

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



Transferencia estratégica de eyaculado
en *Stenomacra marginella*
(Heteroptera: Largidae)

CELIA OLIVER MORALES
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS R. CORDERO MACEDO

MEXICO, DF

ENERO 2010



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.

Para mi sol y mi luna

Emilia y Sebastián

*"Como mi paracaídas, y del borde de mi estrella en
marcha, me lanzo a la atmósfera del último suspiro"*

Vicente Huidobro

AGRADECIMIENTOS

Después de pensar, diseñar, realizar, analizar, describir e interpretar todo un proyecto, llego a la calma. Esa calma que sólo se puede sentir cuando se acaba de salir de los rápidos más duros y tortuosos, pero esa calma que a su vez esta cargada de adrenalina, nos hace sonreír espontáneamente. Bueno, después de haber bajado por el río y estar a poco de salir de él, me detengo un poco y agradezco a todos aquellos que me acompañaron durante este viaje y de alguna forma impactaron en mi vida.

Al Dr. Carlos Cordero, mi tutor y mi comité tutorial Dra. Margarita Martínez y Dr. Alejandro Córdoba, quienes se reunían conmigo semestre tras semestre para llevar a buen término este proyecto. También quiero agradecer a la Dra. Marcela Osorio, por su confianza y calidez que me permitieron crecer académica y emocionalmente al impartir clases con ella, así como diseñar proyectos que espero que pronto comiencen a volar.

A los investigadores Juan José Morrone, Constantino Macías y Raúl Cueva, por su pronta respuesta a mi trabajo y al Dr. Rogelio Macías por la paciencia y cuidado con que leyó mi trabajo, dándome la oportunidad de mejorarlo.

Agradezco los apoyos económicos recibidos de CONACYT (número de expediente 163233) y DGEP-UNAM.

A la Lic. Verónica Martínez Estrella, Angélica Téllez Garmendia, Zenaida Martínez Estrella, Lorena Olivares, Anahí García Mac Naught, Patricia Martínez y Carolina Espinosa por su amabilidad y paciencia infinita para que pudiera realizar fácilmente cualquier trámite. También al M. en I. Alejandro René González Ponce por revivir mi computadora y evitarme el síncope cuando pensaba que todo se había perdido.

Gracias a los amigos que encontré en el laboratorio Víctor, Nubia, Liz. A los que descubrí camino a mi casa y que me invitan a la suya ofreciéndome entre muchas cosas,

la sonrisa de la bienvenida, como la de mi padre, con la que siempre me recibía. Gracias Velia, Amadeo y Julios.

También a madre, Celia y mis suegros, Leticia y César, porque son el corazón y las manos que siempre están cerca ofreciendo su apoyo. A César, Emilia y Sebastián porque oyen mis historias y las hacen suyas, para después regresármelas gigantes, fuertes, llenas de colores y de fantasía.



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....1
ESPECIE DE ESTUDIO.....5
 BIBLIOGRAFÍA.....6
PRÓLOGO.....9

CAPÍTULO I: MULTIPLE MATING REDUCES MALE SURVIVORSHIP BUT NOT

EJACULATE SIZE IN THE POLYGAMOUS INSECT STENOMACRA

MARGINELLA (HETEROPTERA: LARGIDAE).....11

ABSTRACT.....11

INTRODUCTION.....12

MATERIAL AND METHODS.....12

 STUDY SPECIES.....12

 LABORATORY REARING.....12

 EXPERIMENTAL PROTOCOL.....13

RESULTS.....14

 LATENCY TO COPULA AND COPULA DURATION.....14

 EJACULATE SIZE.....15

 MALE SURVIVORSHIP.....15

DISCUSSION.....15

ACKNOWLEDGEMENTS.....17

REFERENCES.....17

CAPÍTULO II: PERCEPTION OF NEARBY VIRGIN MALES (SOMETIMES) AFFECTS EJACULATE

TRANSFER BUT NOT COPULA DURATION IN STENOMACRA MARGINELLA

(HETEROPTERA: LARGIDAE).....19

KEYWORDS.....19

INTRODUCTION.....20

MATERIAL AND METHODS.....22

RESULTS.....	24
DISCUSSION.....	25
ACKNOWLEDGEMENTS.....	28
REFERENCES	29
TABLE 1 MEDIAN [Q _{25%} –Q _{75%}] (N) AREA OF THE EJACULATE TRANSFERRED BY MALE <i>Stenomacra marginella</i> WHEN MATING IN ABSENCE (CONTROL) OR PRESENCE OF FOUR VIRGIN MALES (EXPERIMENTAL) IN EACH REPLICATE OF THE EXPERIMENT (2005 AND 2006).....	30
TABLE 2 MEAN (± STANDARD DEVIATION) (N) COPULA DURATION OF <i>Stenomacra marginella</i> COUPLES MATED IN ABSENCE (CONTROL) OR PRESENCE OF FOUR VIRGIN MALES (EXPERIMENTAL) IN EACH REPLICATE OF THE EXPERIMENT (2005 AND 2006).....	30
CAPÍTULO III: VARIACIÓN EN LA CANTIDAD DE EYACULADO TRANSFERIDO DE ACUERDO AL TAMAÑO E HISTORIA DE APAREAMIENTO FEMENINO EN <i>Stenomacra marginella</i> (HETEROPTERA: LARGIDAE).....	31
RESUMEN.....	31
INTRODUCCIÓN.....	32
ESPECIE DE ESTUDIO.....	34
COLECTA, MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN.....	35
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	36
EXPERIMENTO I.....	36
PREDICCIONES.....	36
RESULTADOS.....	37
EL TAMAÑO DE LAS HEMBRAS.....	37
EL TAMAÑO DE LOS MACHOS.....	38
EL EFECTO DEL TAMAÑO DE LAS HEMBRAS EN LA DURACIÓN DE LA CÓPULA Y EN LA TRANSFERENCIA DEL EYACULADO.....	38
EXPERIMENTO II.....	39
PREDICCIONES.....	39
RESULTADOS.....	41
EL EFECTO DE LA HISTORIA REPRODUCTIVA FEMENINA EN	

LA DURACIÓN DE LA CÓPULA.....	41
ALMACENAMIENTO DEL EYACULADO EN LA ESPERMATECA DEPENDIENDO DE LA HISTORIA REPRODUCTIVA FEMENINA.....	43
DISCUSIÓN.....	45
BIBLIOGRAFÍA.....	46
 CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN GENERAL.....	 49
BIBLIOGRAFÍA.....	53



INTRODUCCIÓN

En la teoría de la selección sexual, Darwin (1871) propuso que esta fuerza evolutiva actúa de diferente manera entre los sexos (masculino y femenino), y para poder explicarlo distinguió dos procesos. El de la selección intra sexual, en el cual los individuos de un mismo sexo (generalmente los machos) compiten por aparearse con el sexo contrario, y el de la selección inter sexual, en el cual los individuos de un sexo (generalmente las hembras) eligen a otros del sexo opuesto para reproducirse.

En términos generales, la selección intra sexual favorece a las características que sirven para excluir a los contrincantes, tales como los cuernos o los espolones. Ya que los atributos que son el resultado de este tipo de selección generalmente están presentes en los machos, muchos de los trabajos sobre selección intra sexual se han enfocado en estudiar los enfrentamientos masculinos (Simmons, 2001).

La selección inter sexual en cambio, favorece a las características que son vistosas y que pueden indicar la calidad genética o de la salud del individuo que las porta, tales como los despliegues de coloración, los bailes o los cantos. En este tipo de selección aunque generalmente es la hembra la que elige, Darwin (1874) describió algunos casos aislados en donde los machos eligen y las hembras compiten (papeles sexuales invertidos— Bonduriansky, 2001).

Es importante mencionar que para Darwin (1871) ambos procesos ocurrían previamente a la cópula y una vez ganado el apareamiento, simultáneamente se ganaba la paternidad. Sin embargo, estudios posteriores cuestionaron esta idea, ya que mostraron evidencia que indica que los procesos de competencia y elección continúan durante o aún

después de la cópula (Parker, 1970; Thornhill, 1983; Eberhard, 1996). Parker (1970) por ejemplo, demostró que la competencia entre machos podía continuar durante o después de la cópula. Esta competencia se establece dentro del aparato reproductivo femenino entre los gametos de distintos machos que intentan fecundar el mayor número de óvulos (competencia espermática).

Para analizar el efecto de la competencia espermática en la adecuación masculina, Parker (1970) propuso un modelo que se basa en el mismo principio que el juego de la lotería. En éste, el éxito de fertilización de cada macho depende de su representación espermática respecto al total de espermia reunido en el sitio en donde se lleva a cabo la fecundación. Siendo así, mientras más gametos de un individuo haya respecto al total, sus probabilidades de paternidad serán mayores. Sin embargo, esta propuesta no considera los costos que podrían estar asociados a la producción de los gametos, pues la única forma en que la tasa de producción de eyaculado aumente constantemente, es que producirlo no cueste.

Dewsbury (1982) mostró que los costos en la producción del eyaculado no son triviales, puesto que afectan el éxito reproductivo masculino. Una forma en cómo se puede evaluar la presencia de los costos, es midiendo el tiempo de recuperación espermática, ya que si éste es prolongado, aumenta el tiempo para que un macho pueda volver a copular y pierde así oportunidades de apareamiento (Dewsbury, 1982). Otra forma es la relación entre algunas variables de respuesta relacionadas con la producción espermática, tales como la disminución de la cantidad y la calidad del eyaculado (Levitan y Petersen, 1995; Mesterton, 1999) o incluso de la supervivencia masculina (Van Voorhies, 1992; Oliver y Cordero,

2009).

Una de las diferencias teóricas más importantes entre los modelos que consideran el costo del eyaculado y los que no, es que en los primeros no se espera que aumente la cantidad de eyaculado transferido conforme lo haga la competencia espermática (Parker et ál., 1996). En ellos la transferencia de eyaculado depende en gran medida de la información que los machos sean capaces de obtener acerca del grado de competencia espermática. Los machos pueden obtener la información del ambiente, como por ejemplo del número de competidores sexualmente activos, o bien, de los atributos de las hembras que se relacionan con la fecundidad, como el tamaño corporal (McLain et ál., 1990).

El aumento en el número de machos receptivos cerca de una hembra incrementa sus probabilidades de apareamiento respecto a una que se encuentra sola. Por tal motivo, se espera que los machos capaces de inferir la probabilidad de apareamiento de una hembra, esto es el riesgo de competencia espermática (RCE), aumenten la transferencia de eyaculado hacia apareamientos en los cuales el RCE sea menor (Parker et ál., 1996). De la misma manera, si el tamaño corporal femenino representa su fecundidad, los machos podrían mantenerse por más tiempo cerca de hembras grandes, lo que aumentaría el RCE. Por lo tanto, los machos podrían transferir más eyaculado a hembras chicas que no representan RCE y así asegurar su progenie.

Por otro lado, cuando los machos pueden percibir si dentro de las hembras existe esperma que puede competir con el suyo por fecundar a un grupo de óvulos (intensidad de la competencia espermática—ICE) la cantidad de eyaculado transferido hacia las hembras apareadas podría ser menor (Parker et ál., 1997; Parker, 1998). Los cambios químicos o

conductuales que presentan las hembras después de aparearse u oviponer podrían fungir como indicadores de la ICE.

Originalmente los modelos que incorporan el **RCE** y la **ICE** fueron desarrollados para especies con fecundación externa (Parker et ál., 1996; Parker et ál., 1997). Aún así, sus predicciones son generalizables para especies con fecundación interna (Simmons, 2001).

De lo dicho con antelación se puede deducir que los costos en la producción del eyaculado constituyen una de las presiones selectivas más importantes en la adecuación masculina; teóricamente capaces de favorecer tanto la discriminación de pareja por parte de los machos, como la transferencia de distinta cantidad de eyaculado dependiendo del grado de competencia espermática. Esta conducta masculina es similar a la elección críptica femenina (Thornhill 1983; Eberhard 1996; Pitnick y Brown 2000), que se define como el uso diferencial del espermatozoide de acuerdo con la calidad reproductiva del macho; elección que no es evidente ni para el macho ni para el observador. Por analogía, el ajuste del eyaculado por parte del macho en función del grado de competencia espermática que sea capaz de percibir, se ha denominado como elección críptica masculina (Bonduriansky, 2001; Simmons, 2001).

Debido a la importancia teórica que tienen los costos en la transferencia del eyaculado, en este trabajo primero medimos su presencia, y posteriormente, evaluamos empíricamente algunas predicciones del modelo de **RCE** e **ICE** así como algunas de sus principales consecuencias en términos evolutivos.

Para evaluar los costos en la producción de espermatozoide y las hipótesis de los modelos de **RCE** e **ICE** elegimos a la chinche *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae) por

las siguientes razones. Primero porque el sistema de apareamiento de esta chinche ha sido descrito como poligámico (Cuatianquiz et ál., 2003; Oliver, 2004), lo cual junto con la capacidad que tienen las hembras para almacenar el eyaculado en una estructura especializada llamada espermoteca (Eberhard, 1985, 1996), promueve la competencia espermática. Como se ha visto en otros grupos, los apareamientos múltiples influyen en la duración de la cópula, la cantidad o la calidad del eyaculado (Markow et ál., 1978; Cordero, 2000; Pérez-Staples et ál., 2008) y en la supervivencia masculina (Oliver y Cordero, 2009). Por lo tanto, facilitan la evaluación de los costos en la producción de eyaculado durante cópulas consecutivas (Oliver y Cordero, 2009).

Por otro lado, los machos realizan distintas conductas durante y entre las cópulas (abrazo, monta, toqueteo e intento de cortejo—Cuatianquiz et ál., 2003; Oliver, 2004) en las que el contacto sensorial a través de estructuras como las antenas, los pelos y las cerdas es constante. Potencialmente este tipo de señales permiten el intercambio de sustancias químicas que podrían proporcionar a los machos información sobre el grado de competencia espermática.

ESPECIE DE ESTUDIO

Stenomacra marginella es una especie univoltina que se distribuye en zonas perturbadas de todo el continente (Cibrian et ál., 1995). En la Ciudad de México es común encontrarla asociada a los árboles de *Buddleia chordata*, árbol popularmente conocido como Tepozán.

El periodo de cambio de ninfa a imago en *S. marginella* se lleva a cabo en el mes de abril y es más o menos sincrónico. Una vez ocurrido el cambio a adulto, las chinches

presentan un período de inactividad sexual entre los meses de abril y mayo. La actividad reproductiva inicia a finales de mayo y termina a principios de septiembre (Cuatianquiz *et ál.*, 2003; Oliver, 2004). Los adultos presentan dimorfismo en el tamaño corporal (Cibrián-Tovar *et ál.*, 1995), siendo las hembras más grandes (12 a 15 mm) que los machos (9 a 12 mm). Es una especie poligámica (Cuatianquiz *et ál.*, 2003), en la cual se ha comprobado que las hembras obtienen beneficios derivados de apareamientos múltiples (Cuatianquiz y Cordero, 2005). Los machos cortejan activamente a las hembras durante la fase pre-copulatoria y copulatoria (Cuatianquiz *et ál.*, 2003; Oliver, 2004). Durante estos cortejos existe contacto constante entre distintas estructuras sensoriales, lo que podría significar que los machos estimulan a las hembras (elección críptica femenina o seducción antagonista, Eberhard, 1996) o que las evalúan (elección críptica masculina, Bonduriansky, 2001, Wedell *et ál.*, 2002). En la fase copulatoria, los machos realizan cuatro conductas repetitivas (Oliver, 2004) que afectan la duración de la cópula y, por lo tanto, la transferencia de eyaculado (Oliver 2004). Finalmente, cabe mencionar que ambos sexos están involucrados en la conclusión de la cópula (Obs. Pers. de campo).

BIBLIOGRAFÍA

Bonduriansky, R. 2001. The evolution of male mate choice in insects: a synthesis of ideas and evidence. *Biological Review*. 76: 305-339.

Cibrián-Tovar, D., Méndez-Montiel, J. T., Campos-Bolaños, R., Yates III, H. O. y Flores Lara, J. E. (1995) *Insectos Forestales de México/ Forest Insects of Mexico*. Universidad Autónoma de Chapingo, Publicación # 6.

Cordero, M. C. 2000. Trade-off between fitness components in males of the polygynous butterfly *Callophrys xami* (Lycaenidae): the effect of multiple mating on

longevity. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 48:458-462.

Cuatianquiz C y Cordero C (2005) Multiple mating in female *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae) in Central Mexico. *Entomological News* 116:331-334.

Cuatianquiz, C., Muñoz, L., Oliver, C., Moreno, M. & Cordero, C. 2003. *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae): Un modelo para estudiar la evolución de la poliandria, el cortejo durante la cópula y la conducta de oviposición. In Fisiología, ecología y comportamiento: una propuesta multidisciplinaria (eds. Martínez-Gómez, M., Cruz, Y., Hudson, R. & Lucio, R. A.), pp. 125-132. México: UAT/UNAM.

Darwin, C. R. 1871. *The Descent of Man and Selection in Relation to Sex*. Facsimil de la 1ª edición, Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey.

Darwin, C. R. 1874. *The Descent of Man and Selection in Relation to Sex*. (2ª Edición) Hurst Company, Nueva York.

Dewsbury, D. A. 1982. Ejaculate cost and male Choice. *American Naturalist*. 109: 235-246.

Eberhard, W. G. 1985. *Sexual selection and animal genitalia*. Harvard University Press, Cambridge MA.

Eberhard, W.G. 1996. *Female Control: Sexual Selection by Cryptic Female Choice*. Princeton University Press, Princeton, NJ, USA.

Levitan, D.R. y Petersen, C. 1995. Sperm limitation in the sea. *Trends in Ecology and Evolution*. 10: 228-231.

Markow, T. A. 1978. A test for the rare male mating advantage in coisogenic strains of *Drosophila melanogaster*, *Genetics Research*. 32:123-127.

McLain, D.K., Lanier, D.L. y Marsh N.B. 1990. Effects of female size, mate size and number of copulations on fecundity, fertility, and longevity of *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 83: 1130-1136.

Mesterton-Gibbons, M. 1999. On sperm competition games: incomplete fertilization risk and the equity paradox. *Proceedings of the Royal Society B*. 266: 269-274.

Oliver, C. y Cordero, C. 2009. Multiple mating reduces male survivorship but not ejaculate size in the polygamous insect *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae). *Evolutionary Ecology*. 23:417-424.

Oliver, C. 2004. *Selección sexual pre y postcopulatoria en la chinche Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae) Tesis de Maestría. Instituto de Ecología, UNAM.

46pp.

Parker, G. A., Ball, M.A., Stockley, P., y Gage M.J.G. 1996. Sperm competition games: individual assessment of sperm competition intensity by group spawners.

Proceedings of the Royal Society B. 263: 1291–1297.

Parker, G. A., Ball, M.A., Stockley, P., y Gage M.J.G.. 1997. Sperm competition games: a prospective analysis of risk assessment. *Proceedings of the Royal Society B.* 264: 1793–1802.

Parker, G. A. 1970. Sperm competition and evolutive consequences in insects. *Biological Review* .45: 525—567.

Parker, G.A. 1998. *Sperm competition and the evolution of ejaculates: towards a theory base*. In: Sperm Competition and Sexual Selection (T. R. Birkhead y A. P. Møller, eds), pp. 3–54. Academic Press, San Diego.

Pérez-Staples D., Harmer A.M.T., Collins S.R. y Taylor PW. 2008. Potential for pre-release diet supplements to increase the sexual performance and longevity of male Queensland fruit flies. *Agriculture and Forestal Entomology* 10: 255-262.

Simmons , L.W. 2001. *Sperm Competition and its evolutionary consequences in the Insects*. Princeton University Press Princeton, New Jersey, USA.

Thornhill, R. 1983. Cryptic female choice and its implications in the Scorpionfly *Harpobittacus nigriceps*. *The American Naturalist.* 22:765-788.

Van Voorhies, W. 1992. Production of sperm reduces nematode lifespan. *Letters to Nature.* 360: 456-458.

Wedell, N., Gage, M.J.G y Parker G.A. 2002. Sperm competition, male prudence and sperm-limited females. *Trends in Ecology and Evolution.*17: 313-320.



PRÓLOGO

En el capítulo I de la tesis se evaluó los costos en la producción del eyaculado, midiendo su efecto en tres variables de respuesta (la duración de la cópula, la supervivencia y la transferencia de eyaculado) después de que los machos copularon consecutivamente. En términos generales, se encontró que la supervivencia masculina disminuyó conforme aumentó el número de cópulas. Dado que haber encontrado costos relacionados con la producción del eyaculado al modificar la tasa de apareamiento, en el capítulo II se puso a prueba la hipótesis que propone que los machos al percibir olfativa y visualmente las probabilidades de que una hembra se haya apareado (*riesgo de competencia espermática—RCE*) modifican la cantidad de eyaculado. Para probar este supuesto, comparamos si la transferencia de eyaculado es distinta cuando existe RCE a cuando no lo hay. El resultado más importante de este experimento fue haber encontrado que cuando hay RCE la mayoría de los machos no eyaculan. Aún así, también se detectó una importante variación temporal, puesto que al repetir el experimento, aunque la tendencia estadística se mantuvo, los resultados no fueron significativos. En el capítulo III se investigó si el tamaño y la presencia de eyaculado de otro macho dentro del tracto reproductivo de las hembras (*intensidad de la competencia espermática ICE*) modifican la transferencia de eyaculado. Para evaluar si los machos son capaces de percibir la ICE, se midió la cantidad de eyaculado enviado cuando los machos se aparearon con hembras vírgenes, apareadas previamente, grandes o pequeñas. Lo que se encontró fue que el tamaño femenino no afectó la cantidad del eyaculado enviado. En cambio, la cantidad de eyaculado transferido fue menor cuando las hembras habían ovipuesto respecto a las hembras vírgenes. Finalmente,

en el capítulo IV se presenta una discusión y conclusión general que comienza considerando la producción de eyaculado como un recurso costoso. Posteriormente, se trata la relación que podría existir entre los costos del eyaculado y la evolución de estrategias reproductivas que vuelven a los machos mucho más selectivos de lo que hasta hace pocos años se había considerado. En su conjunto, los principales resultados de la tesis sugieren que la producción del eyaculado podría ser tan costosa, que en algunas especies como en *Stenomacra marginella* se ha favorecido que los machos después de evaluar a las hembras, modulen la cantidad de eyaculado transferido dependiendo de la competencia espermática. Además, como esta conducta reproductiva masculina es poco conspicua, podría ser considerada como elección críptica masculina.



Evol Ecol (2009) 23:417–424
DOI 10.1007/s10682-007-9239-8

ORIGINAL PAPER

Multiple mating reduces male survivorship but not ejaculate size in the polygamous insect *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae)

Celia Oliver · Carlos Cordero

Received: 18 August 2007 / Accepted: 3 December 2007 / Published online: 20 December 2007
© Springer Science+Business Media B.V. 2007

Abstract In polygamous species, successful males should be able to inseminate multiple females, to defeat sperm from previous males, to avoid sperm displacement by other males, and to induce females to use his sperm during fertilization. Since resources are limited, adaptations to perform any of these functions may conflict with each other (and with other life-history traits) and trade-offs are expected to evolve. We studied if males of the polygamous true bug *Stenomacra marginella* face a trade-off between multiple mating and survivorship, by comparing the survivorship of virgin and multiply mated males. We also looked for physiological costs of ejaculate production by examining ejaculate production in consecutive matings in multiple mated males. Multiply mated males were able to produce ejaculates of similar size in up to six consecutive copulations but they had decreased survivorship in comparison with virgin males. There was no difference in survivorship between males mated three and six consecutive times, suggesting that the negative relation between survivorship and number of copulations is not linear. The decrease in survivorship seems to be a cost of mating and ejaculate production. This cost could favor the evolution of prudence in the allocation of resources to ejaculate production (e.g., cryptic male choice).

Keywords Life history trade-off · Survivorship · Multiple mating · Mating costs · Ejaculate

C. Oliver
Posgrado en Ciencias Biomédicas, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México,
México, DF, México
e-mail: oliver_celia@yahoo.com

C. Cordero (✉)
Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de
México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Apdo. Post. 70-275, Coyoacán, DF 04510, México
e-mail: cordero@miranda.ecologia.unam.mx

 Springer

Introduction

In polygamous species males are subject to intense pre- and post-copulatory sexual selection. In these species, successful males must be able not only to inseminate multiple females, but also to defeat sperm from previous males, to avoid sperm displacement by other males, and to induce the female to use his sperm for fertilizing her eggs (see reviews in Eberhard 1996; Simmons 2001). Some male traits can be used to accomplish more than one of these functions. For example, a seminal substance could be used to destroy the sperm of previous males and to intoxicate the female, coercing her to reduce her probability of further mating to avoid accumulating toxic chemicals (Johnstone and Keller 2000; but see Edvardsson and Tregenza 2005). However, in many cases, independent adaptations are needed to confront the different challenges. For example, in the same species, the antenna may be used to detect female odor, pheromones to court females, seminal substances to destroy rivals' sperm, and the penis and legs for courtship during copulation. The evolution of independent adaptations for different functions could lead males to face resource allocation conflicts.

Post-copulatory sexual selection could favor strategic allocation of ejaculate elements (Wedell et al. 2002; Pérez-Staples and Aluja 2006). For example, males could benefit by transferring bigger ejaculates to more fecund (e.g., big sized) virgin females if ejaculate components help reduce female sexual receptivity and increase oviposition rate, number of eggs laid and ability to compete with other males' sperm (Cordero 1995; Eberhard 1996; Simmons 2001). Physiological costs of ejaculate production also affect the size and composition of ejaculates (Dewsbury 1982; Hayashi 1993). In particular, ejaculate size may decrease in consecutive copulations if the time between them is too short for the production of new ejaculates and/or for the replenishment (e.g., through feeding) of substances used for production of ejaculates, even if selection favors the transfer of bigger ejaculates (Drummond 1984).

On the other hand, when receptive females are available during a relatively long period, sexual selection could favor increased male longevity if this increases the lifetime number of females encountered. However, if selection also favors an increase in ejaculate production, males would need to trade-off resources between ejaculates and longevity-increasing traits (Cordero 2000).

Here we present the results of an experiment in which we looked for male mating costs in the polygamous true bug *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae). First, we investigated if the sizes of the ejaculates produced by multiply mated males decrease in consecutive copulations, as expected if there are ejaculate production costs. Second, we investigated if there is a survival cost of mating by assessing if multiple copulations negatively affect the longevity of males mated different numbers of times (0, 3 and 6).

Materials and methods

Study species

Stenomacra marginella is a univoltine species that occurs at high population densities in disturbed areas of central Mexico (Cibrián-Tovar et al. 1995; Cuatianquiz et al. 2003). Last instar nymphs molt synchronously into adults and remain sexually inactive for about a month (Cuatianquiz et al. 2003). The mating season in Mexico City usually begins in May, when an outburst of sexual activity is observed, and finishes in September (Cuatianquiz

et al. 2003). Males are not territorial and actively search for, and try to mate with, females without interacting aggressively with other males (Cuatianquiz et al. 2003). A substantial proportion of females mate multiple times with different males and sometimes they mate repeatedly with the same male (Cuatianquiz and Cordero 2005). Females are bigger than males and frequently reject their courting attempts. Males stimulate females during copulation (Cuatianquiz et al. 2003; Cuatianquiz and Cordero 2006). There is experimental evidence that ejaculates provide females with resources other than sperm (Cuatianquiz and Cordero, in preparation), but have no effect on female receptivity (Cuatianquiz and Cordero 2006).

Laboratory rearing

We collected adult virgin females and males, prior to the mating season of 2004, in the Ciudad Universitaria campus of the Universidad Nacional Autónoma de México in Mexico City. In this year most nymphs molted into adults between March 20 and March 27 (C. Oliver, personal observation) and, therefore, most males had between 88 and 95 days as adults when the experiment began (June 22). We kept adults in unisexual groups in $30 \times 30 \times 50$ cm cages made of a wood frame covered with mesh cloth in an insectary (12L:12D and average temperature of 22°C) until the beginning of the experiment. We fed the insects with fresh leaves of *Buddleia cordata* (Loganiaceae) and a solution of water with 20 g of sugar, 0.2 ml of hydrolyzed vegetal protein ("Jugo Maggi"™) and 37 ml of raw egg white (amounts needed to produce 100 ml of solution); this solution was presented on small balls of cotton which we changed every other day.

Experimental protocol

To assess if ejaculate production affects male longevity and to determine how males allocate resources to ejaculates in consecutive copulations, we performed an experiment in which three groups of 10 virgin males each were mated 0, 3 or 6 times, respectively. Copulations were obtained by placing an experimental male and a virgin female in a plastic Petri dish (10 cm diameter \times 1.5 cm height). In most cases, the male followed or chased the female and attempted to mount her soon after being introduced in the Petri dish. After copulation, the mated female was replaced by another virgin female until the number of copulations of each treatment was achieved; if the copula ended after 20:00 h, the new female was placed with the experimental male until the following day. All males copulated when exposed to females. The latency to and duration of each copula was measured. Males were kept individually in Petri dishes between copulations and after their last mating, until they died; during this time they were fed as described in the previous subsection.

Immediately after copulation, females were killed in 70% ethanol. Afterwards, each spermatheca was dissected out, cleared in boiling KOH (10%) during approximately 2 min, and photographed with a digital camera (Sony DSC-P50 Cyber-Shot 2.1) mounted on a dissection microscope (Olympus SZH10) at a magnification of 1.5×7 ; in these photographs, ejaculates were observed through the wall of the rigid spermatheca. We estimated ejaculate size as the area covered by the ejaculate within the spermatheca. Ejaculate area was measured on the digital images with the free software Image Tool 3.00 (developed by the Health Sciences Center of the University of Texas in San Antonio; available at the address <http://www.ddsex.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>).

We compared the latency to and duration of each copula, as well as the amount of ejaculate transferred in consecutive copulations in the groups mated three and six times separately with non-parametric Friedman’s ANOVAs. We used the Kaplan-Meier method for computing survival estimates of the three experimental groups and used log-rank statistics to compare the estimated survival functions between groups. We compared longevity after beginning of the experiment (i.e., day “0” in Fig. 3 is the day in which the experiment began and males of the “three copulations” and “six copulations” treatments had their first copulations); we consider that at the beginning of the experiment most males had similar adult ages since most nymphs molted into adults within 1 week (see previous subsection). The survival analysis was run in *JMP* 5.1.2™, all other tests were performed in *Statistica* 6™. Statistics are given as median and lower and upper quartiles ($Q_{25\%} - Q_{75\%}$).

Results

Males of the “three copulations” treatment achieved their matings in 1–3 days and those of the “six copulations” treatment in 2–5 days. One male of the “six copulations” treatment died after his fourth copulation and was excluded from the analyses.

Latency to copulation and copula duration

Friedman’s ANOVA showed that there were no significant differences in latency to copulation between consecutive matings within the “three copulations” treatment ($\chi^2 = 1.9$, $df = 2$, $P > 0.3$) and within the “six copulations” treatment ($\chi^2 = 1.34$, $df = 5$, $P > 0.9$). Friedman’s ANOVA showed that there were no significant differences in copula duration between consecutive matings within the “three copulations” treatment ($\chi^2 = 3.2$, $df = 2$, $P > 0.2$; Fig. 1a) and within the “six copulations” treatment ($\chi^2 = 3.4$, $df = 5$, $P > 0.6$; Fig. 1b). Since there were no differences between consecutive copulations within treatments, we grouped the data of all copulations and compared the latency to

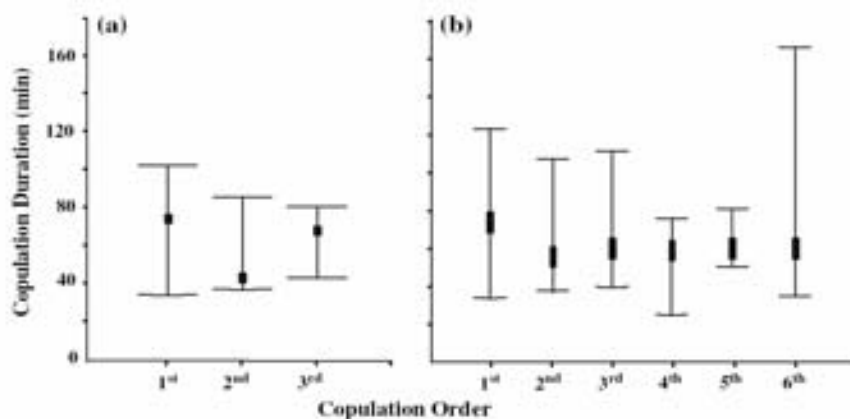


Fig. 1 Median ($Q_{25\%} - Q_{75\%}$) duration (min) of consecutive copulations of males mated with (a) three ($N = 10$) or (b) six virgin females ($N = 9$)

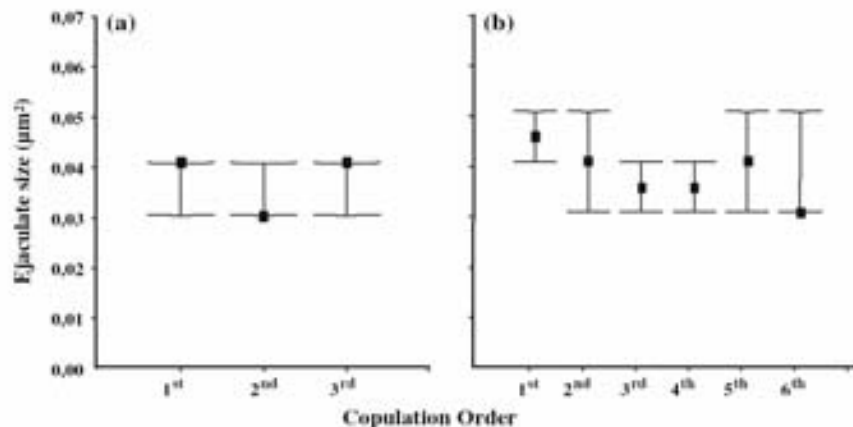


Fig. 2 Median ($Q_{250} - Q_{750}$) size of ejaculates (area covered in μm^2) produced by males mated consecutively with (a) three ($N = 10$) or (b) six virgin females ($N = 9$)

copulation and copula duration between males of both treatments and found no significant differences (Mann-Whitney tests; latency to copulation: $U = 768$, $P = 0.7$, $N_{3C} = 30$, $N_{6C} = 54$; copula duration: $U = 755$, $P = 0.61$, $N_{3C} = 30$, $N_{6C} = 54$).

Ejaculate size

Friedman's ANOVA showed that there were no significant differences in the amount of ejaculate transferred in consecutive copulations by males of the "three copulations" treatment ($\chi^2 = 3.4$, $df = 2$, $P > 0.17$; Fig. 2a) and of the "six copulations" treatment ($\chi^2 = 7.3$, $df = 5$, $P > 0.2$; Fig. 2b). Since there were no differences in ejaculate size between consecutive copulations within treatments, we grouped the data of all copulations and compared the amount of ejaculate transferred by males of the "three copulations" and the "six copulations" treatment and found no significant differences (Mann-Whitney test; $U = 748.5$, $P = 0.57$, $N_{3C} = 30$, $N_{6C} = 54$).

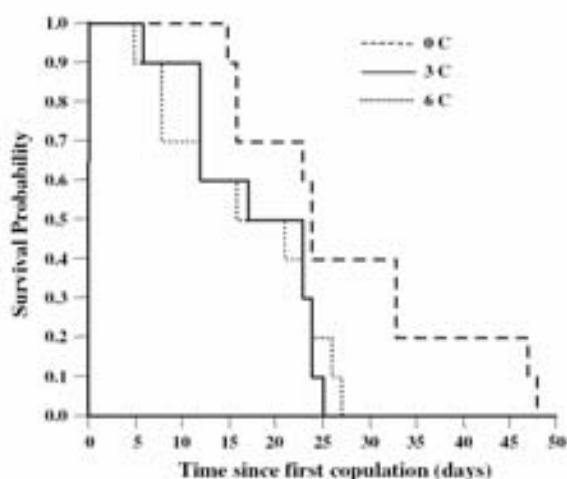
Male survivorship

The overall survival analysis was significant ($\chi^2 = 6.24$, $df = 2$, $P = 0.044$; Fig. 3). Log-rank tests showed that multiply mated males had decreased longevity in comparison with virgin males ("three copulations" vs. "virgin": $\chi^2 = 4.24$, $df = 1$, $P = 0.039$; "six copulations" vs. "virgin": $\chi^2 = 4.51$, $df = 1$, $P = 0.034$; Fig. 3). However, no significant difference in longevity was detected between males of the "three copulations" treatment and the "six copulations" treatment ($\chi^2 = 0.12$, $P = 0.73$; Fig. 3).

Discussion

Our experiment showed that *S. marginella* males are able to produce similar sized ejaculates in up to six consecutive copulations (Fig. 2), and that multiple mated males experienced a sharp decline in male longevity (Fig. 3). The reduction in longevity indicates

Fig. 3 Post-mating survivorship curves of males mated with zero (0C; discontinuous line; $N = 10$), three (3C; solid line; $N = 10$) or six (6C; dotted line; $N = 9$) females; day "0" is the day in which the experiment began (i.e. when males of the "three copulations" and the "six copulations" treatments mated for the first time)



the existence of male mating costs in this species. This study is another case of a growing body of evidence that indicates that mating entails substantial costs that compromise the survivorship of males (Cordero 2000; Martin and Hosken 2004; Paukku and Kotiaho 2005; Ferkau and Fischer 2006; Kotiaho and Simmons 2007; Burton-Chellew et al. 2007; but see Pérez-Staples and Aluja 2006).

Considering that in our experiment mating costs of ecological origin (disease transmission, risk of attack by natural enemies, etc.; Partridge 1987; Cordts and Partridge 1996) were excluded, the negative effect of mating on male survival seems to be a physiological cost of mating (Partridge 1987; Cordts and Partridge 1996), which could result from the trade-off of resources with one or more of the following processes: (a) pre-copulatory chases and courtship (Cuatianquiz and Cordero 2006), (b) the act of mating itself, (c) performance of behaviors whose apparent function is to stimulate the female during copulation (Cuatianquiz and Cordero 2006), (d) behavioral interactions with females rejecting male stimulation during copulation or apparently trying to finish copulation (Cuatianquiz and Cordero 2006), and (e) ejaculate production. Activities (a) and (d) may be energetically costly judging from the time (activity a) and effort (activities a and d) involved in them, whereas (c) is performed relatively frequently (Cuatianquiz and Cordero 2006) during the long copulations (Fig. 1) and involves movement of legs and antennae that could be energetically costly (Cuatianquiz et al. 2003; Cuatianquiz and Cordero 2006).

Considering that *S. marginella* females appear to be highly polyandrous (Cuatianquiz et al. 2003; Cuatianquiz and Cordero 2005), the ability of males to produce ejaculates of similar size in consecutive copulations is an expected adaptive response to selection arising from sperm competition (Svärd and Wiklund 1989). We suggest that ejaculate production could be an important component of male mating costs in this species. In *S. marginella* the size of the ejaculate may not reflect its true cost because unpublished experimental results suggest that the quality of the ejaculate (and, probably, its costliness) is not correlated with its size. Our unpublished experiment shows that males transfer substances in the ejaculate that increase the offspring production of females and this benefit is reduced when the ejaculate is transferred by a recently mated male, despite the fact that we did not find a difference in the size of ejaculates transferred in two consecutive copulations (Cuatianquiz and Cordero in preparation).

Although multiply mated males died at a significantly higher rate than virgin males, there was no difference in longevity between males that mated three and six times. This suggests that the negative relation between longevity and number of copulations is not linear. Ferkau and Fisher (2006) observed a similar pattern in experiments with the butterfly *Pieris napi* and they consider that the absence of a linear relation between number of matings and longevity sheds some doubts on the existence of a survival cost. However, we do not see why survival costs functions should be linear. The rate at which the negative effect of multiple mating accrues may decrease as the number of copulations increases if selection favors the production of bigger ejaculates in first versus subsequent matings, as it has been proposed by Svärd and Wiklund (1986) for the butterfly *Papilio machaon*, or if males allocate resources to several (expected?) copulations immediately before their first copulation (e.g. Pérez-Staples and Aluja 2006).

Male mating costs result in male fitness functions showing diminishing returns and an intermediate maximum with respect to number of copulations, as well as in selection in favor of male mate choice (Bonduriansky 2001). When males invest a substantial amount of resources in each copulation (e.g. the dry mass of the first spermatophore produced by *P. napi* males may be equivalent to as much as 29% of their dry body mass; Ferkau and Fisher 2006) and receptive females are not scarce, males that copulate preferentially with females with a high reproductive value will be favored by sexual selection (Bonduriansky 2001). In the particular case of ejaculate production costs, sexual selection would favor the evolution of modulation of ejaculate allocation as a function of female quality (i.e., cryptic male choice; Wedell et al. 2002). This could explain why our experimental males transferred similar amounts of ejaculate to consecutive females: since females were virgin, males could have “perceived” that they had the same reproductive value. Experiments exploring whether male *S. marginella* allocates ejaculates depending on female quality are currently in process.

Acknowledgements We thank the discussion provided by César Abarca-García, Alex Córdoba and Margarita Martínez-Gómez. Amadeo Estrada, Rebecca S. Malo and Raúl Iván Martínez provided valuable technical help. Funds were provided by PAPIIT-UNAM (ES235802). C. Oliver was supported by a CONACYT scholarship (no. 163233) and by DGEI-UNAM.

References

- Bonduriansky R (2001) The evolution of male mate choice in insects: a synthesis of ideas and evidence. *Biol Rev* 76:305–339
- Burton-Chellow MN, Sykes EM, Patterson S, Shuker DM, West SA (2007) The cost of mating and the relationship between body size and fitness in males of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*. *Evol Ecol Res* 9:921–934
- Cibrián-Tovar D, Méndez-Montiel JT, Campos-Bolaños R, Yates HO III, Flores-Lara JE (1995) Insectos forestales de México/Forest insects of Mexico. Publicación # 6 of the Universidad Autónoma de Chapingo, México
- Cordero C (1995) Ejaculate substances that affect female insect reproductive physiology and behaviour: honest or arbitrary traits? *J Theor Biol* 174:453–461
- Cordero C (2000) Trade-off between fitness components in males of the polygynous butterfly *Callophrys xami* (Lycenidae): the effect of multiple mating on longevity. *Behav Ecol Sociobiol* 48:458–462
- Cordts R, Partridge L (1996) Courtship reduces longevity of male *Drosophila melanogaster*. *Anim Behav* 52:269–278
- Cuatlanquíz C, Cordero C (2005) Multiple mating in female *Stenomacrus marginella* (Heteroptera: Largidae) in Central Mexico. *Entomol News* 116:331–334
- Cuatlanquíz C, Cordero C (2006) Experimental manipulation of male behaviour during copulation in *Stenomacrus marginella* (Heteroptera: Largidae): effect on copula duration, female remating and oviposition. *Behav Proc* 73:222–227

- Cuatlanquiz C, Muñoz L, Oliver C, Moreno M, Cordero C (2003) *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae): un modelo para estudiar la evolución de la poliandria, el cortejo durante la cópula y la conducta de oviposición. In: Martínez-Gómez M, Cruz Y, Hudson R, Lucio RA (eds) Fisiología, ecología y comportamiento: una propuesta multidisciplinaria. UAT/UNAM, México, pp 125–132
- Dewsbury DA (1982) Ejaculate costs and male choice. *Am Nat* 119:601–610
- Drummond BA III (1984) Multiple mating and sperm competition in the Lepidoptera. In: Smith RL (ed) Sperm competition and the evolution of animal mating systems. Academic Press, San Diego, pp 291–371
- Eberhard WG (1996) Female control: sexual selection by cryptic female choice. Princeton University Press, Princeton
- Edvardsson M, Tregenza T (2005) Why do male *Callisobruchus maculatus* harm their mates? *Behav Ecol* 16:788–793
- Ferkau C, Fischer K (2006) Costs of reproduction in male *Bicyclus aninana* and *Pieris napi* butterflies: effects of mating history and food limitation. *Ethology* 112:1117–1127
- Hayashi F (1993) Male mating costs in two insect species (*Protoparce*, Megaloptera) that produce large spermatophores. *Anim Behav* 45:343–349
- Johnstone R, Keller L (2000) How males can gain by harming their mates: sexual conflict, seminal toxins, and the cost of mating. *Am Nat* 156:368–377
- Kotiaho JS, Simmons LW (2007) The effects of reproduction on courtship, fertility and longevity within and between alternative male mating tactics of the horned beetle *Oonthophagus binodis*. *J Evol Biol* 20:488–495
- Martin OY, Hosken DJ (2004) Copulation reduces male but not female longevity in *Salitella sphenodylli* (Diptera: Sepsidae). *J Evol Biol* 17:357–362
- Partridge L (1987) Is accelerated senescence a cost of reproduction? *Funct Ecol* 1:317–320
- Pauku S, Kotiaho JS (2005) Cost of reproduction in *Callisobruchus maculatus*: effects of mating on male longevity and the effect of male mating status on female longevity. *J Insect Physiol* 51:1220–1226
- Pérez-Staples D, Aluja M (2006) Sperm allocation and cost of mating in a tropical tephritid fruit fly. *J Insect Physiol* 52:839–845
- Simmons LW (2001) Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Princeton University Press, Princeton
- Svärd L, Wiklund C (1986) Different ejaculate delivery strategies in first versus subsequent matings in the swallowtail butterfly *Papilio machaon* L. *Behav Ecol Sociobiol* 18:325–330
- Svärd L, Wiklund C (1989) Mass and production rate of ejaculates in relation to monandry/polyandry in butterflies. *Behav Ecol Sociobiol* 24:395–402
- Wedell N, Gage MJG, Parker GA (2002) Sperm competition, male prudence and sperm-limited females. *Trends Ecol Evol* 17:313–320



**Perception of nearby virgin males (sometimes) affects ejaculate transfer
but not copula duration in *Stenomacra marginella* (Heteroptera:
Largidae)**

Celia Oliver¹

Carlos Cordero²

¹ Posgrado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, DF, México

² Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, CU, AP 70-275, Coyoacán 04510, DF, México

Current address (until July 2010): Department of Invertebrate Zoology, American Museum of Natural History, Central Park West at 79th Street, New York, NY 10024–5192, USA.

Telephone: +212–769–5946.

E-mail: signa_cornuti@yahoo.com.mx

Keywords Male competition • strategic ejaculation • copula duration • sperm competition • mate choice

Introduction

In many insect species copulations commonly occur in presence of conspecific individuals (Thornhill and Alcock 1983). The presence of males searching for mates could provide information to copulating individuals and affect their behaviour. For the mating female, the presence of nearby males could provide information about the relative quality of various males and about female mate searching costs in case further mates are looked for after the current copulation. These estimates could influence behavioural decisions of females, such as copula interruption and female remating. For the mating male, the perception of additional males in the neighbourhood could be associated with a higher probability of non-virginity of his actual mate and with higher risks of copula interruption and female remating after copulation. These factors translate into higher risks of sperm competition for the male (Parker 1998; Simmons 2001) and in greater opportunity for cryptic female choice (Eberhard 1996). Therefore, males mating in presence of other males are expected to evolve adaptations in response to these selective pressures (Simmons 2001).

Two variables are of particular interest for the study here reported. First, copula duration is predicted to increase when there is risk of sperm competition due to male biased sex ratio or increased male density, although other factors (e.g. female fecundity) are also important and could alter this prediction (Simmons 2001). Second, the amount of ejaculate transferred is predicted to evolve flexibility in response to sperm competition risk (Parker

1998; Simmons 2001) as a result of ejaculate production costs (Dewsbury 1982). In general, theoretical models predict that increased risk of sperm competition favours an increase in the amount of ejaculate transferred, although other factors can modify this expectation (Parker 1998; Simmons 2001; Wedell et al. 2002). For example, larger females could be more fecund and more sexually attractive—and therefore have a higher probability of being mated—and males could be selected to transfer larger ejaculates to them (Bonduriansky 2001; Simmons 2001; Wedell et al. 2002). On the other hand, males could also be selected to produce smaller ejaculates when copulating with previously mated females—in which sperm competition is more intense—if seminal substances ameliorate the hostile conditions of the female genital tract, thus exploiting ejaculates of previous males (Hodgson and Hosken 2006). Cryptic female choice could also influence the amount of ejaculate transferred if females can prevent, decrease or stimulate ejaculation by some males (Eberhard 1996).

Here we report the results of an study of the effect of perceiving nearby virgin males on ejaculate transfer and copula duration in the insect *Stenomacra marginella* (Herrich-Schaeffer) (Heteroptera: Largidae). Perception of nearby males during copulation can be important for *S. marginella* because in nature they can reach very high population densities during the mating season. In this species both sexes mate multiply and females can remate with consecutive males, even in the same day, without necessarily having laid eggs between copulations (Cuatianquiz and Cordero 2005, 2006). Ejaculate production is costly for males, as judged from the negative relation between number of copulations and male longevity (Oliver and Cordero 2009), and there is sperm precedence of the last male,

although variation in P2 is wide (N Caballero, BE Hernández-Baños and C Cordero unpublished data).

Materials and Methods

S. marginella is a univoltine species that occurs at variable but generally very high population densities in central Mexico (Cuatianquiz et al. 2003). Adult body length varies between 12 and 15 mm, and females are longer and wider than males. In the Ciudad Universitaria campus of the Universidad Nacional Autónoma de México in Mexico City, the mating season occurs between May and September, after a period of about six weeks in which adults are present but sexually inactive (Cuatianquiz and Cordero 2005, 2006). Males actively search and try to mate with females without showing aggressivity towards other males; females frequently reject the mating attempts of males. Males perform a complex apparently stimulatory behaviour during copulation (Cuatianquiz and Cordero 2006).

We collected adult virgin females and males during the period in which virgin adults are sexually inactive. We kept adults in the laboratory following the method previously developed by our group (Cuatianquiz and Cordero 2006). Briefly, individuals were kept in unisexual groups of 25-35 individuals within 30 × 30 × 50 cm cages made of a wooden frame covered with mesh cloth in an insectary (12L:12 D and average temperature of 22°C). The insects were fed fresh leaves of *Buddleia cordata* (Loganiaceae) and a solution of water with 20 g of sugar, 0.2 ml of hydrolyzed vegetal protein (“Jugo Maggi”™) and 37 ml of raw egg white (amounts needed to produce 100 ml of solution) absorbed in small balls of cotton that we changed every other day.

To assess the effect of perceiving nearby virgin males on copula duration and amount of ejaculate transferred, we made an experiment in which virgin males were mated with virgin females either in isolation (control group) or in presence of four virgin males (experimental group) in transparent plastic petri dishes (10 cm diameter) with one transparent division in the middle in which several holes were made to allow the pass of odours from one side of the cage to the other. In the experimental group a pair was introduced in one side of the petri dish and the four additional males in the other to avoid direct physical contact; in the control group only the pair was introduced and the other side of the dish was kept empty. Mating and “nearby” males were randomly chosen from the available virgin males. We measured copula duration and, immediately after copulation, females were killed in 70% ethanol and preserved in a refrigerator (-20°C). Afterwards, each spermatheca was dissected out, cleared in slowing boiling KOH (10%) during 2 h, and photographed with a digital camera (Sony DSC-P50 Cyber-Shot 2.1) mounted on a dissection microscope (Olympus SZH10). In the photographs, ejaculates were observed through the wall of the rigid and spherical spermatheca. We used the area covered by the ejaculate as an estimate of ejaculate size. Ejaculate area was measured on the photographs with the software *ImageTool* 3.00 (<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>). We dissected all mating pairs to check if they had been attacked by parasitoid flies (Tachinidae) or wasps (*Hexacladia* sp., Encyrtidae), the main parasitoids of *S. marginella* in the study site (Mendez and Cordero, unpublished data). We checked parasitism by looking for fly larvae or larvae or pupae of *Hexacladia* within the body cavity. We repeated the experiment in two consecutive years (2005 and 2006).

Results

In 2005 we found that 13 out of 17 (76.5%) control males transferred ejaculates, whereas only one of the 17 males (5.9%) of the experimental group delivered an ejaculate during copulation (Chi square=17.49, $df=1$, $P<0.0001$). The size of the ejaculate produced by the only experimental male that transferred an ejaculate was relatively small compared to that of control males (Table 1). In 2006, all 20 control and 16 out of 19 (84%) experimental males transferred ejaculates. The difference between treatments in the frequency of males not transferring an ejaculate was not significant (Chi square=3.42, $df=1$, $P=0.064$). The size of the ejaculates transferred by control and experimental males was similar (Table 1; Mann–Withney $U=177$, $P=0.710$). The proportion of experimental males that transferred an ejaculate was much larger in 2006 than in 2005 (84% vs. 5.9%; Chi square=22.1, $df=1$, $P=0.0001$). Lumping together both replicates (2005 + 2006), the size of the ejaculates produced by males of the control groups of both years and the experimental group of 2006 showed no significant differences (Table 1; Kruskal-Wallis ANOVA: $H_{2,56}=1.75$, $P=0.416$).

A two-way ANOVA showed no significant differences in copula duration between control and experimental groups ($F_{1,69}=1.43$, $P=0.236$; Table 2). However, copulations were of longer duration in 2006 ($F_{1,69}=10.15$, $P=0.002$; Table 2). The interaction between treatment and year was not significant ($F_{1,69}=0.47$, $P=0.495$).

No evidence of parasitism was found in any of the mating males and females.

Discussion

The probability of transferring an ejaculate was lower in copulating pairs of *S. marginella* when they mated in visual and olfactory contact with groups of virgin males than in isolation in 2005 but not in 2006. Our experiment does not permit to distinguish if the 2005 result was a product of strategic ejaculation or of females exerting cryptic choice by somehow preventing some males from transferring an ejaculate. In the first case, it is possible that the substantial ejaculate production costs (Oliver and Cordero 2009), female promiscuity (Cuatianquiz and Cordero 2005, 2006) and relatively high probability of finding more receptive females (a reasonable assumption given the high population densities observed during both years of study), favored males that did not deliver an ejaculate to females in which they perceived a high risk of suffering sperm competition due to the presence of several nearby virgin males. The second possibility is that in 2005 females prevented most males from transferring an ejaculate due to the fact that they perceived the mating males as suboptimal because they were not able to keep other males away from the couple or take the female away from other males. Other reason why females could prevent ejaculate transfer is that they detected a mate of better quality among the nearby males, although this seems unlikely because mating and “nearby” males were randomly chosen from the available virgin males.

Even if we consider the results from 2006 as marginally significant ($P=0.064$), the results obtained in both replicates of the experiment were clearly and significantly different (84% of experimental males transferred an ejaculate in 2006 vs. 5.9% in 2005, $P=0.0001$). We carefully checked the methods employed in both years and did not found any difference

that could explain the different results as an experimental artifact. We do not have an explanation for these differences and we can only provide some speculative ideas. First, it is possible that in 2006 the value of females for males was larger than in 2005 and, therefore, the estimated cost of not transferring an ejaculate to a particular female was also larger. Differences in factors such as sex ratio, population density or rates of parasitoid attack could produce between-years differences in a male's estimates of female value. Taking parasitoids as an example, tachinid flies and *Hexacladia* wasps attack *S. marginella* adults since before they are sexually active, parasitized females do not produce any eggs, and there are large between-years differences in rates of attack (unpublished data). If attack by parasitoids was particularly high in 2006, males perceiving a high average level of parasitism *before* being collected for the experiment could have estimated their own probability of survival and their probability of finding females as very small, and these factors could have contributed to increase the value of females and, thus, the probability of transferring an ejaculate.

A second hypothesis for the differences between years is that they are a product of cryptic female choice. For example, females could have been more selective in 2005 than in 2006. Females could have been more selective if, for example, as in the previous hypothesis, attack by parasitoids was higher in 2006 than in 2005. If in 2006 females perceived a high level of parasitism in males *before* being collected for the experiment, such perception could reduce their estimates of the probability of finding males in the future and of their own probability of survival, and these two factors could have contributed to decrease their choosiness. If copula duration is at least partially controlled by males (and

this seems possible thanks to the genital claspers of male *S. marginella*; Moreno-García and Cordero 2008), this hypothesis helps explain why copula durations were similar whether the male transferred an ejaculate or not, because males could try to transfer an ejaculate during the “typical” mating duration. Nevertheless, this “female control of ejaculation” hypothesis does not explain why copulations were of longer duration in 2006 than in 2005. However, although sexual selection can influence copula duration, other factors (review in Simmons 2001) could have been responsible of the between-years difference. Finally, it is important to stress that in the previous discussion the influence of differences in parasitoid attack is a purely speculative example, used for illustrative purposes, for which we do not have any direct evidence.

Acknowledgements Drs. César Abarca, Alex Córdoba and Margarita Martínez-Gómez provided useful discussion. Raúl Iván Martínez gave useful technical help. We thank the support of the Posgrado en Ciencias Biomédicas (Universidad Nacional Autónoma de México). Funds were provided by PAPIIT-UNAM (IN223508). C. Oliver was supported by a CONACYT doctoral scholarship (no. 163233) and by DGEP-UNAM.

References

- Bonduriansky R (2001) The evolution of male mate choice in insects: a synthesis of ideas and evidence. *Biol Rev* 76:305-339
- Cuatianquiz C, Cordero C (2005) Multiple mating in female *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae) in Central Mexico. *Entomol News* 116: 31-334
- Cuatianquiz C, Cordero C (2006) Experimental manipulation of male behaviour during copulation in *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae): effect on copula duration, female remating and oviposition. *Behav Proc* 73:222-227
- Cuatianquiz C, Muñoz L, Oliver C, Moreno M, Cordero C (2003) *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae): un modelo para estudiar la evolución de la poliandria, el cortejo durante la cópula y la conducta de oviposición. In: Martínez-Gómez M, Cruz Y, Hudson R, Lucio RA (eds) Fisiología, ecología y comportamiento: una propuesta multidisciplinaria. UAT/UNAM, México, pp 125–132
- Dewsbury DA (1982) Ejaculate costs and male choice. *Amer. Nat.* 119: 601-610.
- Eberhard WG, 1996. *Female control*. Princeton Univ. Press, NJ, USA
- Hodgson DJ, Hosken DJ (2006) Sperm competition promotes the exploitation of rival ejaculates. *J Theor Biol* 243:230-234
- Moreno-García M, Cordero C (2008) On the function of male genital claspers in *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae). *J Ethol* 26:255-260
- Oliver C, Cordero C (2009) Multiple mating reduces male survivorship but not ejaculate size in the polygamous insect *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae). *Evol Ecol* 23:417-424
- Parker GA (1998) *Sperm competition and the evolution of ejaculates: towards a theory base*. In: Birkhead TH, Møller AP (eds) Sperm competition and sexual selection. Academic Press, London, UK, pp 3-54
- Simmons LW (2001) Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Princeton Univ. Press, NJ, USA
- Thornhill R, Alcock J (1983) *The evolution of insect mating systems*. Harvard Univ. Press, Mass, USA
- Wedell N, Gage MJG, Parker GA (2002) Sperm competition, male prudence and sperm-limited females. *Trends Ecol Evol* 17:313-320

Table 1 Median [$Q_{25\%}$ – $Q_{75\%}$] (n) area of the ejaculate transferred by male *Stenomacra marginella* when mating in absence (control) or presence of four virgin males (experimental) in each replicate of the experiment (2005 and 2006)

Treatment	Ejaculate area (μm^2)	
	First replicate (2005)	Second replicate (2006)
Control group	0.03 [0.03–0.04] (17)	0.036 [0.033–0.038] (20)
Experimental group	0.02 [–] (1)	0.036 [0.034–0.039] (19)

Table 2 Mean (\pm standard deviation) (n) copula duration of *Stenomacra marginella* couples mated in absence (control) or presence of four virgin males (experimental) in each replicate of the experiment (2005 and 2006)

Treatment	Copula duration (min)	
	First replicate (2005)	Second replicate (2006)
Control group	86.9 \pm 49.0 (17)	113.8 \pm 45.3 (20)
Experimental group	66.6 \pm 45.4 (17)	108.3 \pm 43.7 (19)



VARIACIÓN EN LA CANTIDAD DE EYACULADO TRANSFERIDO DE ACUERDO CON EL GRADO

DE COMPETENCIA ESPERMÁTICA EN

S marginella (HETEROPTERA: LARGIDAE)

Celia Oliver Morales

Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología Universidad Nacional

Autónoma de México, AP 70-275, México DF 04510 México.

Resumen

Para que un macho gane la competencia espermática (CE), necesita fecundar el mayor número de óvulos. No obstante, si la tasa a la que se produce el eyaculado afecta la adecuación masculina, algunos modelos teóricos han propuesto que una estrategia que les permite optimizar sus recursos reproductivos no es, como se suponía, aumentando la cantidad de eyaculado cuando hay CE, sino reduciéndola o evitándola. Para hacerlo, se ha sugerido que los machos son capaces de obtener información de la CE a través de algunas características propias de las hembras o del medio en el que se encuentran durante la época reproductiva. En este trabajo se evaluó empíricamente si los machos de *Stenomacra marginella* son capaces de percibir la CE y evitarla.

Aunque el tamaño de las hembras no fue utilizado por los machos para inferir la CE, puesto que no importando las diferencias de éste enviaron la misma cantidad de eyaculado, si encontramos que son capaces de reconocer si una hembra se ha apareado o es virgen y transferir menos eyaculado a las hembras que habían utilizado parte de su grupo de óvulos. En su conjunto, los resultados sugieren que cuando hay CE y la producción de eyaculado es costosa, los machos no envían más eyaculado, sino al contrario, reducen su envío como una forma de optimizar sus recursos reproductivos.

Introducción

En muchas especies, incluyendo algunas que habían sido consideradas como monógamas, es común que una hembra se aparee con distintos machos (Morrell, 1998). La obtención de apareamientos múltiples puede beneficiar a las hembras por diversas razones; por ejemplo, es usual que junto con el eyaculado se envíen sustancias nutritivas que son utilizados para asegurar a la progenie (Eberhard, 1996).

Por otro lado, la poligamia en los machos promueve la competencia de los gametos de distintos individuos que intentan fecundar a los óvulos (competencia espermática—CE; Paker, 1970). Para ganar la CE, algunos autores han propuesto que los machos necesitan enviar cantidades similares de eyaculado entre cópulas. Este esfuerzo fisiológico sin embargo, se considera costoso, pues se ha observado que después de cada apareamiento, el eyaculado se modifica cualitativa (contenido del fluido seminal) y cuantitativamente (cantidad de fluido seminal) y por lo tanto, puede afectar la adecuación masculina (Dewsbury, 1982). El tiempo que tarda un macho en volverse aparear (latencia a la cópula) y que esta relacionado con su capacidad de producir el eyaculado es un ejemplo de ello, pues si la latencia a la cópula se incrementa conforme aumenta el número de apareamientos, entonces la adecuación masculina disminuye puesto que se pierden oportunidades de cópula (Wedell et ál., 2002).

Debido a los beneficios que las hembras obtienen de la CE, y al contrario, a los costos que ésta le imprime a la producción de eyaculado, se ha considerado que la CE puede generar un conflicto de interés reproductivo entre los sexos (Simmons, 2001). Entre los caracteres que les permiten evitar o disminuir la CE a los machos y reducir los costos,

se encuentran los conductuales, como por ejemplo, el resguardo de la pareja (Simmons, 2001). Entre los morfológicos, las estructuras utilizadas durante los procesos de desplazamiento o remoción espermática (Córdoba-Aguilar 1999). Y entre los fisiológicos, una transferencia de menos esperma cuando aumenta la probabilidad de que una hembra determinada se haya apareado (riesgo de competencia espermática—RCE; Parker et ál., 1996). Si el tamaño de las hembras se relaciona proporcionalmente con la capacidad de producir óvulos y almacenar eyaculado (Ryne et ál., 2001; Michaelidis et ál., 2006) por ejemplo, entonces las hembras grandes podrían representar mayor RCE que aquellas de menor tamaño. Por lo tanto, para disminuir el efecto del RCE y asegurar la paternidad, los machos deberían enviar más eyaculado a hembras chicas (McLain et ál., 1990; Parker et ál., 1996; Parker et ál., 1999; Reinhardt, 2001).

Por otro lado, si los machos son capaces de detectar la presencia de otro eyaculado dentro el tracto reproductivo de las hembras (intensidad de la competencia espermática—ICE) y enviar menos eyaculado a estas hembras que a las vírgenes, entonces podrían disminuir el efecto de la ICE y aumentar sus probabilidades de paternidad (Paker, 1998; LaMunyon y Huffman, 2001; Engqvist y Reinhold, 2006; Frieberg, 2006).

Una forma de evaluar la cantidad de eyaculado transferido es por medio de la duración de la cópula, ya que se ha encontrado que ambas variables se correlacionan positivamente (Parker et ál., 1999; Taylor et ál., 2000; García-González y Gomedio, 2004). Por lo tanto, ambas variables fueron utilizadas para evaluar si los machos transfieren menos eyaculado cuando se aparean con hembras grandes o apareadas, respecto a aquellas que son chicas o vírgenes.

Especie de estudio

Stenomacra marginella se encuentra distribuida desde la región Patagónica hasta el norte de Estados Unidos. En México generalmente se les encuentra en densidades altas sobre los árboles de *Buddleia cordata*. La temporada de apareamiento en la Ciudad de México comienza en mayo y finaliza en septiembre (Cuatianquiz et ál., 2003). El cambio de ninfa a imago es sincrónico; una vez que los individuos alcanzan el estado adulto presentan un periodo aproximado de un mes sin receptividad sexual (Cuatianquiz et ál., 2003). Las hembras casi siempre se aparean con diferentes machos, aunque algunas veces lo hacen con el mismo (Cuatianquiz y Cordero, 2005). Como en otras especies poligámicas, las hembras tienen un reservorio espermático que les permite mantener el eyaculado de diferentes machos (Eberhard, 1996).

Las hembras son significativamente más grandes que los machos (medición ventral que abarca la cabeza, el tórax y el abdomen [U = 1839.5; P = 0.0000001; ♂: n = 103, mediana = 11.6, CI-11.23, CS-12, y ♀: n = 106, mediana = 12.68, CI-12, CS-13.22] Obs. Pers. de campo 2004 — 2008).

Los machos realizan una serie de conductas durante el apareamiento (Cuatianquiz et ál., 2003; Cuatianquiz y Cordero, 2006) en las cuales hay contacto entre estructuras sensoriales como las antenas, los pelos y las cerdas. Además presentan vellosidades alrededor del edeago (Moreno-García y Cordero, 2008). Se sabe que los apareamientos afectan negativamente la longevidad masculina (Oliver y Cordero, 2009);

Finalmente la oviposición ocurre, aproximadamente, 12 días después del apareamiento [(n = 50, mediana 11; CI-9, CS-13) Obs. Pers. de campo] y hay evidencia

experimental que indica que el segundo macho en copular obtiene del 75 al 80% de la paternidad respecto al primero (Caballero, 2007).

Colecta, mantenimiento y conservación

Este trabajo se realizó durante la temporada reproductiva (mayo) de los años 2004 y 2005. Durante el mes de abril (2004 y 2005) se aprovechó el periodo en donde no hay receptividad sexual para coleccionar individuos vírgenes que se encontraban alrededor de la reserva del Pedregal de San Ángel, en el campus de la Ciudad Universitaria que pertenece a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los individuos colectados fueron separados por sexo y mantenidos en encierros de $30 \times 30 \times 50$ cm que fueron hechos con un armazón de madera y paredes de tul. En cada encierro se mantuvo una densidad de 25 a 30 individuos. Todos los encierros fueron mantenidos en condiciones controladas de luz y temperatura (12L:12D; 22°C). A los organismos se les alimentó con hojas de *Buddleia cordata* (Loganiaceae) y una solución de agua con 20 g de azúcar, 0.2 ml de proteína hidrolizada (“Jugo Maggi”™) y 37 ml de clara de huevo/ 100 mg de la solución. La solución les fue proporcionada por medio de algodones que fueron empapados y colocados dentro de recipientes redondos (5 x 0.5 cm). El recambio del alimento se realizó cada 48 h.

Para la fase experimental, todas las parejas fueron asignadas aleatoriamente a cada uno de los grupos. Las observaciones de los apareamientos fueron hechas a través de cajas petri (15cm x 0.5 cm). En todos los casos, después de haber concluido los tratamientos, las hembras fueron incluidas en alcohol al 70% . Posteriormente se les fotografió y se les extrajo la espermateca. Cada espermateca se aclaró con hidróxido de potasio (KOH al

10%); para acelerar la reacción se calentó en baño maría por 45 minutos. Por medio de ésta técnica se obtuvo tanto el área de la espermateca como la del eyaculado almacenado dentro de ellas. Las preparaciones se observaron y fotografiaron en un microscopio estereoscópico Olympus SZH10 a un aumento de 1.5X7 con una cámara Sony digital DSC-P50 Cyber-shot de 2.1 mega pixeles. Las imágenes se procesaron con el programa ImageTool versión 3.00 para Windows y la escala utilizada para medirlas fue en μm .

Diseño experimental

Experimento I

Para conocer si la cantidad de eyaculado transferido cambia entre hembras grandes y chicas y de qué manera, se plantearon las siguientes predicciones y se realizó el experimento que posteriormente se describe.

Predicciones

Partiendo del supuesto que considera que las hembras grandes representar un mayor riesgo de competencia espermática, esperábamos que:

- 1) Los apareamientos con hembras grandes serían de menor duración que con hembras chicas.
- 2) La transferencia de eyaculado sería menor hacia hembras grandes.

A un grupo de hembras vírgenes (N=100) tomadas de manera aleatoria de los encierros, se les midió el largo del cuerpo con un vernier manual (en milímetros). Para hacerlo, se midió

la parte ventral del cuerpo, que abarcó desde la cabeza, pasando por el tórax, hasta el abdomen. Posteriormente, y de acuerdo con su longitud, fueron escogidas las 11 hembras más grandes y las 11 más chicas. Finalmente ambos grupos fueron utilizados para formar las parejas que se aparearían con los machos vírgenes y que fueron tomados aleatoriamente de las cajas en donde se mantenían.

Al término del experimento se volvió a medir la longitud de las hembras y también se midió la longitud de los machos. A las hembras se les midió para corroborar si las diferencias en el tamaño corporal entre el grupo que consideramos como chicas y como grandes eran significativas. A los machos en cambio, se les midió para asegurar que no había diferencias significativas de tamaño entre los que elegimos para aparearse entre los grupos de hembras grandes y chicas.

Las variables que se midieron en este experimento fueron las siguientes: a) la duración de la cópula (*min*), b) el área visible de la espermateca (μm^2) y c) el área visible del eyaculado dentro de la espermateca (μm^2). Para comparar el tamaño de las hembras, las espermatecas, la duración de las copulas y el tamaño de los eyaculados entre ambos grupos, se utilizó la prueba de “U” de Mann Whitney, que se encuentra disponible en el programa Statistica (StatSoft 1999).

Resultados

El tamaño de las hembras

El tamaño de las hembras (*mm*) pertenecientes a los grupos que denominados como *grandes* y como *chicas* fueron estadísticamente distintos entre sí ($U = 0.000001$, $p =$

0.00007; hembras grandes N = 11, mediana 13.89; CI-13.58, CS-14.17; hembras chicas N = 11, mediana 11.76; CI-10.91, CS-12.43). A pesar de ello, el tamaño de las espermatecas (μm^2) no difirió significativamente entre ambos grupos (U = 45, p = 0.31; hembras grandes N = 11, mediana 0.05; CI-0.05, CS-0.06; hembras chicas N = 11, mediana 0.05; CI-0.05, CS-0.05;).

El tamaño de los machos

El tamaño (*mm*) de los machos que fueron asignados para aparearse con hembras grandes o con hembras chicas no presentó diferencias significativas entre los tratamientos (U = 49, p = 0.45; grupo de ♀ grandes N = 11, mediana 12.13; CI-11.72, CS-12.64; grupo de ♀ chicas N = 11, mediana 12; CI-10.35, CS-12.44).

El efecto del tamaño de las hembras en la duración de la cópula y en la transferencia del eyaculado

La duración de la cópula (*min*) no mostró diferencias significativas entre los tratamientos (U = 34, p = 0.08; grupo de ♀ grandes N = 11, mediana 124; CI-70, CS-137; grupo de ♀ chicas N = 11, mediana 68; CI-48, CS-104). Tampoco se encontraron diferencias significativas en el área visible del eyaculado (μm^2) que fue transferido a las espermatecas entre los tratamientos (U = 47.5, p = 0.4; grupo de ♀ grandes N = 11, mediana 0.03; CI-0.02, CS-0.03; grupo de ♀ chicas N = 11, mediana 0.02; CI-0.01, CS-0.03).

Experimento II

Para analizar la idea que propone que las hembras apareadas representan un mayor el riesgo de competencia espermática que las hembras vírgenes, en el experimento que aparece más adelante, se evaluaron las siguientes predicciones:

Predicciones

1. La duración de la cópula es mayor en los apareamientos con hembras vírgenes que con hembras que se han apareado u ovipuesto.
2. La cantidad de eyaculado transferido es menor cuando las hembras se han apareado u ovipuesto respecto a las vírgenes.

Para el experimento se establecieron cuatro grupos con individuos vírgenes. Dos de ellos consistieron de dos controles con $\sigma = 15$ y $\varphi = 15$ cada uno y otros dos experimentales con $\sigma = 30$ y $\varphi = 15$ respectivamente.

El primer grupo control (**A**) se utilizó con la finalidad de conocer cuánto eyaculado podría transferir un macho virgen en un primer apareamiento con una hembra también virgen. El segundo grupo control (**AO**)¹ se planteó para saber la cantidad de eyaculado que queda dentro de una hembra que ha ovipuesto después de haberse apareado por una sola vez con un macho virgen.

En el primer grupo experimental (**AA**) se evaluó la cantidad de eyaculado que queda almacenado en una espermoteca después de que una hembra se apareó consecutivamente

¹ El número de replicas en este tratamiento fue menor porque las hembras murieron antes de oviponer

con dos machos vírgenes. Para ello cada hembra se reapareó después de 24 h de que se había llevado a cabo el primer apareamiento.

En el segundo grupo experimental (AOA)² se evaluó la cantidad de eyaculado almacenado en la espermateca después de que una hembra que se había apareado y ovipuesto, se volvió a aparearse con otro macho virgen. En este experimento las hembras primero se aparearon con un macho virgen. Posteriormente se esperó a que ovipusieran y a las 24 h se reaparearon con otro macho virgen. El tiempo que tardan en oviponer después de un primer apareamiento con un macho virgen es en promedio de 12 días (n = 50, mediana 11; CI-9, CS-13).

Las variables que se midieron en este experimento fueron las siguientes: a) la duración de la primera cópula (*min*), b) la duración de la segunda cópula (*min*) y c) el área visible del eyaculado dentro de la espermateca (μm^2). Todos los datos fueron analizados por medio de pruebas no paramétricas. Para comparar la duración de la primera cópula y el área del eyaculado en la espermateca entre los cuatro grupos (A, AA, AO y AOA) se utilizó la prueba de Kruskal Wallis. Para analizar la duración de la segunda cópula entre los grupos AA y AOA se utilizó la prueba de U de Mann Whitney, y para analizar la duración entre la primera y la segunda cópula de estos mismos grupos, se utilizó la prueba de Wilcoxon para muestras dependientes. Para todos los análisis se utilizó el programa Statistica 6.0 (StatSoft 2001).

² El número de replicas en este tratamiento disminuyó porque las hembras murieron antes de oviponer

Resultados

El efecto de la historia reproductiva femenina en la duración de la cópula

No se encontraron diferencias significativas ni en la duración de la primera cópula entre los tratamientos ($H_{3, N=54} = 1.88, p = 0.59$), ni tampoco de la segunda cópula entre los grupos AA y AOA ($U = 85, p = 0.8$; grupo AA $N = 15$, mediana 142; CI-66, CS-125; grupo AOA $N = 12$, mediana 142; CI-91, CS-214). Sin embargo, si se encontraron diferencias significativas en la duración de la primera cópula con relación a la segunda cópula de los tratamientos AOA ($T_{12} = 14, p = 0.04$), pero no en el tratamiento AA ($T_{15} = 27, p = 0.06$) (Fig. 1).

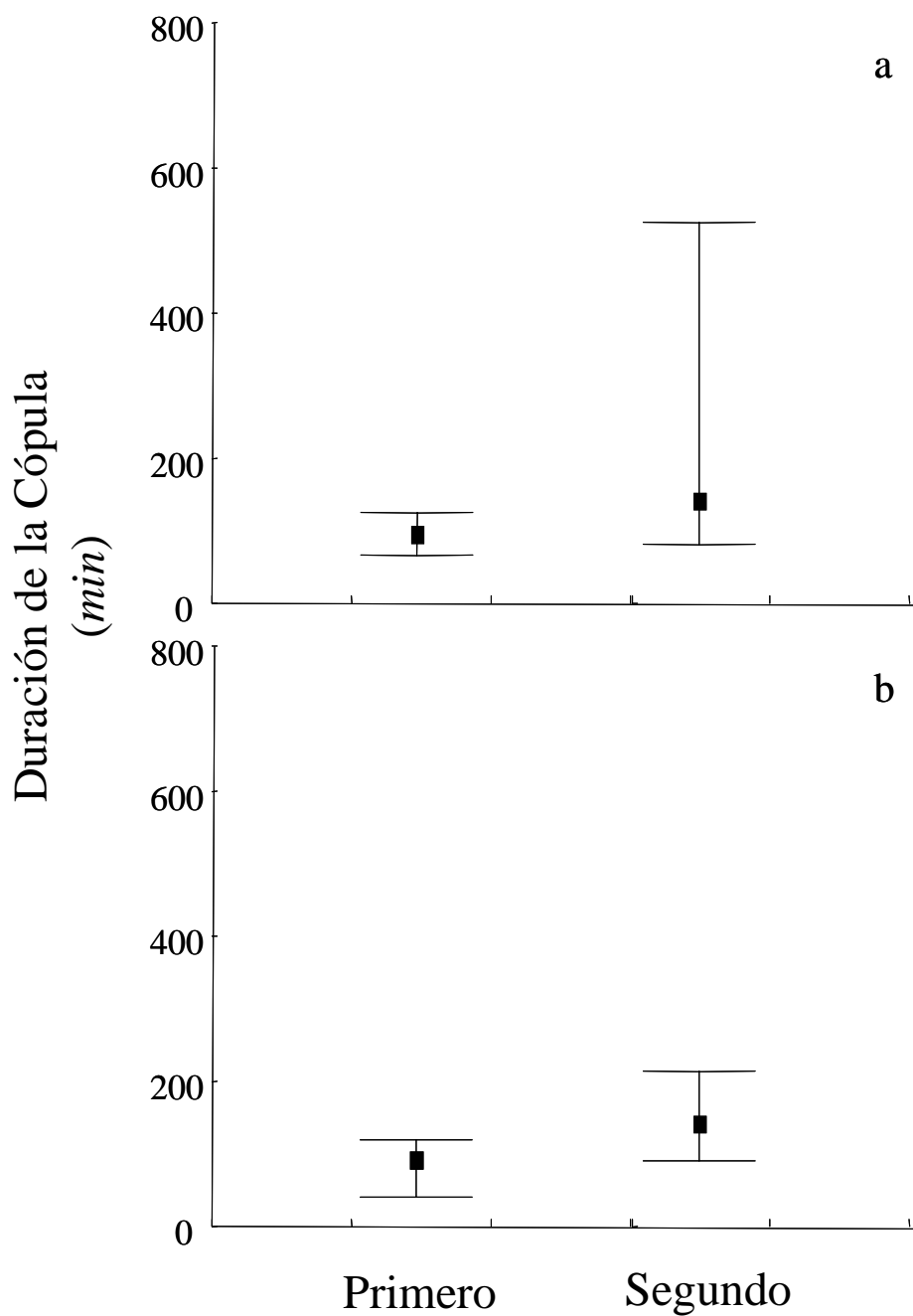


Fig. 1 Análisis de medidas repetidas de la duración de la primera cópula contra la segunda a) cuando las hembras se aparearon dos veces consecutivas y b) cuando las hembras se aparearon 24h después de haber ovipuesto (■ mediana y I cuartiles).

***Almacenamiento del eyaculado en la espermateca
dependiendo de la historia reproductiva femenina***

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el área del eyaculado almacenado en la espermateca entre los grupos control ($U_{15,12} = 49$; $p = 0.045$), siendo menor en el grupo de hembras que ovipusieron después de apararse (AO). De la misma manera también se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos experimentales ($U_{15,12} = 40$; $p = 0.15$), siendo menor en el grupo de hembras que se aparearon por segunda vez después de haber ovipuesto (AOA). Al comparar el grupo control en donde la hembra se apareo una sola vez (A) con los grupos experimentales (AA y AOA), se observó que el grupo AOA presentó un área de eyaculado estadísticamente menor que los otros dos grupos (Fig. 2 y Cuadro 1).

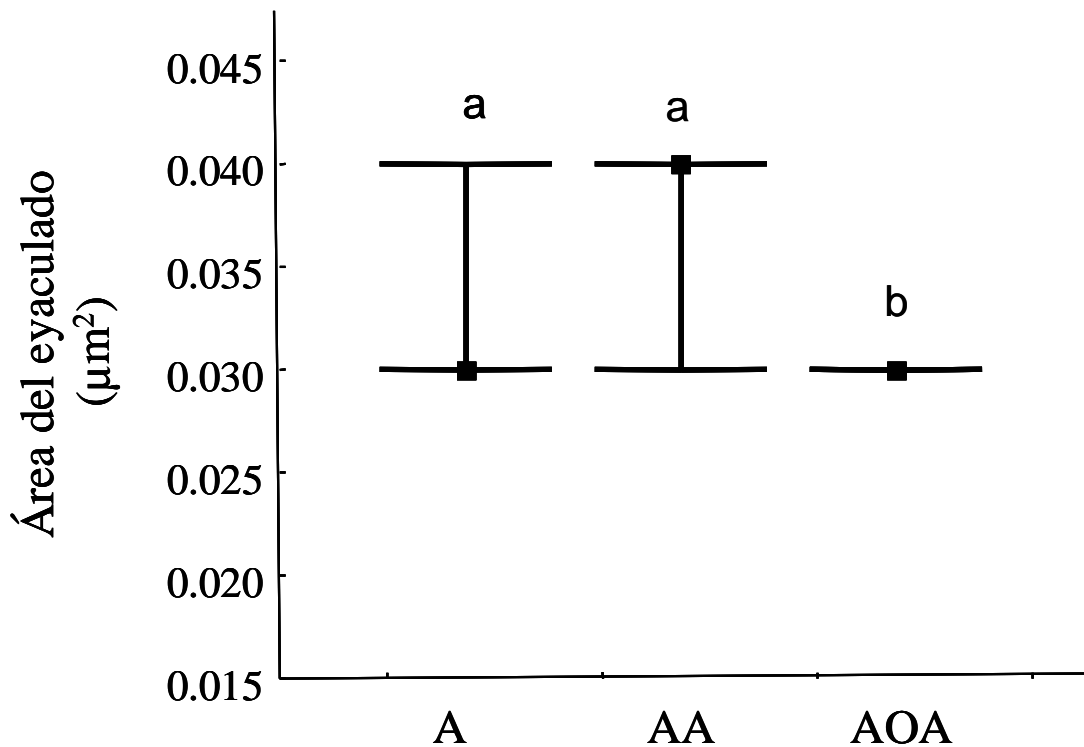


Fig. 2 Diferencias en el área del eyaculado transferido a hembras con diferente historia de apareamiento (■ mediana, I cuartiles). Hembras apareadas una vez (A); hembras apareadas con dos machos vírgenes consecutivamente (AA) y hembras apareadas por segunda vez con otro macho virgen después de haber ovipuesto (AOA) (las letras a y b muestran diferencias significativas $P < 0.05$).

Cuadro 1. Área visible del eyaculado en la espermateca en el grupo control (A, AO) y los grupos experimentales (AA, AOA) [valores de la mediana, cuartil inferior (CI) y cuartil superior (CS)]

Tratamiento	Mediana	CI	CS
A	0.03	0.03	0.04
AO	0.03	0.02	0.03
AA	0.04	0.03	0.04
AOA	0.03	0.03	0.03

A Apareadas una vez y sacrificadas inmediatamente

AO Sacrificadas 24 h después de haber ovipuesto

AA Apareadas con dos machos vírgenes consecutivamente y sacrificadas 24 h después del segundo apareamiento

AOA Apareadas por segunda vez con otro macho virgen después de haber ovipuesto y sacrificadas 24 h después

Discusión

Que la duración de la cópula fuera mayor en las hembras de *Stenomacra marginella* que se habían apareado u ovipuesto respecto a las vírgenes, podría no apoyar el supuesto del modelo teórico que evaluamos, pues éste propone que cuando existe ICE, los machos deberían de transferir menos eyaculado para así reducir los costos de la producción gamética (Parker et ál., 1996). Sin embargo, como durante la cópula un macho podría desplazar o estratificar el eyaculado de otros machos (McLain 1980; Arnqvist y Danielsson, 1999) y no únicamente incrementar la cantidad de eyaculado que transfiere, entonces la duración de la cópula en *S. marginella* podría estar más bien relacionada con evitar o disminuir los costos asociados de la CE a través de este tipo de mecanismos.

Además que la transferencia de eyaculado a las hembras que se aparearon por segunda vez después de haber ovipuesto (AOA) fuera menor que a las que se aparearon una (A) o dos veces consecutivas (AA, Fig. 2), podría implicar que los machos son capaces discriminar si las hembras han utilizado sus recursos reproductivos y siendo así, transferir menos eyaculado. En otras palabras, este resultado se ajusta a las predicciones del modelo teórico que sugiere que conforme aumenta la ICE, la transferencia de eyaculado será mayor a hembras que representen menor CE y al mismo tiempo, sigue siendo compatible con la idea de que la producción espermática es costosa. Por otro lado, no haber encontrado diferencias significativas en la transferencia de eyaculado entre los grupos de hembras que se aparearon una (A) o dos veces consecutivas (AA, Fig. 2), es difícil de interpretar y podría ir en contra de lo que esperábamos. Sin embargo, una posibilidad que nos permitiría

explicar porque no encontramos las diferencias esperadas entre ambos grupos, podría deberse a que los machos del grupo AA que se aparearon en segundo lugar, hayan estratificado o removido el esperma del primer macho. Esta interpretación es apoyada con un estudio previo hecho en *S. marginella*, en el que se muestra que el segundo macho es quien gana del 75 al 80% de la paternidad (Caballero, 2007). También hace falta mencionar que el aparato copulador de los machos de *S. marginella* se encuentra cubierto de vellosidades (Moreno-García y Cordero, 2008), y que como en otras especies, podría ser usado como un mecanismo sensoriales que permite evaluar si existe eyaculado dentro del tracto reproductivo femenino (Siva-Jothy y Stutt, 2003; Uhía y Cordero Rivera, 2005).

Por otro lado, no encontramos que el tamaño de la espermateca se relacionara con el tamaño de las hembras. Es decir, las hembras grandes no representan mayor RCE que las chicas. Por lo tanto, no fue raro encontrar que el tamaño de las hembras no influyera en la cantidad de eyaculado que los machos les transfirieron. Este resultado además se relaciona con otros datos (Oliver C, datos no publicados) en los que se encontró que tanto la latencia a la oviposición ($U_{G=12,C=12} = 54$; $P = 0.31$), como la eclosión de los huevos ($U_{G=12,C=12} = 50$; $P = 0.22$) y el número de huevos puestos ($U_{G=12,C=12} = 55$; $P = 0.35$), no es distinto estadísticamente entre hembras grandes o chicas ($U_{G=12,C=12} = 0.000001$; $P = 0.000032$).

Finalmente cabe destacar que los resultados de este trabajo en su conjunto, sugieren que la elección críptica masculina puede ser una estrategia reproductiva que ha evolucionado en los machos como un mecanismo que podría optimizar los recursos reproductivos.

Bibliografía

Arnqvist, G. y Danielsson, I. 1999. Postmating sexual selection: the effects of male body size and recovery period on paternity and egg production rate in a water strider. *Behavioral Ecology* 10: 358-365.

Caballero, N. 2007. Efecto de la conducta del macho durante la cópula sobre su éxito reproductivo en la chinche *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae). Tesis de Maestría. Instituto de Ecología, UNAM. 46pp.

Córdoba-Aguilar, A. 1999. Male copulatory sensory stimulation induces female ejection of rival sperm in a damselfly. *Proceedings of the Royal Society, London; series Biological Sciences*. 266: 779-784.

Cuatianquiz, C., Muñoz, L., Oliver, C., Moreno, M. & Cordero, C. 2003. *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae): *Un modelo para estudiar la evolución de la poliandria, el cortejo durante la cópula y la conducta de oviposición*. In *Fisiología, ecología y comportamiento: una propuesta multidisciplinaria* (eds. Martínez-Gómez, M., Cruz, Y., Hudson, R. & Lucio, R. A.), pp. 125-132. México: UAT/UNAM.

Cuatianquiz C, Cordero C (2005) Multiple mating in female *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae) in Central Mexico. *Entomological News* 116:331-334.

Cuatianquiz C, Cordero C (2006) Experimental manipulation of male behaviour during copulation in *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae): effect on copula duration, female remating and oviposition. *Behav. Proc.* 73:222-227.

Dewsbury DA (1982). Ejaculate cost and male choice. *American Naturalist* 119:601-610.

Eberhard, W.G. 1996. *Female Control: Sexual Selection by Cryptic Female Choice*. Princeton University Press, Princeton, NJ, USA.

García-González, F. y Gomedio, M. 2004. Adjustment of copula duration and ejaculate size according to the risk of sperm competition in the golden egg bug (*Phyllomorpha laciniata*). *Behavioral Ecology*. 15: 23-30.

McLain, D.K. 1980. Female choice and the adaptive significance of prolonged copulation in *Nezara vidula* (Hemiptera: Pentatomidae) *Psyche*. 87, 325-336.

McLain, D.K., Lanier, D.L. y Marsh N.B. 1990. Effects of female size, mate size and number of copulations on fecundity, fertility, and longevity of *Nezara viridula*

(Hemiptera: Pentatomidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 83: 1130-1136.

Michaelidis, C.I., Demary K. y Lewis S.M. 2006. Male courtship signal and female signal assessment in *Photinus greeni* fireflies. *Behavioral Ecology*. 17: 329-335.

Morell, V. 1998. A new look at monogamy. *Science*. 281: 1982-1983.

Moreno-García M. y Cordero, C. 2007. On the function of claspers in *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae). *Journal of Ethology* 26: 1 - 6.

Oliver, C. y Cordero, C. 2009. Multiple mating reduces male survivorship but not ejaculate size in the polygamous insect *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae). *Evolutionary Ecology*. 23:417-424.

Parker, G. A. 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Review*. 45, 525-567.

Parker, G.A., Ball, M.A., Stocley, P. y Gage, M.J.G. 1996. Sperm competition games: individual assesment sperm competition intensity by group spawners. *Proceedings of the Royal Society, London; series Biological Sciences*. 263: 1291-1297

Parker, G.A., Simmons L.W., Stockley P., McChristie, D.M., Charnov, E.L. 1999. Optimal copula duration in yellow dung flies: effects of female size and egg content. *Animal Behaviour*. 57: 795-805.

Reinhard, K. 2001. Determinants of ejaculate size in a grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 50: 503-510.

Ryne, C., Zhu J.W., Van Dangen, S. y Löfstedt, C. 2001. Spermatophore size and multiple mating: effects on reproductive success and post-mating behaviour in the indian meal moth. *Behaviour*. 138: 947-963

Simmons, L.W. 2001. *Sperm Competition and its Evolutionary Consequences in the insects*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.

Siva-Jothy, M.T. y Stutt, A.D. 2003. A matter of taste: direct detection of female mating status in bedbug. *Proceedings of the Royal Society, London; series Biological Sciences*. 270:649-652

Taylor, P. Kaspi, R. y Yuval, B. 2000. Copula duration and sperm storage in mediterranean fruit flies from a wild population. *Physiological Entomology*. 25: 94-99.

Uhía, E. y Cordero Rivera, A. 2005. Male damselflies detect female mating status: importance for postcopulatory sexual selection. *Animal Behaviour*. 69:797-804.

Wedell, N., Gage, M.J.G y Parker G.A. 2002. Sperm competition, male prudence

and sperm-limited females. *Trends in Ecology and Evolution*.17: 313-320.



DISCUSIÓN GENERAL

Uno de los resultados centrales de este trabajo fue haber encontrado que la transferencia de eyaculado en *Stenomacra marginella* puede afectar el tiempo de vida, lo cual sugiere la presencia de costos asociados con la producción de gametos (capítulo I). Como este resultado además es similar a lo encontrado en distintos grupos taxonómicos en donde se ha mostrado que la producción de eyaculado genera costos (Dewsbury, 1982; Cook y Wedell, 1996; Hellriegel y Blanckhorn, 2002; Rooney y Lewis, 2002; Iyengar y Eisner, 2004; Wedell y Ritchie, 2004; Engqvist y Reinhold, 2006; Michaelidis et ál., 2006), posiblemente su presencia sea todavía más común de lo que se ha detectado. Si así fuera, las predicciones de los modelos referentes al uso eyaculado, particularmente de especies polígamas en donde hay CE, seguramente se modificarán, puesto que es difícil pensar que si el eyaculado cuesta, los machos pueden hacer uso de éste de manera casi ilimitada.

Si los costos de la producción espermática restringen el éxito reproductivo masculino, una manera en cómo se ha propuesto podrían reducirse, es cuando la selección favorece tanto la evaluación masculina, como una menor transferencia de eyaculado cuando se intensifica la CE (Schaus y Sakaluk, 2001; Bonduriansky, 2001; Wedell et ál., 2002). Algunas características que han sido relacionadas con la intensidad y el riesgo de la competencia espermática son la historia reproductiva de las hembras y el tamaño corporal. Sin embargo, aunque se ha propuesto que las hembras grandes podrían representar un mayor potencial reproductivo, hay especies como en la mariposa *Utethesia oratrix* (Iyengar y Eisner, 2004) o en *S. marginella* en donde la transferencia de eyaculado no depende del tamaño corporal de las hembras. En el caso de *S. marginella* además, no

encontramos ninguna relación entre el tamaño de las hembras y el de las espermatecas, ni tampoco con la cantidad de eyaculado o la duración de la cópula (capítulo III). Estos resultados muestran que el tamaño de las hembras no indica el grado de CE y por lo tanto, transferir la misma cantidad de esperma a hembras grandes o chicas seguramente representa ventajas reproductivas.

Por otro lado, en *S. marginella* la duración de la cópula fue mayor en los casos en los cuales los machos vírgenes se aparearon con hembras que habían ovipuesto, lo cual también se vio reflejado en que la cantidad de eyaculado que se les transfirió fue menor que a las hembras que se aparearon una y dos veces consecutivas (capítulo III). En algunas especies, la presencia de otro eyaculado dentro de las hembras puede percibirse por medio del órgano copulador. En *S. marginella* el edeago que se encuentra cubierto de vellosidades (Moreno-García y Cordero 2008), podría permitir, como en otros insectos, detectar el esperma de machos previos (Siva-Jothy y Stutt, 2003; Uhía y Cordero Rivera, 2005). Otra forma que no excluye a la anterior, es que durante la cópula, las antenas de ambos sexos hacen contacto constantemente, lo cual puede estar relacionado con la detección de ciertos cambios químicos en la cutícula de las hembras u otros, como la presencia de sustancias de otros machos, que les indiquen si esa pareja ya ha copulado (Siva Jothy y Stutt, 2003; Ryan y Sakaluk, 2009; Thomas y Simmons, 2009).

La similitud en la cantidad de eyaculado transferido a las hembras que copularon por segunda vez después de 24 h del primer apareamiento respecto a las que se aparearon una sola vez, permite sugerir que los machos podrían estar estratificando el eyaculado, ya que la espermateca en *S. marginella* es una estructura esférica y rígida que no facilita el

movimiento espermático (Miller y Pitnick, 2003). Sin embargo, alternativamente los machos podrían desplazar el primer eyaculado por medio de la presión de entrada del segundo. Ambas posibilidades son compatibles con un trabajo previo en el que se demostró que los machos vírgenes de *S. marginella* apareados con hembras apareadas 24 h antes, ganaron entre el 75 y el 80% de la paternidad (Caballero, 2007).

Por otro lado, una forma por la cual los machos podrían discriminar el riesgo de competencia espermática es evaluando el número de machos sexualmente activos alrededor de una pareja. Cuando consideramos los datos de transferencia de eyaculado bajo RCE de dos años consecutivos, observamos que se mantuvo la siguiente tendencia estadística. Los machos que se encontraban bajo RCE no transfirieron eyaculado. Sin embargo, los datos obtenidos fueron significativamente menores para el segundo año (capítulo II). Este comportamiento podría estar asociado a un cambio del valor reproductivo de las hembras entre años. Aunque en ambos años detectamos que durante la fase de inactividad sexual los adultos de *S. marginella* fueron parasitados por una mosca de la familia Tachinidae y una avispa de la familia Enoyrtidae (*Hexcladia sp*) que causan que las hembras no pongan huevos, el grado de ataque fue mayor durante el segundo año (Méndes, V; Cuatianquiz, C; y Cordero, C, datos no publicados). A pesar de no contar con evidencia directa sobre el parasitismo en los individuos de nuestro experimento, una forma de explicar la diferencia en la transferencia de eyaculado entre años es la siguiente. Si los parasitoides reducen las probabilidades de encuentro con hembras receptivas y los machos lo percibieron antes de ser colectados para el experimento, entonces el grado de ataque en una población podría traducirse en que durante un aumento de éste (como en el segundo año), las hembras

tuvieron un mayor valor reproductivo. Otra opción es que este comportamiento se explique por medio de la elección críptica femenina. La explicación es similar a la anterior, solamente que en este caso, las probabilidades de encuentro que se reducen podrían ser la de los machos. Si así fuera, entonces las hembras podrían ser más selectivas en años en donde el parasitismo fuera menor y de esa manera, permitirles a los machos transferir más eyaculado en un año que en el otro.

Para terminar, queremos enfatizar algunos de los principales resultados. Primero, que la producción de eyaculado de *S. marginella* es costosa. Segundo, que como teóricamente se puede esperar cuando hay costos, los machos optimizan sus recursos reproductivos mediante el establecimiento de estrategias que les permiten reducir o evitar la CE. En *S. marginella*, como nuestros resultados lo muestran en su conjunto, una forma para llevarlo a cabo es transfiriendo una menor cantidad de eyaculado a cópulas donde el riesgo o la intensidad de competencia es mayor. Finalmente, los resultados de esta tesis muestran la presencia de lo que se ha denominado como elección críptica masculina. Un tipo de elección que siendo poco conspicua para el observador, no nos había permitido detectar sino hasta hace poco, como el sexo masculino que se pensaba poco selectivo, en realidad no lo es.

BIBLIOGRAFÍA

- Dewsbury DA (1982). Ejaculate cost and male choice. *American Naturalist* 119:601-610.
- Bonduriansky, R. 2001. The evolution of male mate choice in insects: a synthesis of ideas and evidence. *Biological Review*. 76: 305-339.
- Caballero, N. 2007. Efecto de la conducta del macho durante la cópula sobre su éxito reproductivo en la chinche *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae). Tesis de Maestría. Instituto de Ecología, UNAM. 46pp.
- Cook P.A. y N. Wedell. 1996. Ejaculate dynamics in butterflies: a strategy for maximizing fertilization success? *Proceedings of the Royal Society B*. 263: 1047-1051
- Engqvist L. y K., Reinhold. 2006. Theoretical influence of female mating status and remating propensity on male sperm allocation patterns. *Journal Compilation European Society for Evolutionary Biology*. 19: 1448-1458.
- Hellriegel B. y W.U. Blanckhorn. 2002. Environment influences on the gametic investment of yellow dung fly males. *Evolutionary Ecology*. 16: 505-522.
- Iyengar V.K.y T. Eisner. 2004. Male difference to female traits in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). *Ecological Entomology*. 29: 281-284.
- Michaelidis, C.I.; K. Demary y S.M.Lewis. 2006. Male courtship signal and female signal assessment in *Photinus greeni* fireflies. *Behavioral Ecology*. 17: 329-335
- Miller G.T.y S.Pitnick. 2003. Functional significance of seminal receptacle length in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology*. 16: 114-126.
- Moreno-García M. y Cordero, C. 2007. On the function of claspers in *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae). *Journal of Ethology*. 26: 1 - 6.
- Rooney J., y S.M., Lewis. 2002. Fitness advantage from nuptial gifts in female fireflies. *Ecological Entomology*, 27: 373-377.
- Ryan K.M., y S.K., Sakaluk. Dulling the senses: the role of the antennae in mate recognition, copulation and mate guarding in decorated crickets. *Animal Behaviour*.(2009), doi: 10.1016/j.anbehav.2009.02011.
- Schaus J.M. y Sakaluk, K. 2001. Ejaculate expenditure of male crickets in response to varying risk and intensity of sperm competition: not all species play games. *Behavioral Ecology*. 12: 740-745.
- Siva-Jothy, M.T. y A.D, Stutt. 2003. A matter of taste: direct detection of female mating status in begbug. *Proceedings of the Royal Society B*. 270:649-652

Thomas M.L y Simmons L.W., 2009. Male-derived cuticular hydrocarbons signal sperm competition intensity and effect ejaculate expenditure in crickets. *Proceedings of the Royal Society B*. 279:383-388.

Uhía, E., y Cordero-Rivera. A. 2005. Male damselflies detect female mating status: importance for postcopulatory sexual selection. *Animal Behaviour*. 69: 797–804.

Wedell, N., Gage, M.J.G y Parker G.A. 2002. Sperm competition, male prudence and sperm-limited females. *Trends in Ecology and Evolution*.17: 313-320.

Wedell N., y M. Ritchie. 2004. Male age, mating status and nuptial gift quality in a bushcricket. *Animal Behaviour*. 67: 1057-106.

