot may be used for intraspecific sex recognition (Grether *et al.*, 2015); and the size of a black spot correlates positively with longevity using, as a proxy, the last day that the individual is detected in the field (Córdoba-Aguilar *et al.*, 2007).

One interesting phenotypic change in *H. titia* is that males show a seasonal polyphenism where wing melanization covaries during the year (Drury *et al.*, 2015a). Males emerging during autumn and winter (November to March) show little or even absent black pigment on the forewings and a small black area on the hindwing basis, contrasting with males emerging in the spring and summer, which show more melanized wings (Córdoba-Aguilar *et al.*, 2007; González-Santoyo *et al.*, 2010; Drury *et al.*, 2015a). Variation in the wing melanized area serves to categorize males as early and late season phenotypes (Drury *et al.*, 2015a).

Similar to other calopterygids, wing black pigmentation in *H. titia* is likely explained by a melanic pigment whose production is also shared by a melanic-based immune response (González-Santoyo *et al.*, 2010). Given this correlation, one current hypothesis is that there could be a trade-off in resource allocation between wing spot melanization and immune response (Siva-Jothy, 2000). Accordingly, wing melanization could be a costly signal associated with a physiological mechanism in a similar fashion to that proposed by Warren *et al.* (2013) for a secondary sexual character.

An increase in wing melanization area in males emerging during the season could be related to a decrease in the frequency and intensity of male–male agonistic interactions (Anderson & Grether, 2010a, b; Drury & Grether, 2014). According to this,

seasonal polyphenism in male pigmentation could be adaptive because it reduces the agonistic and reproductive interference between heterospecifics (Drury *et al.*, 2015a). Individuals with blackened wing patterns tend to show fewer agonistic interspecific interactions with males of *Hetaerina occisa* in the early and late seasons, with the decrease being higher in the late season (Drury *et al.*, 2015a). Drury *et al.* (2015a) question why *H. titia* males do not present the dark wing phenotype throughout the year, and one proposed explanation is the costly energetic budget that these insects have to face at different times of the year.

Energetic reserves are accumulated by feeding during the larval and adult stages (Mirth & Riddiford, 2007; Arrese & Soulages, 2010; Jiménez-Cortés *et al.*, 2012). These reserves are critical for calopterygid males because they engage in aerial contests to defend territories against other males (Córdoba-Aguilar & Cordero-Rivera, 2005). The outcome of these contests frequently depends on the amount of reserves that the resident and intruder male each have available (Contreras-Garduño *et al.*, 2006).

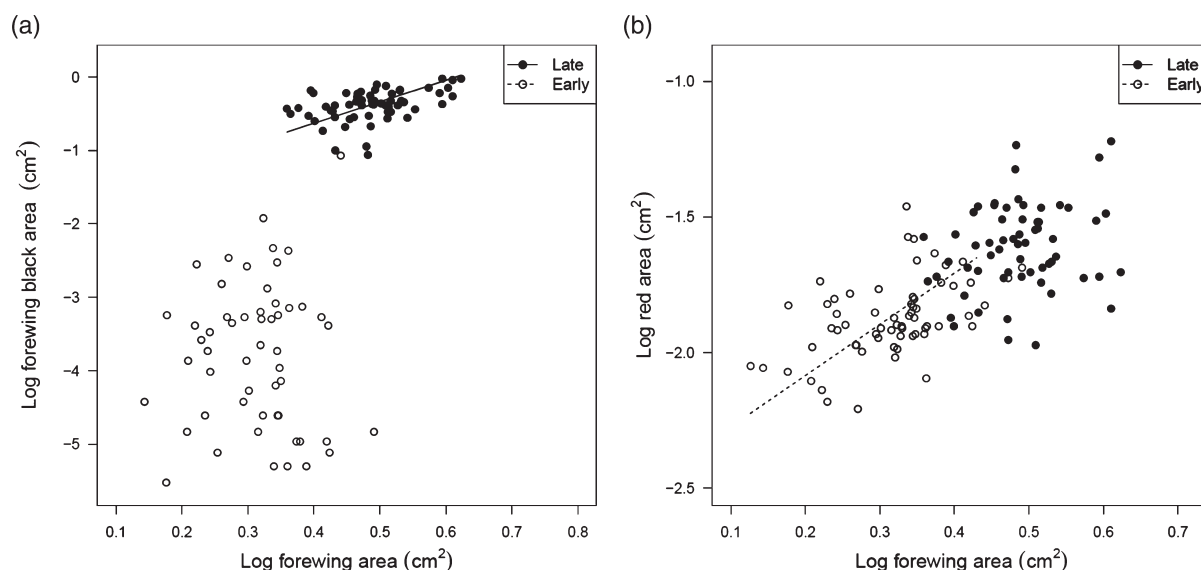
The principal macromolecules of energy reserves are used differentially to fulfill a variety of metabolic functions (Suarez *et al.*, 2005; Arrese & Soulages, 2010) at dissimilar time periods of the insect life history (Cunningham *et al.*, 2001; Matsubara *et al.*, 2005). Energy is stored as carbohydrates for short-term use (as an immediate source of energy for metabolism and activity) and typical carbohydrate reserves are glucose, trehalose and glycogen, the polymeric glucose form that can be readily degraded and used as fuel (Steele, 1982; Klowden, 2002). Lipids (e.g. triglycerides) are long-term energy stores (Klowden, 2002), which, along with proteins, represent energetic capability sources in insects and their concentration can be interpreted as a physiological indicator of condition (Jacot *et al.*, 2005; Jiménez-Cortés *et al.*, 2012).

To date, no studies have investigated the relationship between the predominant phenotypes of the two seasons and the physiological condition of these individuals. This information could help to further our understanding of the evolutionary–ecological role of this polyphenism. Quantifying the energetic reserves of early and late male phenotypes of *H. titia* will allow an estimation of the relationship between melanization and physiological condition. In the present study, we characterize the allometric relationships of black and red spots and their associated energetic reserves in *H. titia* individuals of the early and late seasons to test whether seasonal phenotypes are condition-dependent *sensu* the criteria of Warren *et al.* (2013). This test is used also to evaluate the evolutionary maintenance of both spot traits.

## Materials and methods

### Study site

The present study was conducted in a tropical rainforest at La Palma river (18°33'N, 95°03'W) near Los Tuxtlas Biological Station (Universidad Nacional Autónoma de México), Veracruz, México. At the study site, *H. titia* occurs in sympatry with



**Fig. 1.** Male allometric analysis of the pigmented areas by season. (a) Allometry of black wing spot area in relation to the total forewing area in the late season. (b) Allometry of red wing spot area in relation to the total forewing area in the early season.

**Table 1.** Allometric coefficients of male black and red wing spots in both seasons.

Wing spot	Season	Intercept	Slope	Slope 95% CI	<i>P</i>
Black	Early	0.71	-14.30	-18.98 to -10.78	0.095
Black	Late	-1.80	2.92	2.24–3.82	<0.001
Red	Early	-2.46	1.87	1.41–2.51	0.001
Red	Late	-2.83	2.52	1.87–3.39	0.086

CI, confidence interval.

**Table 2.** Multiple analysis of covariance relating energetic reserves black and red wing areas as response variables to season, wing area and their interaction as predictors.

Predictors	d.f.	Wilk's $\lambda$	<i>F</i>	<i>P</i>
Season	1	0.039	462.530	<0.001
Wing area	1	0.552	15.450	<0.001
Season $\times$ Wing area	1	0.863	3.010	0.009
Residuals	119			

*H. occisa* (Anderson & Grether, 2010a, b; Drury *et al.*, 2015a). During every visit, we collected males in the margins of the stream with entomological nets. We collected 64 male individuals of the early season phenotype in two visits: one from 17 to 22 November 2015 ( $n = 44$ ) and another from 4 to 6 March 2016 ( $n = 20$ ).

Organisms of the late emergence season were collected in another single visit that took place during 1–4 June 2016 ( $n = 61$ ). Determination of early and late season phenotypes is in accordance with the dates employed in previous studies conducted in the same population (González-Santoyo *et al.*, 2010; Drury *et al.*, 2015a). Phenotypic patterns can be discriminated between seasons because it is very unlikely that we would find

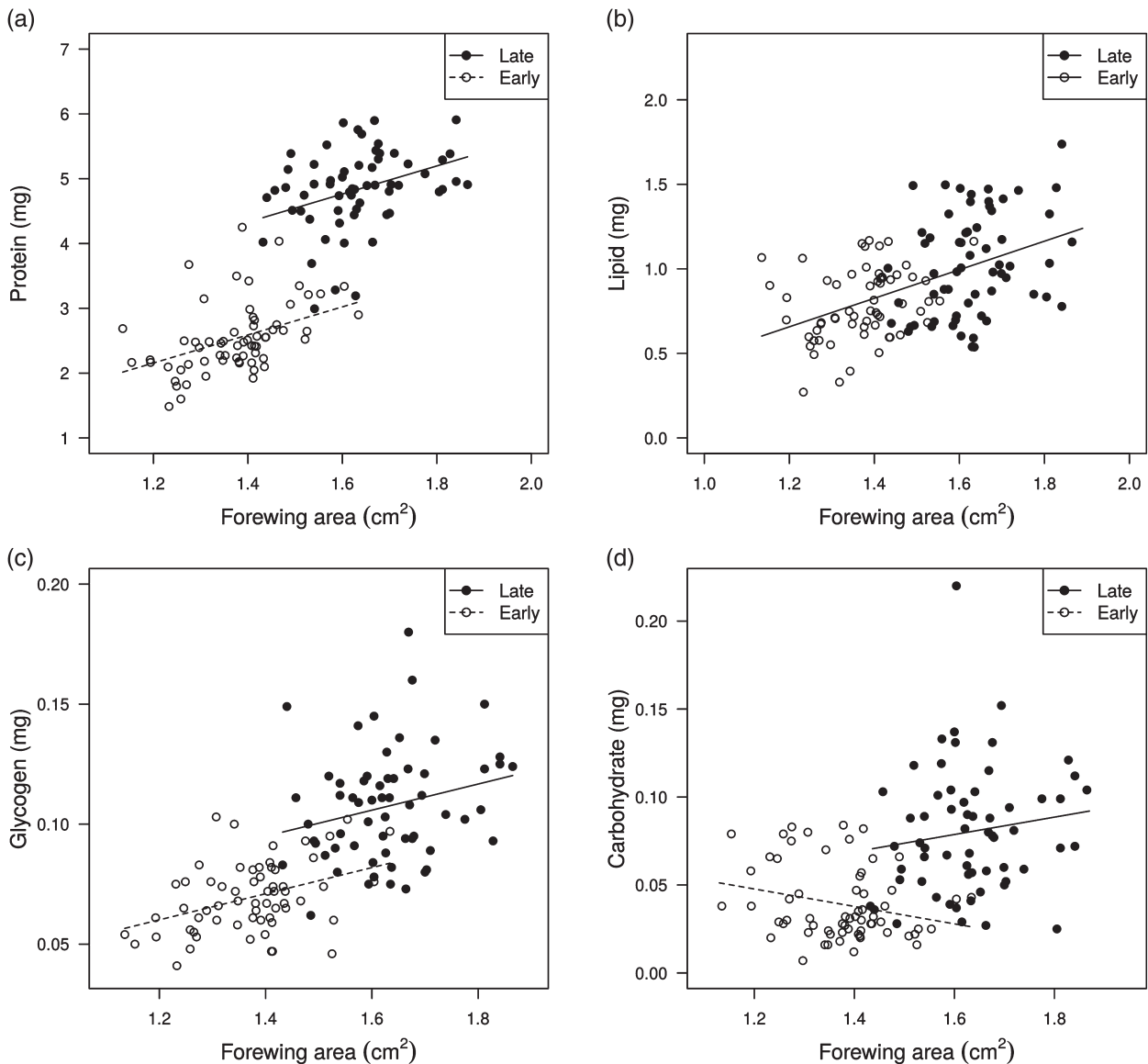
individuals that emerged in the early season still alive in our visit in the late season, considering the daily survival probabilities reported for calopterygids (Cordero-Rivera & Stoks, 2008) and the 87-day interval elapsed between the early and late season visits.

It is essential to take age into account when looking at physiological condition in adult calopterygid damselflies because condition-reflecting traits covary tremendously with ontogeny (Hooper *et al.*, 1999). Therefore, and in accordance with the age criteria established by Plaistow & Siva-Jothy (1996), we collected and worked only with young adult sexually mature males. Animals at this age have shiny, fully-fixed body colours, transparent wings and no signs of pruinosity.

#### Measurement of morphological variables

After male capture, each individual was placed in a dorsal position with their wings completely separated and flattened over a Petri dish next to a millimeter grid paper that served as a scale. Wings were held still by placing a glass slide on them, so that they were parallel to the camera lens. Subsequently, we took images of each male using a camera (DSLR Rebel T3i; Canon, Japan) mounted on a tripod. We measured morphological variables from the derived image using IMAGEJ (NIH, Bethesda, Maryland) (Abràmoff *et al.*, 2004): red and black wing spot area and right forewing area as a proxy of body size. Wing area is confirmed to be a good indicator of body size and is highly correlated with total length (Hardersen, 2010; Sacchi & Hardersen, 2012; Outomuro *et al.*, 2014; Bello-Bedoy *et al.*, 2015). Additionally, we measured the morphometric variables of 15 randomly chosen individuals twice and estimated measurement error (Bailey & Byrnes, 1990). Measurement errors were fairly low for all morphometric variables: forewing area = 0.66%; red spot area = 3.32%; and black forewing spot area = 0.20%.





**Fig. 2.** General linear models showing the relation between each energetic reserve and the predictors season and size (forewing area) and their interactions. Some models are simpler because they presented a lower Akaike information criterion than the global model. (a) Relationship between protein and wing area by season. (b) Relationship between lipids and wing area. (c) Relationship between glycogen and wing area by season. (d) Relationship between carbohydrates and wing area by season.

#### Quantification of energy reserves

Organisms collected in the field were transported to the laboratory at 0°C and then promptly stored at -80°C until energy reserves analyses were conducted. To determine energy reserves, we used the unified method of Foray *et al.* (2012). This methodology allows an estimation of the energy stored in the four main energetic components: proteins, total lipids, free sugars and glycogen in single individuals. In short, different assay solvents are successively employed to extract the desired components sequentially, which are then quantified using specific colorimetric techniques.

**Table 3.** Protein content in males according to season and wing area.

Predictors	d.f.	Protein content			
		Sum of squares	Mean squares	<i>F</i>	<i>P</i>
Season	1	165.095	165.095	574.57	<0.001
Wing area	1	6.132	6.132	21.34	<0.001
Residuals	122	35.055	0.287		

More precisely, all males collected from both seasons were crushed individually in a 2-mL Eppendorf tube by shaking each individual for 1 min at 27 Hz (Tissue Lyser-II; Qiagen,

**Table 4.** Lipid content in males according to wing area.

Lipid content					
Predictors	d.f.	Sum of squares	Mean squares	<i>F</i>	<i>P</i>
Wing area	1	2.405	2.405	38.692	<0.001
Residuals	123	7.646	0.061		

**Table 5.** Glycogen content in males according to season and wing area.

Glycogen content					
Predictors	d.f.	Sum of squares	Mean squares	<i>F</i>	<i>P</i>
Season	1	0.045	0.045	128.224	<0.001
Wing area	1	0.004	0.004	11.005	0.001
Residuals	120	0.042	<0.001		

**Table 6.** Carbohydrate content in males according to season, wing area and their interaction.

Carbohydrate content					
Predictors	d.f.	Sum of squares	Mean squares	<i>F</i>	<i>P</i>
Season	1	0.0528	0.0528	63.059	<0.001
Wing area	1	<0.001	<0.001	0.002	0.966
Season × Wing area	1	0.003	0.003	3.814	0.053
Residuals	121	0.101	<0.001		

Valancia, California) with 1 mL of aqueous lysis buffer solution (100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM dithiothreitol and 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid) and two steel beads. After the proteins were solubilized in the phosphate lysis-buffer they were quantified with the classical Bradford procedure (Bradford, 1976). Bovine serum albumin was used as the standard and absorbance was determined at 590 nm.

Lipids, free sugars and glycogen, were assayed in accordance with the method of Van Handel & Day (1988). Total lipid amount was determined in accordance with the vanillin assay procedure using triolein as standard (Van Handel, 1985) and absorbance was measured at 540 nm. Protein and lipid absorbance measurements were made using an absorbance reader (Absorbance Reader ELx808; BioTek). Total carbohydrates were determined using a colorimetric methodology based on anthrone reagent with D-glucose as the standard and the absorbance of the samples was read at 630 nm (Absorbance Reader ELx800; BioTek Inc., Winooski, Vermont). All absorbance measurements were made in 96-well polystyrene microplates.

### Statistical analysis

We compared male size (wing area) and black and red wing spots between seasons by performing *t*-tests with a Welch's correction that deals with heterogeneity of variance between groups. We also estimated allometric coefficients between black and red pigmented wing areas and total wing area for both

seasons with standardized major axis regressions using robust fitting methods that are insensitive to outliers (Warton *et al.*, 2006, 2012). Additionally, we estimated the coefficients of variation (CV) of male size, black and red wing spots between seasons and we performed Bartlett's tests to determine whether variance differed between seasons in these characters. We performed a multiple analysis of covariance to determine whether individuals of different seasons and wing area and their interaction (predictors) differed in morphological attributes (red and black spot areas) and energetic reserves: soluble carbohydrates, glycogen, lipids and proteins. Wilk's lambda tests were used to assess the significance of predictors. Also, we carried out univariate analyses of covariance with each response variable. We performed model selection in each case, keeping the minimal adequate model based on Akaike information criterion values (Johnson & Omland, 2004).

All statistical analyses were performed using R, version 3.1.2 (R Core Team, 2016), with the 'lme4' package to calculate the percentage measurement error (Bates *et al.*, 2015) and the 'smatr' package for allometry analyses to calculate the allometric coefficients (Warton *et al.*, 2012). Additionally, we used the 'effects' (Fox, 2003) package to calculate the model's predicted values.

## Results

### Body size, wing spots and seasonality

Individuals presented a smaller wing area in the early season (mean ± SD:  $1.37 \pm 0.103 \text{ cm}^2$ ) than in the late season (mean ± SD:  $1.63 \pm 0.103 \text{ cm}^2$ ;  $t = -13.95$ , d.f. = 122.65,  $P < 0.001$ ). CV of wing area of males in the early season was higher (0.075) than in the late season (0.063), although there was no heterogeneity of variance between groups (Bartlett's test,  $P = 0.9689$ ).

Males presented smaller red spots in the early (mean ± SD:  $0.155 \pm 0.023 \text{ cm}^2$ ) than in the late season (mean ± SD:  $0.200 \pm 0.039 \text{ cm}^2$ ) ( $t = -7.73$ , d.f. = 96.4,  $P < 0.001$ ). Black spots were much smaller in the early (mean ± SD:  $0.239 \pm 0.130 \text{ cm}^2$ ) than in the late season (mean ± SD:  $2.35 \pm 0.289 \text{ cm}^2$ ) ( $t = -35.71$ , d.f. = 74.48,  $P < 0.001$ ). Ten males of the early season did not present melanization in their forewings and were not included in the allometric analyses of black spots. CVs were higher in the early season for black spots and lower in the late season compared with red spots and there was heterogeneity of variances for both spots between seasons (CV black spots: early season = 0.545, late season = 0.123, Bartlett's test,  $P < 0.001$ ; CV red spots: early season = 0.148, late season = 0.195; Bartlett's test,  $P = 0.003$ ).

### Allometry of wing spots and seasonality

The allometry between the complete black pigmented area and wing area was significant and positive only for the late season (Fig. 1a and Table 1). The slope value of the allometric coefficient was 2.92, with 95% confidence intervals higher than

1 (Table 1). The allometry of the red spot area and forewing area was positive and significant for the early season (Fig. 1b and Table 1). The allometric coefficient was 1.787, with confidence intervals higher than 1 (Table 1).

#### Energy reserves and seasonality

Early and late individuals differed in energetic reserves and wing pigmentation including size as a covariate (Table 2). The content of protein was higher for males of the early season than for those of the late season, and larger males presented more protein in both seasons (Fig. 2a and Table 3). There was no significant difference in lipid content between seasons but males with a larger forewing area had higher lipid content (Fig. 2b and Table 4). Larger males presented more glycogen for both seasons and the content of this component was lower for males of the early season (Fig. 2c and Table 5). Finally, for carbohydrate analysis, there was a relationship with wing area (Fig. 2d and Table 6), although it varied according to season. For the early season, we observed a negative relation, which became positive in the late season (Fig. 2d).

#### Discussion

Individuals of the late season are larger, present more energetic reserves and are more pigmented than males of the early season. When comparing males of early and late seasons, the variation for black wing spots is larger than for red wing spots. Furthermore, early season males show a higher variation in black spot than in the red spot. In general and despite the fact that our study is correlational, this variation in morphometry and physiological condition could reflect a cost of producing the pigment as a result of environmental differences along seasons.

Seasonality could have an impact on ecological factors such as resource availability, as is observed in other species of damselflies (Hooper *et al.*, 1999; Dmitriew & Rowe, 2005; Hardersen, 2010; Álvarez *et al.*, 2013). Accordingly, perhaps when food resources are scarce during larval development, the wing pigmented areas show a reduced size, as is documented in *Hetaerina americana* (Jiménez-Cortés *et al.*, 2012; Álvarez *et al.*, 2013). By contrast, if the food source is not a limiting factor (as could be in the late season), all individuals will express a minimal pigmented area and the variation in phenotypic variation among individuals would decrease at this moment. A related case is that of butterflies also showing wing melanization. When butterfly larvae are fed with a diet of lower quality, they end up becoming less melanized as adults compared with control larvae (Talloon *et al.*, 2004), suggesting that melanine synthesis is costly and that environmental quality variation can induce phenotypic shift in wing melanization. Resource availability between seasons is not measured directly in the present study, although adults of the late season are active in summer when reproductive activity is high. The fact that reproductive peaks and insect abundance are usually associated with availability of food resources (Wolda, 1988) suggests

an environmental-mediated, diet role for wing melanization variation in *H. titia*.

The cost of producing the black wing spot is also evident when analyzing allometric patterns of red and black wing spots along the early and late seasons. In the late season, when males present higher energetic reserves, the relationship between black spot and wing area is hyperallometric, which is in contrast to a lack of relationship in early season males. This suggests that the wing melanization patterns along seasons could be indicative of male condition. Surprisingly, red pigmentation is hyperallometric in the early season but not significant in the late season. This could indicate that red and black pigmentation expression are complementary but not redundant signals (Rowe, 1999).

We find a significantly higher content of carbohydrates (soluble carbohydrates and glycogen) in males of the late season. Carbohydrates are known to be heavily involved in sustaining flight in different insect orders (Rowan & Newsholme, 1979; Beenackers *et al.*, 1984; Suarez *et al.*, 2005). This can explain the negative correlation between carbohydrate content and wing area for males of the early season (Fig. 2c) because flight is costlier for heavier animals during this time. Furthermore, carbohydrates are a short-term energy resource and the first to be depleted (Klowden, 2002). Given these relationships, we hypothesize that carbohydrates could be an honest signal of condition for *H. titia* males during the early season. Accordingly, the present study and the findings obtained with carbohydrates should be replicated using a manipulative experimental protocol in both *H. titia* and other calopterygids, subjecting individuals of different sizes to different levels of flying activity and food stress.

Lipid reserves do not show higher values in the late season, although they do so for protein content (Fig. 2a). Proteins are essential for development, adult tissue construction, ontogenesis and reproduction (Burmester, 1999; Petersen *et al.*, 2000). Given their important role on larval development, a lack of protein in the early season would likely impact the corresponding adult phenotype of that season in the form of a smaller body length and the size of the black spot.

The higher energy content and lower coefficients found for the late season for most of the reserves measured may be another indicator that individuals of the late season are in a better condition than those in the early season. We have not estimated the mating success of males along the season but, in damselflies, generally, reproductive activity is higher in summer when the food resources are higher and day length is higher (Córdoba-Aguilar, 2008; McPeck, 2008). This is relevant because a deficient physiological condition limits reproduction, abundance and population growth rates (Bauerfeind & Fischer, 2005; McPeck, 2008; Dmitriew, & Rowe, 2011).

Within the *Hetaerina* genus, the red spot is the basal character, whereas the black spot is a derived character (Svensson & Waller, 2013; Drury *et al.*, 2015b). Contreras-Garduño *et al.* (2006, 2007) hypothesize that the red spot was initially favoured via intrasexual competition, although it is still unclear which process favoured the evolution of black melanization in *H. titia*. Drury *et al.* (2015a) suggest that the seasonal polyphenism generates differential levels of interspecific aggression between *H. titia* and other sympatric species of the same genus. More

pigmented males suffer less aggression, whereas more pigmented females experience fewer attempts of copulations by heterospecific males.

Variation in the expression of both pigments and higher differences in the allometric coefficients between individuals of the early and late seasons indicate that, in this species, black is more costly and more variable than red wing spots, such that black pigmentation could be a more reliable signal of condition. Furthermore, black pigmentation is metabolically connected with the insect immune system (González-Santoyo & Córdoba-Aguilar, 2012). This could reflect a trade-off between the immune response and black spot expression and so black extension may signal immune ability (Rantala *et al.*, 2000; González-Santoyo & Córdoba-Aguilar, 2012). Also, black pigmentation presents a high variability in expression between individuals that is susceptible to seasonality (Córdoba-Aguilar *et al.*, 2007; Drury *et al.*, 2015a). Melanization expression could also be modulated by thermoregulation (Svensson & Waller, 2013). However, this occurs especially in damselfly species of temperate regions with cooler climates (Outomuro & Ocharan, 2011); this is not the case for the population in the present study, which is located in a rainforest tropical region (for a similar case in other semi-tropical *Hetaerina* and a rejection of the thermoregulation hypothesis for pigmentation, see Rivas *et al.*, 2016).

One key question is why the red spot is preserved when the black spot appears to be a better indicator of condition in *H. titia*. One idea is that the red spot is maintained because it decreases reproductive interference between *Hetaerina* homo and heterospecifics living in sympatry (Grether *et al.*, 2015). When females are experimentally manipulated and painted with red spots in their wings, males engage less in mating attempts and more in agonistic encounters (Grether *et al.*, 2015). Additionally, in the early season, when melanine is low or absent in male wings, red spot pigmentation could still signal condition when resources are scarce. Finally, red pigmentation in calopterygids comprises ommochromes (Futahashi, 2016) and these pigments are involved in a mechanism that disposes toxic concentrations of tryptophane during adult emergence (Shamim *et al.*, 2014). This mechanism may be used by *H. titia* males to avoid intoxicating tryptophane levels.

A behavioural difference is reported in the two phenotypes of *H. titia* (Drury *et al.*, 2015a; Grether *et al.*, 2015) and, in the present study, we find physiological differences as indicated by different amounts of energetic reserves. We argue that these differences between seasons are given by the environment and resource availability. Experimental studies show that, in calopterygid damselflies, wing spot expression can be constrained by environmental stress factors such as food limitation or immunological challenges (Córdoba-Aguilar *et al.*, 2009; Jiménez-Cortés *et al.*, 2012, Álvarez *et al.*, 2013).

In conclusion, our data suggest that, even if melanized individuals of *H. titia* suffer less interspecific aggression (Drury *et al.*, 2015a), males with smaller energetic budgets could not express dark wings throughout the year, giving rise to seasonal polyphenism patterns. Black pigmentation in *H. titia* would be then a condition-dependent trait that, as proposed by Córdoba-Aguilar *et al.* (2007), has replaced the red wing

spot signal present in all males of the genus as an indicator of condition.

## Acknowledgements

We thank the individuals who provided help in the field: Martín Olvera-Hernández, Adolfo Chavarría-Yáñez, David Schneider and Jhony Enríquez-Vara. Our gratitude is extended to the staff of the Estación Biológica de los Tuxtlas, UNAM. This present study was supported financially by a UNAM research grant provided to RM-S (PAPIIT: IA204315) and AC-A (PAPIIT: IN203115). The study constitutes a partial requirement for obtaining a master's degree by the Graduate Program in Biological Sciences (Posgrado en Ciencias Biológicas) in evolutionary biology of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) for Clara Elisa Castaños. The authors declare that they have no conflicts of interest.

## References

- Abràmoff, M.D., Magalhães, P.J. & Ram, S.J. (2004) Image processing with Image J. *Biophotonics International*, **11**, 36–42.
- Álvarez, H.A., Serrano-Meneses, M.A., Reyes-Márquez, I. *et al.* (2013) Allometry of a sexual trait in relation to diet experience and alternative mating tactics in two rubyspot damselflies (Calopterygidae: *Hetaerina*). *Biological Journal of the Linnean Society*, **108**, 521–533.
- Anderson, C.N. & Grether, G.F. (2010a) Interspecific aggression and character displacement of competitor recognition in *Hetaerina* damselflies. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **277**, 549–555.
- Anderson, C.N. & Grether, G.F. (2010b) Character displacement in the fighting colours of *Hetaerina* damselflies. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **277**, 3669–3675.
- Andersson, M.B. (1994) *Sexual Selection*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Arrese, E.L. & Soulages, J.L. (2010) Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, **55**, 207–225.
- Bailey, R.C. & Byrnes, J. (1990) A new, old method for assessing measurement error in both univariate and multivariate morphometric studies. *Systematic Biology*, **39**, 124–130.
- Bauerfeind, S.S. & Fischer, K. (2005) Effects of food stress and density in different life stages on reproduction in a butterfly. *Oikos*, **111**, 514–524.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. & Walker, S. (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, **67**, 1–48.
- Beenackers, A.T., Van der Horst, D.J. & Van Marrewijk, W.J.A. (1984) Insect flight muscle metabolism. *Insect Biochemistry*, **14**, 243–260.
- Bello-Bedoy, R., González-Santoyo, I., Serrano-Meneses, M.A. *et al.* (2015) Is allometry of sexual traits adaptive? A field test with territorial damselflies. *Biological Journal of the Linnean Society*, **114**, 327–334.
- Bergsten, J., Töyrä, A. & Nilsson, A.N. (2001) Intraspecific variation and intersexual correlation in secondary sexual characters of three diving beetles (Coleoptera: Dytiscidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **73**, 221–232.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248–254.

- Burmester, T. (1999) Evolution and function of the insect hexamerins. *European Journal of Entomology*, **96**, 213–226.
- Contreras-Garduño, J., Canales-Lazcano, J. & Córdoba-Aguilar, A. (2006) Wing pigmentation, immune ability, fat reserves and territorial status in males of the rubyspot damselfly, *Hetaerina americana*. *Journal of Ethology*, **24**, 165–173.
- Contreras-Garduño, J., Lanz-Mendoza, H. & Córdoba-Aguilar, A. (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.
- Cordero-Rivera, A. & Stoks, R. (2008) Mark-recapture studies and demography. *Dragonflies and Damselflies: Model Organisms for Ecological and Evolutionary Research* (ed. by A. Córdoba-Aguilar), pp. 7–20. Oxford University Press, U.K.
- Córdoba-Aguilar, A. (2008) Seasonal variation in genital and body size, sperm displacement ability, female mating rate, and male harassment in two calopterygid damselflies (Odonata: Calopterygidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **96**, 815–829.
- Córdoba-Aguilar, A. & Cordero-Rivera, A. (2005) Evolution and ecology of Calopterygidae (Zygoptera: Odonata): status of knowledge and research perspectives. *Neotropical Entomology*, **34**, 861–879.
- Córdoba-Aguilar, A. & González-Tokman, D.M. (2014) The behavioral and physiological ecology of adult rubyspot damselflies (Hetaerina, Calopterygidae, Odonata). *Advances in the Study of Behavior*, **46**, 311–341.
- Córdoba-Aguilar, A., Leshner-Trevino, A.C. & Anderson, C.N. (2007) Sexual selection in *Hetaerina titia* males: a possible key species to understand the evolution of pigmentation in calopterygid damselflies (Odonata: Zygoptera). *Behaviour*, **144**, 931–952.
- Córdoba-Aguilar, A., Jiménez-Cortés, J.G. & Lanz-Mendoza, H. (2009) Seasonal variation in ornament expression, body size, energetic reserves, immune response, and survival in males of a territorial insect. *Ecological Entomology*, **34**, 228–239.
- Cunningham, M., Gonzalez, A., Dreon, M. *et al.* (2001) Lipid and protein composition at different developmental stages of *Pediculus capitis* (Arthropoda, Phthiraptera). *Journal of Parasitology*, **87**, 1251–1254.
- Dmitriew, C. & Rowe, L. (2005) Resource limitation, predation risk and compensatory growth in a damselfly. *Oecologia*, **142**, 150–154.
- Dmitriew, C. & Rowe, L. (2011) The effects of larval nutrition on reproductive performance in a food-limited adult environment. *PLoS ONE*, **6**, e17399.
- Drury, J.P. & Grether, G.F. (2014) Interspecific aggression, not interspecific mating, drives character displacement in the wing coloration of male rubyspot damselflies (*Hetaerina*). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **281**, 20141737.
- Drury, J.P., Anderson, C.N. & Grether, G.F. (2015a) Seasonal polyphenism in wing coloration affects species recognition in rubyspot damselflies (*Hetaerina spp.*). *Journal of Evolutionary Biology*, **28**, 1439–1452.
- Drury, J.P., Okamoto, K.W., Anderson, C.N. & Grether, G.F. (2015b) Reproductive interference explains persistence of aggression between species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **282**, 20142256.
- Fairbairn, D.J. (2007) Introduction: the enigma of sexual dimorphism. *Sex, Size and Gender Roles: Evolutionary Studies of Sexual Size Dimorphism* (ed. by D.J. Fairbairn, W.U. Blanckenhorn and T. Székely), pp. 1–12. Oxford University Press, U.K.
- Folstad, I. & Karter, A.J. (1992) Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. *The American Naturalist*, **139**, 603–622.
- Foray, V., Pelisson, P.P., Bel, V.M. *et al.* (2012) A handbook for uncovering the complete energetic budget in insects: the van Handel's method (1985) revisited. *Physiological Entomology*, **37**, 295–302.
- Fox, J. (2003) Effect displays in R for generalized linear models. *Journal of Statistical Software*, **8**, 1–27.
- Futahashi, R. (2016) Color vision and color formation in dragonflies. *Current Opinion in Insect Science*, **17**, 32–39.
- González-Santoyo, I. & Córdoba-Aguilar, A. (2012) Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **142**, 1–16.
- González-Santoyo, I., Córdoba-Aguilar, A., González-Manato, D.M. & Lanz-Mendoza, H. (2010) Phenoloxidase activity and melanization do not always covary with sexual trait expression in *Hetaerina* damselflies (Insecta: Calopterygidae). *Behaviour*, **147**, 1285–1307.
- González-Santoyo, I., González-Tokman, D.M., Munguía-Steyer, R.E. & Córdoba-Aguilar, A. (2014) A mismatch between the perceived fighting signal and fighting ability reveals survival and physiological costs for bearers. *PLoS ONE*, **9**, e84571.
- Gotoh, H., Cornette, R., Koshikawa, S. *et al.* (2011) Juvenile hormone regulates extreme mandible growth in male stag beetles. *PLoS ONE*, **6**, 1–5.
- Green, A.J. (1992) Positive allometry is likely with mate choice, competitive display and other functions. *Animal Behaviour*, **43**, 170–172.
- Grether, G.F. (1997) Survival cost of an intrasexually selected ornament in a damselfly. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, **264**, 207–210.
- Grether, G.F., Drury, J.P., Berlin, E. & Anderson, C.N. (2015) The role of wing coloration in sex recognition and competitor recognition in rubyspot damselflies (*Hetaerina spp.*). *Ethology*, **121**, 674–685.
- Hardersen, S. (2010) Seasonal variation of wing spot allometry in *Calopteryx splendens* (Odonata Calopterygidae). *Ethology Ecology and Evolution*, **22**, 365–373.
- Hebets, E.A. & Papaj, D.R. (2005) Complex signal function: developing a framework of testable hypotheses. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **57**, 197–214.
- Hooper, R.E., Tsubaki, Y. & Siva-Jothy, M.T. (1999) Expression of a costly, plastic secondary sexual trait is correlated with age and condition in a damselfly with two male morphs. *Physiological Entomology*, **24**, 364–369.
- Jacot, A., Scheuber, H., Kurtz, J. & Brinkhof, M.W. (2005) Juvenile immune system activation induces a costly up regulation of adult immunity in field crickets *Gryllus campestris*. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, **272**, 63–69.
- Jiménez-Cortés, J.G., Serrano-Meneses, M.A. & Córdoba-Aguilar, A. (2012) The effects of food shortage during larval development on adult body size, body mass, physiology and developmental time in a tropical damselfly. *Journal of Insect Physiology*, **58**, 318–326.
- Johnson, J.B. & Omland, K.S. (2004) Model selection in ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, **19**, 101–108.
- Klowden, M.J. (2002) *Physiological Systems in Insects*. Academic Press, New York, New York.
- Koskimäki, J., Rantala, M.J., Taskinen, J. *et al.* (2004) Immunocompetence and resource holding potential in the damselfly, *Calopteryx virgo* L. *Behavioral Ecology*, **15**, 169–173.
- Matsubara, K., Tojo, S. & Suzuki, N. (2005) Age-related changes in flight muscle mass, lipid reserves and flight capacity during adult maturation in males of the territorial damselfly *Calopteryx atrata* (Odonata: Calopterygidae). *Zoological Science*, **22**, 587–592.
- McPeck, M.A. (2008) Ecological factors limiting the distributions and abundances of Odonata. *Dragonflies and Damselflies: Model Organisms for Ecological and Evolutionary Research* (ed. by A. Córdoba-Aguilar), pp. 51–62. Oxford University Press, U.K.
- Mirth, C.K. & Riddiford, L.M. (2007) Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. *BioEssays*, **29**, 344–355.

- Møller, A.P. & Pomiankowski, A. (1993) Why have birds got multiple sexual ornaments? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **32**, 167–176.
- Outomuro, D., Cordero-Rivera, A., Nava-Bolaños, A. & Córdoba-Aguilar, A. (2014) Does allometry of a sexually selected ornamental trait vary with sexual selection intensity? A multispecies test in damselflies. *Ecological Entomology*, **39**, 399–403.
- Outomuro, D. & Ocharan, F.J. (2011) Wing pigmentation in *Calopteryx* damselflies: a role in thermoregulation? *Biological Journal of the Linnean Society*, **103**, 36–44.
- Plaistow, S. & Siva-Jothy, M.T. (1996) Energetic constraints and male mate-securing tactics in the damselfly *Calopteryx splendens xanthostoma* (Charpentier). *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, **263**, 1233–1239.
- Petersen, C.R., Woods, H.A. & Kingsolver, J.O. (2000) Stage-specific effects of temperature and dietary protein on growth and survival of *Manduca sexta* caterpillars. *Physiological Entomology*, **25**, 35–40.
- R Core Team (2016) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Austria.
- Rantala, M.J., Koskimäki, J., Taskinen, J. et al. (2000) Immunocompetence, developmental stability and wingspot size in the damselfly *Calopteryx splendens* L. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, **267**, 2453–2457.
- Rivas, M., Martínez-Meyer, E., Muñoz, J. & Córdoba-Aguilar, A. (2016) Body temperature is associated with climatic and geographical variables but not wing pigmentation in two rubyspot damselflies (Odonata: Calopterygidae). *Physiological Entomology*, **41**, 132–142.
- Rowan, A.N. & Newsholme, E.A. (1979) Changes in the contents of adenine nucleotides and intermediates of glycolysis and citric acid cycle in flight muscle of the locust upon flight and their relationship to the control of the cycle. *Biochemical Journal*, **178**, 209–216.
- Rowe, C. (1999) Receiver psychology and the evolution of multicomponent signals. *Animal Behaviour*, **58**, 921–931.
- Sacchi, R. & Hardersen, S. (2012) Wing length allometry in Odonata: differences between families in relation to migratory behaviour. *Zoomorphology*, **132**, 23–32.
- Shamim, G., Ranjan, S.K., Pandey, D.M. & Ramani, R. (2014) Biochemistry and biosynthesis of insect pigments. *European Journal of Entomology*, **111**, 149–164.
- Siva-Jothy, M.T. (2000) A mechanistic link between parasite resistance and expression of a sexually selected trait in a damselfly. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **267**, 2523–2527.
- Steele, J.E. (1982) Glycogen-phosphorylase in insects. *Insect Biochemistry*, **12**, 131–147.
- Suarez, R.K., Darveau, C.A., Welch, K.C. et al. (2005) Energy metabolism in orchid bee flight muscles: carbohydrate fuels all. *Journal of Experimental Biology*, **208**, 3573–3579.
- Svensson, E.I. & Waller, J.T. (2013) Ecology and sexual selection: evolution of wing pigmentation in calopterygid damselflies in relation to latitude, sexual dimorphism, and speciation. *The American Naturalist*, **182**, E174–E195.
- Talloon, W., Van Dyck, H. & Lens, L. (2004) The cost of melanization: butterfly wing coloration under environmental stress. *Evolution*, **58**, 360–366.
- Van Handel, E. (1985) Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **1**, 302–304.
- Van Handel, E. & Day, J. (1988) Assay of lipids, glycogen and sugars in individual mosquitoes: correlations with wing length in field collected *Aedes vexans*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **4**, 549–550.
- Warren, I.A., Gotoh, H., Dworkin, I.M. et al. (2013) A general mechanism for conditional expression of exaggerated sexually-selected traits. *BioEssays*, **35**, 889–899.
- Warton, D.I., Wright, I.J., Falster, D.S. & Westoby, M. (2006) Bivariate line-fitting methods for allometry. *Biological Reviews*, **81**, 259–291.
- Warton, D.I., Duursma, R.A., Falster, D.S. & Taskinen, S. (2012) smatr 3—an R package for estimation and inference about allometric lines. *Methods in Ecology and Evolution*, **3**, 257–259.
- Wolda, H. (1988) Insect seasonality: why? *Annual Review of Ecology and Systematics*, **19**, 1–18.
- Zahavi, A. (1975) Mate selection: a selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology*, **53**, 205–214.

Accepted 21 May 2017

First published online 10 August 2017

## Capítulo II

### **Supervivencia diferencial de los machos de *Hetaerina titia* en relación a la manipulación del área alar melanizada**

## Introducción

La teoría de la selección sexual explica el origen y la modulación de ciertos rasgos conocidos como caracteres sexuales secundarios, los cuales pueden surgir debido a la competencia entre individuos de un mismo sexo por el acceso a la cópula (armamentos) y/o por la elección por parte de uno de los sexos de individuos del sexo opuesto (ornamentos) (Andersson, 1994; Berglund *et al.*, 1996). Comúnmente estos caracteres se presentan en los machos y suelen implicar un costo, es por ello que no todos los individuos pueden expresarlos. Esta idea fue propuesta por Zahavi (1975) como la hipótesis de la desventaja, donde se plantea que la expresión de los caracteres sexuales es dependiente de la condición de los individuos y no todos son capaces de pagar los costos de expresar y exhibir dichos caracteres. Por lo tanto, estos rasgos se conocen como señales honestas (Stuart-Fox, 2005).

Los costos de los caracteres sexuales secundarios generalmente son pagados de distintas maneras en los individuos dependiendo del rasgo, o incluso en algunas ocasiones, para un mismo rasgo existe más de un costo (Møller, 1996). Por ejemplo, los costos en la producción del carácter suelen ser fisiológicos, como en el caso de los pinzones *Taeniopygia guttata*. La coloración del pico de los machos es un carácter sexual secundario, dependiente de carotenoides, compuestos que también son esenciales en el sistema inmune, por lo que existe una disyuntiva en la asignación de este recurso (Blount *et al.*, 2003; McGraw & Ardia, 2003; Alonso-Alvarez *et al.*, 2004).

Por otro lado, los costos en el mantenimiento y exhibición del carácter suelen manifestarse con un aumento en el riesgo de depredación, como en lagartijas donde machos de colores brillantes sufren mayor depredación que aquellos de colores opacos (Stuart-Fox *et al.*, 2003). Otro ejemplo son los patrones de coloración complejos que presenta el pez *Poecilia reticulata*, donde la selección sexual favorece colores conspicuos en los machos, ya que son sujetos a elección



femenina, por lo que individuos más coloridos tienen una mayor probabilidad de obtener cópulas, pero mayor susceptibilidad a depredación por tornarse conspicuos hacia sus depredadores (Endler, 1978, 1980; Houde & Endler, 1990; Gordon, *et al.*, 2012). Por otro lado, la selección natural favorece patrones de coloración críptico, los cuales tornan a los individuos más parecidos al ambiente, menos conspicuos hacia sus depredadores y en consecuencia la tasa de depredación disminuye (Endler, 1978, 1980; Gordon, *et al.*, 2012). En cuanto a caracteres conductuales los costos pueden ser parecidos a estos últimos, como en el caso de animales que realizan señalizaciones auditivas, por ejemplo; el sonido producido por grillos machos atrae a las hembras, pero también atrae a depredadores como gekos y murciélagos (Sakaluk & Belwood 1984; Bailey & Haythornthwaite 1998).

Dependiendo del carácter sexual secundario estudiado y la pregunta a resolver, los costos en la producción, desarrollo y mantenimiento de estos rasgos pueden ser estimados de diferentes maneras. En las libélulas de la familia Calopterygidae se han evaluado estos costos estimando la supervivencia (Córdoba-Aguilar, 2002; Contreras-Garduño *et al.*, 2007; Munguía-Steyer *et al.*, 2010), otra forma ha sido manipulando el estado nutricional de los individuos, para ver su relación con el grado de expresión del rasgo evaluado (Álvarez *et al.*, 2013) así como mediante la estimación de reservas energéticas (Contreras-Garduño *et al.*, 2006, 2008; Córdoba-Aguilar *et al.*, 2007).

Los costos fisiológicos pueden ser evaluados mediante el estudio del sistema inmunológico, como se comprobó con la hipótesis de “la desventaja por inmunocompetencia”. Donde en ratones se observó que la producción de testosterona estimula la producción de caracteres sexuales secundarios, pero disminuye la respuesta inmunológica, por lo que la intensidad del carácter disminuye a mayor carga parasitaria (ej. Folstad & Karter, 1992). En la familia Calopterygidae se han evaluado los costos inmunológicos mediante la teoría de “la desventaja por inmunocompetencia”, induciendo un reto inmunológico y estimando

la respuesta inmune (Siva-Jothy, 2000, González-Tokman *et al.*, 2012; Rantala, 2000; Córdoba Aguilar *et al.*, 2007; Contreras-Garduño *et al.*, 2006, 2007; Córdoba-Aguilar & Munguía-Steyer, 2013).

Aunado a estos costos asociados a los caracteres sexuales, es importante considerar que la variación temporal es un factor que puede influir en los gradientes de selección natural en el tiempo, por lo que la selección puede variar considerablemente de un año a otro (Siepielski, *et al.*, 2009). Un ejemplo de lo anterior es el estudio de Grant & Grant (1995) con la población de pinzones *Geospiza fortis*, en la isla Daphne Mayor de las Galápagos, donde debido a una sequía, los individuos con picos grandes experimentaron una mayor supervivencia que los individuos de picos pequeños, en un periodo de un año (1976-1977). Posteriormente en un periodo de dos años (1984-1986), debido a otra sequía la población experimentó la selección en los rasgos del pico en dirección opuesta. Este fenómeno fue atribuido a cambios repentinos en las condiciones ambientales que derivaron en cambios en la disponibilidad de semillas de diferentes tamaños, ocasionando la selección diferencial de los fenotipos (Grant & Grant, 1995). Dado lo anterior, es conveniente contar con trabajos que analicen la selección natural en más de una ocasión.

La pigmentación alar de las libélulas de la familia Calopterygidae ha sido muy estudiada y hoy en día se sabe que es un carácter sexual secundario asociado a condición debido a diferentes características, por ejemplo: en *Hetaerina* y *Calopteryx* el tamaño de la mancha está positivamente relacionado con la probabilidad de supervivencia (Grether, 1997; González-Santoyo *et al.*, 2014, Munguía-Steyer *et al.*, 2010), machos con manchas alares más grandes presentan un mayor éxito reproductivo, (Siva-Jothy, 1999; Córdoba- Aguilar, 2002) y una mejor respuesta inmune, (Siva-Jothy, 2000; Rantala *et al.*, 2000; Contreras-Garduño *et al.*, 2006; Contreras- Garduño *et al.*, 2007). Sin embargo, también han existido estudios contrastantes en algunos componentes asociados al sistema inmune, como el estudio realizado por González-Santoyo y colaboradores (2010),

en el que no se encontró asociación entre la fenoloxidasa, que es un componente del sistema inmune y el pigmento alar de cinco especies pertenecientes al género *Hetaerina* entre dos temporadas contrastantes.

Otro aspecto importante de la pigmentación alar en los machos de la familia Calopterygidae es que está asociada a la defensa de territorios en las orillas de los ríos que contienen substratos apropiados para la puesta de las hembras (revisar Córdoba-Aguilar & Cordero-Rivera 2005 y Córdoba-Aguilar, 2008). Por ejemplo, en *Hetaerina* (Contreras-Garduño *et al.*, 2006; Córdoba-Aguilar *et al.*, 2007), *Calopteryx* (Waage, 1973; Tynkkynen *et al.*, 2006) y *Mnesarete* (Guillermo-Ferreira *et al.*, 2015) se ha observado que esta defensa de territorio se lleva a cabo mediante contiendas de vuelo. Una peculiaridad de *Mnesarete pudica* es que, mediante manipulaciones experimentales, se comprobó que los machos son capaces de evaluar el grado de pigmentación alar de sus rivales, modificando la probabilidad de iniciar un encuentro agonístico (Guillermo-Ferreira *et al.*, 2015).

Uno de los géneros más estudiados dentro de la familia Calopterygidae ha sido *Hetaerina*. Por ejemplo, en *H. americana* Barceló-Atilano (2013) demostró que, dentro de la variación natural de la mancha roja que presentan los machos, individuos con manchas alares más grandes presentan mayor probabilidad de supervivencia comparados con machos de manchas pequeñas. Además, al aumentar artificialmente el tamaño de la mancha la probabilidad de supervivencia es menor comparada a la de los machos controles (Grether, 1997, Barceló-Atilano, 2013). Lo anterior nos indica que en esta especie existe un costo en supervivencia por expresar la mancha roja y machos en mejor condición estarían expresando manchas alares más grandes (Grether, 1997, Barceló-Atilano, 2013).

*Hetaerina tita* es la única especie dentro del género que presenta dos coloraciones: una mancha rojiza en la base de las alas anteriores y pigmentación negra en las alas anteriores y posteriores (Córdoba-Aguilar *et al.* 2007). Puede ser que estos dos pigmentos sean señales complejas; las cuales podrían ser

multicomponentes (Moller & Pomiankowski, 1993). Como señales multicomponentes, las dos coloraciones podrían ser redundantes y proveer la misma información, o bien, pueden ser complementarias, donde cada una transmita diferente mensaje (Moller & Pomiankowski, 1993; Rowe, 1999; Hebets, 2005). Un ejemplo de señales multicomponentes complementarias es el sonido producido por los machos de la rana *Eleutherodactylus coqui*, estudiado por Narins y Capranica (1976). En este caso los machos producen dos sonidos con diferente frecuencia e intensidad de onda, uno de los sonidos atrae a las hembras y otro a los machos, por lo que son dos señales transmitidas mediante la misma vía, pero la información recibida es distinta.

Hasta el momento se ha encontrado que al igual que en *H. americana*, machos de *H. titia* con mayor área alar pigmentada (dentro del rango de variación natural del rasgo, sin una manipulación experimental que permitiera evaluar los costos asociados) presentan una mayor probabilidad de supervivencia (Olvera-Hernández, 2016). Sin embargo, en *H. titia* que presenta dos pigmentos, la relación con supervivencia fue encontrada únicamente con la mancha negra y no con la mancha roja. Se sabe que la mancha negra está implicada en la disminución de interacciones agonísticas entre machos, (Anderson & Grether 2010a, 2010b; Drury & Grether, 2014), posiblemente por ser un carácter señalizador de la condición de los individuos. Por último, Grether (1997), sugiere que la disminución en las tasas de supervivencia encontrada en machos de *H. americana* con el área alar aumentada artificialmente, puede deberse a un incremento en la visibilidad de estos individuos hacia sus depredadores y depredadores que se orientan mediante señales visuales.

Dado lo anterior, el objetivo de este capítulo fue realizar manipulaciones experimentales mediante el aumento artificial del área alar melanizada de machos de *H. titia* para evaluar el impacto que este rasgo pudiese ocasionar en la supervivencia de los individuos. Nosotros predecimos que debido a que la mancha negra de *H. titia* (y no la roja) parece estar cumpliendo la función de señalizador

de condición (Córdoba-Aguilar *et al.*, 2007, Anderson & Grether 2010a, 2010b; Drury & Grether, 2014; Olvera-Hernández, 2016, Castaños *et al.*, 2017), la supervivencia de los machos experimentales disminuirá por no poder pagar el costo de portar el carácter exagerado, posiblemente por tornar a los individuos más vistosos hacia sus depredadores y presas, aumentando así su depredación y disminuyendo la caza exitosa (Grether & Grey 1996; Svensson & Friberg, 2007).

## **Material y métodos**

### *Sitio de estudio y temporadas de muestreo*

El estudio se realizó en el río La Palma (18° 33' N, 95° 03' W) en Los Tuxtlas, Veracruz, México, a 5 km de la estación de Biología Tropical de la UNAM. En un fragmento de 300 metros a lo largo de ambas orillas del río se llevó a cabo la captura de machos de *H. titia* con redes entomológicas aéreas. Únicamente trabajamos con individuos machos jóvenes, maduros sexualmente, que según los criterios establecidos por Plaistow y Siva-Jothy (1996), son individuos que presentan las alas suaves y transparentes sin ser completamente flexibles como los individuos demasiado jóvenes o rígidas y opacas como los más viejos (Plaistow & Siva-Jothy, 1996).

El análisis de supervivencia realizado mediante métodos de captura-recaptura se llevó a cabo durante dos años, en los veranos del 2015 y del 2016, lo que nos permitió evaluar la variación temporal en las probabilidades de supervivencia de los individuos.

### *Marcaje y recaptura de organismos*

El primer periodo de captura-recaptura lo realizamos 3 personas durante 29 días continuos, del 27 de junio al 25 de julio del 2015, periodo en el que marcamos y llevamos a cabo el seguimiento de 358 individuos (apéndice 1a). El segundo periodo de captura-recaptura lo realizamos 5 personas durante 30 días, del 6 de julio al 2 de agosto del 2016, cuando marcamos y registramos la recaptura de 241 individuos (apéndice 1b).

Una vez capturados los individuos, los fotografiamos para posteriormente poder medir las variables morfométricas. Cada libélula fue colocada en posición dorsal con las alas extendidas sobre una caja Petri, de manera que las alas quedaran

completamente separadas. Posteriormente para evitar que la libélula se moviera mientras tomábamos la fotografía, colocamos un porta objetos en cada par de alas. Bajo la caja Petri fijamos un papel milimétrico como referencia de escala (apéndice 2) y tomamos las fotografías con una cámara (Canon DSLR Rebel T3i) montada en un trípode, cerciorándonos que la posición entre el lente de la cámara y la caja Petri fuera siempre perpendicular.

Después de ser fotografiados, marcamos a los organismos con plumones de diferentes colores (DecoColor, Fine Line, Marvy Uchida of America Corp, Torrance CA) en la parte dorsal del abdomen, utilizando un código de colores único en cada caso, con la finalidad de reconocerlos posteriormente. Este marcaje lo realizamos colocando un punto de color por cada segmento del abdomen, marcando del cuarto segmento al séptimo, comenzando por la parte superior. Plumones iguales han sido usados y recomendados para el marcaje de libélulas de la familia Calopterygidae mediante esta técnica (ver Anderson, *et al.*, 2011).

El experimento consistió en tres grupos: 1) control negativo (c-), no manipulamos las alas; 2) control positivo (c+), marcamos el área de las alas anteriores que originalmente se encuentra sin pigmento con un plumón transparente (Prismacolor, Premier PM-121) y 3) experimental (e), incrementamos el área melanizada, pintando el área transparente de las alas anteriores con un marcador negro (Prismacolor, Premier PM-98). El grupo c+ lo utilizamos para poder disociar el efecto del marcaje del efecto del color agregado en el grupo e. Los individuos capturados fueron asignados aleatoriamente a cada uno de los grupos, de manera que quedaran el mismo número de individuos en cada grupo. Los plumones negro y transparente que utilizamos para marcar las alas, han sido usados en estudios previos con esta especie (Drury & Grether, 2014; Grether *et al.*, 2015; Drury *et al.*, 2015) y el plumón transparente con *H. americana* (Barceló-Atilano, 2013).

Por último, liberamos a todos los individuos y consideramos el primer día de captura y marcaje de cada uno como su primer registro en la historia de encuentros. A partir del segundo día de nuestro trabajo de campo realizamos visitas diarias para llevar a cabo un registro de la detección o no detección de los individuos ya marcados. Si el individuo era observado durante ese día lo registramos con un 1 y si no, con un 0. Así, al final del trabajo de campo cada individuo presentó una historia de detección, conformada de una cadena de ceros y unos, empleadas en los análisis de supervivencia. Para realizar los registros de detección de cada individuo marcado, utilizamos binoculares (Nikon *prostaff 7s* 8X30) que nos permitieron ver y registrar el código de cada uno sin la necesidad de recapturarlos.

#### *Medición de variables morfométricas*

Con las fotografías tomadas en campo, medimos las variables morfométricas en computadora en el laboratorio, utilizando el programa para análisis de imágenes ImageJ (Abràmoff *et al.*, 2004). Medimos el área alar total, el área alar roja y el área alar negra del ala anterior derecha de todos los individuos del estudio.

Existe gran variación en la melanización que presentan los machos de esta especie (Córdoba-Aguilar *et al.*, 2007; Drury *et al.*, 2015), comparada con la variación en la expresión de la mancha que presentan otros congéneres como *H. americana*, (Grether, 1997 y Barceló-Atilano, 2013). Esto significa que el área comprendida a la manipulación del color en las alas de *H. titia*, no estaría siendo homogénea entre los individuos y por lo tanto el costo de la manipulación no sería el mismo. Por tal motivo, decidimos considerar el área melanizada como una variable dicotómica en vez de continua (individuos con poca melanización e individuos con mucha melanización), ya que podría existir un efecto diferencial de esta variable independiente al grupo experimental al que posteriormente fuera asignado cada individuo. Además, como lo hemos reportado en el primer capítulo de este estudio, el grado de melanización está asociado a la condición inicial que



presentan los individuos, por lo que el efecto de la manipulación en los individuos poco melanizados originalmente, podría ser más grande.

Con relación a la melanización alar, categorizamos a los individuos en dos niveles: individuos poco y muy melanizados. El método de discriminación empleado para definir estos dos grupos usó como umbral el valor promedio del porcentaje de área alar melanizada para cada uno de los años que comprendió el estudio. En 2015 el umbral de discriminación empleado en la definición de individuos poco y muy melanizados fue del 55 % del área melanizada, mientras que para 2016 fue del 65 %.

### *Análisis de supervivencia*

Empleamos modelos de captura-recaptura Cormack-Jolly-Seber (CJS) con el fin de estimar las probabilidades de supervivencia ( $\phi$ ) y recaptura ( $p$ ), a partir de la historia de encuentros construida con los registros de detección diarios de cada individuo en campo. Los modelos de captura-recaptura consideran la detectabilidad imperfecta del observador (Kéry & Schaub, 2012), de tal manera que es posible disociar la probabilidad de supervivencia de la de recaptura y no suponer que los individuos viven hasta el último día en que los detectamos, lo que podría subestimar el valor de longevidad (Lebreton *et al.*, 1992).

Los supuestos de los modelos CJS son:

- 1) Cada animal marcado en el tiempo ( $i$ ) tiene la misma probabilidad de ser recapturado.
- 2) Cada animal marcado en el tiempo ( $i$ ) tiene la misma probabilidad de sobrevivir al tiempo ( $i+1$ ).
- 3) Las marcas no se caen o se borran y son detectables.
- 4) El proceso de colecta de la información durante las visitas es instantáneo, relativo al intervalo de tiempo transcurrido entre el tiempo ( $i$ ) y el tiempo ( $i+1$ ).

En este estudio relajamos los primeros dos supuestos del modelo, al incorporar las covariables individuales (área alar, área alar pigmentada) y grupo experimental (c+, c-, e), lo cual permite que los individuos presenten diferentes probabilidades de supervivencia y recaptura. Por otro lado, nuestro estudio no cumple de manera estricta con el cuarto supuesto (como sucede en casi todos los estudios), sin embargo, nuestra colecta de información la realizamos en un lapso de 4 horas dentro de un intervalo de 24 horas. Esto representa una fracción pequeña de tiempo relativa al intervalo de supervivencia diario y que no difiere de lo recomendado y realizado en trabajos previos para los estudios de captura y recaptura en calopterígididos (ver Cordero-Rivera & Stoks, 2008). Así mismo, el intervalo de tiempo es comparable con los intervalos usados en estudios de captura y recaptura en otros grupos animales, por ejemplo, en aves, donde se estiman supervivencias anuales realizando la colecta de información en los periodos de la época reproductiva (generalmente tres meses, de los doce meses del año) (Spendelov *et al.*, 1995; Johnston *et al.*, 1997; Naef-Daenzer *et al.*, 2001). Por último, para poder ver el posible efecto de relajar este último supuesto consideramos solo los datos de detección de intervalos de cada dos días en nuestro modelo y no encontramos diferencias en las probabilidades de supervivencia estimadas (apéndice 3).

Usamos la inferencia bayesiana para estimar las probabilidades de supervivencia y recaptura, empleando las cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) debido a que presenta las siguientes ventajas sobre los métodos de máxima verosimilitud: 1) los valores de los parámetros son relativamente fáciles de estimar, al igual que los componentes derivados de estos; 2) todos los resultados son exactos, no hay estimaciones con valores asintóticos y 3) el lenguaje de los programas utilizados para análisis bayesianos permite construir modelos complejos que pueden ser fácilmente modificados y ajustables a propósitos particulares, e incluir variables como heterogeneidad individual y tiempo (Kéry & Schaub, 2012).

Para la estimación de las probabilidades de  $\phi$  y  $p$ , construimos un modelo CJS en el que consideramos distintas variables predictoras: el grado de melanización, el grupo experimental y la interacción de estas dos variables; además agregamos la variable de heterogeneidad individual ( $hi$ ) en ambos parámetros. La inclusión de la heterogeneidad individual en los modelos tiene la ventaja de incorporar de manera explícita la variación en las probabilidades de supervivencia y de recaptura que no están siendo consideradas en las variables predictoras que incluimos en nuestro estudio (Cooch *et al.*, 2002; Kéry & Schaub, 2012).

También consideramos la variable de tiempo como efecto aleatorio ( $t$ ), que supone la variación en los parámetros de supervivencia y recaptura a lo largo del tiempo presentan una distribución normal, por lo que solo es necesario estimar un promedio y la varianza en cada uno de estos parámetros (Cooch *et al.*, 2002; Kéry & Schaub, 2012).

Cabe resaltar que para la construcción de nuestro modelo tomamos en cuenta la importancia de incluir o no ciertas variables tomando en consideración la biología del sistema de estudio y el propósito de la investigación. Por ejemplo, el área roja no fue incluida, ya que, aunque para las discusiones generales del estudio es un factor importante, previamente ha sido demostrado que el tamaño del área de este pigmento, no tiene una relación con la supervivencia en los machos de *H. titia* (Olvera-Hernández, 2016). Agregamos en el apéndice los modelos que consideran el área roja como predictor de la supervivencia y recaptura y mostramos que no presentan un mejor poder de explicación que los que no lo consideran, presentando los parámetros valores similares y siendo los mismos resultados para los contrastes de los grupos.

Al final, el modelo que ajustamos para ambos años fue:  $\phi(\text{mel} * \text{manip} + hi + t)$   
 $p(\text{mel} * \text{manip} + hi + t)$ , donde la supervivencia y recaptura varían con respecto a la cantidad de melanización original de los individuos ( $mel$ ), a la manipulación experimental en el área alar melanizada ( $manip$ ) y a la interacción entre estas dos

variables. Adicionalmente incluimos como variables aleatorias, la heterogeneidad individual y temporal en las probabilidades de supervivencia y recaptura y adicionalmente ajustamos un modelo que no las incluyera para comprobar que existen diferencias en las estimaciones de los parámetros al considerar o no estas variables, ya que el no considerarlas puede ocasionar inferencias erróneas o sesgos en las estimaciones de supervivencia o senescencia como se ha observado en estudios previos (Cooch *et al.*, 2002; Péron, *et al.*, 2010).

Construimos los modelos de captura-recaptura en el programa de inferencia bayesiana JAGS (Plummer, 2013) y estimamos los parámetros usando el lenguaje de programación R versión 3.1.2 (R Core Team, 2016) y el paquete R2jags (Su & Yajima, 2012) como interfaz del programa JAGS. Elaboramos los modelos adaptando y modificando el código de Kéry y Schaub (2012).

En nuestro modelo empleamos el estadístico de Gelman-Rubin (Rhat) para evaluar la convergencia de los valores de parámetros procedentes de 3 cadenas diferentes y todos fueron valores inferiores a 1.01. Por último, para estimar si existen diferencias entre las probabilidades de supervivencia y recaptura de los grupos, productos de manipulación experimental del área melanizada, realizamos contrastes entre los dos grupos controles, el control negativo contra el experimental y el control positivo contra el experimental. Consideramos que existían diferencias entre los grupos contrastados si el intervalo de credibilidad al 95 % del contraste no incluía en su rango el valor de cero.

### *Mediciones espectrofotométricas*

La reflexión y refracción de luz ultravioleta puede ser una señal visual esencial en las interacciones de las libélulas, como se ha comprobado que sucede en algunas especies de libélulas de la familia Calopterygidae (Schultz & Fincke, 2009; Guillermo-Ferreira *et al.*, 2014). Para descartar la posibilidad de que el plumón transparente que utilizamos pudiese estar incidiendo en las probabilidades de supervivencia y recaptura debido a que algún componente de señalización visual esté siendo alterado al manipular a los individuos, se realizó un análisis espectrofotométrico.

Medimos el espectro de reflectancia del área alar transparente de ocho machos con un espectrofotómetro (Jaz Spectrometer, JAZ-S, Ocean Optics) de la longitud de onda de 250 nm a 800 nm, lo cual abarca el rango de luz visible (380 nm -780 nm) y luz UV cercana (250 nm-380 nm). Se midieron específicamente las zonas transparentes de las dos alas anteriores derechas de los ocho individuos. Posteriormente se midió el patrón de reflectancia en las mismas longitudes de onda del área transparente de las alas anteriores derechas de cuatro de los anteriores ocho individuos, pero manipuladas con un plumón transparente.

Para ver si existen diferencias en los en los espectros de reflectancia por grupos, se hizo una inspección visual graficando las medias de los valores de reflectancia de los dos grupos y sus respectivas desviaciones estándar, similar a como se ha hecho en estudios previos (Torres & Velando, 2007; Schultz & Fincke, 2009; Guillermo-Ferreira *et al.*, 2014).

## Resultados

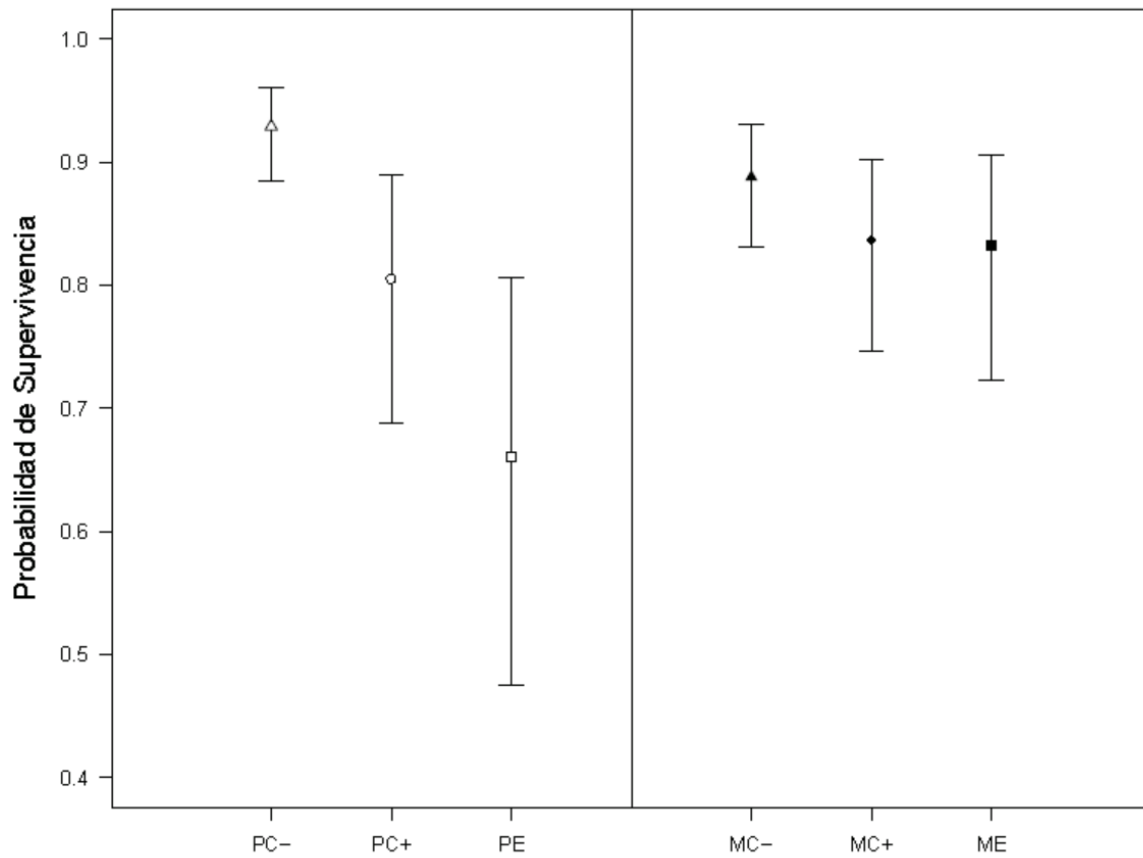
### *Probabilidades de supervivencia y recaptura 2015*

En todos los cuadros de resultados puede observarse el valor promedio de la distribución de probabilidad, el valor del percentil al 50% (la mediana) y los valores de los percentiles al 2.5% y al 97.5% empleados en la estimación los intervalos de credibilidad (IC95%), (estos últimos se observan en los rangos de las figuras). La probabilidad de supervivencia de los individuos del control negativo ( $\varphi_{c-} = 0.929$ ) es mayor comparada con los individuos del control positivo ( $\varphi_{c+} = 0.805$ ; fig. 1, cuadro 1), con diferencias entre los contrastes ( $\varphi_{c- \text{ vs. } c+} = 0.124$ , IC95% = 0.034 - 0.242; fig. 2, cuadro 2). El grupo control negativo también tiene menor probabilidad de supervivencia que el experimental ( $\varphi_e = 0.661$ ) cuando los machos presentan poca melanina ( $\varphi_{c- \text{ vs. } e} = 0.268$ , IC95% = 0.121- 0.453; fig. 1 y 2, cuadros 1 y 2). Sin embargo, no se observaron diferencias entre el grupo control positivo y el experimental de los individuos poco melanizados ( $\varphi_{c+ \text{ vs. } e} = 0.143$ , IC95% = -0.023 - 0.334; fig. 2, cuadro 2). Por otro lado, cuando los individuos presentan mucha melanización las probabilidades de supervivencia entre grupos no difieren (fig. 2, cuadro 2).

**Cuadro 1.** Parámetros 2015  $\phi(\text{mel} * \text{manip} + \text{hi} + \text{t})$   $p(\text{mel} * \text{manip} + \text{hi} + \text{t})$ . Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e).

<b>Parámetros</b>	<b>Media</b>	<b>2.5 %</b>	<b>50.0 %</b>	<b>97.5 %</b>	<b>Rhat</b>
Supervivencia poca melanización c-	0.929	0.885	0.931	0.961	<1.01
Supervivencia poca melanización c+	0.805	0.688	0.810	0.890	<1.01
Supervivencia poca melanización e	0.661	0.476	0.668	0.806	<1.01
Supervivencia mucha melanización c-	0.889	0.831	0.891	0.931	<1.01
Supervivencia mucha melanización c+	0.838	0.748	0.842	0.901	<1.01
Supervivencia mucha melanización e	0.833	0.724	0.839	0.906	<1.01
Recaptura poca melanización c-	0.582	-0.480	0.586	0.759	<1.01
Recaptura poca melanización c+	0.295	-0.929	0.284	0.521	<1.01
Recaptura poca melanización e	0.331	-1.989	0.316	0.621	<1.01
Recaptura mucha melanización c-	0.665	-0.097	0.671	0.819	<1.01
Recaptura mucha melanización c+	0.271	-1.868	0.263	0.452	<1.01
Recaptura mucha melanización e	0.130	-2.896	0.122	0.257	<1.01
Supervivencia het. individual	0.950	0.435	0.950	1.450	<1.01
Supervivencia het. individual y tiempo	0.314	0.015	0.287	0.791	<1.01
Recaptura het. individual	2.141	1.736	2.130	2.601	<1.01
Recaptura het. individual y tiempo	0.299	0.0706	0.298	0.535	<1.01
Devianza	2082.236	2001.923	2081.585	2166.032	<1.01

Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e).



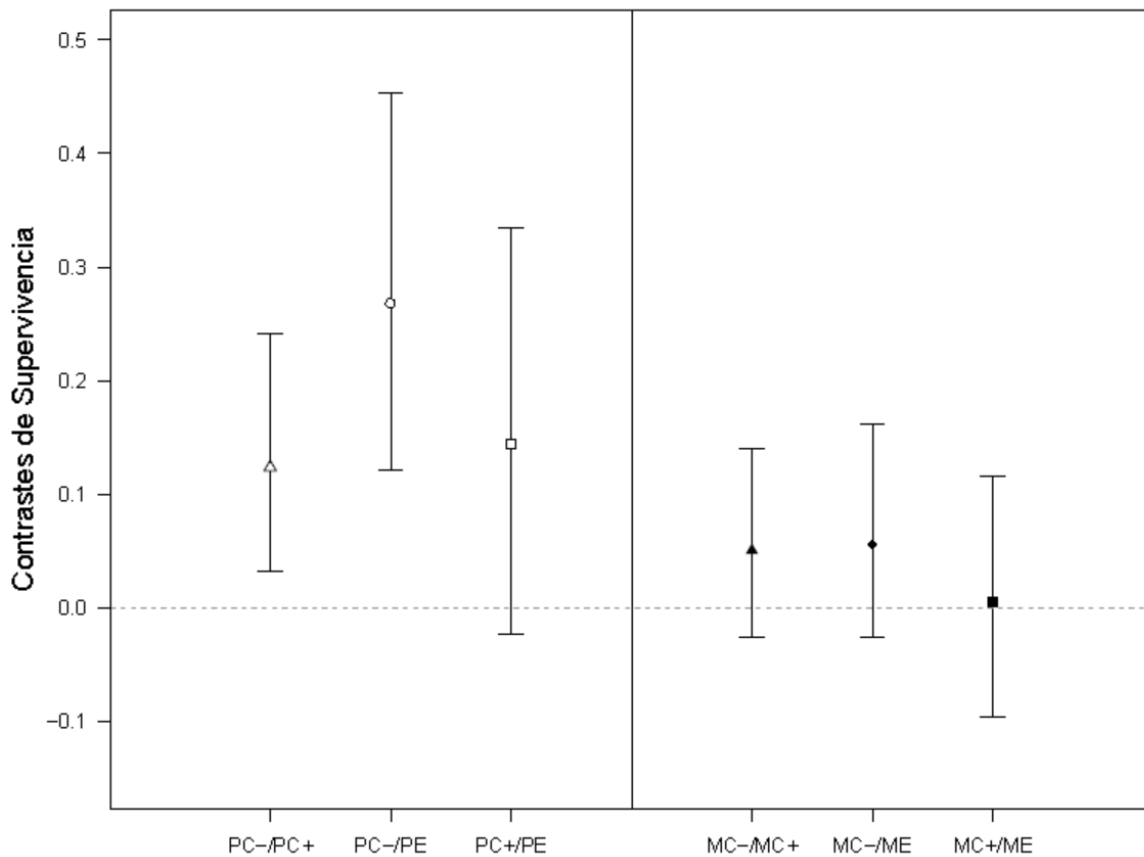
**Figura 1:** Probabilidad de supervivencia diaria del 2015  $\phi(\text{mel} * \text{manip} + \text{hi} + \text{t})$   $p(\text{mel} * \text{manip} + \text{hi} + \text{t})$ . Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e). Melanización: p=poca, m=mucha.



**Cuadro 2:** Contrastes entre grupos de la probabilidad de supervivencia del 2015  $\phi(\text{mel} * \text{manip} + \text{hi} + \text{t})$   $p(\text{mel} * \text{manip} + \text{hi} + \text{t})$ .

Contrastes Supervivencia		Media	2.5 %	50.0 %	97.5 %	Rhat
c- vs. c+	poca melanización	0.124	0.034	0.120	0.242	<1.01
c- vs. e	poca melanización	0.268	0.121	0.261	0.453	<1.01
c+ vs. e	poca melanización	0.143	-0.023	0.139	0.334	<1.01
c- vs. c+	mucha melanización	0.051	-0.025	0.049	0.140	<1.01
c- vs. e	mucha melanización	0.056	-0.026	0.052	0.162	<1.01
c+ vs. e	mucha melanización	0.004	-0.096	-0.003	0.116	<1.01

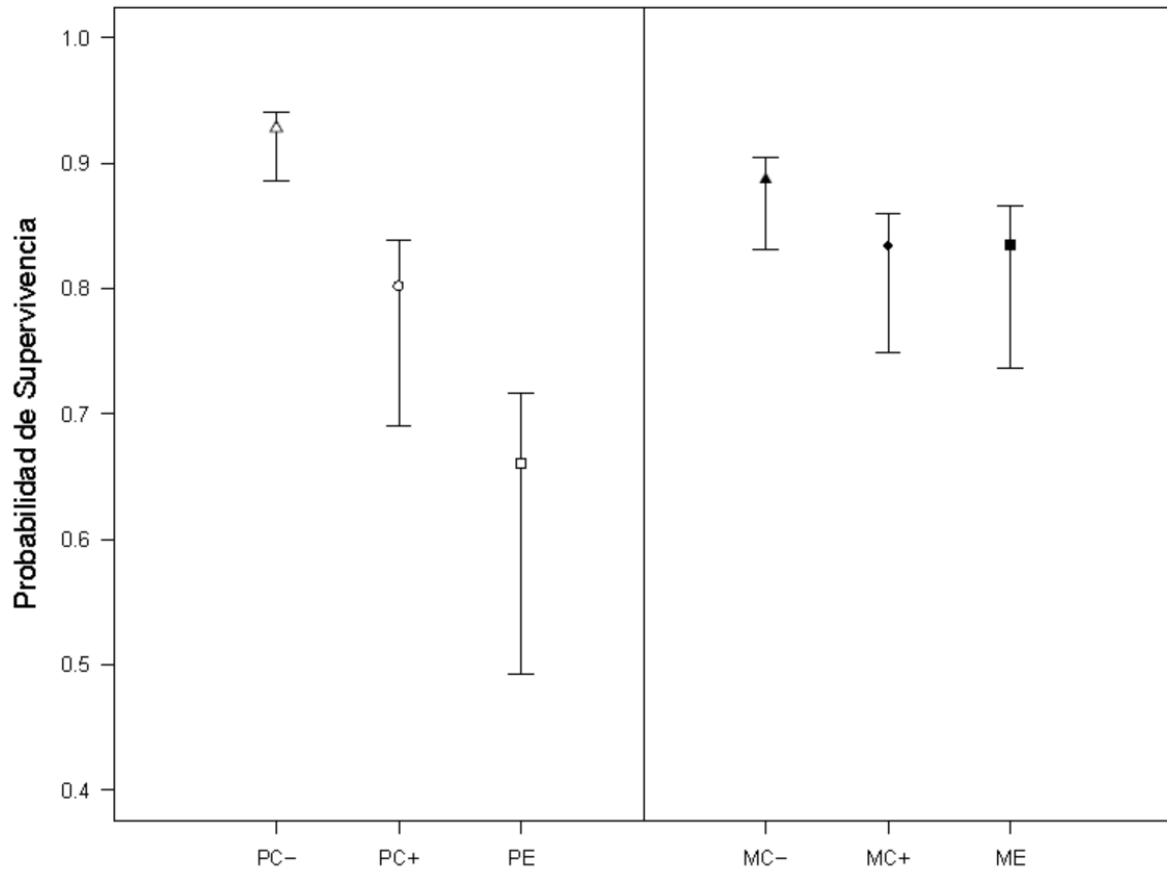
Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e).



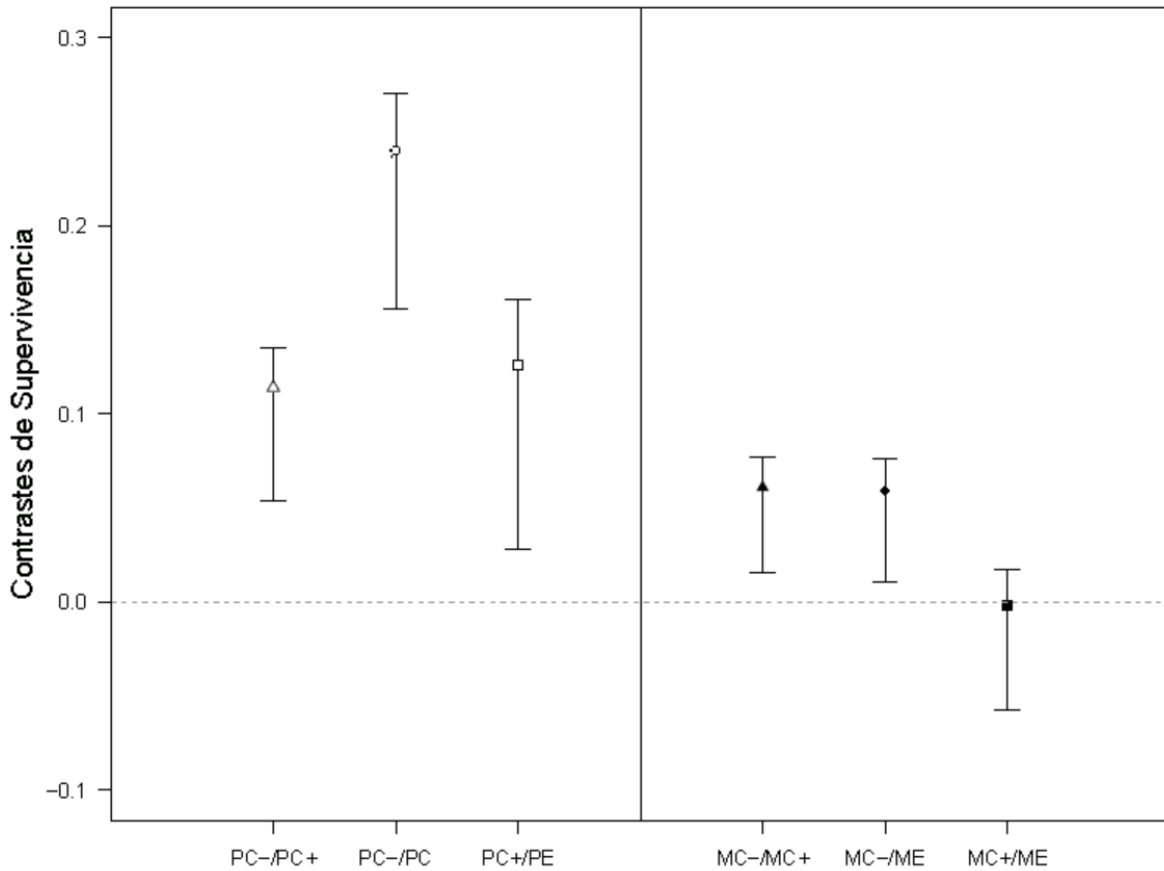
**Figura 2:** Contrastes entre grupos de la probabilidad de supervivencia del 2015  $\phi(\text{mel} * \text{manip} + \text{hi} + \text{t})$   $p(\text{mel} * \text{manip} + \text{hi} + \text{t})$ . Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e).

Melanización: poca (p), mucha (m).

Partiendo del modelo original, pero sin las variables de heterogeneidad individual y tiempo, los resultados de supervivencia son muy parecidos (fig. 3, apéndice 4,) pero la diferencia respecto al modelo original, es que en este caso las probabilidades de supervivencia de los individuos poco melanizados de los grupos c- ( $\varphi_{c-} = 0.918$ ), c+ ( $\varphi_{c+} = 0.804$ ) y e ( $\varphi_e = 0.678$ ) (apéndice 4) si muestran diferencias entre todos ( $\varphi_{c- vs. c+} = 0.114$ , IC95% = 0.054 - 0.178;  $\varphi_{c- vs. e} = 0.240$ , IC 95% = 0.156 - 0.333;  $\varphi_{c+ vs. e} = 0.126$ , IC 95% = 0.028 - 0.229; fig. 4, apéndice 5). En los individuos muy melanizados también se encontró que el grupo c- tiene mayor probabilidad de supervivencia ( $\varphi_{c-} = 0.895$ ) que el c+ ( $\varphi_{c+} = 0.833$ ), (fig. 3, apéndice 4) con diferencias entre los contrastes ( $\varphi_{c- vs. c+} = 0.061$ , IC95% = 0.016 - 0.109) y de igual modo el c- presentó una menor supervivencia que el e ( $\varphi_e = 0.835$ , apéndice 6) ( $\varphi_{c- vs. e} = 0.059$ , IC95% = 0.011 - 0.111; fig. 4, apéndice 5). Únicamente no se encontraron diferencias entre los contrastes del grupo c+ y el e de los individuos muy melanizados ( $\varphi_{c+ vs. e} = -0.002$ , IC 95% = -0.057 - 0.054; fig. 4, apéndice 5).



**Figura 3:** Probabilidad de supervivencia diaria del 2015  $\phi(\text{mel} * \text{manip})$   $p(\text{mel} * \text{manip})$ . Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e). Melanización: poca (p), mucha (m).



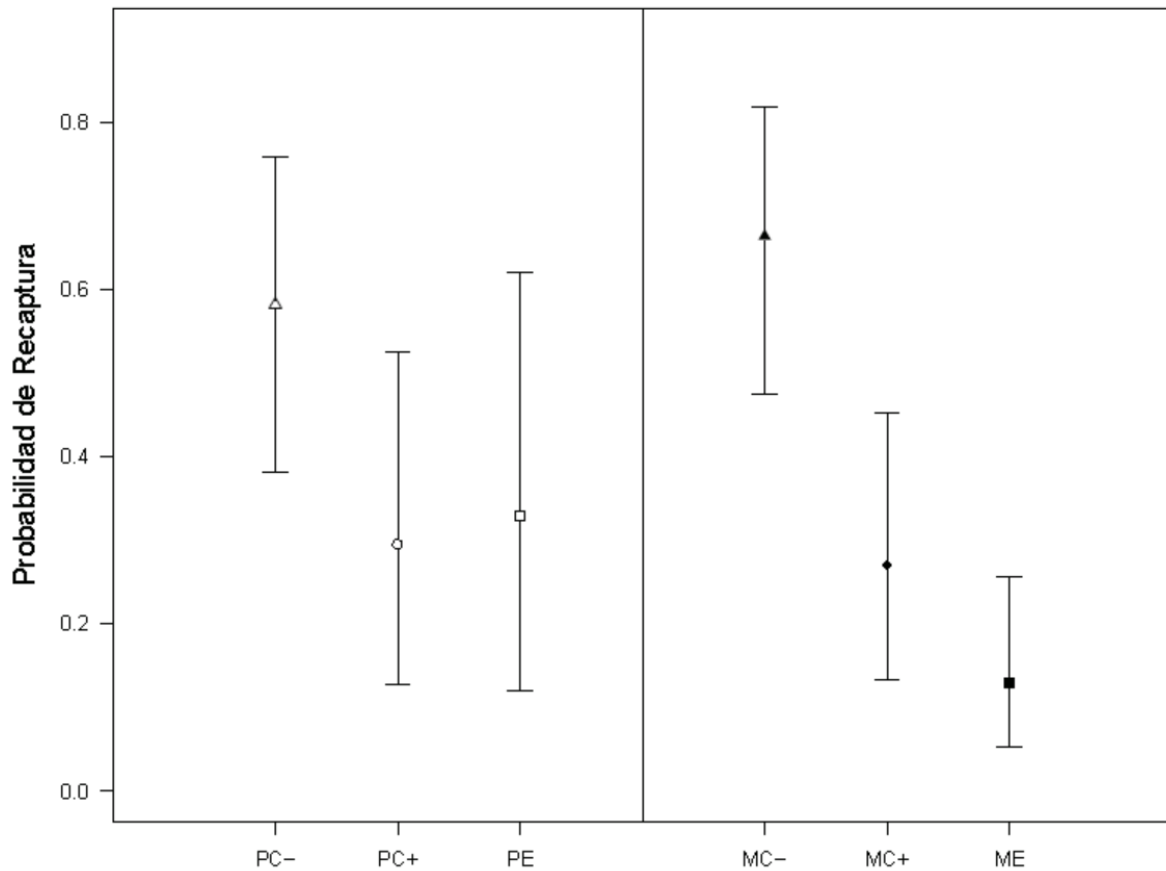
**Figura 4:** Contrastes entre grupos de la probabilidad de supervivencia del 2015  $\phi(\text{mel} * \text{manip})$   $p(\text{mel} * \text{manip})$ . Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e). Melanización: poca (p), mucha (m).

Volviendo al modelo  $\phi(\text{mel} * \text{manip} + \text{hi} + \text{t}) p(\text{mel} * \text{manip} + \text{hi} + \text{t})$  del 2015, las probabilidades de recaptura no difieren entre grupos cuando los individuos se encuentran poco melanizados ( $p_{c-} = 0.582$ ,  $p_{c+} = 0.295$ ,  $p_e = 0.331$ , fig. 5, cuadro 1), esto es evidente en los intervalos de credibilidad, ya que no incluyen en su rango el cero (fig. 6, cuadro 3). Cuando los individuos están muy melanizados, existe una mayor probabilidad de recaptura para el grupo c- ( $p_{c-} = 0.665$ ) respecto al c+ ( $p_{c+} = 0.271$ ) (cuadro 1), ( $p_{c- \text{ vs. } c+} = 0.394$ , IC95% = 0.153 - 0.602; fig. 6, cuadro 3) y al e ( $p_e = 0.130$  ( $p_{c- \text{ vs. } e} = 0.535$ , IC95% = 0.327 - 0.711; fig. 6, cuadro 3), pero nuevamente no hay diferencias entre las probabilidades de recaptura del c+ y el e ( $p_{c+ \text{ vs. } e} = 0.004$ , IC95% = -0.096 - 0.116; fig. 6, cuadro 3).

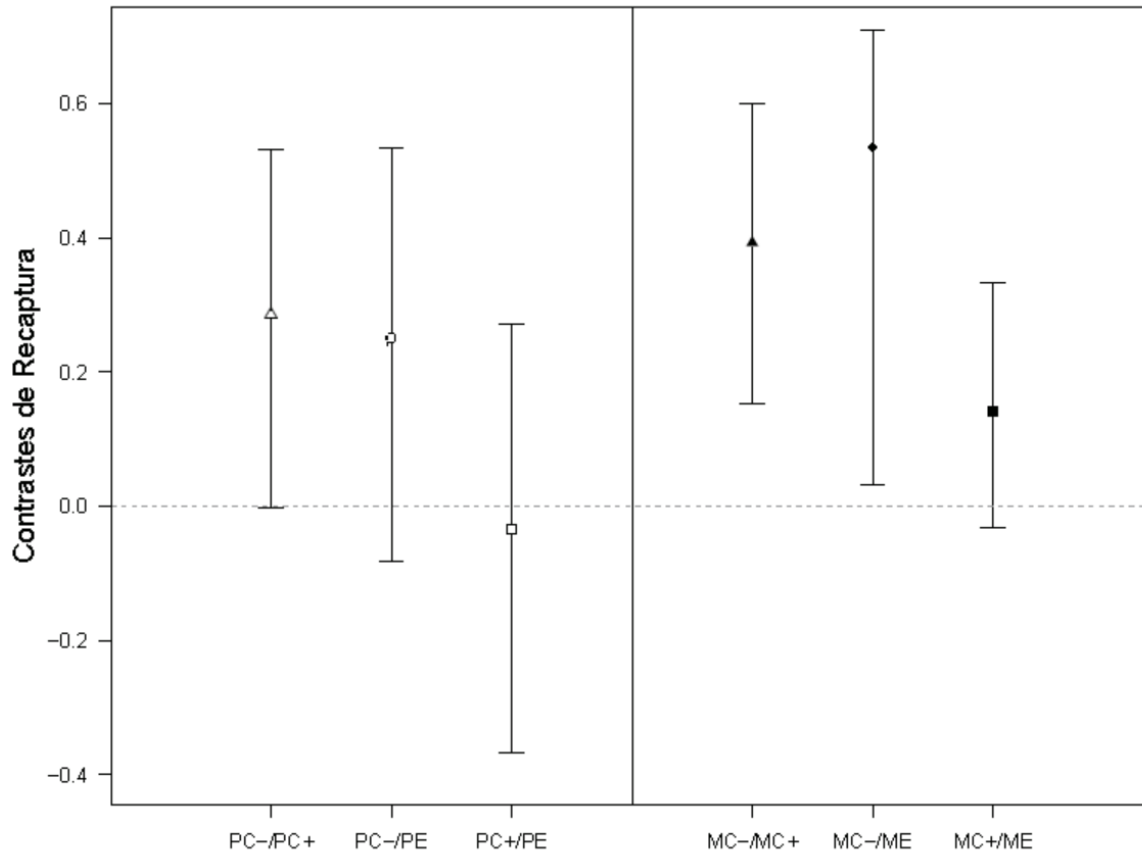
**Cuadro 3:** Contrastes entre grupos de la probabilidad de recaptura del 2015  $\phi(\text{mel} * \text{manip})$   $p(\text{mel} * \text{manip})$ .

Contrastes Recaptura		Media	2.5 %	50.0 %	97.5 %	Rhat
c- vs. c+	poca melanización	0.287	-0.003	0.294	0.533	<1.01
c- vs. e	poca melanización	0.251	-0.082	0.261	0.534	<1.01
c+ vs. e	poca melanización	-0.036	-0.367	-0.030	0.270	<1.01
c- vs. c+	mucha melanización	0.394	0.153	0.400	0.602	<1.01
c- vs. e	mucha melanización	0.535	0.327	0.540	0.711	<1.01
c+ vs. e	mucha melanización	0.141	-0.032	0.137	0.334	<1.01

Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e).

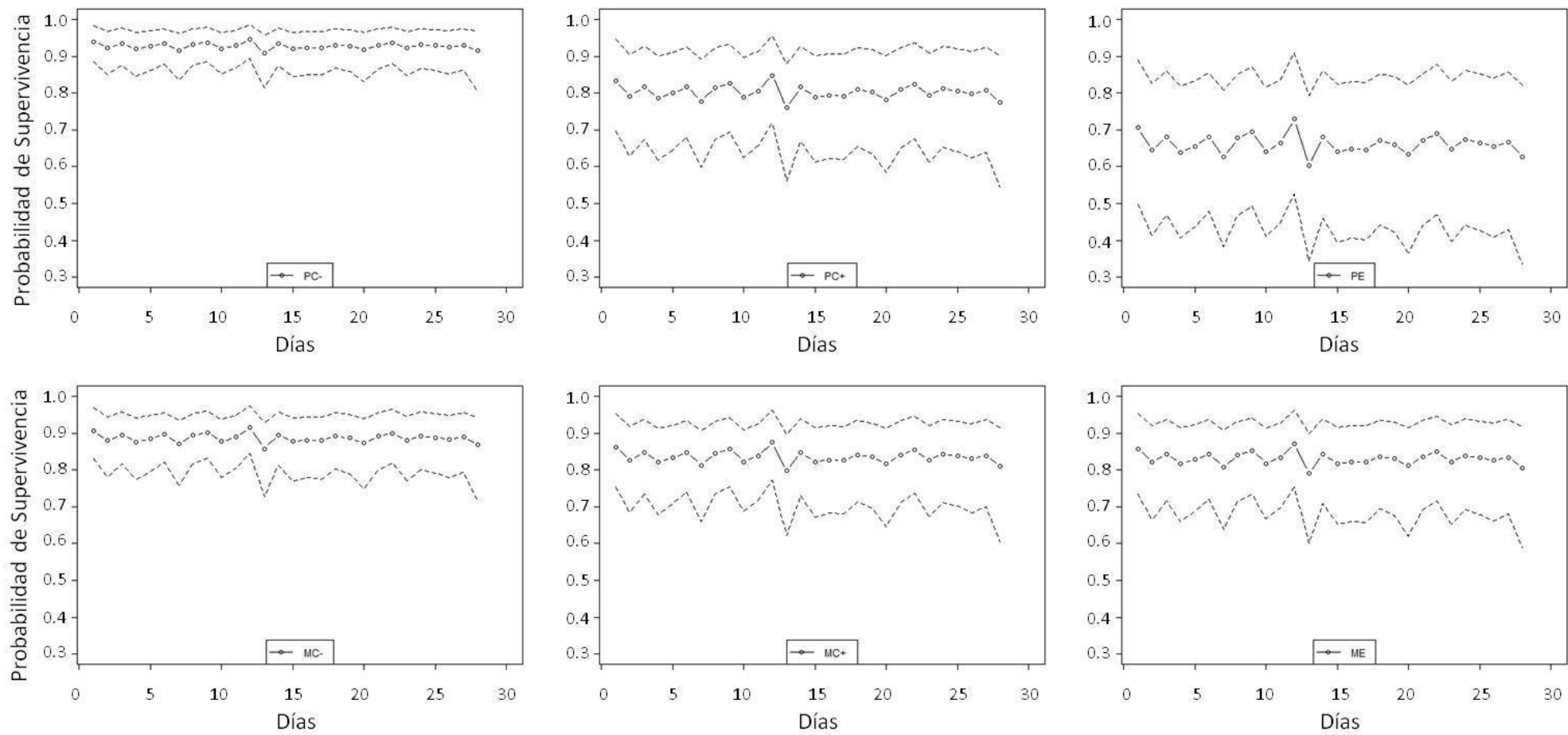


**Figura 5:** Probabilidad de recaptura diaria del 2015  $\phi(\text{mel} * \text{manip} + \text{hi} + \text{t})$   $p(\text{mel} * \text{manip} + \text{hi} + \text{t})$ . Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e). Melanización: poca (p), mucha (m).

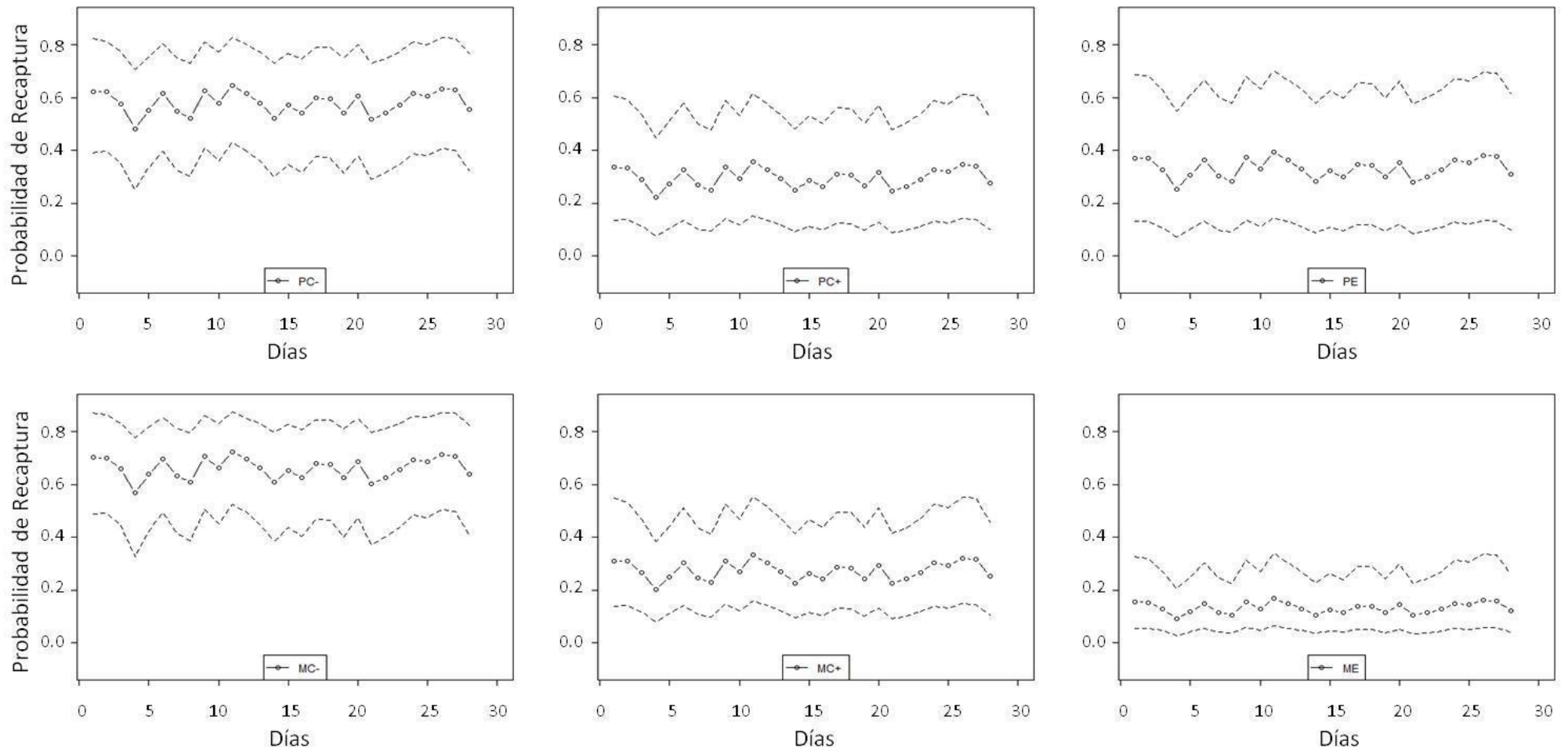


**Figura 6:** Contrastes entre grupos de la probabilidad de recaptura del 2015  $\phi(\text{mel} * \text{manip} + \text{hi} + \text{t})$   $p(\text{mel} * \text{manip} + \text{hi} + \text{t})$ . Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e). Melanización: poca (p), mucha (m).

En general, existe una gran variación temporal en las probabilidades de supervivencia y recaptura (fig. 7 y 8), pero sin existir una tendencia al aumento o disminución de estas probabilidades conforme aumentan los días. En los individuos manipulados existe una gran amplitud en los intervalos de credibilidad, pero los individuos del grupo c- son los que presentan la menor amplitud en los intervalos de credibilidad (fig. 8).



**Figura 7:** Probabilidad de supervivencia de cada grupo por día en el 2015. Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e). Melanización: poca (p), mucha (m).



**Figura 8:** Probabilidad de recaptura de cada grupo por día en el 2015. Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e). Melanización: poca (p), mucha (m).



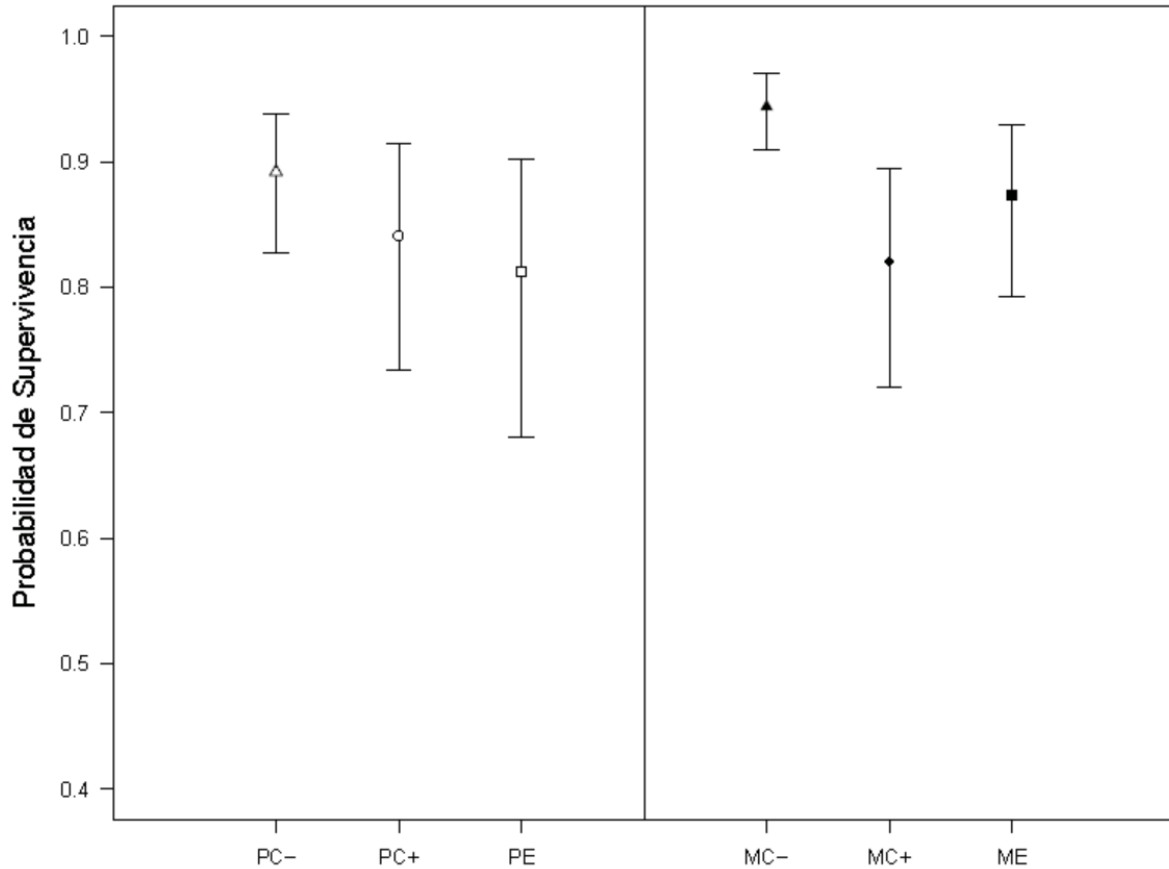
### *Probabilidades de supervivencia y recaptura 2016*

Para el 2016, no se encontraron diferencias significativas en la probabilidad de supervivencia entre grupos cuando los individuos presentan poca melanización (fig. 10, cuadro 5). Sin embargo, la probabilidad de supervivencia de los individuos del grupo c- ( $\varphi_{c-} = 0.944$ ) es mayor comparada con los individuos del c+ ( $\varphi_{c+} = 0.820$ ) y del grupo e ( $\varphi_e = 0.873$ ) en el caso de machos muy melanizados (fig. 9, cuadro 4), encontrando diferencias en los contrastes ( $\varphi_{c- \text{ vs. } c+} = 0.124$ , IC95% = 0.048 - 0.222;  $\varphi_{c- \text{ vs. } e} = 0.071$ , IC95% = 0.010 - 0.67; fig. 10, cuadro 5). Sin embargo, tampoco se encontraron diferencias en la probabilidad de supervivencia del grupo c- y e de los organismos muy melanizados ( $\varphi_{c+ \text{ vs. } e} = -0.053$ , IC95% = -0.015 - 0.042; fig. 10, cuadro 5).

**Cuadro 4.** Parámetros del modelo del 2016  $\phi(\text{mel} + \text{manip} + \text{hi} + \text{t})$   $p(\text{mel} + \text{manip} + \text{hi} + \text{t})$ .

<b>Parámetros</b>	<b>Media</b>	<b>2.5 %</b>	<b>50.0 %</b>	<b>97.5 %</b>	<b>Rhat</b>
Supervivencia poca melanización c-	0.892	0.827	0.895	0.938	<1.01
Supervivencia poca melanización c+	0.841	0.734	0.847	0.914	<1.01
Supervivencia poca melanización e	0.813	0.680	0.820	0.902	<1.01
Supervivencia mucha melanización c-	0.944	0.909	0.946	0.970	<1.01
Supervivencia mucha melanización c+	0.820	0.720	0.825	0.894	<1.01
Supervivencia mucha melanización e	0.873	0.793	0.877	0.930	<1.01
Recaptura poca melanización c-	0.777	0.568	0.790	0.920	<1.01
Recaptura poca melanización c+	0.415	0.183	0.407	0.691	<1.01
Recaptura poca melanización e	0.395	0.152	0.385	0.688	<1.01
Recaptura mucha melanización c-	0.703	0.502	0.710	0.859	<1.01
Recaptura mucha melanización c+	0.745	0.501	0.759	0.914	<1.01
Recaptura mucha melanización e	0.356	0.163	0.347	0.594	<1.01
Supervivencia het. individual	0.722	0.190	0.726	1.230	<1.01
Supervivencia het. individual y tiempo	0.588	0.170	0.572	1.091	<1.01
Recaptura het. individual	2.462	1.981	2.448	3.033	<1.01
Recaptura het. individual y tiempo	0.417	0.125	0.413	0.730	<1.01
Devianza	1582.949	1510.037	1582.376	1659.063	<1.01

Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e).

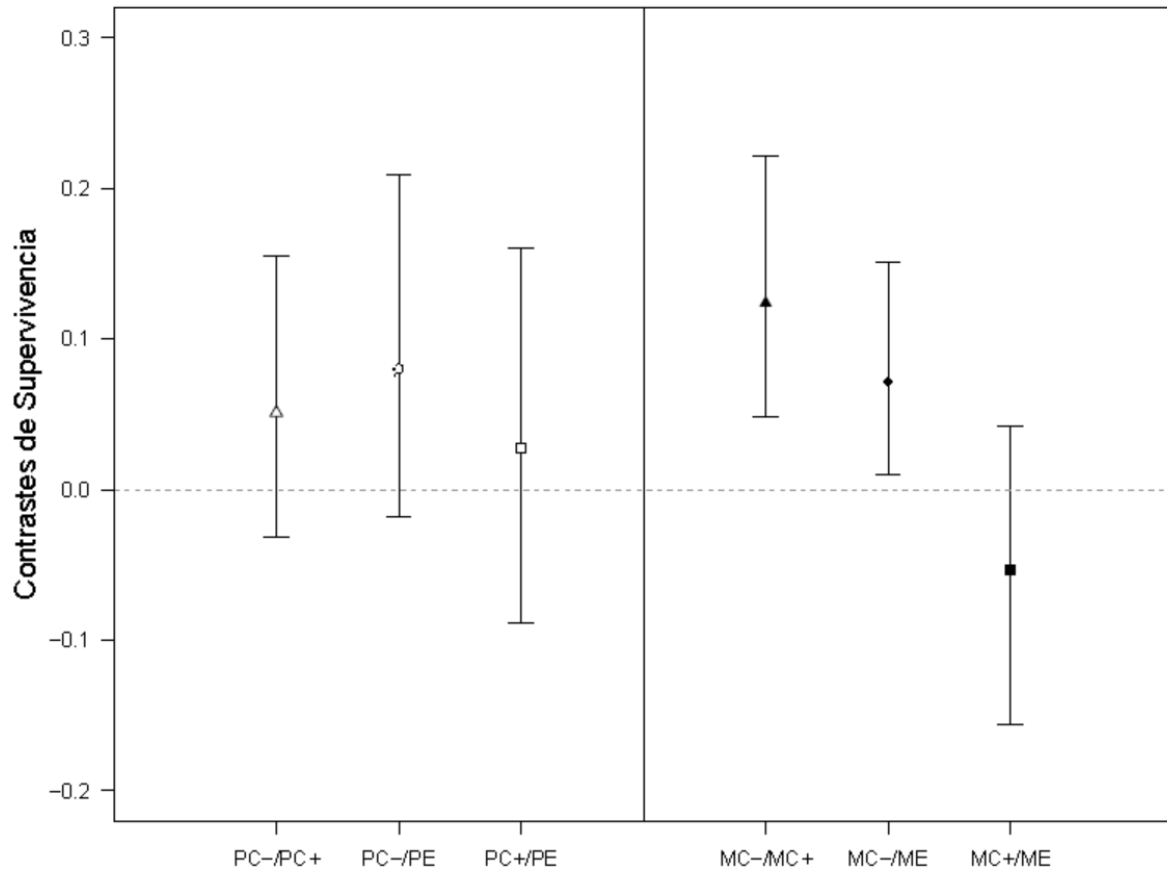


**Figura 9:** Probabilidad de supervivencia diaria. Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e). Melanización: poca (p), mucha (m).

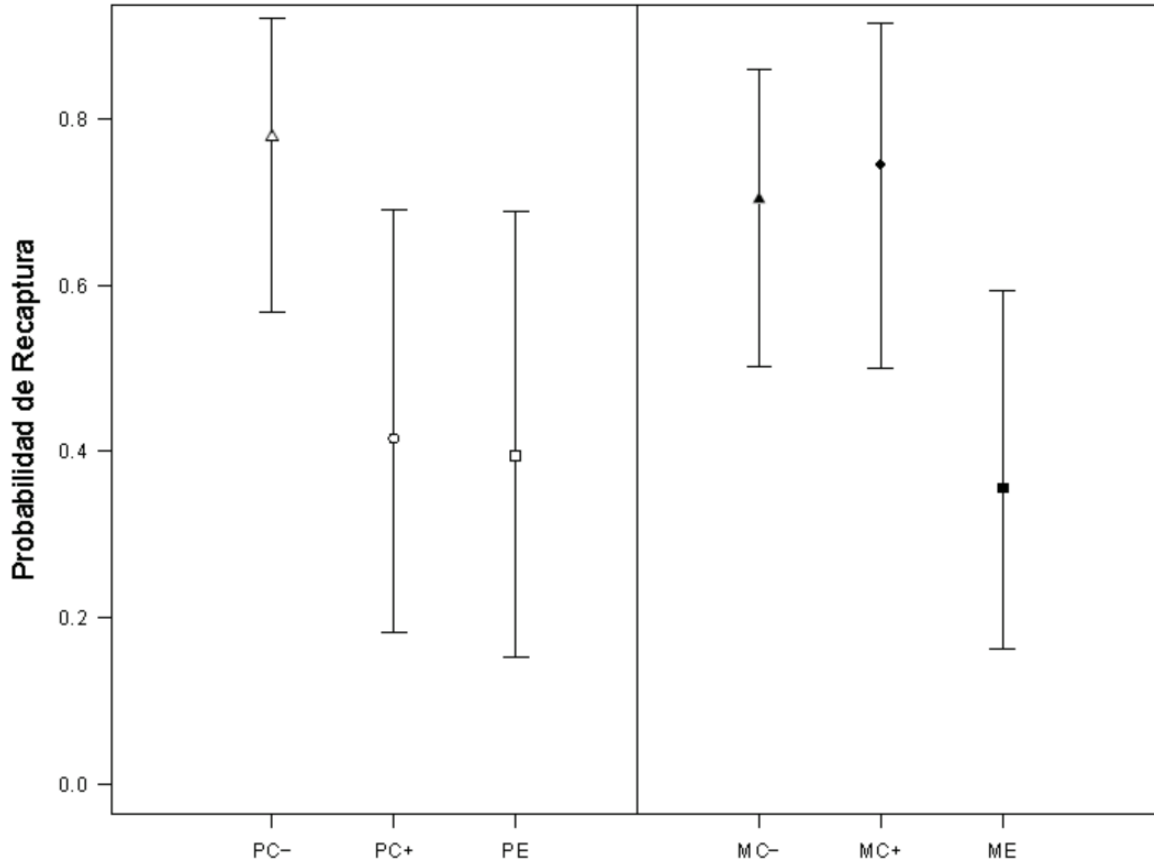
**Cuadro 5:** Contrastes entre grupos de la probabilidad de supervivencia del 2016.

Contrastes Supervivencia		Media	2.5 %	50.0 %	97.5 %	Rhat
c- vs. c+	poca melanización	0.051	-0.032	0.047	0.155	<1.01
c- vs. e	poca melanización	0.079	-0.018	0.074	0.209	<1.01
c+ vs. e	poca melanización	0.028	-0.089	0.026	0.160	<1.01
c- vs. c+	mucha melanización	0.124	0.048	0.120	0.222	<1.01
c- vs. e	mucha melanización	0.071	0.010	0.067	0.151	<1.01
c+ vs. e	mucha melanización	-0.053	-0.015	-0.052	0.042	<1.01

Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e).



**Figura 10:** Contrastes entre grupos de la probabilidad de supervivencia del 2016. Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e). Melanización: poca (p), mucha (m).



**Figura 11:** Probabilidad de recaptura diaria del 2016. Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e). Melanización: poca (p), mucha (m).

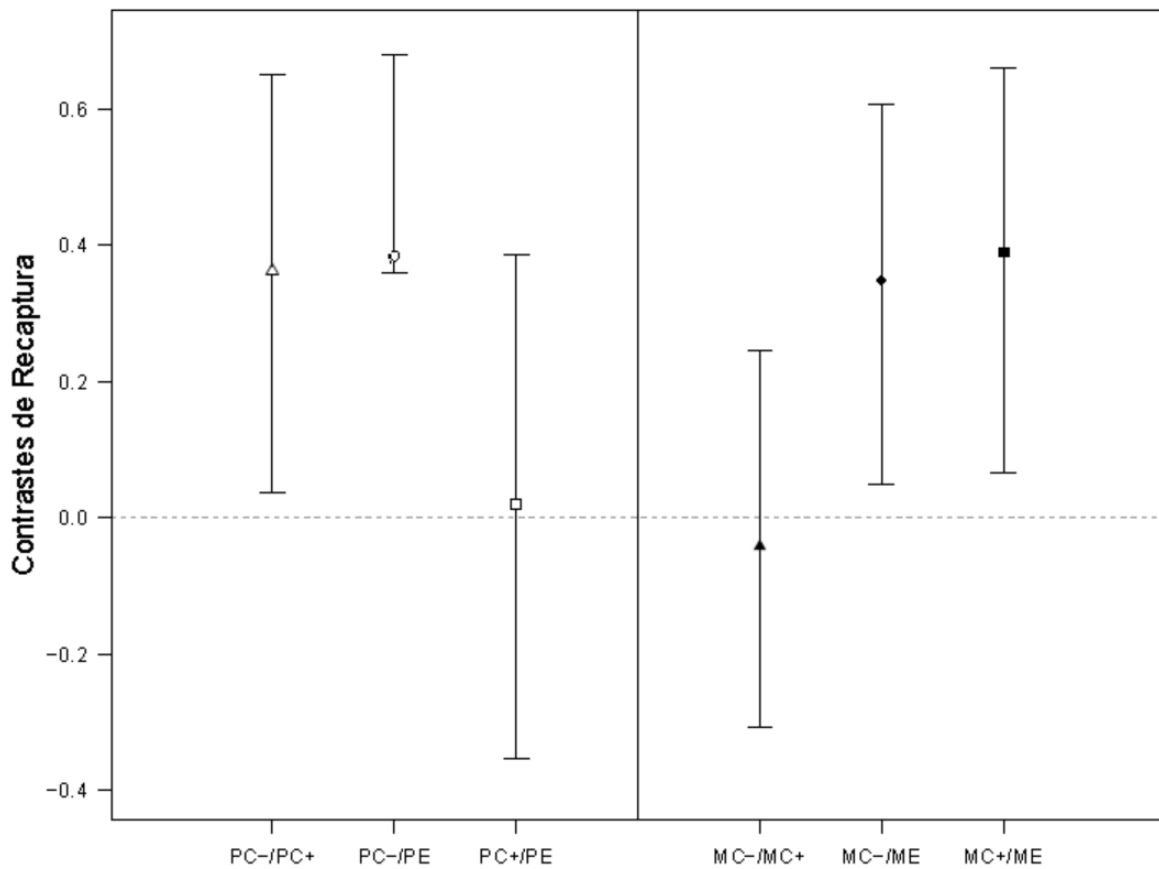
Las probabilidades de recaptura de los individuos del 2016 difieren según el grado de melanización (fig. 11, cuadro 4). Cuando los machos presentan poca melanina, el grupo c- ( $p_{c-} = 0.777$ ) tiene una mayor probabilidad de recaptura (fig. 11, cuadro 6), esta diferencia se observa en los contrastes con el grupo c+ ( $p_{c+} = 0.415$ ), ( $p_{c- \text{ vs. } c+} = 0.362$ , IC95% = 0.036 - 0.650; fig. 12, cuadro 6) y el e ( $p_e = 0.395$ ), ( $p_{c- \text{ vs. } e} = 0.383$ , IC 95% = 0.036 - 0.679; fig. 12, cuadro 6). No obstante, cuando el grado de melanización es alto, no existe una diferencia en recaptura entre grupos controles ( $p_{c-} = 0.703$ ,  $p_{c+} = 0.745$ ;  $p_{c- \text{ vs. } c+} = -0.042$ , IC95% = 0.308 - 0.244; fig. 12, cuadro 6) y por primera vez los individuos del grupo e con alto grado de melanización, presentan una menor probabilidad de recaptura ( $p_e = 0.356$ ) comparada con la de los controles, habiendo diferencias entre los contrastes ( $p_{c- \text{ vs. } e} = 0.347$ , IC95% = 0.048 - 0.607;  $p_{c+ \text{ vs. } e} = 0.389$ , IC95% = 0.066 - 0.659; fig.

12, cuadro 6).

**Cuadro 6:** Contrastes entre grupos de la probabilidad de recaptura del 2016.

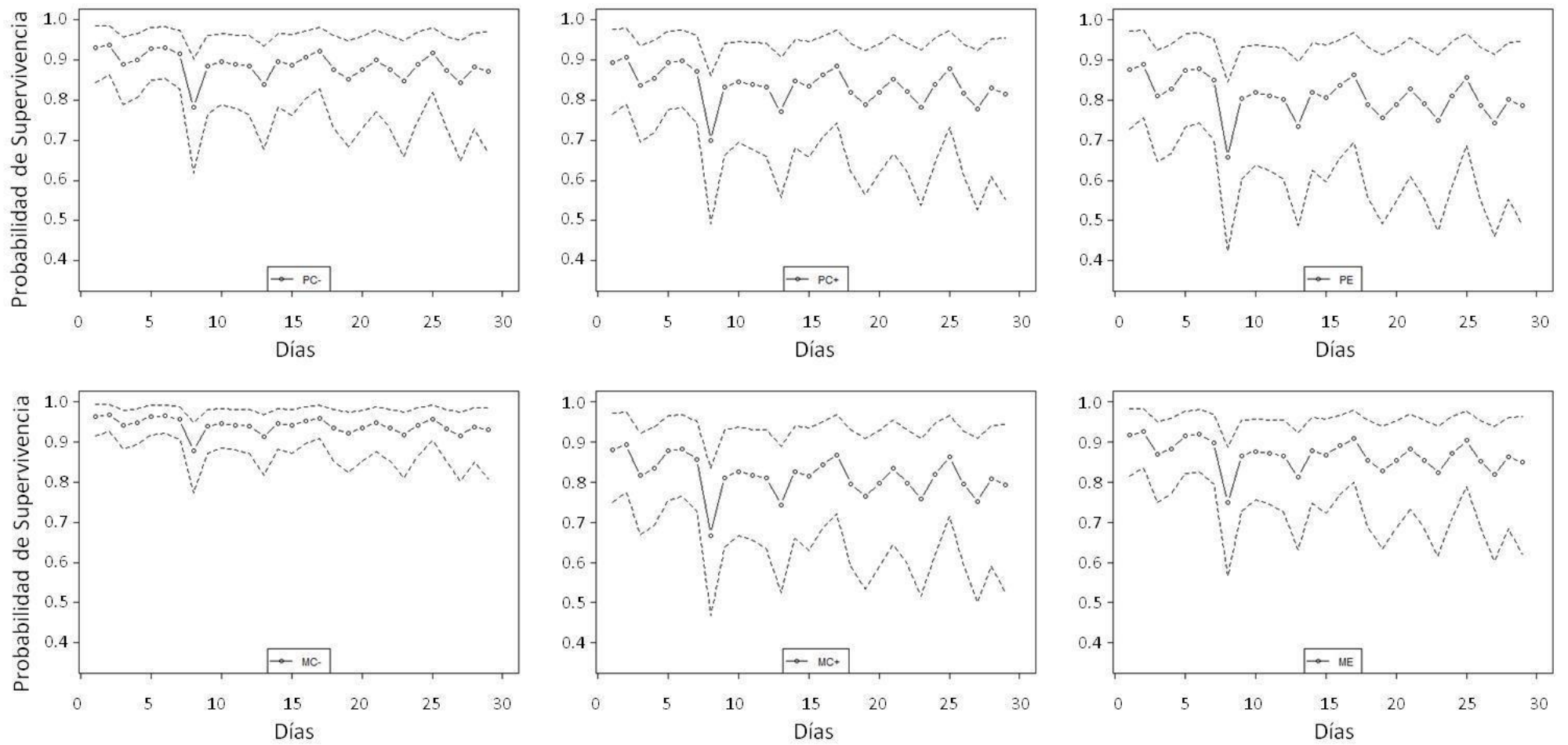
Contrastes Recaptura	Media	2.5 %	50.0 %	97.5 %	Rhat
c- vs. c+ poca melanización	0.362	0.036	0.369	0.650	<1.01
c- vs. e poca melanización	0.383	0.036	0.393	0.679	<1.01
c+ vs. e poca melanización	0.020	-0.354	0.022	0.386	<1.01
c- vs. c+ mucha melanización	-0.042	0.308	-0.047	0.244	<1.01
c- vs. e mucha melanización	0.347	0.048	0.353	0.607	<1.01
c+ vs. e mucha melanización	0.389	0.066	0.399	0.659	<1.01

Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e).



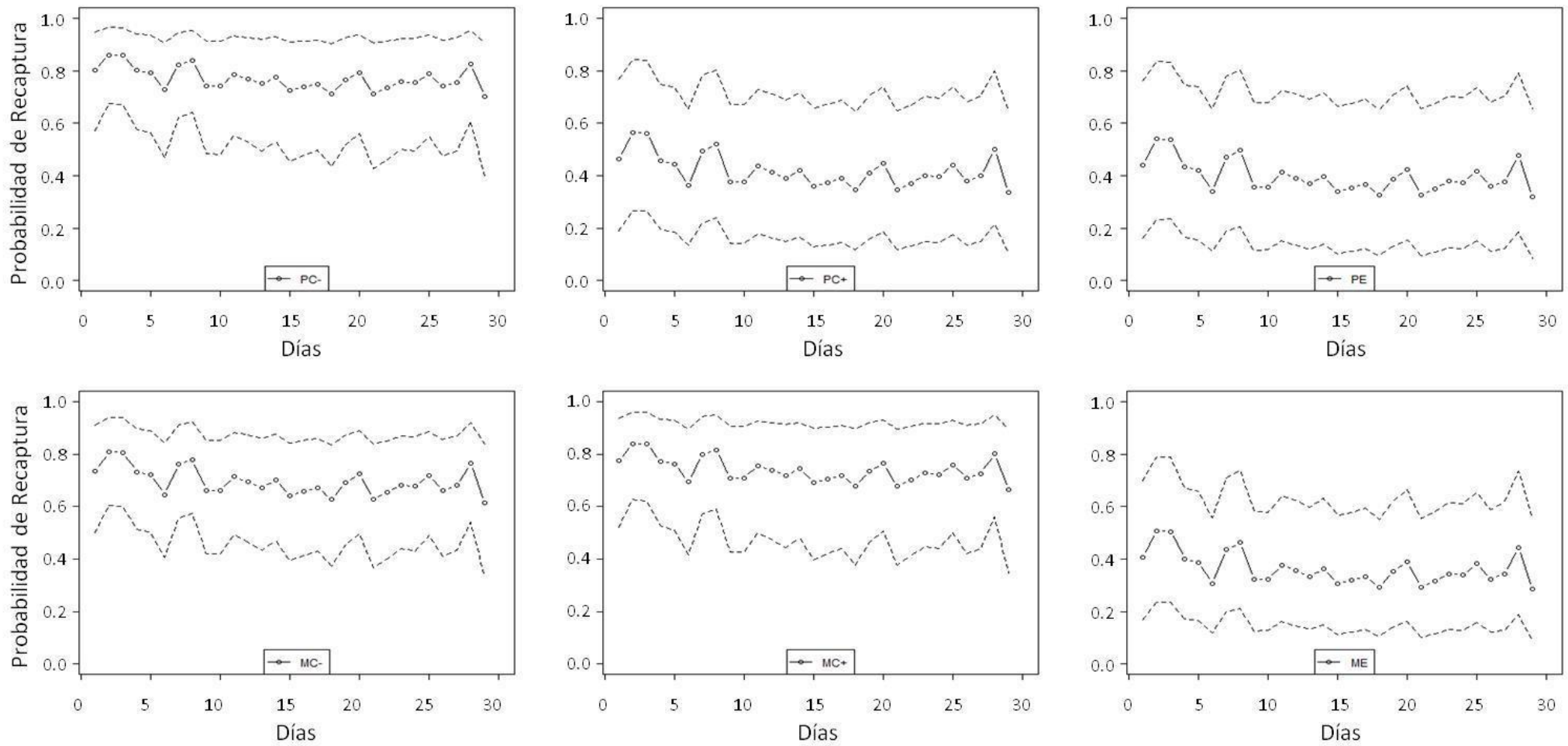
**Figura 12:** Contrastes entre grupos de la probabilidad de supervivencia del 2016. Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e). Melanización: poca (p), mucha (m).

Al igual que para el año 2015, para el 2016 también existe una amplia variación temporal en las probabilidades de supervivencia y recaptura (fig. 13 y 14), sin una tendencia al aumento o disminución. En este caso, el grupo c- con mucha melanina es el que presenta la menor amplitud en los intervalos de credibilidad (fig. 13).

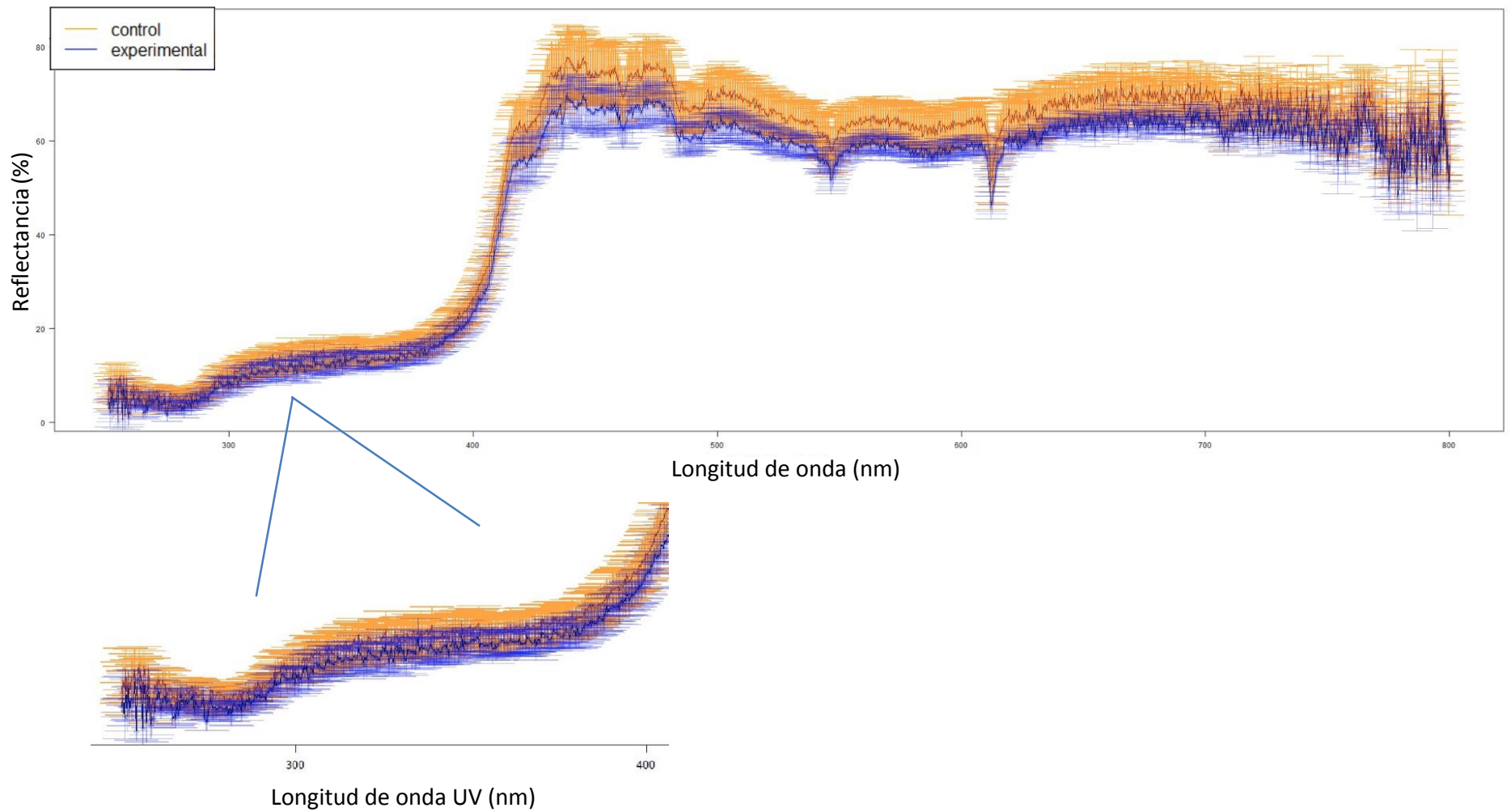


**Figura 13:** Probabilidad de supervivencia de cada grupo por día en el 2016. Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e). Melanización: poca (p), mucha (m).





**Figura 14:** Probabilidad de recaptura de cada grupo por día en el 2016. Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e). Melanización: poca (p), mucha (m).



**Figura 15:** Espectro de reflectancia del área alar transparente de machos (media y errores estándar): En color naranja el grupo control, en color azul el grupo experimental.

Como se mencionó anteriormente no existen diferencias relevantes en la estimación de los parámetros al incluir la variable del área alar roja para el año 2015 ni para el 2016, (apéndice 6 y 7 respectivamente) ya que la estimación de las diferencias entre los contratos de los grupos para ambos años (apéndice 8 y 9 respectivamente) sigue siendo la misma.

### *Mediciones espectrofotométricas*

El análisis visual de la gráfica del espectro de reflectancia nos indica que no existen diferencias entre los patrones de reflectancia de los dos grupos, ya que las barras de las desviaciones estándar se sobrelapan a lo largo de todo el espectro (fig. 15). Este es un patrón que no sucede al revisar los resultados gráficos de distintos trabajos donde encuentran diferencias en los espectros de reflectancia; ya sea graficando las medias con los errores estándar (Torres & Velando, 2007; Guillermo-Ferreira *et al.*, 2014) o con las desviaciones estándar, (Schultz & Fincke, 2009).

## Discusión

De manera general los resultados mostraron una probabilidad de supervivencia menor de los individuos del grupo experimental, comparado con el grupo control negativo, pero de los contrastes evaluados entre el grupo experimental y el control positivo, solo algunos presentaron diferencias. Aún así, existió una tendencia hacia lo esperado en las predicciones.

La disminución en la tasa de supervivencia al aumentar el rasgo puede deberse a que los individuos se presentan más llamativos hacia sus depredadores (como aves y arañas observadas en campo), casos como estos han sido reportados en calopterígidios, donde mediante la expresión natural del rasgo existe una mayor depredación por aves (Svensson & Friberg, 2007). Por otro lado, la exageración del rasgo aparte de influenciar la visibilidad hacia sus depredadores, también podría estar afectando la capacidad de las libélulas para atrapar a sus presas. Como lo han reportado anteriormente Grether & Grey (1996), una mayor visibilidad de los individuos por parte de sus presas debida a la pigmentación alar, ocasiona una baja eficiencia en la caza. Esto tiene como consecuencia que los individuos lleven a cabo una caza compensatoria, que a su vez aumenta su exposición a potenciales depredadores.

La tasa de recaptura del grupo experimental muestra un patrón similar al de supervivencia, ya que la recaptura del grupo experimental es consistentemente menor a la de los grupos controles y específicamente en los individuos muy melanizados del 2016 los contrastes muestran que la recaptura de los experimentales es menor. Una menor tasa de recaptura del grupo experimental puede deberse a que los individuos con pigmentación aumentada artificialmente no están siendo capaces de ganar y retener un territorio, suceso contrario a lo encontrado con la variación natural del rasgo, donde individuos más melanizados tienen una mayor probabilidad de ser territoriales (Córdoba-Aguilar *et al.*, 2007; Anderson & Grether, 2010a).

Individuos con alta melanización presentan una menor tasa de interacciones agonísticas entre congéneres, (tanto homoespecíficos como heteroespecíficos) posiblemente por ser una señal de su buena condición y capacidad de combate (Anderson & Grether 2010a, 2010b; Drury & Grether, 2014). Sin embargo, en este estudio al exagerar la señal obtuvimos una menor tasa de recaptura, lo que pudiese estar indicando que, aunque dichos individuos quizá estén evitando peleas, no están siendo capaces de retener un territorio, posiblemente por ser demasiado llamativos hacia sus depredadores (Grether 1997, Svensson y Friberg, 2007). Existen estudios en los que el rasgo evaluado, en lugar de ser aumentado es remplazado, como en el caso del trabajo de González-Santoyo y colaboradores (2014) en *H. americana*. En dicho estudio ocultaron con pigmento azul la mancha roja de los machos y los resultados indicaron una disminución en la condición y en la tasa de supervivencia de estos machos, lo cual atribuyen a una disminución en la capacidad de los individuos para evaluar la calidad de sus contendientes, ocasionando un aumento en las interacciones agonísticas.

El modelo ajustado en el cual no consideramos la heterogeneidad individual y el tiempo como variables aleatorias nos permitió corroborar la relevancia de incluir estas variables, ya que los valores de los parámetros estimados son distintos al modelo que los considera, con lo que corroboramos que el poder explicativo de los modelos que incluyen estas variables es mayor, tal como se ha reportado en otros estudios (Cooch *et al.*, 2002; Péron, *et al.*, 2010). Es importante considerar que hasta la fecha no existe un gran número de trabajos de captura-recaptura en el que incluyan la heterogeneidad individual, a pesar de que se ha comprobado la potencial influencia de esta variable en las estimaciones de supervivencia (Pradel *et al.*, 1997; Cooch *et al.*, 2002; Péron, *et al.*, 2010). Por otro lado, el incluir la variación de la pigmentación roja no tuvo mayor relevancia, ya que las diferencias en la supervivencia de los grupos condujeron al mismo resultado, lo cual corrobora lo encontrado por Olvera-Hernández (2016) donde el área de la mancha roja no tiene relación con la probabilidad de supervivencia de los machos de *H. titia*.

La variación temporal es un factor que puede influir en la dirección y magnitud de la selección natural, con lo cual estos gradientes de selección pueden ser significativamente diferentes de un año a otro (Siepielski, *et al.*, 2009). Sin embargo, en este caso al considerar esta posible variación y hacer el análisis mediante el estudio de dos años, obtuvimos una mejor validación de nuestros resultados, ya que obtuvimos las mismas conclusiones. Al obtener tendencias similares en ambos años, también comprobamos que no existe una fluctuación en los gradientes de selección de un año al otro. Cabe destacar que, a diferencia de las inferencias realizadas con máxima verosimilitud, la selección de modelos con análisis bayesianos es una metodología incipiente y no estandarizada (Hooten & Hobbs, 2015). A la fecha, existen diversas metodologías que se han empleado para la selección de modelos y aunque no se ha llegado a determinar la mejor de ellas parece ser que la más acertada hasta ahora para modelos complejos con variación temporal y espacial es “The Watanabe-Akaike information criterion” (WAIC) (Hooten & Hobbs, 2015). Sin embargo, su aplicación por las dificultades metodológicas que implica, no se ha generalizado.

Este estudio nos permitió analizar las consecuencias de la manipulación del rasgo en un periodo de tiempo largo, sin embargo, únicamente podemos hacer inferencias de las interacciones a corto plazo que pudiesen estar causando estas diferencias reflejadas en las probabilidades de supervivencia y recaptura a largo plazo. Para profundizar este estudio, podrían hacerse experimentos conductuales, por ejemplo, para comprobar que la diferencia en recaptura o supervivencia se deba a interacciones agonísticas diferenciales causadas por exagerar el rasgo (con individuos de los tres grupos de manipulación), podrían evaluarse combates en campo, como el trabajo realizado por Anderson y Grether (2010a), incitando a un macho a volar dentro del territorio de otro, atando al primero con un hilo transparente de 30 cm y registrando las características de esta interacción.

Se observó una alta variación en las tasas de supervivencia y recaptura por día, en mayor grado en los individuos manipulados en el área alar y en menor grado en

los no manipulados, comprobándose así que el tiempo es un factor importante a considerar. Esta variación temporal la atribuimos principalmente a las abundantes lluvias de la zona (Gutiérrez-García & Ricker, 2011), factor que pudiese estar afectando en mayor medida a los individuos manipulados. Por otro lado, desde el primer día del análisis los individuos manipulados se ven afectados en los dos parámetros estimados y este efecto continuó a lo largo de los días, pero sin mostrar una tendencia al aumento o la disminución, lo cual podría sugerir que no existe un efecto acumulado o diferencial por estos factores climáticos puntuales.

Los plumones con los que se marcaron las alas y en especial el plumón transparente han sido usados en estudios previos con esta especie (Drury & Grether, 2014; Grether *et al.*, 2015; Drury *et al.*, 2015) y en un estudio de supervivencia con *H. americana* (Barceló-Atilano, 2013), sin que hubiese reportes de que dichos plumones causaran alteraciones en las interacciones o en la supervivencia de los individuos, razón por la cual decidimos utilizarlos. Sin embargo, en este trabajo las probabilidades de supervivencia y recaptura del grupo control positivo tienen valores por debajo de lo esperado, lo cual puede deberse a que marcar las alas les afecta a los individuos por el simple hecho de la manipulación, ya sea por aumentar el peso en las alas de los individuos o por alteración de señales visuales. En un estudio similar González-Santoyo y colaboradores (2014) probaron que no hay un aumento en el peso de las alas al ser manipuladas con plumones, tanto el usado para el grupo experimental (en su caso azul) y el usado para el grupo control positivo (transparente).

Se sabe que existen componentes no visibles al ojo humano que actúan como señales en las interacciones de las libélulas de la familia Calopterygidae (Schultz, T. & Fincke, 2009; Guillermo-Ferreira *et al.* 2014). Los ojos de las libélulas pueden detectar colores desde la longitud de onda en luz UV (~300 nm) hasta la longitud de onda de luz visible (700 nm) (Bybee, *et al.*, 2012) y que ciertas especies de arañas (arañas han sido los principales depredadores de *H. titia* observados en campo en esta población) también tienen capacidad visual en el espectro de luz

UV (Walla, *et al.*, 1996; Lim & Li, 2006). Es por ello, que una hipótesis de por qué no encontramos diferencias entre las probabilidades de supervivencia del grupo control positivo y el experimental fue que estas señales pudiesen estarse viendo comprometidas al cambiar los patrones de reflectancia de las alas del grupo control positivo por manipularlas con marcador transparente. Sin embargo, en nuestro análisis no encontramos diferencias entre los espectros de reflectancia de los individuos que manipulamos con plumón transparente y los que no, por lo que es muy poco probable que el plumón transparente esté afectando señales visuales intra o interespecíficas.

Por otro lado, un factor importante por el cual no se encontraron diferencias significativas entre los grupos podría ser la gran variación interindividual en la expresión de la mancha alar melanizada que presenta *H. titia* (Barceló-Atilano, 2013; Drury *et al.*, 2015). Esta variación es mayor a la que presentan otros congéneres como *H. americana*, donde en estudios similares si se han encontrado diferencias significativas (Grether, 1997 y Barceló-Atilano, 2013). Esto significa que la manipulación en *H. titia* estaría siendo muy variable y de mayor magnitud para aquellos individuos que originalmente presenten un área melanizada pequeña. Como lo menciona Andersson (1982) un ornamento exacerbado en fenotipos de baja calidad (como lo estarían siendo aquellos manipulados, pero poco melanizados originalmente) aumenta su probabilidad de ser depredados, en comparación a individuos de mejor condición. Aunado a esto, sabemos que el tamaño de la mancha negra está relacionado positivamente con la cantidad de reservas energéticas en los machos (Castaños *et al.*, 2017), lo cual puede explicar por qué en general las diferencias en la probabilidad de supervivencia entre grupos parecen ser más evidentes para los individuos que presentan poca melanización natural.

En este trabajo fue posible observar una tendencia hacia la disminución en la probabilidad de supervivencia de machos de *H. titia* con un aumento artificial del área melanizada, comparado con individuos no manipulados. Esto nos permite



especular que posiblemente si existe un costo en supervivencia al portar el carácter y quizá los pigmentos presentes en los machos de *H. titia* no son señales multicomponentes redundantes, si no complementarias, donde cada pigmento este indicando diferentes aspectos de la condición (Moller & Pomiankowski, 1993; Hebets, 2005).

Según la “hipótesis de ambientes fluctuantes” puede existir más de una señal en la transmisión de un mensaje y una de ellas puede ser la que transmita la información cuando los recursos son limitados y la otra cuando los recursos son abundantes (Bro-Jørgensen, 2010). En el estudio de Castaños y colaboradores (2017) se encontró que el polifenismo estacional de los machos de *H. titia* está ligado a su condición fisiológicas, ya que los machos de la temporada temprana (con poca melanina), presentan menos reservas energéticas que los machos de la temporada tardía (muy melanizados), relación que atribuimos a los costos de producción del rasgo ligados a los recursos disponibles de cada temporada. Dada esta relación la pigmentación roja estaría siendo el señalizador en una temporada y la pigmentación negra en la otra, reforzando así la hipótesis de que las dos pigmentaciones de los machos de *H. titia* son señales multicomponentes complementarias ligadas a la disponibilidad de recursos.

Grether (1997) reportó un caso en el que la exageración en la pigmentación alar de *H. americana* posiblemente afecte su supervivencia, atribuyéndolo a sucesos como un aumento en la depredación (aunque esta no fue cuantificada). Por otra parte, el estudio de Grether no consideró la detectabilidad imperfecta, lo cual significa que registró el último día de observación de los individuos como el día de su muerte, por lo que pudo haber subestimado su longevidad. Mediante métodos de captura-recaptura que consideran la detectabilidad imperfecta, nosotros obtuvimos una tendencia similar a lo reportado por Grether, pero en *H. titia*, sin embargo, como propuestas a futuro consideramos necesario realizar más estudios para profundizar en los costos de esta melanización. Por ejemplo, un estudio donde se cuantificara la depredación, como el realizado por Svensson y Friberg

(2007), en el que gracias a que el depredador de calopterígidios que ellos localizaron, desechaba las alas de éstos en zonas específicas, pudieron medir la tasa de depredación de diferentes especies a través de las alas desechadas. Si en la zona de estudio se encontrara un depredador que deje rastros de los individuos como en el estudio de Svensson y Friberg (2007) podríamos cuantificar la tasa de depredación de nuestros tres grupos experimentales y con ello comprobar si la supervivencia diferencial encontrada en este estudio es consecuencia de depredación. Por otro lado, también podría estimarse la tasa de forrajeo de cada grupo experimental, mediante observaciones de 20 minutos en las que se cuantifiquen los intentos de captura de presa, como en el estudio realizado por Grether & Grey (1996).

Estudios fisiológicos también podrían completar información acerca de los costos del rasgo estudiado, por ejemplo, con un estudio que ya hemos comenzado en el que estamos estimando las diferencias en reservas energéticas de individuos de los 3 grupos experimentales después de permanecer con esta manipulación de 3 a 4 días en vida silvestre, lo cual nos brindará información acerca de los costos del carácter en un periodo más corto de tiempo a nivel fisiológico. Por último, un estudio que complementaría la parte fisiológica sería la cuantificación de la respuesta inmune asociada a la expresión del carácter, insertando implantes de nailon y midiendo la respuesta inmune a través de la melanización del implante, como lo realizado por Contreras-Garduño y colaboradores (2006).

## Referencias (del Segundo capítulo)

- Abràmoff, M.D., Magalhães, P. J. & Ram, S. J. (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, **11**, 36-42.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Gaillard, M., Prost, J., Faivre, B., & Sorci, G. (2004) An experimental test of the dose-dependent effect of carotenoids and immune activation on sexual signals and antioxidant activity. *The American Naturalist*, **164**, 651-659.
- Álvarez, H. A., Serrano-Meneses, M. A., Reyes-Márquez, I., Jiménez-Cortés, J. G., & Córdoba-Aguilar, A. (2013) Allometry of a sexual trait in relation to diet experience and alternative mating tactics in two rubyspot damselflies (Calopterygidae: Hetaerina). *Biological Journal of the Linnean Society*, **108**, 521-533.
- Anderson, C. N., Córdoba-Aguilar, A., Drury, J. P., & Grether, G. F. (2011) An assessment of marking techniques for odonates in the family Calopterygidae. *Entomologia experimentalis et applicata*, **141**, 258-261.
- Anderson, C. N. & Grether, G. F. (2010a) Interspecific aggression and character displacement of competitor recognition in *Hetaerina* damselflies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **277**, 549-555.
- Anderson, C. N. & Grether, G. F. (2010b) Character displacement in the fighting colours of *Hetaerina* damselflies. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **277**, 3669–3675.
- Andersson, M. (1982) Sexual selection, natural selection and quality advertisement. *Biological Journal of the Linnean Society*, **17**, 375-393.

- Andersson, M. (1994) *Sexual selection*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- Bailey, W. J., & Haythornthwaite, S. (1998) Risks of calling by the field cricket *Teleogryllus oceanicus*; potential predation by Australian long-eared bats. *Journal of Zoology*, **244**, 505-513.
- Barceló-Atilano, A. (2013) Dimorfismo sexual, caracteres sexuales secundarios y supervivencia diferencial en la libélula de alas pigmentadas, *Hetaerina americana* (Fabricius, 1798) (Odonata, Calopterygidae). Tesis de licenciatura. Universidad de las Américas de Puebla. 58 pp.
- Berglund, A., Bisazza, A., y Pilastro, A. (1996) Armaments and ornaments: an evolutionary explanation of traits of dual utility. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**, 385-399
- Blount, J. D., Metcalfe, N. B., Birkhead, T. R., & Surai, P. F. (2003) Carotenoid modulation of immune function and sexual attractiveness in zebra finches. *Science*, **300**, 125-127.
- Bro-Jørgensen, J. (2010) Dynamics of multiple signalling systems: animal communication in a world in flux. *Trends in Ecology & Evolution*, **25**, 292-300.
- Bybee, S. M., Johnson, K. K., Gering, E. J., Whiting, M. F., & Crandall, K. A. (2012) All the better to see you with: a review of odonate color vision with transcriptomic insight into the odonate eye. *Organisms Diversity & Evolution*, 1-10.
- Castaños, C. E., Córdoba-Aguilar, A. and Munguía-Steyer, R. (2017) Physiological condition and wing pigmentation expression in a damselfly with seasonal polyphenism. *Physiological Entomology*, **42**, 346-354.

- Contreras-Garduño, J., Canales-Lazcano, J., & Córdoba-Aguilar, A. (2006) Wing pigmentation, immune ability, fat reserves and territorial status in males of the rubyspot damselfly, *Hetaerina americana*. *Journal of Ethology*, **24**, 165-173.
- Contreras-Garduño, J., Buzatto, B. A., Serrano-Meneses, M. A., Nájera-Cordero, K., & Córdoba-Aguilar, A. (2008) The size of the red wing spot of the American rubyspot as a heightened condition-dependent ornament. *Behavioral Ecology*, **19**, 724-732.
- Contreras-Garduño, J., Lanz-Mendoza, H., y Córdoba-Aguilar, A. (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.
- Cooch, E. G., Cam, E., & Link, W. (2002) Occam's shadow: Levels of analysis in evolutionary ecology--where to next? *Journal of Applied Statistics*, **29**, 19-48.
- Cordero-Rivera, A., & Stoks, R. (2008). Mark-recapture studies and demography. *Dragonflies and damselflies: model organisms for ecological and evolutionary research*, 7-20.
- Córdoba-Aguilar A. (ed) (2008) *Dragonflies and Damselflies: Model organisms of ecological and evolutionary research*. (pp. 153-166). New York: Oxford University Press.
- Córdoba-Aguilar, A., Lesher-Trevino, A. C. & Anderson, C. N. (2007) Sexual selection in *Hetaerina titia* males: a possible key species to understand the evolution of pigmentation in calopterygid damselflies (Odonata: Zygoptera). *Behaviour* **144**, 931-952.

- Córdoba-Aguilar, A. & Cordero-Rivera, A. (2005) Evolution and ecology of Calopterygidae (Zygoptera: Odonata): status of knowledge and research perspectives. *Neotropical Entomology*, **34**, 861-879.
- Córdoba-Aguilar, A., & Munguía-Steyer, R. (2013) The sicker sex: understanding male biases in parasitic infection, resource allocation and fitness. *PloS One*, **8**, e76246.
- Drury, J. P. & Grether, G. F. (2014) Interspecific aggression, not interspecific mating, drives character displacement in the wing coloration of male rubyspot damselflies (*Hetaerina*). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **281**, 20141737.
- Drury, J. P., Anderson, C.N. & Grether, G.F. (2015) Seasonal polyphenism in wing coloration affects species recognition in rubyspot damselflies (*Hetaerina spp.*). *Journal of Evolutionary Biology*, **28**, 1439-1452.
- Endler, J. A. (1978) A predator's view of animal color patterns. *Evolutionary Biology*, **11**, 319–364.
- Endler, J. A. (1980) Natural selection on color patterns in *Poecilia reticulata*. *Evolution*, **34**, 76–91.
- Gimenez, O., Gregoire, A., & Lenormand, T. (2009) Estimating and visualizing fitness surfaces using mark–recapture data. *Evolution* **63**, 3097-3105.
- González-Santoyo, I., González-Tokman, D.M., Munguía-Steyer, R.E. & Córdoba-Aguilar, A. (2014) A mismatch between the perceived fighting signal and fighting ability reveals survival and physiological costs for bearers. *PLoS ONE*, **9**, e84571.

- González-Tokman, D. M., Munguía-Steyer, R., González-Santoyo, I., Baena-Díaz, F. S., & Córdoba-Aguilar, A. (2012) Support for the immunocompetence handicap hypothesis in the wild: hormonal manipulation decreases survival in sick damselflies. *Evolution*, **66**, 3294-3301.
- Gordon, S. P., López-Sepulcre, A., & Reznick, D. N. (2012) Predation-associated differences in sex linkage of wild guppy coloration. *Evolution*, **66**, 912-918.
- Grant, P. R., & Grant, B. R. (1995) Predicting microevolutionary responses to directional selection on heritable variation. *Evolution*, **49**, 241-251.
- Grether, G. F. (1996) Sexual selection and survival selection on wing coloration and body size in the rubyspot damselfly *Hetaerina americana*. *Evolution*, **50**, 1939-1948.
- Grether, G. F. (1997) Survival cost of an intrasexually selected ornament in a damselfly. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **264**, 207-210.
- Grether, G. F., Drury, J. P., Berlin, E. & Anderson, C.N. (2015) The role of wing coloration in sex recognition and competitor recognition in rubyspot damselflies (*Hetaerina spp.*). *Ethology*, **121**, 674-685.
- Grether, G. F. & Grey, R. M. (1996) Novel cost of a sexually selected trait in the rubyspot damselfly *Hetaerina americana*: conspicuousness to prey. *Behavioral Ecology*, **7**, 465-473.
- Guillermo-Ferreira, R., Gorb, S. N., Appel, E., Kovalev, A., & Bispo, P. C. (2015) Variable assessment of wing colouration in aerial contests of the red-winged damselfly *Mnesarete pudica* (Zygoptera, Calopterygidae). *The Science of*

*Nature*, **102**, 13.

Guillermo-Ferreira, R., Therézio, E. M., Gehlen, M. H., Bispo, P. C., & Marletta, A. (2014) The role of wing pigmentation, UV and fluorescence as signals in a Neotropical damselfly. *Journal of insect behavior*, **27**, 67-80.

Gutiérrez-García, G., y Ricker, M. (2011) Climate and climate change in the region of Los Tuxtlas (Veracruz, Mexico): A statistical analysis. *Atmósfera*, **24**, 347-373.

Hebets, E. A., & Papaj, D. R. (2005) Complex signal function: developing a framework of testable hypotheses. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **57**, 197-214.

Hooten, M. B., & Hobbs, N. T. (2015) A guide to Bayesian model selection for ecologists. *Ecological Monographs*, **85**, 3-28.

Houde, A. E., & Endler, J. A. (1990) Correlated evolution of female mating preferences and male color patterns in the guppy *Poecilia reticulata*. *Science (Washington)*, **248**, 1405-1408.

Jiménez-Cortés, J. G., Serrano-Meneses, M.A. & Córdoba-Aguilar, A. (2012) The effects of food shortage during larval development on adult body size, body mass, physiology and developmental time in a tropical damselfly. *Journal of Insect Physiology*, **58**, 318-326.

Johnston, J. P., Peach, W. J., Gregory, R. D., & White, S. A. (1997) Survival rates of tropical and temperate passerines: a Trinidadian perspective. *The American Naturalist*, **150**, 771-789.

Kéry, M. & M. Schaub. (2012) *Bayesian population analysis using WinBUGS*. Academic Press, Burlington, MA.



- Lebreton, J. D., Burnham, K. P., Clobert, J., y Anderson, D. R. (1992). Modeling survival and testing biological hypotheses using marked animals: a unified approach with case studies. *Ecological Monographs*, **62**, 67-118.
- Lim, M. L., & Li, D. (2006) Behavioural evidence of UV sensitivity in jumping spiders (Araneae: Salticidae). *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, **192**, 871-878.
- McGraw, K. J., & Ardia, D. R. (2003) Carotenoids, immunocompetence, and the information content of sexual colors: an experimental test. *The American Naturalist*, **162**, 704-712.
- Møller, A. P. (1996) The cost of secondary sexual characters and the evolution of cost-reducing traits. *Ibis*, **138**, 112-119.
- Møller, A. P., & Pomiankowski, A. (1993) Why have birds got multiple sexual ornaments? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **32**, 167-176.
- Naef-Daenzer, B., Widmer, F., & Nuber, M. (2001) Differential post-fledging survival of great and coal tits in relation to their condition and fledging date. *Journal of Animal ecology*, **70**, 730-738.
- Narins, P. M., & Capranica, R. R. (1976) Sexual differences in the auditory system of the tree frog *Eleutherodactylus coqui*. *Science*, **192**, 378-380.
- Olvera-Hernández, M. (2016) Supervivencia diferencial de los machos de *Hetaerina titia* (Drury, 1773) (Odonata: Zygoptera) en relación al área alar pigmentada. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 62 pp.

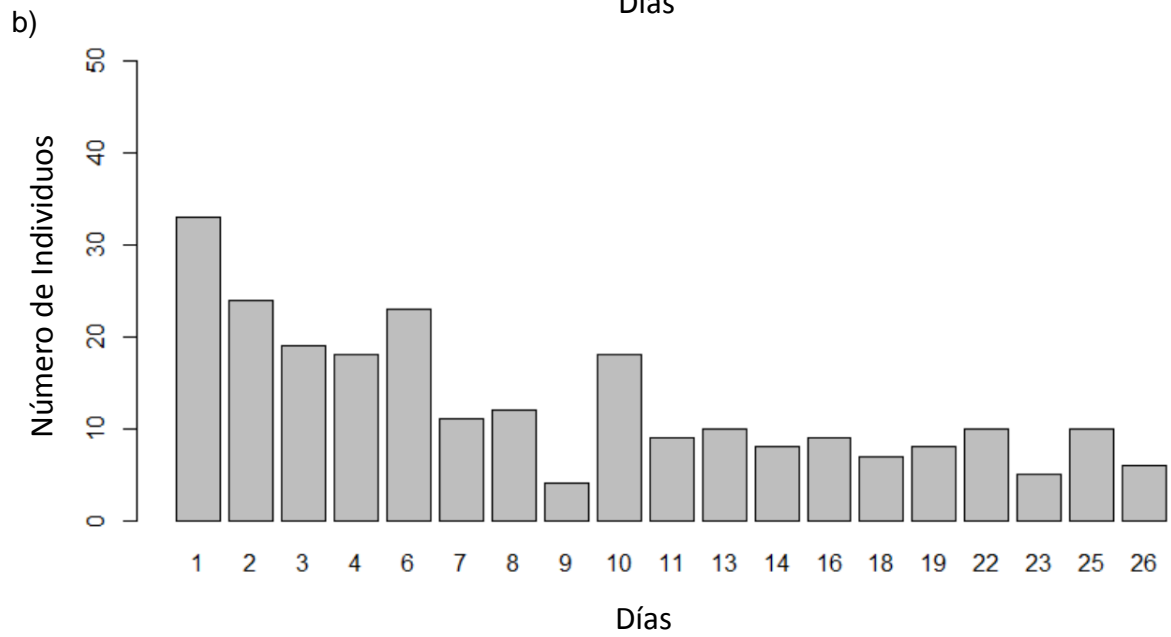
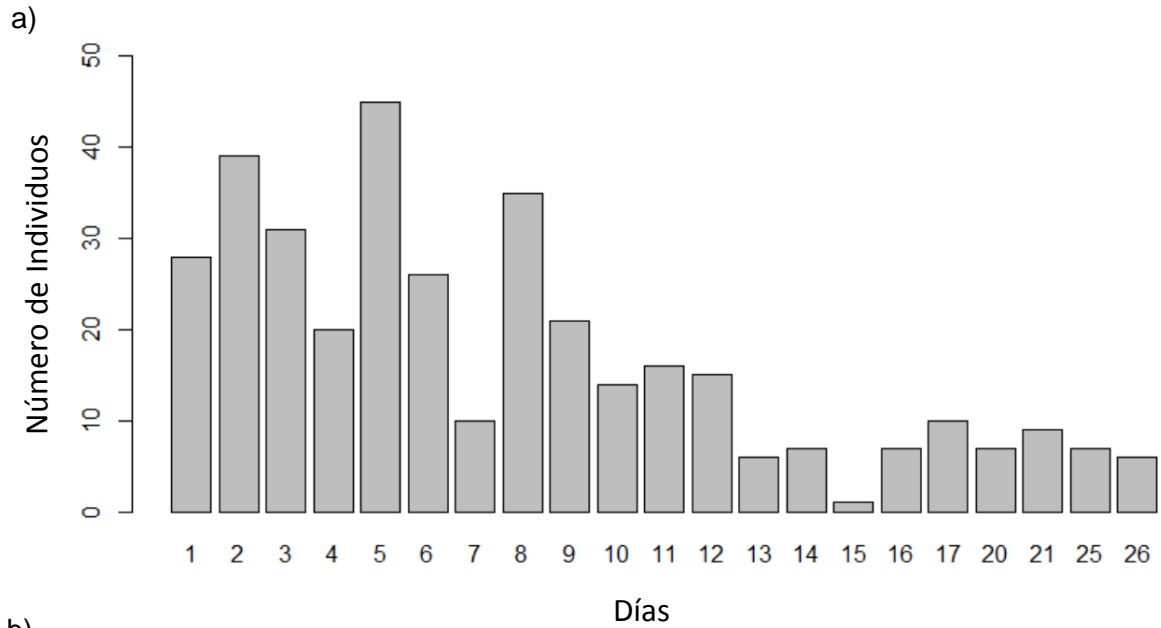
- Outomuro, D., Cordero-Rivera, A., Nava-Bolaños, A., & Córdoba-Aguilar, A. (2014) Does allometry of a sexually selected ornamental trait vary with sexual selection intensity? A multispecies test in damselflies. *Ecological Entomology*, **39**, 399- 403.
- Péron, G., Crochet, P. A., Choquet, R., Pradel, R., Lebreton, J. D., & Gimenez, O. (2010) Capture–recapture models with heterogeneity to study survival senescence in the wild. *Oikos*, **119**, 524-532.
- Plaistow, S., & Siva-Jothy, M. T. (1996) Energetic constraints and male mate-securing tactics in the damselfly *Calopteryx splendens xanthostoma* (Charpentier). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **263**, 1233-1239.
- Plummer, M. (2013) JAGS version 3.4.0. *Manual. International Agency for Research on Cancer. Available at: <http://mcmc-jags.sourceforge.net/>*
- Pradel, R., Hines, J. E., Lebreton, J. D., & Nichols, J. D. (1997) Capture-recapture survival models taking account of transients. *Biometrics*, 60-72.
- Rantala, M. J., Koskimäki, J., Taskinen, J., Tynkkynen, K., & Suhonen, J. (2000) Immunocompetence, developmental stability and wingspot size in the damselfly *Calopteryx splendens* L. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **267**, 2453-2457.
- R Core Team (2016) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rowe, C. (1999) Receiver psychology and the evolution of multicomponent signals. *Animal Behaviour*, **58**, 921-931.

- Sakaluk, S. K., & Belwood, J. J. (1984) Gecko phonotaxis to cricket calling song: a case of satellite predation. *Animal Behaviour*, **32**, 659-662.
- Schultz, T. D., & Fincke, O. M. (2009) Structural colours create a flashing cue for sexual recognition and male quality in a Neotropical giant damselfly. *Functional Ecology*, **23**, 724-732.
- Serrano-Meneses, M. A., Córdoba-Aguilar, A., Méndez, V., Layen, S. J., y Székely, T. (2007) Sexual size dimorphism in the American rubyspot: male body size predicts male competition and mating success. *Animal Behaviour*, **73**, 987-997.
- Siepielski, A. M., DiBattista, J. D., & Carlson, S. M. (2009) It's about time: the temporal dynamics of phenotypic selection in the wild. *Ecology Letters*, **12**, 1261-1276.
- Siva-Jothy, M. T. (1999) Male wing pigmentation may affect reproductive success via female choice in a calopterygid damselfly (Zygoptera). *Behaviour*, **136**, 1365-1377.
- Siva-Jothy, M. T. (2000) A mechanistic link between parasite resistance and expression of a sexually selected trait in a damselfly. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **267**, 2523-2527.
- Spendelov, J. A., Nichols, J. D., Nisbet, I. C., Hays, H., Cormons, G. D., Burger, J., & Gochfeld, M. (1995). Estimating annual survival and movement rates of adults within a metapopulation of Roseate Terns. *Ecology*, **76**, 2415-2428.
- Stuart-Fox, D. M., (2005) Deception and the origin of honest signals. *Trends in Ecology & Evolution*, **20**, 521-523.
- Stuart-Fox, D. M., Moussalli, A., Marshall, N. J., & Owens, I. P. (2003)

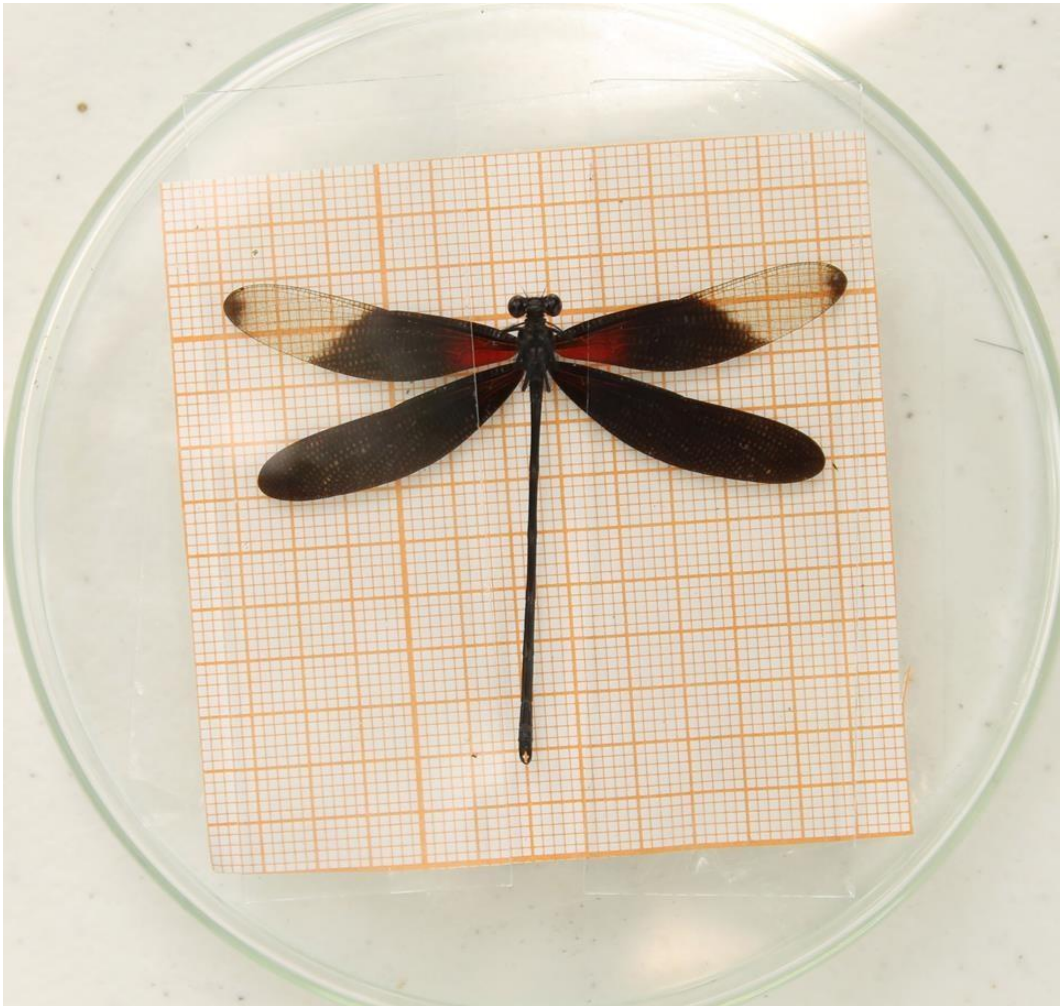
- Conspicuous males suffer higher predation risk: visual modelling and experimental evidence from lizards. *Animal Behaviour*, **66**, 541-550.
- Su, Y. & M. Yajima. (2012) R2jags: A package for running JAGS from R. R package version 0.03-08. <http://CRAN.R-project.org/package=R2jags>
- Svensson, E. I., & Friberg, M. (2007) Selective predation on wing morphology in sympatric damselflies. *The American Naturalist*, **170**, 101-112.
- Torres, R., & Velando, A. (2007) Male reproductive senescence: the price of immune-induced oxidative damage on sexual attractiveness in the blue-footed booby. *Journal of Animal Ecology*, **76**, 1161-1168.
- Tynkkynen, K., Kotiaho, J. S., Luojumäki, M., & Suhonen, J. (2006) Interspecific territoriality in *Calopteryx* damselflies: the role of secondary sexual characters. *Animal Behaviour*, **71**, 299-306.
- Waage, J. K. (1973). Reproductive behavior and its relation to territoriality in *Calopteryx maculata* (Beauvois) (Odonata: Calopterygidae). *Behaviour*, **47**, 240-256.
- Walla, P., Barth, F. G., & Eguchi, E. (1996) Spectral Sensitivity of Single Photoreceptor Cells in the Eyes of the Ctenid Spicier *Cupiennius salei* Keys. *Zoological Science*, **13**, 199-202.
- White, G. C., y Burnham, K. P. (1999) Program MARK: survival estimation from populations of marked animals. *Bird study*, **46**, 120-S139.
- Zahavi, A. (1975) Mate selection—a selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology*, **53**, 205-214.

## Apéndices

**Apéndice 1:** Número de individuos capturados y marcados por día en a) el 2015, b) el 2016.



**Apéndice 2:** Ejemplo de montaje de individuos para la toma de fotografía.



**Apéndice 3:** Parámetros 2015  $\phi(\text{mel} * \text{manip} + \text{hi} + \text{t})$   $p(\text{mel} * \text{manip} + \text{hi} + \text{t})$ . Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e).

<b>Parámetros</b>	<b>Media</b>	<b>2.5 %</b>	<b>50.0 %</b>	<b>97.5 %</b>	<b>Rhat</b>
Supervivencia poca melanización c-	0.933	0.874	0.937	0.972	<1.01
Supervivencia poca melanización c+	0.679	0.462	0.686	0.855	<1.01
Supervivencia poca melanización e	0.653	0.437	0.659	0.835	<1.01
Supervivencia mucha melanización c-	0.889	0.800	0.894	0.948	<1.01
Supervivencia mucha melanización c+	0.827	0.702	0.834	0.914	<1.01
Supervivencia mucha melanización e	0.781	0.575	0.793	0.923	<1.01

Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e).

**Apéndice 4:** Parámetros de supervivencia del 2015 del modelo  $\phi(\text{mel} * \text{manip}) \rho(\text{mel} * \text{manip})$ .

Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e).

<b>Parámetros</b>	<b>Media</b>	<b>2.5 %</b>	<b>50.0 %</b>	<b>97.5 %</b>	<b>Rhat</b>
Supervivencia poca melanización c-	0.918	0.891	0.919	0.942	<1.01
Supervivencia poca melanización c+	0.804	0.746	0.805	0.857	<1.01
Supervivencia poca melanización e	0.678	0.592	0.679	0.757	<1.01
Supervivencia mucha melanización c-	0.895	0.866	0.895	0.920	<1.01
Supervivencia mucha melanización c+	0.833	0.793	0.834	0.870	<1.01
Supervivencia mucha melanización e	0.835	0.791	0.836	0.875	<1.01
Recaptura poca melanización c-	0.725	0.678	0.725	0.769	<1.01
Recaptura poca melanización c+	0.388	0.301	0.387	0.479	<1.01
Recaptura poca melanización e	0.525	0.398	0.524	0.653	<1.01
Recaptura mucha melanización c-	0.733	0.689	0.733	0.774	<1.01
Recaptura mucha melanización c+	0.392	0.332	0.392	0.454	<1.01
Recaptura mucha melanización e	0.222	0.171	0.221	0.277	<1.01
Devianza	2741.520	2671.513	2740.835	2814.656	<1.01

Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e).

**Apéndice 5:** Contrastes entre grupos de la probabilidad de supervivencia del 2015 del modelo

$\phi(\text{mel} * \text{manip}) \rho(\text{mel} * \text{manip})$ .

<b>Contrastes Supervivencia</b>	<b>Media</b>	<b>2.5 %</b>	<b>50.0 %</b>	<b>97.5 %</b>	<b>Rhat</b>
c- vs. c+ poca melanización	0.114	0.054	0.113	0.178	<1.01
c- vs. e poca melanización	0.240	0.156	0.239	0.333	<1.01
c+ vs. e poca melanización	0.126	0.028	0.126	0.229	<1.01
c- vs. c+ mucha melanización	0.061	0.016	0.061	0.109	<1.01
c- vs. e mucha melanización	0.059	0.011	0.059	0.111	<1.01
c+ vs. e mucha melanización	-0.002	-0.057	-0.002	0.054	<1.01

Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e).

**Apéndice 6:** Parámetros de supervivencia del 2015 del modelo  $\phi(\text{mel} * \text{manip} + \text{hi} + \text{t} + \text{rojo}) p(\text{mel} * \text{manip} + \text{hi} + \text{t} + \text{rojo})$ .

<b>Parámetros</b>	<b>Media</b>	<b>2.5 %</b>	<b>50.0 %</b>	<b>97.5 %</b>	<b>Rhat</b>
Supervivencia poca melanización c-	0.934	0.893	0.936	0.966	<1.01
Supervivencia poca melanización c+	0.821	0.711	0.827	0.903	<1.01
Supervivencia poca melanización e	0.693	0.509	0.701	0.834	<1.01
Supervivencia mucha melanización c-	0.901	0.849	0.903	0.940	<1.01
Supervivencia mucha melanización c+	0.866	0.790	0.870	0.923	<1.01
Supervivencia mucha melanización e	0.867	0.776	0.872	0.932	<1.01
Recaptura poca melanización c-	0.612	0.383	0.619	0.801	<1.01
Recaptura poca melanización c+	0.286	0.113	0.273	0.528	<1.01
Recaptura poca melanización e	0.305	0.091	0.286	0.622	<1.01
Recaptura mucha melanización c-	0.660	0.447	0.666	0.830	<1.01
Recaptura mucha melanización c+	0.210	0.092	0.201	0.376	<1.01
Recaptura mucha melanización e	0.087	0.030	0.079	0.185	<1.01
Supervivencia het. individual	0.818	0.188	0.831	1.312	<1.01
Supervivencia het. individual y tiempo	0.348	0.022	0.319	0.864	<1.01
Recaptura het. individual	2.264	1.835	2.255	2.745	<1.01
Recaptura het. individual y tiempo	0.303	0.065	0.302	0.543	<1.01
Supervivencia rojo	0.134	-0.111	0.133	0.390	<1.01
Recaptura rojo	-0.419	-0.843	-0.418	-0.005	<1.01
Devianza	2076.793	19997.168	2076.178	2160.545	<1.01

Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e).



**Apéndice 7:** Parámetros de supervivencia del 2016 del modelo  $\phi(\text{mel} * \text{manip} + \text{hi} + \text{t} + \text{rojo}) p(\text{mel} * \text{manip} + \text{hi} + \text{t} + \text{rojo})$ .

<b>Parámetros</b>	<b>Media</b>	<b>2.5 %</b>	<b>50.0 %</b>	<b>97.5 %</b>	<b>Rhat</b>
Supervivencia poca melanización c-	0.908	0.849	0.911	0.951	<1.01
Supervivencia poca melanización c+	0.868	0.774	0.873	0.934	<1.01
Supervivencia poca melanización e	0.841	0.717	0.847	0.924	<1.01
Supervivencia mucha melanización c-	0.953	0.922	0.954	0.976	<1.01
Supervivencia mucha melanización c+	0.841	0.749	0.845	0.911	<1.01
Supervivencia mucha melanización e	0.889	0.815	0.892	0.942	<1.01
Recaptura poca melanización c-	0.803	0.580	0.818	0.872	<1.01
Recaptura poca melanización c+	0.371	0.142	0.359	0.460	<1.01
Recaptura poca melanización e	0.355	0.114	0.339	0.450	<1.01
Recaptura mucha melanización c-	0.723	0.516	0.732	0.795	<1.01
Recaptura mucha melanización c+	0.773	0.522	0.789	0.854	<1.01
Recaptura mucha melanización e	0.331	0.133	0.319	0.407	<1.01
Supervivencia het. individual	0.658	0.061	0.671	1.220	<1.01
Supervivencia het. individual y tiempo	0.654	0.234	0.632	1.197	<1.01
Recaptura het. individual	2.563	2.051	2.546	3.173	<1.01
Recaptura het. individual y tiempo	0.436	0.129	0.433	0.753	<1.01
Supervivencia rojo	0.103	-0.107	0.101	0.326	<1.01
Recaptura rojo	0.073	-0.380	0.070	0.537	<1.01
Devianza	1574.913	1501.550	1574.382	1651.444	<1.01

Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e).

**Apéndice 8:** Contrastes entre grupos de la probabilidad de supervivencia del 2015 del modelo  $\varphi(\text{mel} * \text{manip} + \text{hi} + \text{t} + \text{rojo})$   $p(\text{mel} * \text{manip} + \text{hi} + \text{t} + \text{rojo})$ .

<b>Contrastes Supervivencia</b>	<b>Media</b>	<b>2.5 %</b>	<b>50.0 %</b>	<b>97.5 %</b>	<b>Rhat</b>
c- vs. c+ poca melanización	0.113	0.030	0.108	0.223	<1.01
c- vs. e poca melanización	0.241	0.101	0.233	0.425	<1.01
c+ vs. e poca melanización	0.128	-0.032	0.123	0.315	<1.01
c- vs. c+ mucha melanización	0.035	-0.032	0.033	0.109	<1.01
c- vs. e mucha melanización	0.034	-0.040	0.031	0.121	<1.01
c+ vs. e mucha melanización	-0.001	-0.087	-0.002	0.090	<1.01

Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e).

**Apéndice 9:** Contrastes entre grupos de la probabilidad de supervivencia del 2016  $\varphi(\text{mel} * \text{manip} + \text{hi} + \text{t} + \text{rojo})$   $p(\text{mel} * \text{manip} + \text{hi} + \text{t} + \text{rojo})$ .

<b>Contrastes Supervivencia</b>	<b>Media</b>	<b>2.5 %</b>	<b>50.0 %</b>	<b>97.5 %</b>	<b>Rhat</b>
c- vs. c+ poca melanización	0.040	-0.033	0.037	0.131	<1.01
c- vs. e poca melanización	0.068	-0.021	0.062	0.188	<1.01
c+ vs. e poca melanización	0.028	-0.080	0.025	0.148	<1.01
c- vs. c+ mucha melanización	0.111	0.044	0.107	0.202	<1.01
c- vs. e mucha melanización	0.064	0.010	0.061	0.137	<1.01
c+ vs. e mucha melanización	-0.047	-0.141	-0.046	0.040	<1.01

Grupos: control negativo (c-), control positivo (c+), experimental (e).

## Discusión general

El propósito de este estudio fue evaluar de manera integral los costos asociados a la expresión de un carácter sexual secundario en condiciones de vida silvestre. La evaluación fue realizada mediante dos vías: 1) costos fisiológicos, los cuales están implicados en la producción del rasgo y fueron evaluados a través de la cuantificación de reservas energéticas de los machos adultos y 2) costos de supervivencia, relacionados con portar el rasgo, los cuales fueron estimados mediante métodos de captura-recaptura.

En el primer capítulo demostramos que el polifenismo estacional de los machos de *H. titia*, manifestado en una drástica diferencia en el tamaño del área melanizada (Drury *et al.*, 2015a), está ligado a la condición de los individuos en términos fisiológicos. En este estudio encontramos que los machos con poca o nula melanina presentan menos reservas energéticas que los machos muy melanizados. Asociamos estas diferencias fisiológicas a los costos de producción del rasgo debido a que se ha reportado que el tamaño del área pigmentada se encuentra definido por las condiciones nutricionales de la etapa larvaria en congéneres como *H. americana* (Álvarez *et al.*, 2013).

El objetivo del trabajo fue la estimación de los costos de melanización, para el cual el polifenismo presente en el organismo (al estar directamente relacionado con la expresión del carácter) fue un factor importante que nos permitió explorar este rasgo aunado a otros factores, principalmente la estacionalidad. La estacionalidad es un factor de relevancia, ya que impacta directamente componentes ecológicos como temperatura, disponibilidad de recursos o historia de vida de los insectos a nivel general (Wolda, 1978, 1980). Existen casos en libélulas donde se observan variaciones fenotípicas de las alas, ya sea en forma (Gallesi *et al.*, 2016) o color (Hardersen, 2010; Hooper *et al.*, 1999), que en ocasiones están asociadas a diferencias conductuales, posiblemente relacionadas con diferentes tácticas reproductivas, (Hooper *et al.*, 1999; Gallesi *et al.*, 2016) como lo que parece estar

sucedido con la pigmentación alar de los machos de *H. titia* (Drury *et al.*, 2015a; capítulo 1). Es por ello que nosotros concluimos que posiblemente el polifenismo y la alta variación del carácter (en vez de ser una adaptación de la especie) se encuentran ligados a cambios en las condiciones ambientales y disponibilidad de recursos, los cuales rigen la capacidad de expresar una alta melanización. Esta idea se ve reforzada con el hecho de que también encontramos diferencias en las relaciones alométricas de los pigmentos respecto al área alar por temporadas. En la temporada tardía cuando los individuos se encuentran en mejor condición la relación del área melanizada con el área alar total es hiperalométrica, caso contrario los individuos de la temporada temprana, donde la relación hiperalométrica se encontró para la mancha roja y no la negra.

En cuanto a los costos en supervivencia, aunque los grupos experimentales no reflejaron las diferencias en probabilidades de supervivencia que esperábamos, se observó una tendencia a que machos de *H. titia* con área alar melanizada aumentada sufren una disminución en la probabilidad de supervivencia. Esta tendencia la atribuimos a un aumento en la depredación por presentar un rasgo demasiado conspicuo que vuelve a los individuos más visibles hacia sus depredadores y presas, como lo sugerido en trabajos previos (Grether & Grey 1996; Svensson & Friberg, 2007). También encontramos que esta tendencia de disminución en supervivencia es más evidente en los individuos con poca expresión original de área melanizada y que según nuestro planteamiento estarían siendo más depredados. Lo anterior refuerza nuestra hipótesis de que el tamaño del área alar melanizada refleja la condición de los individuos, ya que como lo menciona Andersson (1982) organismos con una mala condición y con ornamentos exacerbados, son más susceptibles a ser depredados.

Por último, el realizar los análisis durante el 2015 y 2016 y llegar a las mismas conclusiones para ambos años nos permitió validar nuestros resultados. Al considerar esta variación anual de tiempo, comprobamos que en este caso no existe una influencia temporal que ocasione fluctuaciones en la magnitud y

dirección de la selección natural de un año respecto al otro, lo cual se sabe es un aspecto importante a considerar en estos estudios (Siepielski, *et al.*, 2009).

Si la melanización es la señal implicada en las interacciones inter e intra específicas de *H. titia*, es indicador de condición, parece estar sujeto a disponibilidad de recursos y es costoso en términos de supervivencia, ¿cuál es la función de la pigmentación roja en los machos de esta especie? o si no la hay ¿por qué es un carácter que sigue presente si en congéneres de *H. titia* es costoso?

La “hipótesis de los mensajes múltiples” de Møller y Pomiankowski (1993) plantea que diferentes rasgos pueden estar señalizando diferentes aspectos de la condición del organismo y según Grether (2004), los parches de color que cumplen la función de señalizadores, podrían ser considerados como señales multicomponentes, donde cada coloración, debido a la estructura de sus pigmentos, pudo haber evolucionado mediante distintas vías y por lo tanto transmitir diferente información. Aunado a esto, recordemos que la macha roja es un carácter ancestral en los calopterígidos, mientras que la pigmentación negra surgió después (Misof *et al.*, 2000; Svensson & Waller, 2013; Drury *et al.*, 2015b), por lo que diferentes procesos pudieron estar actuando sobre cada una de ellas. Por ejemplo, en los pinzones del género *Carduelis*, los machos presentan plumaje color rojo (dependiente de carotenoides) y negro (dependiente de melanina) y se ha demostrado que la información transmitida por cada uno de los pigmentos es diferente y la selección sexual no actúa de la misma manera sobre ambos, siendo el pigmento rojo un mejor indicador de la condición y con presencia de cambios evolutivos más frecuentes entre congéneres que la pigmentación a base de melanina (Badyaev & Hill, 2000).

Puede suceder que diferentes ornamentos reflejen la condición en diferente escala de tiempo, ya sea que el rasgo se exprese durante un periodo largo o que responda a cambios en las condiciones generales a corto plazo (Møller &

Pomiankowski, 1993). Esto último es parecido a lo que plantea Bro-Jørgensen, (2010) con la “hipótesis de ambientes fluctuantes”, donde establece que, los cambios en las condiciones ambientales pueden ser la explicación del porque algunos organismos mantienen más de una señal en la transmisión de un mismo mensaje. Dentro de esta última hipótesis, existe el caso de cuando las señales son sensibles a la calidad de los señalizadores y estos no siempre son capaces de soportar el costo de la señal, de tal forma que se expresará un carácter cuando el ambiente presente recursos limitados y otro cuando el entorno sea rico en recursos (Bro-Jørgensen, 2010).

En el caso de *H. titia*, con los resultados obtenidos en el primer capítulo, encontramos que el tamaño del área melanizada está ligado a la condición fisiológica de los organismos y a la temporada del año. Con ello, podemos especular que se está viendo reflejada la teoría de los entornos fluctuantes, dependiente de un ambiente rico o pobre en recursos, de manera que el pigmento rojo, (el cual posiblemente no sea tan costoso de producir en términos de recursos) indica la condición de los individuos cuando los recursos son escasos y es por ello que aún se conserva en la especie, siendo un carácter hiperalométrico en esa temporada del año. Mientras que la melanización es un mejor indicador de la condición, ya que los individuos son capaces de expresarla en la temporada tardía, cuando tienen los recursos suficientes y las interacciones en la población son más abundantes, presentando una relación hiperalométrica respecto al área alar únicamente en esta temporada.

Como es evidente, para que esta última hipótesis tenga buen sustento, la mancha roja tendría que ser menos costosa que la negra en su producción, para lo cual existen algunos indicadores de ello, por ejemplo: la pigmentación roja se produce a base de omocromos en odonatos (Chapman, 1982; Futahashi, 2016) y estos compuestos están involucrados en el desecho de concentraciones tóxicas de triptófano, (Shamim *et al.*, 2014), por el contrario la melanina que genera la mancha negra requiere de fenoloxidasa, enzima que también es precursor de la

respuesta inmune en insectos (González-Santoyo *et al.*, 2010), lo que podría implicar un compromiso entre pigmentación negra y sistema inmune, siendo así la mancha negra posiblemente más costosa en su producción que la roja.

Por otro lado, la función de la mancha roja podría ser otra, por ejemplo, Cooper (2010) demostró que individuos de *Megalagrion calliphya* con más pigmentación roja en el cuerpo, se encuentran en regiones expuestas a mayor radiación solar, suceso que se atribuye a que la pigmentación roja, mediante su función antioxidante está sirviendo de protector contra los efectos dañinos de los radicales libres creados por la exposición a la luz UV (Cooper, 2010).

En los análisis fisiológicos pudimos comprobar que el tamaño de la mancha tiene una relación positiva con la cantidad de reservas energéticas, sin embargo, para confirmar que la expresión de este carácter está limitada por la disponibilidad de recursos, como perspectivas a futuro sería óptimo hacer un estudio experimental en el laboratorio y bajo condiciones controladas, donde se manipulara la calidad en la alimentación (buena y mala alimentación) en la etapa larval de individuos machos de ambas temporadas, para posteriormente evaluar el tamaño de la mancha de estos individuos en la etapa adulta, similar al trabajo realizado por Álvarez y colaboradores (2013) donde encontraron que la expresión de la mancha roja de *H. americana* se ve restringida por la disponibilidad de alimento en la etapa larval. Así mismo, para evaluar si existen costos asociados a la respuesta inmune, podría inducirse un reto inmunológico inyectando lipopolisacáridos (LPS) de bacterias o parásitos como gregarinas a machos con diferentes grados de área alar melanizada y midiendo su respuesta en supervivencia, como se ha hecho en trabajos previos (Robb, & Forbes, 2006; Córdoba-Aguilar & Munguía-Steyer, 2013).

Para comprobar que la supervivencia en los organismos manipulados se encontró disminuida debido a un aumento en la depredación se podría hacer un estudio donde se cuantifique la depredación. Por ejemplo, Svensson y Friberg (2007)

localizaron a un ave depredadora de calopterígidios, que desecha las alas de éstos en zonas específicas y cerca al lugar de depredación, con lo que pudieron hacer un conteo de las alas desechadas. Nosotros hemos visto que en el sitio de estudio existe una alta depredación por arañas, éstas atrapan a las libélulas y las mantienen así durante un tiempo o las alas de las libélulas aparecen como desechos en las telarañas, por lo cual sería posible realizar un estudio similar al de Svensson & Friberg (2007) y comparar la tasa de depredación entre individuos con área alar melanizada manipulada y sin manipular. Para probar la hipótesis de que la melanización torna más conspicuos a los individuos hacia sus presas, se podría medir la tasa de forrajeo de individuos con diferente tamaño de área alar melanizada, observándolos durante 20 minutos y registrando las ocasiones en las que intenten o logren atrapar una presa en este lapso de tiempo, como en el estudio realizado por Grether & Grey (1996) en *H. americana*.

Por último, en el laboratorio se está llevando a cabo un estudio de peleas entre machos a largo plazo. Dicho estudio, podrá indicarnos si la disminución en la supervivencia o recaptura de los organismos con mayor área alar melanizada, es en cierta medida, debida a las interacciones agonísticas diferenciales causadas por exagerar el rasgo. El estudio se está realizando marcando a los organismos con un código individual, manipulando el área alar (igual que en el estudio de supervivencia realizado en este trabajo) y después buscando interacciones agonísticas a lo largo del río.



## Conclusiones

- 1) La pigmentación negra es un carácter hiperalométrico respecto al área alar de los machos de *H. titia* únicamente en la temporada de pico reproductivo. La pigmentación roja presenta el caso contrario, siendo hiperalométrica únicamente en la temporada donde no se presenta el pico reproductivo.
- 2) Los individuos de la temporada tardía están más melanizados y presentan mejor condición que los individuos de la temporada temprana, diferencia que encontramos reflejada en cantidad de reservas energéticas (proteínas, lípidos, carbohidratos libres y glucógeno).
- 3) Existe la tendencia de que machos de *H. titia* con área alar melanizada aumentada experimentalmente, presentan una disminución en la probabilidad de supervivencia, comparada con machos del grupo control negativo, posiblemente por tornar a los individuos más conspicuos hacia sus presas y depredadores.
- 4) La melanización negra es un carácter sexual secundario dependiente de la condición de los individuos, más costoso en términos fisiológicos que la pigmentación roja y se encuentra restringido en parte por los recursos disponibles en el medio.
- 5) Puede ser que el polifenismo estacional de la especie se deba más a una restricción de recursos que a una adaptación de la especie.
- 6) Las dos pigmentaciones de los machos de *H. titia* son señales multicomponentes complementarias ya que puede ser que la pigmentación roja siga siendo un indicador de la condición en la temporada temprana, pero la melanización esté siendo la señal indicadora en la temporada tardía.

## Referencias de introducción y discusión (las no citadas en el artículo)

- Ahtiainen, J. J., Alatalo, R. V., Kortet, R., & Rantala, M. J. (2005) A trade-off between sexual signalling and immune function in a natural population of the drumming wolf spider *Hygrolycosa rubrofasciata*. *Journal of Evolutionary Biology*, **18**, 985-991.
- Badyaev, A. V., & Hill, G. E. (2000) Evolution of sexual dichromatism: contribution of carotenoid-versus melanin-based coloration. *Biological Journal of the Linnean Society*, **69**, 153-172.
- Berglund, A., Bisazza, A., & Pilastro, A. (1996) Armaments and ornaments: an evolutionary explanation of traits of dual utility. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**, 385-399.
- Bro-Jørgensen, J. (2010) Dynamics of multiple signalling systems: animal communication in a world in flux. *Trends in Ecology & Evolution*, **25**, 292-300.
- Chapman, R. F. (1982) The insects: structure and function. 3rd ed. *Harvard University Press, Cambridge, MA*.
- Cooper, I. A. (2010) Ecology of sexual dimorphism and clinal variation of coloration in a damselfly. *The American Naturalist*, **176**, 566-572.
- Córdoba Aguilar, A. (2002) Wing pigmentation in territorial male damselflies, *Calopteryx haemorrhoidalis*: a possible relation to sexual selection. *Animal Behavior*, **63**, 759-766.
- Córdoba-Aguilar, A., & Munguía-Steyer, R. (2013) The sicker sex: understanding male biases in parasitic infection, resource allocation and fitness. *PloS One*, **8**, e76246.

- Crespi, B. J. (1986) Territoriality and fighting in a colonial thrips, *Hoplothrips pedicularius*, and sexual dimorphism in Thysanoptera. *Ecological Entomology*, **11**, 119-130.
- Darwin, C. (1859) On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. *London: John Murray*.
- Davis, P., Bjorksten, T., Fowler, K., & Pomiankowski, A. (2000) Condition-dependent signalling of genetic variation in stalk-eyed flies. *Nature*, **406**, 186.
- Emlen, D. J. (2008) The evolution of animal weapons. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **39**, 387-413.
- Fairbairn, D.J. (2007) Introduction: the enigma of sexual dimorphism. *Sex, Size and Gender Roles: Evolutionary Studies of Sexual Size Dimorphism*. (ed. by D.J. Fairbairn, W.U. Blanckenhorn & Székely, T). *Oxford University Press, U.K.*
- Galesi, M. M., Mobili, S., Cigognini, R., Hardersen, S., & Sacchi, R. (2016) Season matters: differential variation of wing shape between sexes of *Calopteryx splendens* (Odonata: *Calopterygidae*). *Zoomorphology*, **135**, 313-322.
- Girard, M. B., & Endler, J. A. (2014). Peacock spiders. *Current Biology*, **24**, 13.
- Grether, G. F. & Grey, R. M. (1996) Novel cost of a sexually selected trait in the rubyspot damselfly *Hetaerina americana*: conspicuousness to prey. *Behavioral Ecology*, **7**, 465-473.
- Grether, G. F., Kolluru, G. R., y Nersissian, K. (2004). Individual colour patches as

multicomponent signals. *Biological Reviews*, **79**, 583-610.

Hale A. M. (2004) Predation risk associated with group singing in a neotropical wood-quail. *Wilson Bull*, **116**, 167–171.

Lebreton, J. D., Burnham, K. P., Clobert, J., y Anderson, D. R. (1992) Modeling survival and testing biological hypotheses using marked animals: a unified approach with case studies. *Ecological Monographs*, **62**, 67-118.

Misof, B., Anderson, C. L., & Hadrys, H. (2000) A phylogeny of the damselfly genus *Calopteryx* (Odonata) using mitochondrial 16S rDNA markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **15**, 5-14.

Møller, A. P. (1996) The cost of secondary sexual characters and the evolution of cost-reducing traits. *Ibis*, **138**, 112-119.

Mougeot F, Bretagnolle V, (2000) Predation as a cost of sexual communication in nocturnal seabirds: an experimental approach using acoustic signals. *Animal Behaviour*, **60**, 647–656.

Osorio, D., & Vorobyev, M. (2008) A review of the evolution of animal colour vision and visual communication signals. *Vision Research*, **48**, 2042-2051.

Kemp D. J. (2013) Hardy, I. C., & Briffa, M. (Eds.). *Animal contests*. Cambridge University Press.

Robb, T., & Forbes, M. R. (2006) Age-dependent induction of immunity and subsequent survival costs in males and females of a temperate damselfly. *BMC Ecology*, **6**, 15.

Simmons, L. W. (1986) Female choice in the field cricket, *Gryllus bimaculatus* (de

Geer). *Animal Behaviour*, **34**, 1463-1470.

Simmons, L. W. (1987) Sperm competition as a mechanism of female choice in the field cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. **21**, 197-202.

Stuart-Fox, D. M., (2005) Deception and the origin of honest signals. *Trends in Ecology & Evolution*, **20**, 521-523.

Svensson, E. I., & Friberg, M. (2007) Selective predation on wing morphology in sympatric damselflies. *The American Naturalist*, **170**, 101-112.

Wolda, H. (1978) Seasonal fluctuations in rainfall, food and abundance of tropical insects. *Journal of Animal Ecology*, **47**, 369-381.

Wolda, H. (1980) Seasonality of tropical insects. *The Journal of Animal Ecology*, 277-290.