

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Caracterización De Las Fibras Del Músculo De
Vuelo En Machos Territoriales y No Territoriales
De *Hetaerina vulnerata*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Jennifer Ramírez Delgado

Co-directores de Tesis
Dr. Martín Alejandro Serrano Meneses
Dra. Kenia López García

Tlaxcala, Tlax.

Septiembre, 2016



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Caracterización De Las Fibras Del Músculo De
Vuelo En Machos Territoriales y No Territoriales
De *Hetaerina vulnerata*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Jennifer Ramírez Delgado

Comité Tutorial

Dr. Martín Alejandro Serrano Meneses
Dra. Kenia López García
Dr. Amando Bautista Ortega
Dr. Víctor Manuel Fajardo Guadarrama

Tlaxcala, Tlax.

Septiembre, 2016

Esta tesis se realizó bajo la codirección del Dr. Martín Alejandro Serrano Meneses y la Dra. Kenia López García. La asesoría del Dr. Amando Bautista Ortega y el Dr. Víctor Manuel Fajardo Guadarrama. La asistencia técnica brindada por la Q.F.I Silvia Mariscal Tovar y la Q.F.B. Laura García Rivera fue de gran ayuda para la realización de este proyecto.

La fase de laboratorio se realizó en el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Para su desarrollo y realización se contó el financiamiento de CONACYT (627278) y del Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

La Maestría en Ciencias Biológicas forma parte del Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional. Padrón Nacional de Posgrado (PNP).



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Jennifer Ramírez Delgado** realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: “**Caracterización de las fibras del músculo de vuelo en machos territoriales y no territoriales de *Hetaerina vulnerata***”.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., AGOSTO 10 DE 2016


DR. MARTÍN ALEJANDRO SERRANO MENESES


DR. AMANDO BAUTISTA ORTEGA


DRA. MARGARITA MARTÍNEZ GÓMEZ


DR. ISMAEL JIMÉNEZ ESTRADA


DR. SERGIO IVÁN ANCONA MARTÍNEZ



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: posgradoctbcuat@gmail.com
Tlaxcala, Tlax.

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC), Universidad Autónoma de Tlaxcala por mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la otorgarme la beca durante la maestría (627278).

A los miembros del comité tutorial Dr. Martín Alejandro Serrano Meneses, Dra. Kenia López García, Dr. Amando Bautista Ortega y Dr. Víctor Manuel Fajardo Guadarrama por sus valiosos aportes para la elaboración de mi tesis.

Agradecimientos a título personal

A Mi Familia por el cariño y apoyo constante e incansable durante toda mi vida.

A mis Codirectores Martín A. Serrano Meneses por invitarme al posgrado, por los consejos, la asesoría y por dejarme ser, una vez más, parte de su equipo de trabajo. Y Kenia García López por su constante apoyo y compromiso, tanto con la realización de la tesis, como con mi formación profesional.

Al Dr. Amando Bautista y el Dr. Víctor M. Fajardo por formar parte de mi comité tutorial y asesorarme durante mi proceso académico. Asimismo, le agradezco a los jurados Dr. Ismael Jiménez, Dra. Margarita Martínez, Dr. Sergio I. Ancona por haber aceptado y realizar la corrección de mi tesis de la mejor manera.

Al Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, directora, docentes y administrativos por la enseñanza académica y profesional que me ofrecieron.

A Frida Rodríguez y en especial a Rafael Hernández por su valiosa colaboración en campo.

Al Dr. Ismael Jiménez y su equipo de trabajo Silvia Mariscal, José Carlos Guadarrama, Berta Segura, Verónica Vargas y Vladimir Martínez por ayudarme y ofrecerme el espacio necesario para concluir la fase de laboratorio de mi tesis en el CINVESTAV.

A los *Cubiculeros* Laura Núñez, Gisela Bautista, Minerva Flores, Maribel Muñoz, Yahvé González, y en especial a Ernesto Pérez por los nuevos conocimientos, los consejos académicos y personales que me brindaron, pero sobre todo, por su grata y alegre compañía.

A Alejandro Soto y Iván Bravo por sus excelentes aportes y reflexiones durante la elaboración de mi tesis.

A mis grandes y nuevos amigos Graciela Zambrano, Gabriela Zambrano, Janet Atenco, Verónica Ramírez, Karla Ramírez, Evangelina García, Hilda Castro, Iván Pérez, Salvador Martínez, Mariana Cabrera, Andrea López, Diego García, Stacey Alpuche y David George por su hospitalidad y atención durante mi aprendizaje socio-cultural y académico en México.

A mis amigos Yeraldín Sánchez, Carolay Guarín y Andrés Ruano por el ánimo que me han dado sin importar los miles de kilómetros que nos separan.

A todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en la realización de esta tesis.

Dedicatoria

Le dedico esta tesis y mi nuevo grado a mi madre **María Lyda**
porque gracias a sus bendiciones, apoyo constante,
ánimo y esfuerzo los he logrado.

Resumen

En insectos voladores, estructuras como la musculatura estriada son indispensables para el mantenimiento del vuelo y maximizar su adecuación. La energía usada por las fibras musculares durante el vuelo puede obtenerse a partir de carbohidratos, oxidación de lípidos o ambos, dando a las fibras características de resistencia a la fatiga. Estas características, junto con la composición del tipo de proteínas, son determinantes para el desarrollo de conductas específicas en los individuos. En *Hetaerina vulnerata* (Insecta: Odonata), los machos presentan dos tácticas reproductivas alternativas: territorial y no territorial, las cuales difieren conductualmente con el fin de maximizar el éxito de apareamiento de los machos. Dado que la composición de los músculos del vuelo podría influir directamente sobre la adopción de esas conductas, en esta tesis se caracterizaron los tipos de fibras de los músculos del vuelo de machos territoriales (n=9) y no territoriales (n=8) de *H. vulnerata*. Se extrajeron los músculos asociados directamente al vuelo (insertados en las alas), y se congelaron con isopentano y hielo seco para realizar cortes seriados de 10 µm de grosor en un criostato (Leica CM1850) a -25°C. Se analizó la histología (H-E), metabolismo (NADH-TR) y tipo de actividad ATPasa (ATPasa básica) de las fibras. Los resultados muestran que los músculos del vuelo de los machos de *H. vulnerata* presentan una disposición radial de las fibras, un núcleo central y sarcosomas desarrollados. Las fibras tienen un metabolismo predominantemente oxidativo y pueden ser lentas o intermedias en los individuos de ambas tácticas, lo cual podría proporcionar mayor resistencia a la fatiga en el músculo y facilitar un vuelo prolongado. También, el área transversal de las fibras musculares es significativamente mayor en los músculos anteriores comparados con los posteriores y esta diferencia es mayor en machos territoriales, lo que probablemente se relaciona con el incremento en la generación de fuerza para combatir por un territorio.

Índice

1. Introducción.....	12
2. Antecedentes.....	17
2.1. Diferencias generales entre tácticas reproductivas alternativas de Odonata	17
2.1.1. Conducta y éxito de apareamiento	17
2.1.2. Características morfológicas de los machos dentro de las tácticas reproductivas alternativas	18
2.1.3. Masa muscular del vuelo.....	19
2.2. Músculo estriado en insectos	20
2.3. Morfología del tórax y músculo del vuelo en Odonata	21
3. Planteamiento del problema	26
4. Justificación.....	28
5. Hipótesis y predicciones	29
6. Objetivos.....	30
6.1. Objetivo general.....	30
6.2. Objetivos específicos	30
7. Materiales y métodos.....	31
7.1. Área de estudio	31
7.2. Fase de campo.....	31
7.2.1. Determinación de tácticas reproductivas alternativas en los machos	31
7.3. Manipulación de los individuos en el laboratorio y disección.....	32
7.4. Fase de laboratorio.....	33
7.4.1. Caracterización histológica	34
7.4.1.1. <i>Tinción Hematoxilina-Eosina</i>	34
7.4.2. Caracterización histoquímica	34
7.4.2.1. <i>Técnica ATPasa básica (pH 9.4)</i>	34
7.4.2.2. <i>Técnica NADH-TR</i>	35
7.5. Pruebas piloto	35

7.5.1. Músculos del vuelo de <i>Rhionaeschna sp.</i> : identificación y caracterización de las fibras	35
7.6. Colecta de datos en <i>Hetaerina vulnerata</i>	39
7.7. Análisis de datos	40
8. Resultados.....	41
8.1. Características morfológicas de los machos de <i>H. vulnerata</i>	41
8.2. Características histológicas de los músculos del vuelo.....	42
8.2.1. Área transversal de las fibras	43
8.3. Caracterización histoquímica.....	44
8.3.1. Determinación del metabolismo de las fibras: Histoquímica para NADH-TR	44
8.3.2. Determinación de la actividad enzimática de la ATPasa miofibrilar de las fibras: Histoquímica para ATPasa básica (pH 9.4)	48
9. Discusión	52
10. Conclusiones.....	60
11. Perspectivas	61
12. Referencias	62
13. Publicaciones	69

1. Introducción

Los odonatos son un grupo de insectos con aproximadamente 6,000 especies descritas (Silsby 2001). Las larvas (ninfas, Fig. 1 A) son acuáticas y se caracterizan por tener el labio –parte del aparato bucal– modificado como apéndice contráctil para capturar presas que van desde insectos hasta pequeños vertebrados (Orr 2003). Después de emerger (Fig. 1 B), se transforman en adultos voladores, los cuales presentan dos pares de alas membranosas transparentes, grandes ojos compuestos y un abdomen delgado y alargado (Ramírez 2010). Cuando los machos maduran, vuelan en búsqueda de pareja para copular (Fig. 1 C) y las hembras ovipositan en el agua (Fig. 1 D). El Orden Odonata se compone de dos subórdenes: Zygoptera (caballitos del diablo, Fig. 1 E) y Anisoptera (libélulas, Fig. 1 F). Los adultos de los primeros se caracterizan por tener el cuerpo delgado, las alas son de forma similar y se juntan sobre el abdomen al estar inmóviles. Mientras que en los segundos el cuerpo es robusto, las alas anteriores y posteriores son diferentes entre sí y se mantienen a los lados del cuerpo cuando están en reposo (Corbet 1999).

Generalmente, los machos adultos utilizan tácticas reproductivas con características conductuales y/o morfológicas específicas que maximizan la adecuación de los individuos (p. e.j. cortejo, territorialidad) (Oliveira y cols. 2008). El uso de una u otra táctica se ve determinada por una relación costo-beneficio (Oliveira y cols. 2008). En Odonata, los machos pueden adoptar una táctica *territorial* que se caracteriza por la defensa de territorios localizados en las orillas de cuerpos de agua a los cuales llegan las hembras con el único fin de reproducirse (Corbet 1999, Sanz 2002, Córdoba-Aguilar y Cordero- Rivera 2005). En este caso, el aumento del número de apareamientos es el principal beneficio de la territorialidad. Mientras que los costos pueden acumularse debido a la depredación, lesiones, y/o pérdida de energía por competencias territoriales (Suhonen y cols. 2008). Cuando el costo es muy alto, los individuos pueden exhibir una táctica reproductiva alternativa a la realizada por el resto de la población, y competir por el acceso a los apareamientos (Emlen y Oring 1977, Sanz 2002). Así, los machos que no logran mantener un territorio, adoptan una táctica alternativa denominada *no territorial* en la que recorren el cuerpo de agua en búsqueda de hembras o las

esperan cerca de los territorios de otros machos para intentar copular con ellas (Córdoba-Aguilar y Cordero- Rivera 2005, Serrano-Meneses y cols. 2007).

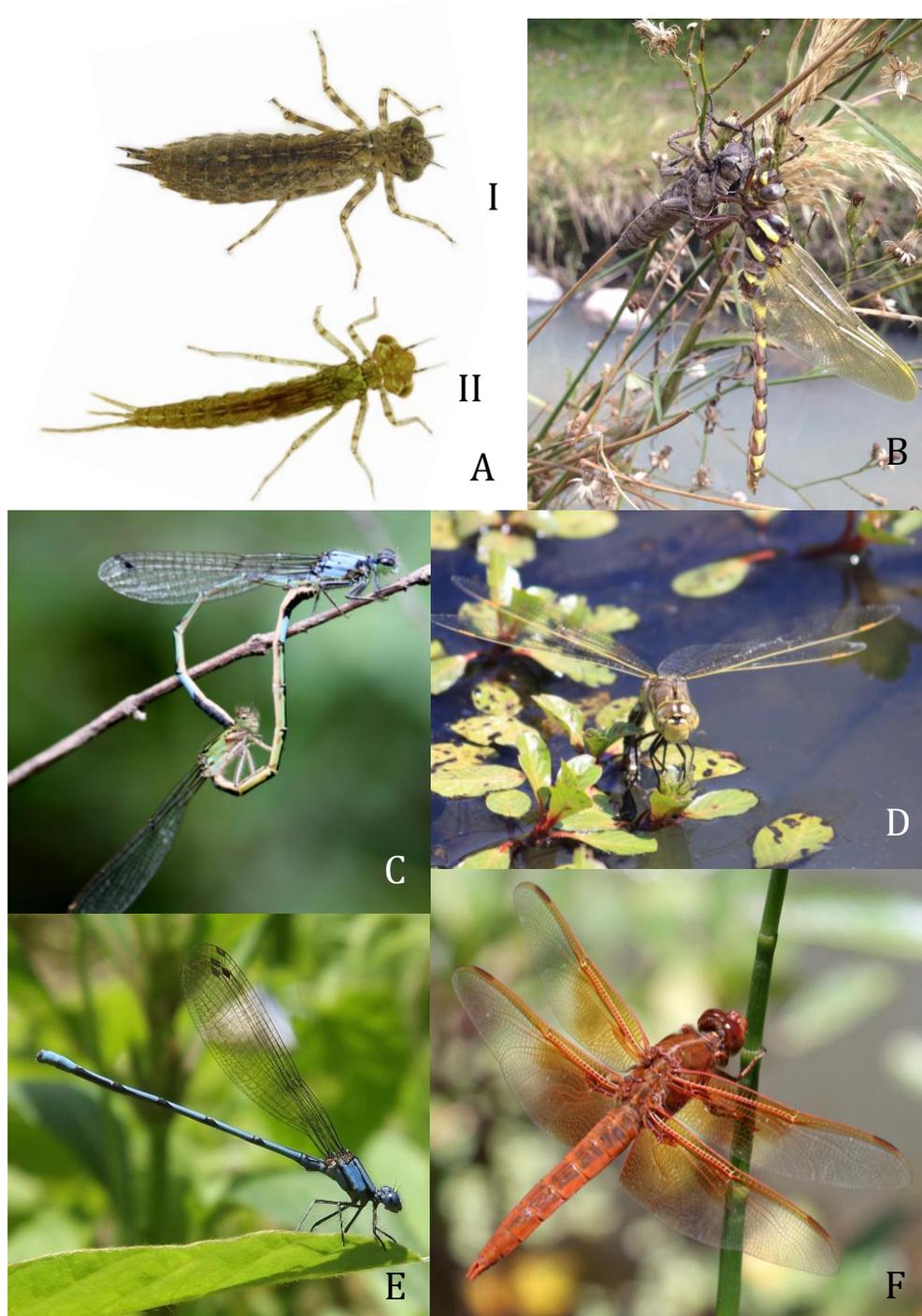


Figura 1. Ciclo de vida en Odonatos. A) Ninfas de Anisoptera (I) y Zygoptera (II). B) Emergiendo. C) Cópula. D) Oviposición. E) Suborden Zygoptera. F) Suborden Anisoptera.

En algunas especies de la familia Calopterygidae, los machos pueden optar por una u otra táctica dependiendo de las condiciones físicas y ambientales prevalentes en el lugar, así como de la densidad de machos dentro de la población (Corbet 1999). Por un lado, características ambientales como la sombra, el nivel del agua y la vegetación recién cortada, disminuyen los sitios potenciales para establecer un territorio, y por lo tanto, los costos asociados a la obtención y defensa de un territorio se ven incrementados (Corbet 1999). Por otro lado, el aumento de la densidad de los machos incrementa la competencia intrasexual, por lo que defender territorios y ganar el acceso a las hembras conlleva a un alto gasto energético (Emlen y Oring 1977). En ambos casos, los machos con potencial para defender un territorio estarían optando por una táctica alternativa menos costosa (Emlen y Oring 1977, Suhonen y cols. 2008), donde la energía adquirida en etapas tempranas sería invertida en encontrar e intentar copular con las hembras, como sucede en *Calopteryx haemorrhoidalis* (Vander Linden) (Cordero 1999).

El éxito de apareamiento se ve influenciado por la táctica reproductiva exhibida. Dentro de Calopterygidae, los machos con táctica territorial obtienen un alto número de cópulas comparado con los machos no territoriales (Grether 1996, Plaistow y Siva-Jothy 1996, Plaistow y Tsubaki 2000, Ramírez-Delgado y cols. 2015). Debido a que las hembras llegan a los territorios y se aparean principalmente con los machos que se encuentran allí (Siva-Jothy 1999). Se ha encontrado que la capacidad territorial en machos se relaciona positivamente con el tamaño corporal (Raihani y cols. 2008, Koskimäki 2009), la cantidad de grasa torácica (Marden y Waage, 1990, Plaistow y Siva-Jothy 1996) y la masa de los músculos de vuelo (Marden 1989, Plaistow y Tsubaki 2000). Estas características podrían facilitar la adquisición de un territorio al favorecer los movimientos alares y aumentar la capacidad de combate (Serrano-Meneses y cols. 2007, Contreras-Garduño y cols. 2008).

La capacidad de vuelo en odonatos favorece su éxito reproductivo, ya que este es necesario para desarrollar conductas como la captura de presas, competir por un territorio, copular y defender a la hembra durante la oviposición (Marden 2008). Esta capacidad depende de los músculos asociados directamente con el vuelo. Los músculos *basealar* y *subalar* son los encargados de tirar del ala hacia abajo, así como realizar la pronación y supinación durante el vuelo (fig. 2) (Nation 2008, Büsse y cols. 2013). Estos músculos se encuentran ubicados

anat6micamente en el t6rax, lo que les permite intervenir en el vuelo, debido a que est6n insertados directamente a las placas humeral y axilar de cada ala (Hatch 1966), y presentan una relaci3n sincr3nica entre la estimulaci3n de los nervios motores y la contracci3n muscular (Pringle 1957, Smith 1966, Beenackers y cols. 1984, Josephson 2006).

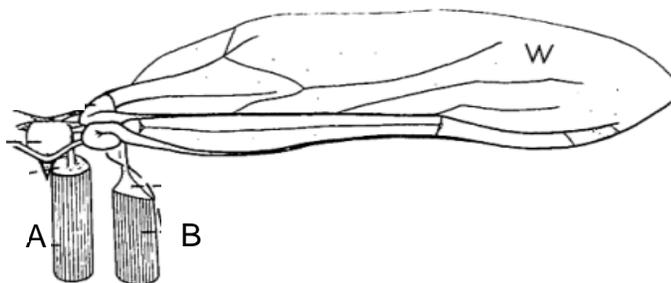


Figura 2. Músculos *Basalar* (A) y *Subalar* (B) del ala en *Aeshna umbrosa*. Modificado de Hatch 1966.

En general, el músculo estriado encargado de la locomoci3n y el tono postural est6 constituido por fibras musculares que pueden ser clasificadas por la concentraci3n de sus isoformas de miosina en r6pidas, intermedias y lentas; y por la expresi3n de las enzimas metab3licas caracterizadas en glucol6ticas y oxidativas con t6cnicas histoqu6micas como la ATPasa y NADH-TR respectivamente (Jolesz y Sreter 1981, Blaauw y cols. 2013). En los insectos, el músculo estriado est6 constituido de manera similar al de los vertebrados y otros invertebrados, sin embargo, difiere en la disposici3n y la abundancia relativa de componentes como las miofibrillas, posici3n del n6cleo y los sarcosomas (Smith 1961, Klowden 2007).

En Odonata, el músculo del vuelo presenta una organizaci3n tubular, la cual se caracteriza por el gran desarrollo de los sarcosomas, una disposici3n radial de las miofibrillas laminares alrededor de un n6cleo central, as6 como un ret6culo sarcopl6smico bien ordenado y desarrollado (Smith 1966). El tama1o y la organizaci3n de estos m6sculos en Odonata pueden haberse especializado a partir de las demandas metab3licas necesarias para la obtenci3n de energ6a para el vuelo (Pringle 1957, Smith 1966), por lo que un alto contenido de mitocondrias en las fibras musculares favorece el uso de un metabolismo oxidativo. Sin embargo, se desconoce si la composici3n del tipo de fibras de los m6sculos del vuelo favorece el uso de un metabolismo energ6tico eficiente en lib6lulas. No obstante, se sabe que los insectos pueden

obtener energía derivada de carbohidratos, oxidación de lípidos o incluso ambos (Beenakkers 1969, Beenakkers y cols. 1984). Un ejemplo sobre el cambio del metabolismo glucolítico al oxidativo durante el vuelo prolongado es el de la langosta *Schistocerca gregaria* Forskal (Weis-Fogh 1952). Asimismo, en la libélula *Pantala flavescens* Fabricius, se observó el cambio en el uso de sustratos como fuente de energía, de carbohidratos a lípidos, al ser utilizado inicialmente ácido butírico y finalmente las reservas de ácido palmítico (Kallapur y George 1973). En especies migratorias como *S. gregaria* y *P. flavescens*, el utilizar un metabolismo oxidativo durante el vuelo economiza carbohidratos y favorece la resistencia a la fatiga, lo que les permite mantener un vuelo prolongado durante la migración (Beenakkers y cols. 1984, Pflüger y Duch 2011).

Debido a la importancia que tiene la táctica empleada por los machos de especies territoriales de Odonata en el éxito de apareamiento, algunas características como la rapidez, la fuerza y la resistencia durante los combates aéreos y el vuelo prolongado, sugieren la existencia de una diferenciación metabólica entre los machos territoriales y no territoriales. Estas diferencias podrían ser evidentes al menos en el metabolismo y el fenotipo de las fibras que componen los músculos de vuelo. Así, sugiero que los machos territoriales necesitan mayor fuerza en los músculos del vuelo para realizar movimientos alares rápidos y combatir por un territorio durante los enfrentamientos aéreos, mientras que los machos no territoriales requieren resistencia a la fatiga por el constante movimiento en el que deben estar para buscar hembras. Sin embargo, a pesar de lo descrito anteriormente, no se sabe si en especies con tácticas alternativas de reproducción en Odonata existen diferencias en el tipo, cantidad y distribución de las fibras musculares que componen el músculo del vuelo y si estas diferencias podrían estar asociadas con el éxito reproductivo promedio que presentan los machos que utilizan una u otra táctica.

2. Antecedentes

2.1. Diferencias generales entre tácticas reproductivas alternativas de Odonata

2.1.1. Conducta y éxito de apareamiento

Las tácticas reproductivas hacen referencia a las características conductuales llevadas a cabo con el fin de aparearse (p. ej. cortejo, cuidado parental, territorialidad) (Oliveira y cols. 2008). La táctica exhibida por un macho es determinada por la relación costo/beneficio, siendo el aumento en el número de cópulas uno de los beneficios de la territorialidad. La defensa de un territorio involucra altos gastos energéticos (Suhonen y cols. 2008); por lo tanto, si los costos son elevados, los machos pueden presentar estrategias alternativas a la defensa de un territorio: una táctica no territorial (Emlen y Oring 1977, Sanz 2002).

Dentro de la familia Calopterygidae, los machos pueden usar como táctica reproductiva la territorialidad, no territorialidad o reversible entre ambas, y estas pueden ser determinadas por el ambiente (Raihani y cols. 2008, Suhonen y cols. 2008). De esta manera, los machos territoriales defienden y alejan a otros machos de un territorio de hasta 10 m de diámetro aproximadamente por varios días consecutivos y éste puede poseer o no recursos para las hembras (Corbet 1999, Sanz 2002, Córdoba- Aguilar y Cordero- Rivera 2005). En la táctica no territorial, los machos se ocultan entre la vegetación y/o recorren el cuerpo de agua en búsqueda de hembras ya que son perseguidos y expulsados por otros machos de los territorios (Córdoba-Aguilar y Cordero-Rivera 2005, Serrano-Meneses y cols. 2007). Aun así, hay individuos que tienen la capacidad de alternar o cambiar de táctica durante su tiempo de vida, como ciertos machos de *H. americana* (Raihani y cols. 2008).

Estas tácticas pueden ser determinadas ambientalmente como en *Calopteryx haemorrhoidalis* Vander Linden donde el aumento en la densidad poblacional ocasiona que la mayoría de los machos territoriales opten por una táctica alternativa menos costosa (Cordero 1999). O genéticamente, como en *Mnais costalis*, en la cual los machos con alas naranja presentan una táctica territorial, mientras que los machos con alas claras, exhiben una táctica

no territorial (Plaistow y Tsubaki 2000). Por su parte, los machos de *H. vulnerata* presentan ambas tácticas (no fijas), territorial y no territorial (Ramírez-Delgado y cols. 2015).

El éxito de apareamiento incrementa en odonatos territoriales como beneficio de la defensa y posesión de un territorio en comparación con los machos que no logran mantener uno o que presentan una táctica reproductiva alternativa (Grether 1996, Córdoba-Aguilar y Cordero-Rivera 2005, Contreras-Garduño y cols. 2008). Se ha encontrado en *H. americana* que los machos que permanecieron por más días en un territorio lograron aparearse con un mayor número de hembras que los machos con táctica no territorial (Serrano-Meneses y cols. 2007). Algo similar ocurre en *H. vulnerata* (Ramírez-Delgado y cols. 2015). Esto puede ser debido a que las hembras que llegan a los territorios se aparean principalmente con los machos que se encuentran ahí, como se ha evidenciado en *Calopteryx splendens* (Siva-Jothy 1999).

2.1.2. Características morfológicas de los machos dentro de las tácticas reproductivas alternativas

Las diferentes tácticas reproductivas se encuentran asociadas a rasgos morfológicos que maximizan la adecuación de los individuos (Emlen y Oring 1977, Sinervo y Zamudio 2001). Las características como la extensión del ala y la longitud pigmentación alar, juegan un papel considerable durante la adquisición de un territorio. Por una parte, en *H. americana* los machos que mantienen un territorio presentan una pigmentación alar mayor que los machos que presentan una táctica no territorial (Raihani y cols. 2008). Por otra, en *H. vulnerata* no se encontraron diferencias significativas del tamaño del ala ni del largo de la pigmentación alar entre las tácticas, pero si en el tamaño corporal (Álvarez y cols. 2013).

Un tamaño corporal grande se relaciona con una gran cantidad de grasa (reserva de energía) y de masa en los músculos de vuelo, lo que aumenta la capacidad de combate durante el vuelo favoreciendo los movimientos del ala y facilitando la adquisición del territorio (Contreras-Garduño y cols. 2006, Serrano-Meneses y cols. 2007, Contreras-Garduño y cols. 2008). El tamaño corporal del macho se considera importante en términos de ganar y permanecer en un territorio. En *C. virgo* Linnaeus, los machos territoriales fueron más grandes

y más pesados que los no territoriales, sugiriendo que el tamaño corporal puede predecir la táctica utilizada en algunos odonatos (Koskimäki 2009). En *H. americana*, los machos más grandes mantuvieron territorios por más tiempo que los machos más pequeños (Serrano-Meneses y cols. 2007), y en *M. costalis*, el tamaño corporal se correlacionó positivamente con el éxito de apareamiento, únicamente, en los machos con alas de color naranja (territoriales) (Plaistow y Tsubaki 2000).

2.1.3. Masa muscular del vuelo

Para adquirir un territorio y mantener una táctica territorial, los machos deben tener la capacidad para competir en los combates aéreos. En relación a esto, Marden (1989) reportó que los machos territoriales tienen mayor proporción del músculo de vuelo (PMV; masa muscular del vuelo/masa corporal) que los machos inmaduros de *Plathemis lydia* Drury. Además, al adicionar peso en el tórax de los machos territoriales, encontró que el éxito de adquirir territorio y de copular con las hembras disminuyeron significativamente en los individuos con menor PMV. En base a esto, sugirió que la capacidad competitiva se relaciona con la PMV.

Por otro lado, *H. americana*, Serrano-Meneses y cols. (2007) encontraron que las reservas de grasa localizada en el tórax incrementaron con el tamaño del cuerpo en machos territoriales, sin embargo, esta correlación no parece existir en aquellos machos con táctica no territorial. Asimismo, la masa del músculo del vuelo incrementó con el tamaño del cuerpo, no obstante, no hallaron diferencias significativas de la masa muscular entre los machos de ambas tácticas. Lo que me lleva a sugerir una posible diferenciación metabólica para la obtención de energía en el músculo del vuelo ya que los machos territoriales tienen mayor cantidad de grasa disponible, la cual probablemente puede ser utilizada en un metabolismo oxidativo.

2.2. Músculo estriado en insectos

Las proteínas y la fisiología de la contracción del músculo en los insectos son esencialmente las mismas que en otras especies. En los insectos, los músculos se encuentran generalmente divididos en categorías basados en su localización en el cuerpo, su estructura y función, dividiéndose en esquelético, del vuelo, del corazón y del intestino. Todos estos músculos son estriados (Nation 2008).

El músculo esquelético de los insectos está compuesto por fibras y éstas por miofibrillas. Las miofibrillas se encuentran divididas en sarcómeros los cuales contienen actina, tropomiosina y el complejo de troponina que hacen parte del filamento delgado y la miosina que conforma el filamento grueso, siendo éstos las unidades contráctiles del músculo esquelético, entre otras proteínas (Josephson 2006, Nation 2008). También encontramos el retículo sarcoplasmático (RS), encargado del almacenamiento de los iones de calcio involucrados en el proceso de contracción muscular. Los túbulos transversos (T) son las estructuras por donde se transportan las ondas eléctricas de excitación (vía nerviosa) hacia la superficie del músculo extendiéndose al RS el cual se relaja y libera los iones de calcio necesarios para activar la contracción de las miofibrillas y con ATP disponible en el sarcoplasma, el calcio se une a la subunidad TnC de troponina promoviendo un cambio conformacional del complejo de troponinas causando que la subunidad TnT aleje a la tropomiosina del sitio activo donde se va a unir la cabeza de miosina con la actina para iniciar la contracción (Marden 2000, Nation 2008). El cambio conformacional en la molécula de miosina expone un sitio en la cabeza donde se une el ATP y se hidroliza en ADP y PO_4 , la energía liberada durante esta reacción permite que la cabeza de miosina se libere de la actina volviendo a su forma original. Al terminar la contracción el RS secuestra nuevamente los iones de calcio reduciendo la concentración en el sarcoplasma a un nivel por debajo del necesario para la actividad contráctil (Josephson 2006, Nation 2008).

Los insectos pueden presentar dos tipos de músculos en base al control neural de la contracción: 1) los músculos sincrónicos, los cuales generan una contracción muscular por cada impulso nervioso; y 2) los músculos asincrónicos, aquellos músculos que pueden realizar

varias contracciones con un solo impulso nervioso (Pringle 1957, Beenackers y cols. 1984, Josephson 2006).

Los músculos asincrónicos poseen un RS muy reducido en comparación con el de los músculos sincrónicos, en los que se encuentra muy desarrollado. Por una parte, la alta densidad de RS y la cercanía de las miofibrillas en los músculos sincrónicos, reducen la distancia de difusión y aumenta la capacidad de bombeo de los iones de calcio, permitiendo generar respuestas más rápidas para cada estímulo (Marden 2000). Por otra, los músculos asincrónicos son más eficientes debido a que reducen las repeticiones de los iones del calcio y minimizan los costos de energía (Josephson 2006). Debido a estas características, los músculos asincrónicos se consideran más eficientes (Nation 2008).

Además del tipo de control neural de la contracción, los músculos pueden clasificarse en tres tipos diferentes de acuerdo a la disposición de las miofibrillas, la posición del núcleo y los sarcosomas dentro de las fibras musculares. En el *músculo tubular* las miofibrillas se encuentran de forma radial hacia el centro de la fibra donde se encuentra un único núcleo y los sarcosomas se hallan entre y alrededor de las miofibrillas; este tipo de músculo se encuentra, generalmente en músculo esquelético, en varios órdenes de Insecta y en el músculo del vuelo de Odonata y algunos Orthoptera (Smith 1961, Nation 2008). El *músculo de paquetes cerrados o empaquetado* se caracteriza por tener numerosos núcleos localizados peripátricamente y las miofibrillas intercaladas con columnas de largas mitocondrias; esta forma se ha encontrado en el músculo del vuelo de Orthoptera, Trichoptera y Lepidoptera. Los anteriores dos tipos de músculos son comunes en músculos sincrónicos. Mientras que para los asincrónicos se ha descrito el tipo de *músculo fibrilar*. Este último se caracteriza por presentar fibras cilíndricas y multinucleadas, los núcleos ordenados de manera periférica en filas y los sarcosomas ubicados entre las fibrillas (Nation 2008).

2.3. Morfología del tórax y músculo del vuelo en Odonata

Los odonatos necesitan gran agilidad y maniobrabilidad durante el vuelo para capturar presas, competir por un territorio, cortejar a las hembras y copular. El tórax en estos organismos

presenta una morfología única al encontrarse el meso- y metatórax unidos conformando el pterero o sintórax (fig. 3) (Büsse y cols. 2013) alojando a los músculos del vuelo (Pringle 1957).



Figura 3. Fotografía del tórax de *Hetaerina vulnerata*.

Al describir la estructura del pterotórax y el mecanismo de vuelo en *Aeshna umbrosa* Shadow Darner, Hatch (1966) encontró que, a diferencia de otros insectos, las alas están unidas al tórax por medio de dos placas esclerotizadas: *axilar* y *humeral*. En esta especie, el mecanismo muscular de cada ala ocupa una cuarta parte de la sección transversal torácica dividiéndose estos en los músculos elevadores y depresores. Esta misma conformación fue descrita por Büsse y cols. (2013) al caracterizar la musculatura del tórax de Zygoptera en las familias Coenagrionidae, Calopterygidae, Platycnemididae y Lestidae (fig. 4).

Respecto al movimiento alar, Nation (2008) describe que este difiere en los Odonatos respecto al de otros insectos debido a la presencia de músculos como los *basalar* y *subalar*. Estos músculos se encuentran conectados directamente a los escleritos alares y son los encargados de jalar el ala hacia abajo, realizar la pronación y supinación durante el vuelo.

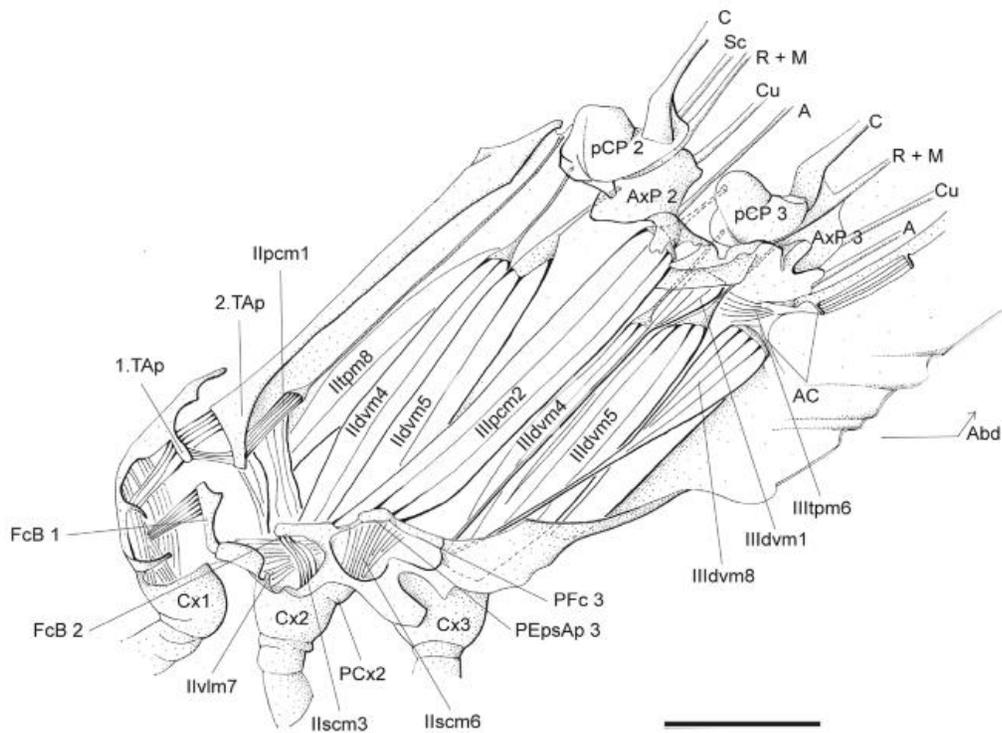


Figura 4. Corte longitudinal de la musculatura interna del tórax de *Pyrrhosoma nymphula*. Músculos del vuelo IIdvm4-IIdvm5 y IIIidvm4-IIIidvm5. Tomado de Büsse y cols. (2013).

El músculo del vuelo en *Aeshna sp.* identificado por Smith (1961), presenta una organización tubular donde las miofibrillas laminares se encuentran orientadas radialmente alrededor de un núcleo central con un gran desarrollo de sarcosomas y del retículo sarcoplasmático (fig. 5) sugiriendo un control bioquímico de relajación similar en músculos sincrónicos de otros insectos y mamíferos.

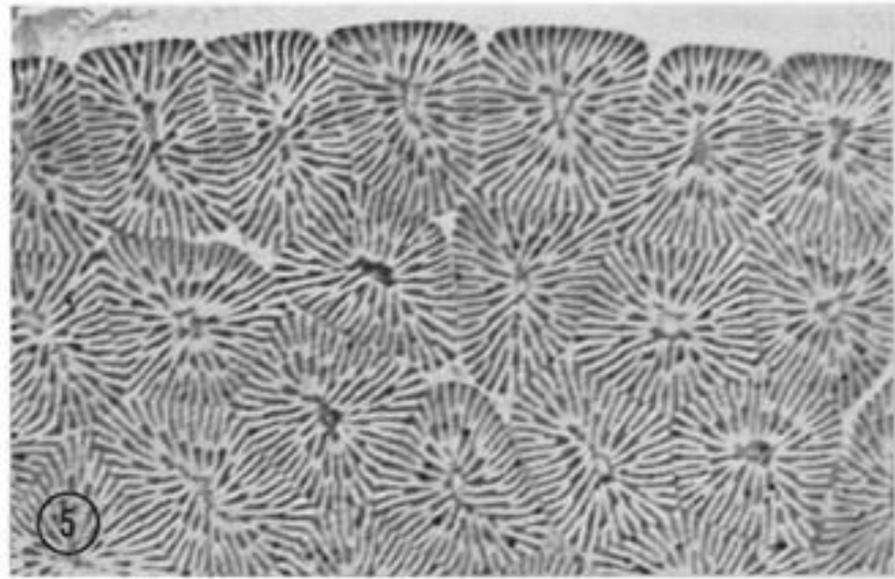


Figura 5. Microfotografía con microscopía electrónica de sección transversal de un grupo de fibras con organización tubular dentro del músculo del vuelo de *Aeshna sp.* Los sarcosomas se notan oscuros, las miofibrillas blancas y el núcleo en el centro de la fibra. Aumento: 1000 X. Tomado de Smith (1961).

Estudios sobre la distribución de la grasa y el glucógeno dentro de los músculos del vuelo en *Brachythemis contaminata* (Fabricius) han demostrado que poseen diferencias en el contenido de metabolitos de las fibras musculares. Las fibras que se encuentran en la periferia de las principales ramas traqueales presentan mayor contenido de glucógeno, mientras que en las fibras más próximas a las principales ramas traqueales poseen una mayor concentración de grasa sugiriendo el uso de estos compuestos por un tipo de fibra específico, con necesidades diferentes respecto a la obtención de energía (Bhat 1968). Con esta información, podría predecir los posibles mecanismos metabólicos utilizados por las fibras musculares de acuerdo a su organización y distribución dentro del músculo del vuelo en los odonatos. Sin embargo, por la escasez de información es necesario hacer estudios y análisis más profundos que relacionen el fenotipo de las fibras con su ubicación espacial dentro del músculo.

Aún con esta información en Odonata, poco o nada se sabe sobre la composición y distribución de las fibras que constituyen los músculos involucrados en el vuelo, así como si el fenotipo que presentan, lento, intermedio y/o rápido, favorece o no la resistencia de vuelo y la capacidad de combate en especies territoriales. Este estudio, que involucra fisiología y

ecología proporcionará la caracterización muscular en odonatos y las posibles diferencias entre las tácticas reproductivas alternativas, así como la distribución específica de las fibras que los componen. Esto es importante debido a la implicación directa de la táctica empleada sobre el éxito de apareamiento.

3. Planteamiento del problema

La táctica de apareamiento utilizada por los machos en las especies territoriales de Odonata se relaciona positivamente con su éxito de apareamiento, donde los machos que tienen la capacidad de ganar y mantener un territorio se ven beneficiados reproductivamente (Grether 1996, Plaistow y Siva-Jothy 1996, Córdoba-Aguilar y Cordero- Rivera 2005, Serrano-Meneses y cols. 2007, Contreras-Garduño y cols. 2008).

En un estudio reciente se encontró que los machos territoriales en *H. americana* (especie filogenéticamente cercana a *H. vulnerata*), al ser más grandes, tienen mayores niveles de grasa en el tórax con respecto a los machos con táctica no territorial, pero no se evidenciaron diferencias en la masa del músculo entre las tácticas (Serrano-Meneses y cols. 2007). También se ha descrito que los niveles de grasa decrecen con la edad, y que es probable que esta disminución influya en la táctica reproductiva utilizada, ya que cuando los machos envejecen adoptan una táctica no territorial (Plaistow y Siva-Jothy 1996). Es posible que las diferencias fisiológicas entre machos territoriales y no territoriales no sean evidentes en los atributos analizados hasta ahora. No obstante, pueden existir a nivel metabólico y fenotípico de las fibras de los músculos utilizados en el vuelo, debido a que los combates por los territorios, la búsqueda de las hembras y la cópula son realizadas mediante conductas aéreas.

En insectos, al igual que en vertebrados, las fibras musculares se dividen en fibras rápidas (glucolíticas), intermedias (glucolíticas/oxidativas) y lentas (oxidativas), las cuales son utilizadas en movimientos determinados. Los músculos del vuelo en insectos están compuestos principalmente por fibras musculares rápidas (Pflüger y Duch 2011). Con esta información se podría suponer que los machos territoriales tienen un mayor número de fibras con metabolismo glucolítico y fenotipo de rápido en los músculos del vuelo que les permiten realizar movimientos con mayor fuerza durante los enfrentamientos aéreos por un territorio. Sin embargo, en los machos no territoriales el presentar una menor cantidad de grasa (Plaistow y Siva-Jothy 1996, Serrano-Meneses y cols. 2007) puede ser un indicio de la presencia de un mayor metabolismo oxidativo, en el cual los lípidos son degradados para obtener la energía necesaria en el vuelo. Este proceso realizado por las fibras musculares lentas podría proveer

una mayor resistencia a la fatiga muscular y permite mantener el vuelo por más tiempo en búsqueda de las hembras.

En otras especies como la langosta *Schistocerca gregaria* se ha estudiado el cambio de metabolismo glucolítico al oxidativo a partir de la activación e inhibición de la liberación de la octopamina (hormona estimuladora de glucólisis). Debido al comportamiento migratorio que esta presenta, en donde cruzan el océano Atlántico, el cambio en el metabolismo le permite obtener la energía a partir de lípidos con el cual el músculo desarrolla una mayor resistencia a la fatiga e incrementa la capacidad de realizar un vuelo prolongado (Pflüger y Duch 2011).

Con estos antecedentes, la resistencia a la fatiga, como característica esencial para el desplazamiento aéreo por largo tiempo en Odonata, favorecería el comportamiento de los machos no territoriales, marcando posibles diferencias fisiológicas entre los machos con diferente táctica reproductiva.

Lo anterior me lleva a la pregunta ¿Hay diferencias en las características del músculo del vuelo y/o están siendo utilizados diferentes metabolismos en las fibras musculares para la obtención de energía requerida en el vuelo por machos con tácticas territorial y no territorial en *Hetaerina vulnerata*?

4. Justificación

Debido a la importancia que tiene la táctica reproductiva sobre el éxito de apareamiento en los machos de especies territoriales de Odonata, conductas como el combate por un territorio o la búsqueda activa de las hembras, nos sugiere una diferenciación metabólica, por lo menos, en las fibras que componen el músculo del vuelo entre los machos con táctica territorial y no territorial dentro de la especie.

Se sabe que los insectos, al igual que los mamíferos, pueden tener tres tipos de fibras musculares de acuerdo a la actividad del enzima fibrilar ATPasa (rápidas, intermedias y lentas), que en conjunto con el metabolismo presentado (oxidativo o glucolítico) otorgan la fuerza o la resistencia necesaria al movimiento que se realiza; y que además este metabolismo se puede modificar durante un vuelo prolongado. Sin embargo, no se sabe si en especies con tácticas reproductivas alternativas no fijas, como en *H. vulnerata*, existen diferencias en el tipo, cantidad y distribución de las fibras musculares que componen el músculo del vuelo y si a su vez éstas podrían estar relacionadas con la adecuación de los individuos.

5. Hipótesis y predicciones

H₁: Habrá diferencia en las características histológicas entre los músculos del vuelo de machos territoriales y no territoriales de *Hetaerina vulnerata*.

H₂: Habrá diferencia en la cantidad y distribución del tipo de fibras musculares entre los músculos del vuelo de machos territoriales y no territoriales de *Hetaerina vulnerata*.

A: Los machos territoriales tendrán mayor área en las fibras de los músculos del vuelo en comparación con los machos no territoriales.

B: Los machos territoriales tendrán mayor cantidad de fibras musculares rápidas e intermedias, mientras que, los machos no territoriales tendrán mayor cantidad de fibras musculares lentas y oxidativas en los músculos involucrados en el vuelo.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

- Caracterizar el músculo de vuelo y los fenotipos de las fibras musculares, así como la distribución que estas presentan en machos territoriales y no territoriales de *Hetaerina vulnerata*.

6.2. Objetivos específicos

En los músculos involucrados en el vuelo de individuos territoriales y no territoriales de *Hetaerina vulnerata*:

- Evaluar las características histológicas.
- Caracterizar y cuantificar la proporción de fibras glicolíticas y oxidativas.
- Caracterizar y cuantificar la proporción de fibras rápidas, intermedias y lentas.

7. Materiales y métodos

7.1. Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en la sección de un arroyo ubicado en la localidad de San Tadeo Huiloapan, Tlaxcala, México (19°23' 42" N, 98°15' 36" W; elevación aproximada 2450 m.s.n.m.).

7.2. Fase de campo

7.2.1. Determinación de tácticas reproductivas alternativas en los machos

Se colectaron machos maduros con redes entomológicas aéreas, luego se marcaron con un código único de tres dígitos; para ello se usó un marcador indeleble en las alas anteriores para identificarlos durante las observaciones conductuales de acuerdo con Cordero-Rivera y Stoks (2008). Se tomaron individuos jóvenes maduros identificados de acuerdo a las características morfológicas propuestas por Córdoba-Aguilar (1994), donde los individuos maduros presentan menor brillo e intensidad del color del cuerpo y las alas son más fuertes. Con las observaciones conductuales se determinó si el macho era territorial o no territorial, es decir, si defendía un área contra otros machos de la misma especie y se mantuvo fiel a esa área después de una disputa agresiva por al menos tres días consecutivos; o si vagaba a lo largo de algunas secciones del arroyo perseguido por machos territoriales (Serrano-Meneses y cols. 2007), respectivamente.

Se capturaron nueve machos territoriales y ocho machos no territoriales. Estos individuos fueron trasladados en tubos de ensayo con algodón empapado en agua y un palillo como soporte en una hielera con gel refrigerante para bajar el ritmo metabólico y asegurar su viabilidad hasta la llegada al laboratorio.

7.3. Manipulación de los individuos en el laboratorio y disección

La disección de los músculos del vuelo se realizó sobre una caja Petri bajo un microscopio esteresocópico (Motic SMZ-140 N2GG) utilizando hielo para reducir el metabolismo de los individuos y mantenerlos vivos durante la disección para evitar la muerte celular y la degradación de las proteínas conformacionales y metabólicas del músculo esquelético. El exoesqueleto fue separado cuidadosamente con ayuda de pinzas entomológicas evitando dañar los músculos. Una vez extraído el exoesqueleto del tórax, los músculos fueron separados con ayuda de disectores (fig. 6 A).

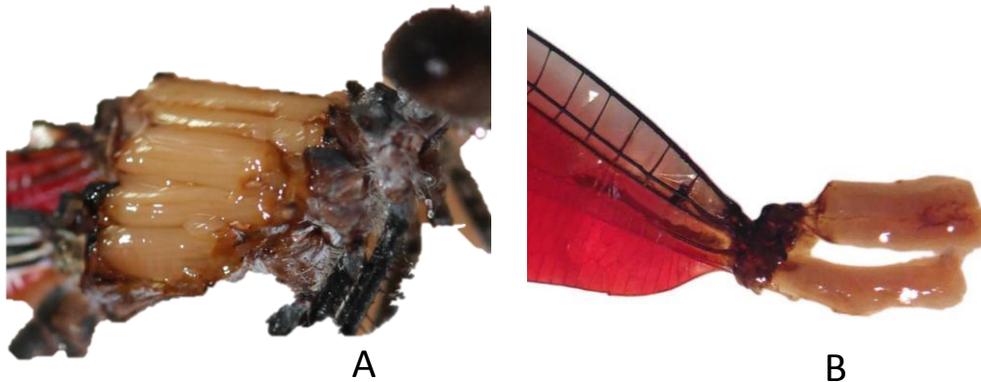


Figura 6. Disección de los músculos del vuelo. A) Separación del exoesqueleto de *Hetaerina vulnerata* para exponer los músculos del tórax. B) Músculos del vuelo adosados al ala.

Una vez que los músculos del vuelo fueron identificados en *Hetaerina vulnerata* se comprobó la relación directa del movimiento alar de cada uno de los músculos adosados a cada una de ellas. Este procedimiento se llevó a cabo realizando un estiramiento manual de los músculos y observando el descenso del ala a partir del estiramiento manual del músculo basalar como se aprecia en la figura 7.

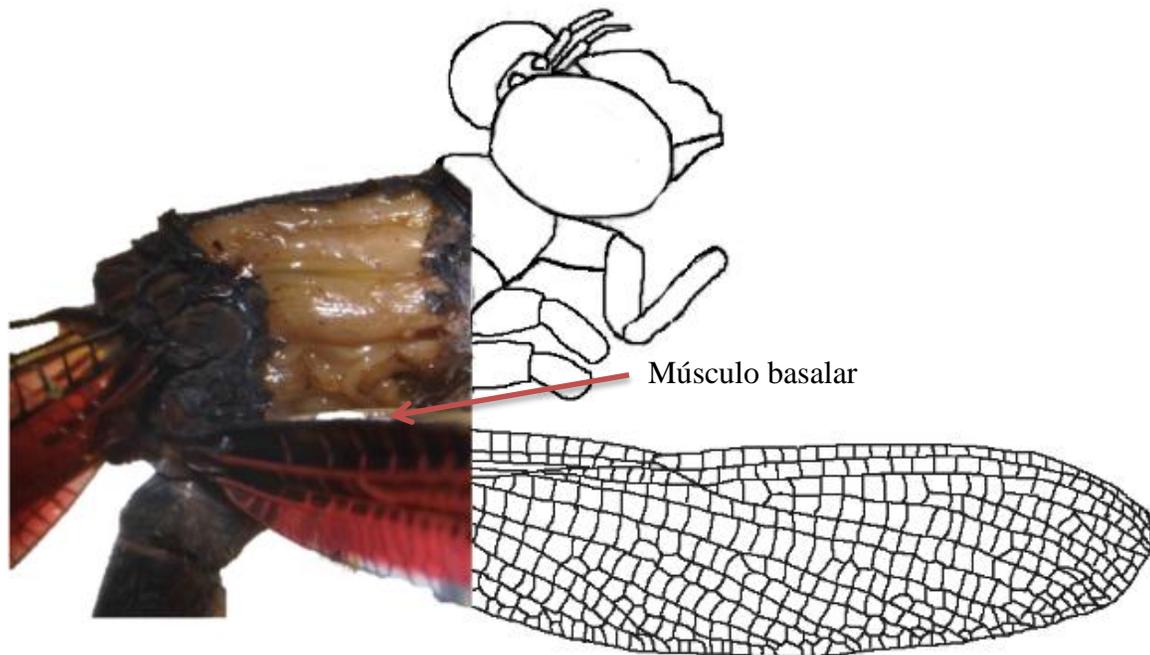


Figura 7. Músculos del tórax de *H. vulnerata*. Se observa el descenso del ala posterior y algunas fibras fuera del fascículo del músculo basalar a partir de la estimulación mecánica.

Una vez identificados los músculos, sólo los cuatro músculos del lado derecho del individuo (dos anteriores y dos posteriores) (fig. 6 B), fueron disecados para posteriormente ser congelados con nitrógeno líquido utilizando isopentano como crioprotector. Finalmente los músculos fueron almacenados en un ultracongelador a -80°C hasta su procesamiento. Se utilizaron sólo los músculos del lado derecho.

7.4. Fase de laboratorio

De los músculos obtenidos se obtuvieron cortes transversales de la parte medial de $10\ \mu\text{m}$ de grosor en un criostato (Leica CM1850) a una temperatura de -25°C . Los cortes fueron montados en portaobjetos seriados (X^a , X^b , X^c ; X = ID del músculo de cada individuo) para posteriormente ser teñidos con Hematoxilina-Eosina para determinar sus características histológicas; con ATPasa básica (pH 9.4) para diferenciar entre las fibras rápidas, intermedias y lentas, las cuales fueron clasificadas de acuerdo a la coloración que obtuvieron después de la

tinción: gris, negro y blanco respectivamente; y con NADH-TR para determinar su metabolismo glucolítico u oxidativo dependiendo de la coloración final obtenida las cuales fueron incoloras y de un color azul intenso respectivamente (López-García y cols. 2013).

7.4.1. Caracterización histológica

7.4.1.1. Tinción Hematoxilina-Eosina

Para llevar a cabo esta tinción, los cortes fueron sumergidos de manera seriada en diferentes colorantes y soluciones comenzando con la hematoxilina de Harris durante 60 min. Después fueron colocados en agua corriente, alcohol ácido al 1 % (alcohol absoluto y ácido acético, 10 : 1), agua destilada, etanol amoniacal al 1 % (alcohol absoluto y amoniaco, 10 : 1) y agua destilada. Posteriormente los cortes fueron teñidos con eosina durante 10 min, lavados con agua destilada y sumergidos serialmente en etanol al 96 %, etanol al 100 %, etanol - xilol (1:1) y xileno.

7.4.2. Caracterización histoquímica

7.4.2.1. Técnica ATPasa básica (pH 9.4)

El procedimiento para la tinción ATPasa fue modificado de López-García y cols. (2013). Los cortes de músculo fueron colocados en cubetas para tinción de coplin con la solución de Pre-incubación [base Tris 5.44 mM y 18 mM CaCl₂, pH 9.4] por 20 min a 22 ° C en baño maría. Se retiró la solución y se lavaron los cortes quince veces con agua destilada. Se incubaron durante 60 min a 22 ° C con la solución de incubación de 0.17% (p / v) adenosina 5-trifosfato en solución de pre-incubación. Nuevamente, se lavaron los cortes quince veces con agua destilada y se dejaron durante 3 min en 2 % (p / v) de CaCl₂ para posteriormente ser transferidos a una solución al 2 % (p / v) de COCl₂ durante 3 min. Finalmente los cortes fueron lavados con agua destilada quince veces y se colocaron en otra solución al 10 % (v / v) de (NH₄)₂SO₄ durante 3 min. Previo a ser montados, las preparaciones fueron deshidratadas

con alcohol a concentraciones ascendentes (70, 80 y 90 %) durante 1.5 min en cada concentración.

7.4.2.2. Técnica NADH-TR

El procedimiento para la tinción NADH-TR, al igual que el de la ATPasa, fue modificado de López-García y cols. (2013). En cubetas para tinción de coplin los cortes fueron incubados durante 6 min a 22 ° C en la solución NBT-NADH 1:1 (v / v) [2.4 mM de Nitro- Azul de tetrazolio diluido en Buffer Tris 50 mM, pH 7.6; 2.4 mM de nicotinamida adenina dinucleótido diluido en 50 mM Buffer Tris]. Después de esta incubación, los cortes fueron lavados tres veces con agua des-ionizada. Finalmente, el exceso de NBT fue removido con soluciones de Acetona a concentraciones ascendentes (30, 60, 90 %) y descendentes (90, 60, 30 %) durante 1 min en cada solución.

Después de cada una de las tinciones, los músculos se dejaron secar y se cubrieron con un medio de montaje (Cytoseal 60®) y un cubre objetos.

7.5. Pruebas piloto

7.5.1. Músculos del vuelo de *Rhionaeschna sp.* : identificación y caracterización de las fibras

Debido a que en el sitio de estudio los adultos de *Hetaerina vulnerata* sólo se encuentran de abril a noviembre (obs. personales), las pruebas de caracterización e identificación metabólica de las fibras de los músculos del vuelo, realizadas entre diciembre y febrero, se hicieron en cortes transversales de los músculos obtenidos de *Rhionaeschna sp.* Para la identificación de las características histológicas de las fibras se realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina. Con esta tinción se pudo apreciar cada una de las fibras que componen el músculo, así como la disposición de los filamentos y el núcleo central (fig. 8).

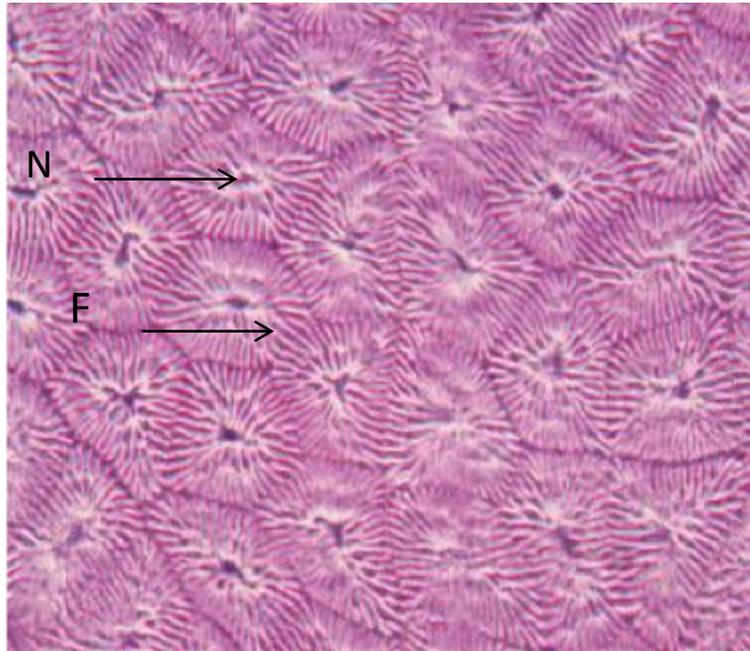


Figura 8. Caracterización histológica de las fibras de *Rhionaeschna sp* con la tinción Hematoxilina-Eosina. Corte transversal del músculo de vuelo. Fibras (F) y Núcleo (N). Escala: 100 μ m.

Para la caracterización histoquímica de las fibras, igualmente, se utilizaron cortes de *Rhionaeschna sp.* y cortes de músculo EDL de rata hembra como control y fueron teñidos en el mismo tren de tinción. Los resultados de la histoquímica para ATPasa básica (pH 9.4) en el músculo de la rata las fibras rápidas se tiñeron de color gris; las intermedias de color negro y las lentas se mantuvieron incoloras (fig. 9). Lo que indica que la técnica se realizó de manera adecuada.

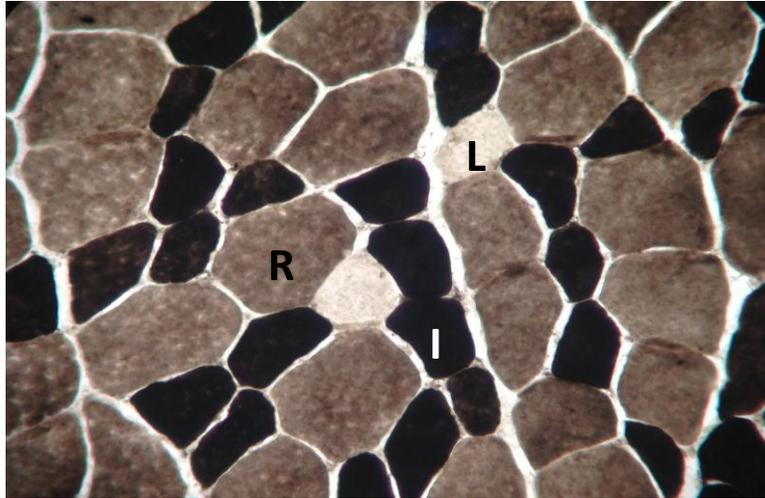


Figura 9. Caracterización de la actividad ATPasa miofibrilar de las fibras del músculo EDL de la rata hembra con la histoquímica de ATPasa básica (pH 9.4). Corte transversal. Las fibras blancas representan fibras lentas (L), las grises a las fibras rápidas (R) y las negras a las fibras intermedias (I). Escala: 100 μ m.

Los resultados para esta técnica en el músculo del vuelo de la libélula *Rhionaeschna sp.* se puede apreciar cualitativamente a todas las fibras incoloras, por lo que pueden ser clasificadas como lentas (fig. 10).

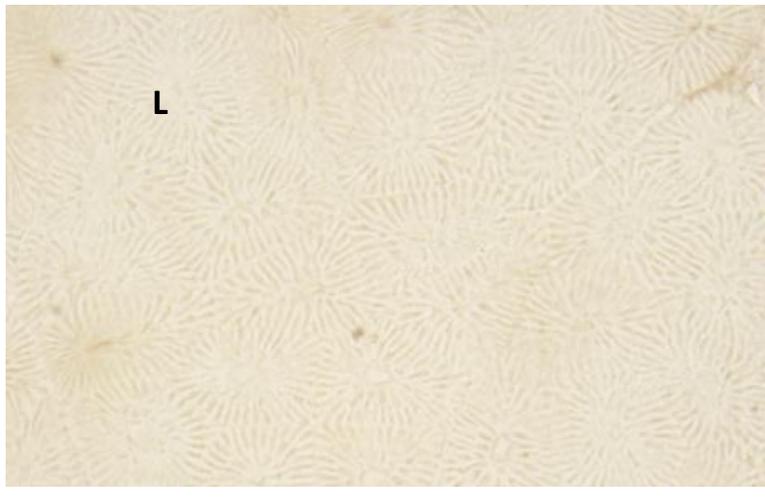


Figura 10. Caracterización de la actividad ATPasa miofibrilar de las fibras de *Rhionaeschna sp* con la histoquímica de ATPasa básica (pH 9.4). Corte transversal del músculo de vuelo. Las fibras blancas representan fibras lentas (L). Escala: 100 μ m.

Con la histoquímica de NADH-TR se diferenciaron las fibras de acuerdo a su metabolismo. Las fibras pigmentadas de color azul presentan un metabolismo oxidativo y las fibras no pigmentadas o con poca coloración presentan un metabolismo glicolítico. En el músculo control para la tinción se pueden apreciar los dos tipos de fibras de acuerdo a su metabolismo (fig. 11), al igual que en las fibras del músculo del vuelo de *Rhionaeschna sp.* (fig. 12).

En el músculo del vuelo de *Rhionaeschna sp.* se pudo apreciar cualitativamente la presencia de los dos fenotipos de metabolismo en sus fibras (fig. 12). Se observa la organización de las fibras y su separación.

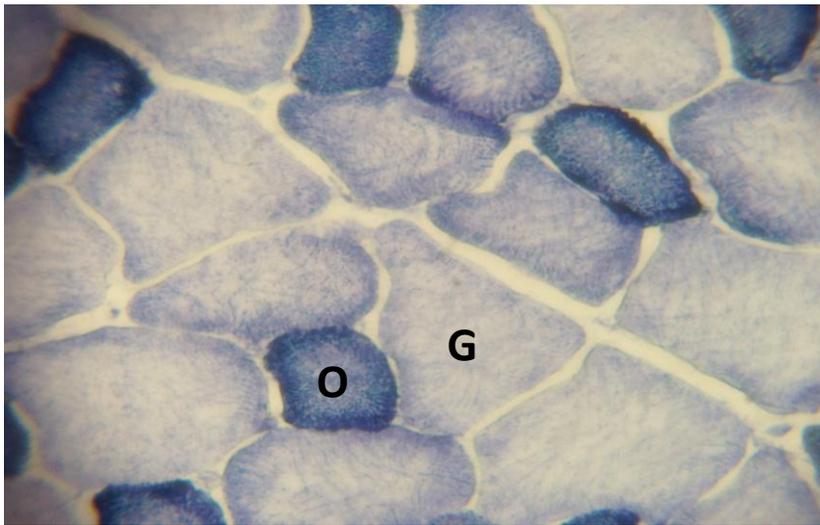


Figura 11. Caracterización del metabolismo de las fibras del músculo EDL de la rata hembra con la histoquímica para NADH-TR. Corte transversal. Las fibras de color azul son las fibras con metabolismo oxidativo (O) y las fibras incoloras o de escasa coloración son fibras glucolíticas (G). Escala: 100 μ m.

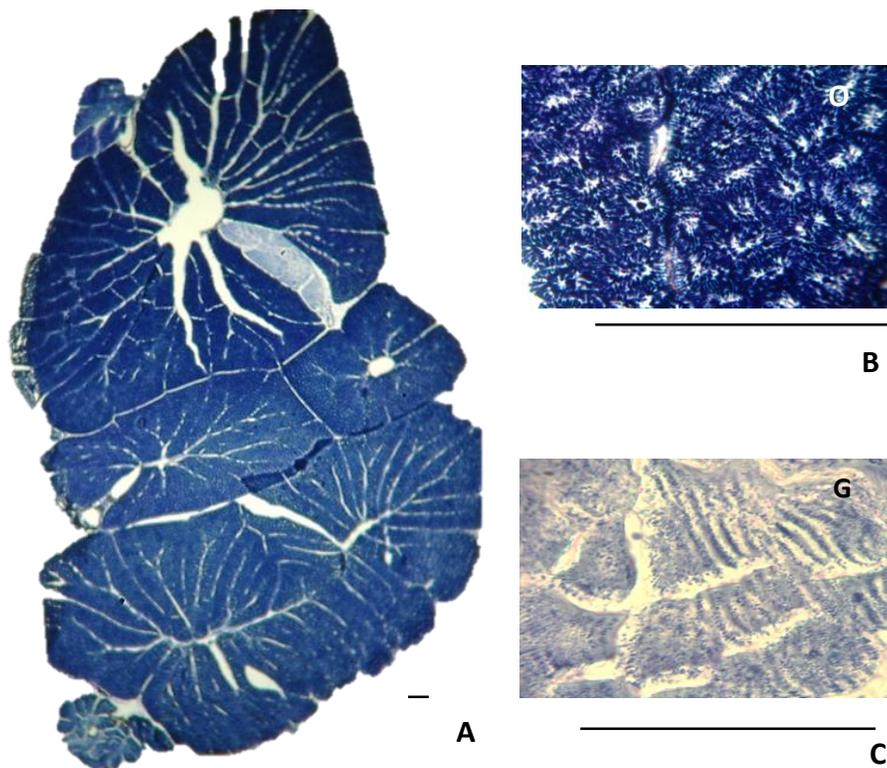


Figura 12. Caracterización del metabolismo de las fibras de *Rhionaeschna sp* con la histoquímica para NADH-TR. Corte transversal del músculo de vuelo. A) Reconstrucción del músculo completo; B) fibras con metabolismo oxidativo (O); C) fibras con metabolismo glucolítico (G). Escala: 100 μ m.

7.6. Colecta de datos en *Hetaerina vulnerata*

Se tomaron microfotografías con una cámara (Nikon Ds-Ri1) acoplada a un microscopio de luz visible (Olympus CX31) a 200 aumentos de todo el músculo. Se realizó la reconstrucción utilizando la aplicación automatizada de Photomerge en Photoshop para medir y cuantificar todas las fibras musculares con el programa ImageJ (versión 1.47v para Mac; NIH) siendo clasificadas las fibras negras, grises y blancas como intermedias, rápidas y lentas respectivamente; las azules como oxidativas y las claras como glucolíticas.

Para estimar las posibles diferencias entre los músculos de los machos de ambas tácticas, se midió el área transversal de 50 fibras musculares, de un músculo anterior y de uno posterior

para cada macho colectado. Las 50 fibras fueron elegidas aleatoriamente con la ayuda de una cuadrícula numerada de 10 x 10 y la tabla de números aleatorios de Rohlf y Sokal (1995).

Adicionalmente, se tomaron medidas morfológicas de los machos, como lo son, la longitud del ala anterior derecha (como estimador del tamaño del cuerpo), el ancho (vertical) y el largo (horizontal) del tórax (fig. 5), para identificar una posible relación con los resultados obtenidos.

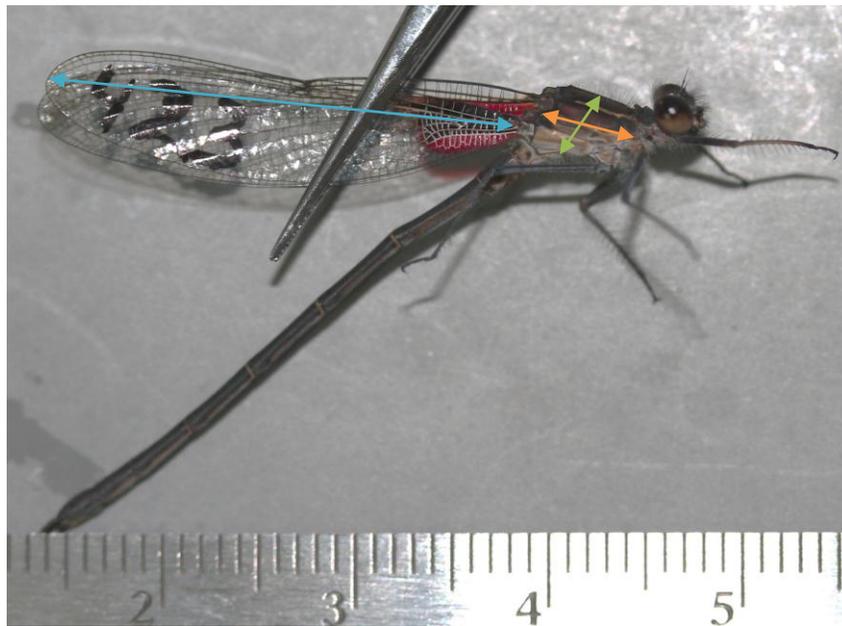


Figura 5. Medidas morfológicas de los machos de *H. vulnerata*. Longitud del ala (línea azul). Ancho del tórax (línea verde). Largo del tórax (línea verde).

7.7. Análisis de datos

Con el fin de minimizar el error de medición del área de las fibras musculares, se calculó el Coeficiente de Correlación Intraclass. Para esto, se midió tres veces el área de veinte fibras y se realizó un análisis de repetibilidad, con la función *ICC* en el paquete estadístico R (version 3.1.3; R Development Core Team 2014), como lo sugieren Wolak y cols. (2012).

Para determinar las diferencias en las características morfológicas (tamaño del ala y del tórax) entre los machos de las dos tácticas reproductivas alternativas de *H. vulnerata*, se

realizaron pruebas de t de Student. Antes de investigar las diferencias en el área de las fibras musculares entre los individuos, se evaluó la distribución de errores del área de las fibras utilizando Q-Q plots, la cual no fue diferente de una distribución normal. Por lo tanto, se utilizaron Modelos Lineales Generalizados Mixtos (MLGM), mediante la función *lme*. Primero se investigó si el área de las fibras musculares se relacionaba con la longitud del ala, la táctica y / o la interacción entre estas variables, pero no se encontró significancia. Posteriormente se realizó un MLGM con la identidad del individuo como factor aleatorio, la táctica empleada por los machos y la posición de los músculos (anterior, posterior) como factores fijos y el área de las fibras musculares como variable respuesta, además se incluyó la interacción entre la táctica y la posición del músculo. Finalmente se eligió el modelo saturado.

El MLGM es útil cuando puede haber pseudoreplicación en la variable respuesta (p. ej. mediciones repetidas de un mismo individuo) y se tienen factores fijos y aleatorios dentro de las variables explicativas. Por lo que este modelo controla la falta de independencia de los errores cuando hay factores aleatorios y permite la correcta correlación entre las variables.

8. Resultados

8.1. Características morfológicas de los machos de *H. vulnerata*

Las características morfológicas del tórax en los machos de *Hetaerina vulnerata* son similares independientemente de la táctica reproductiva alternativa. No se hallaron diferencias significativas en el ancho del tórax (Ancho, $t_{15} = 0.897$, $P = 0.392$), ni en la longitud del tórax (Largo, $t_{15} = 1.672$, $P = 0.122$). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en la longitud del ala –estimador de tamaño corporal– entre machos territoriales y no territoriales de *H. vulnerata* (Ala, $t_{15} = 2.536$, $P = 0.026$). Los machos territoriales tienen el ala 1.5 % más grande que la de los machos no territoriales.

Posteriormente, en machos sin táctica reproductiva determinada, encontramos que las alas anteriores son más largas ($t_{15} = 19.446$, $P = < 0.001$) y tienen un área mayor ($t_{15} = 16.022$, $P = < 0.001$) que las alas posteriores. Asimismo, la longitud ($t_{15} = 12.112$, $P = < 0.001$) y el área de la pigmentación alar ($t_{15} = 9.618$, $P = < 0.001$) son mayores en las alas anteriores.

8.2. Características histológicas de los músculos del vuelo

Las fibras que componen los músculos del vuelo de *H. vulnerata* están organizados en fascículos con diferentes números de fibras, los cuales se encuentran distribuidos de manera radial hacia el centro (fig. 13).

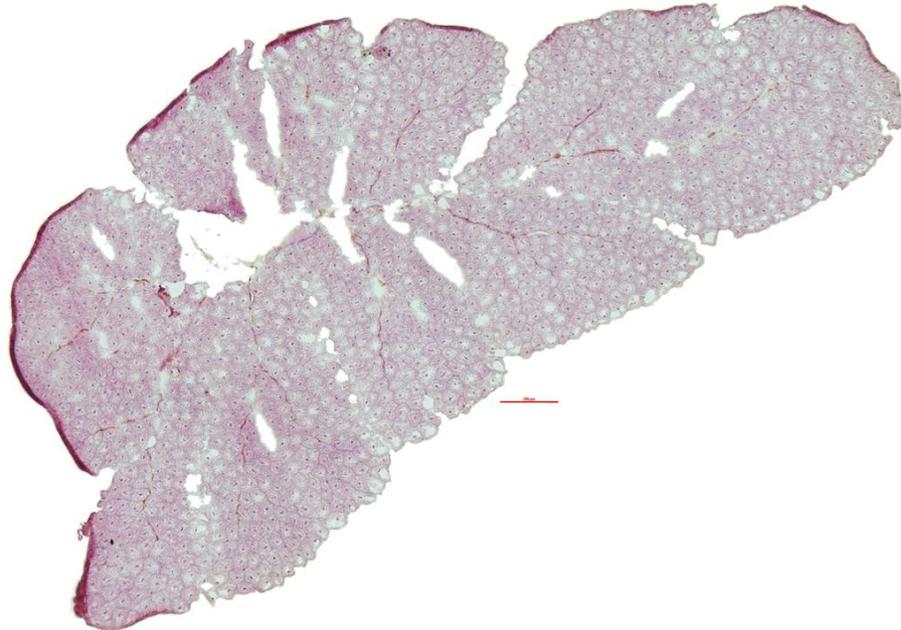


Figura 13. Caracterización histológica con la tinción Hematoxilina-Eosina. Reconstrucción del músculo de vuelo de *H. vulnerata*. Corte transversal. Escala: 100 μm .

Las fibras que componen los fascículos de los músculos en los individuos territoriales y no territoriales presentan una disposición radial de los filamentos de proteínas contráctiles como actina y miosina. Así mismo, los núcleos en estas fibras son centrales y poseen sarcosomas muy desarrollados. Cualitativamente, el número de mitocondrias es grande y se

encuentran ubicadas entre los filamentos de actina y miosina (fig. 14). Las mismas características se aprecian en todos los músculos del vuelo (anteriores y posteriores).

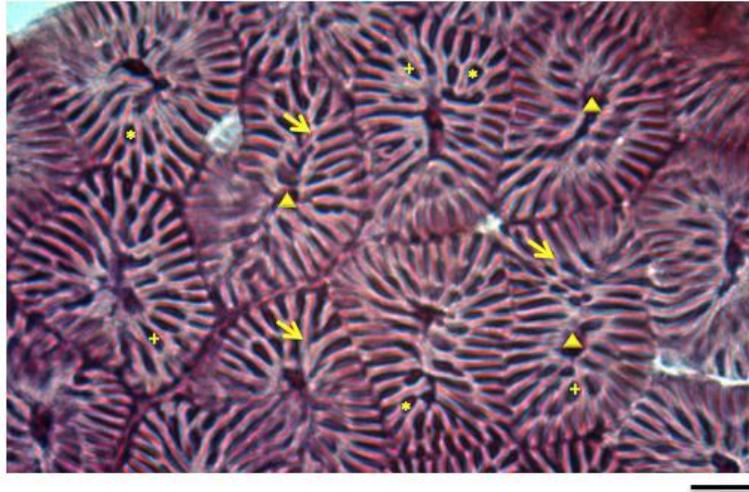


Figura 14. Caracterización histológica de las fibras de *H. vulnerata* con la tinción Hematoxilina-Eosina. Corte transversal del músculo de vuelo. Sarcosomas (+), mitocondrias (*), fibras (↘) y núcleo (▲). Escala: 10 μ m.

8.2.1. Área transversal de las fibras

El Coeficiente de Correlación Intraclase se aproximó a uno ($R = 0.985$), lo que indica que las medidas fueron tomadas de manera precisa.

Al realizar un Modelo Lineal Generalizado Mixto con la identidad del individuo como factor aleatorio y el área de las fibras musculares como variable respuesta, encontramos una interacción significativa entre la posición del músculo del vuelo y la táctica empleada por los machos (Posición*Táctica: $\beta = 40.217$, EE = 63.570, gl = 168, $P = 0.001$; Posición: $\beta = -96.259$, EE = 17.313, $P = < 0.001$; Táctica: $\beta = -188.618$, EE = 63.570, $P = 0.009$) (fig. 15). Dicha interacción sugiere que el área de los músculos anteriores y de los posteriores no es igual cuando la táctica adoptada por los machos es considerada. Al investigar la naturaleza de la interacción se encontró que los músculos anteriores, tanto en machos territoriales como en machos no territoriales, tienen fibras con áreas más grandes que los músculos posteriores; esta

diferencia es mayor en machos territoriales ($a = 792.198$, $\beta = -56.041$, $EE = 7.982$, $P = <0.001$) que en machos no territoriales ($a = 603.580$, $\beta = -15.824$, $EE = 7.693$, $P = 0.04$).

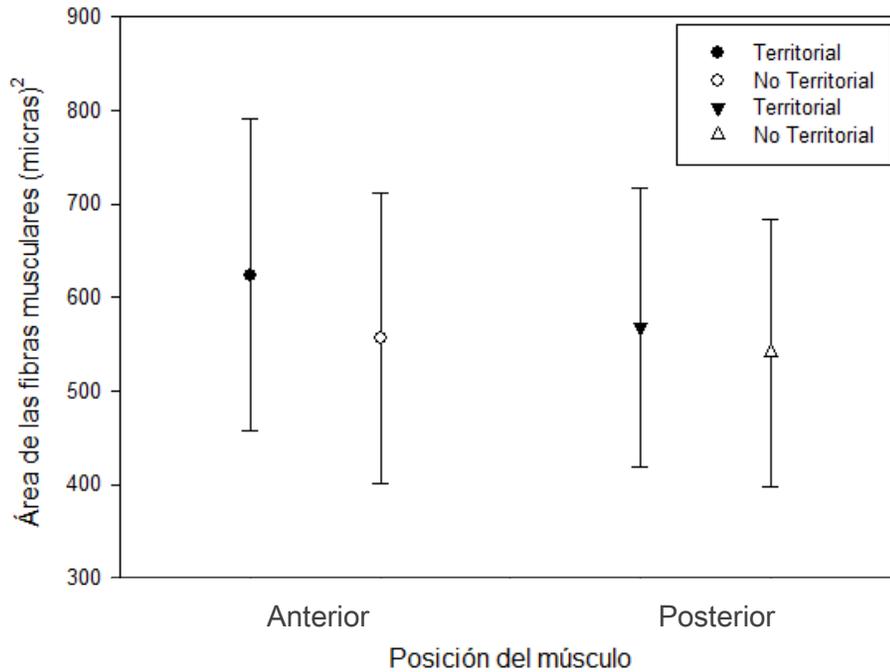


Figura 15. Área de las fibras de los músculos del vuelo de machos territoriales (negro) y no territoriales (blanco) de *Hetaerina vulnerata* en relación a la posición anterior y posterior.

8.3. Caracterización histoquímica

8.3.1. Determinación del metabolismo de las fibras: Histoquímica para NADH-TR

Los resultados mostraron que los músculos del vuelo de los machos de *Hetaerina vulnerata* contienen sólo fibras con metabolismo oxidativo (coloración azul) (fig. 16). La distribución de las fibras observada en la reconstrucción de los músculos de vuelo de machos territoriales (fig. 17) y no territoriales (fig. 18) de *H. vulnerata* muestran que independientemente de la

táctica reproductiva empleada y de la fecha de captura todas las fibras presentan un metabolismo oxidativo y una distribución homogénea en todo el músculo.

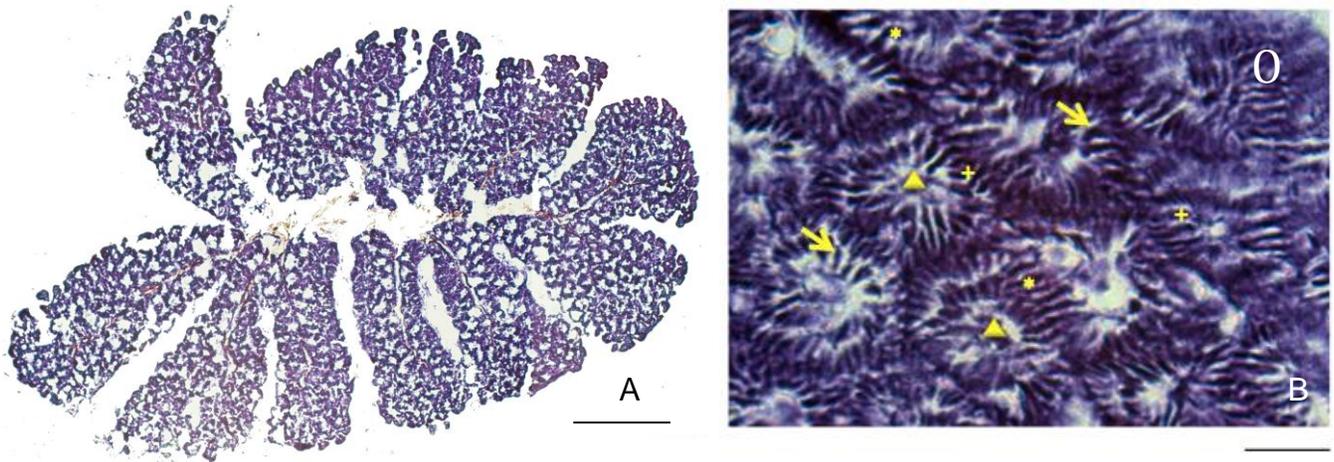


Figura 16. Caracterización del metabolismo de las fibras de *H.vulnerata* con la histoquímica para NADH-TR. Corte transversal del músculo de vuelo. A) Reconstrucción del músculo completo; B) fibras con metabolismo oxidativo (O). Sarcosomas (+), mitocondrias (*), fibras () y núcleo (). Escala: 10 μ m.

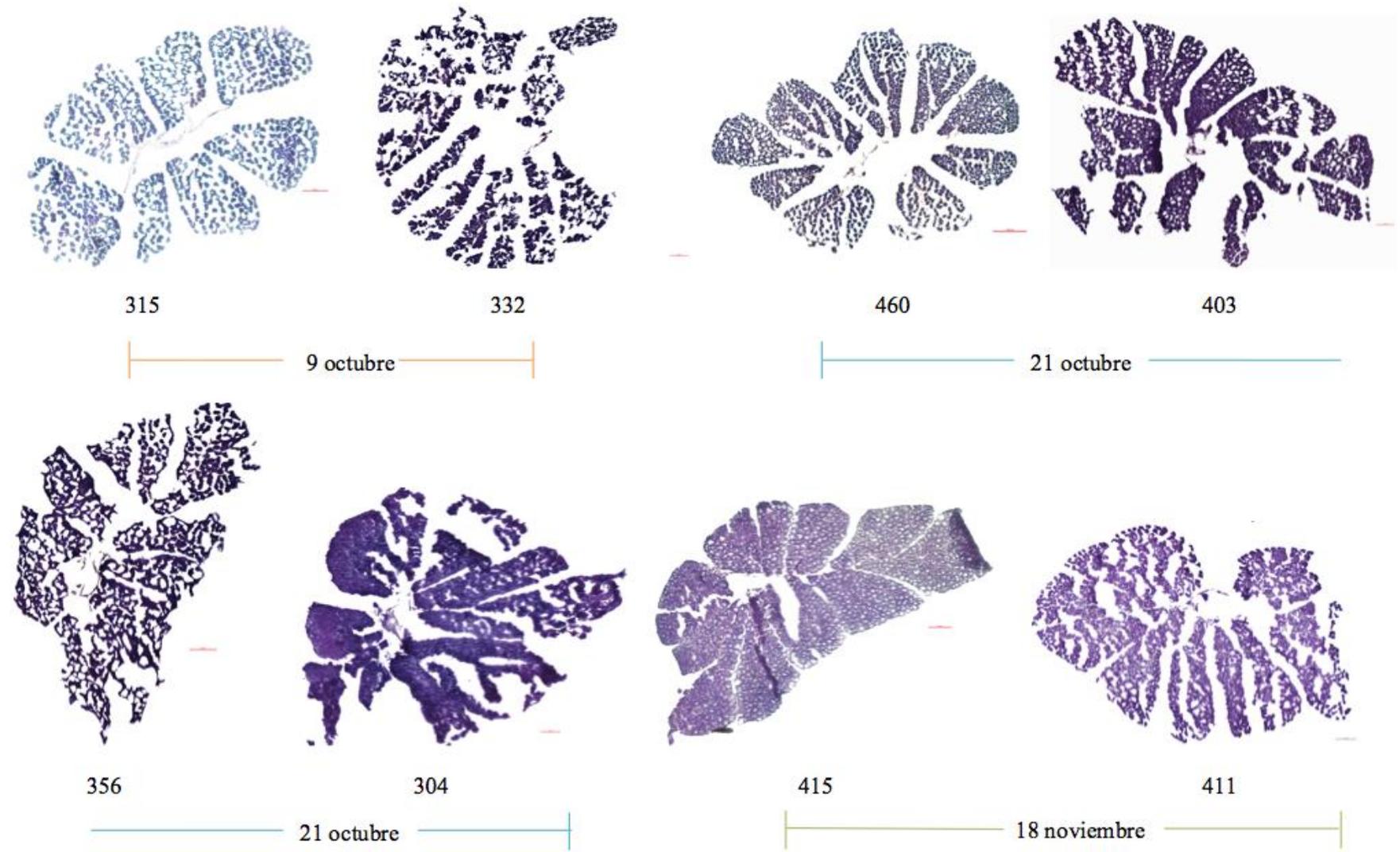


Figura 17. Reconstrucción de uno de los músculos del vuelo de los individuos territoriales de *Hetaerina vulnerata* con la histoquímica NADTH-TR. Los números debajo de cada imagen representan el ID del individuo. La fecha representa el día de captura. Escala: 100 μ m.

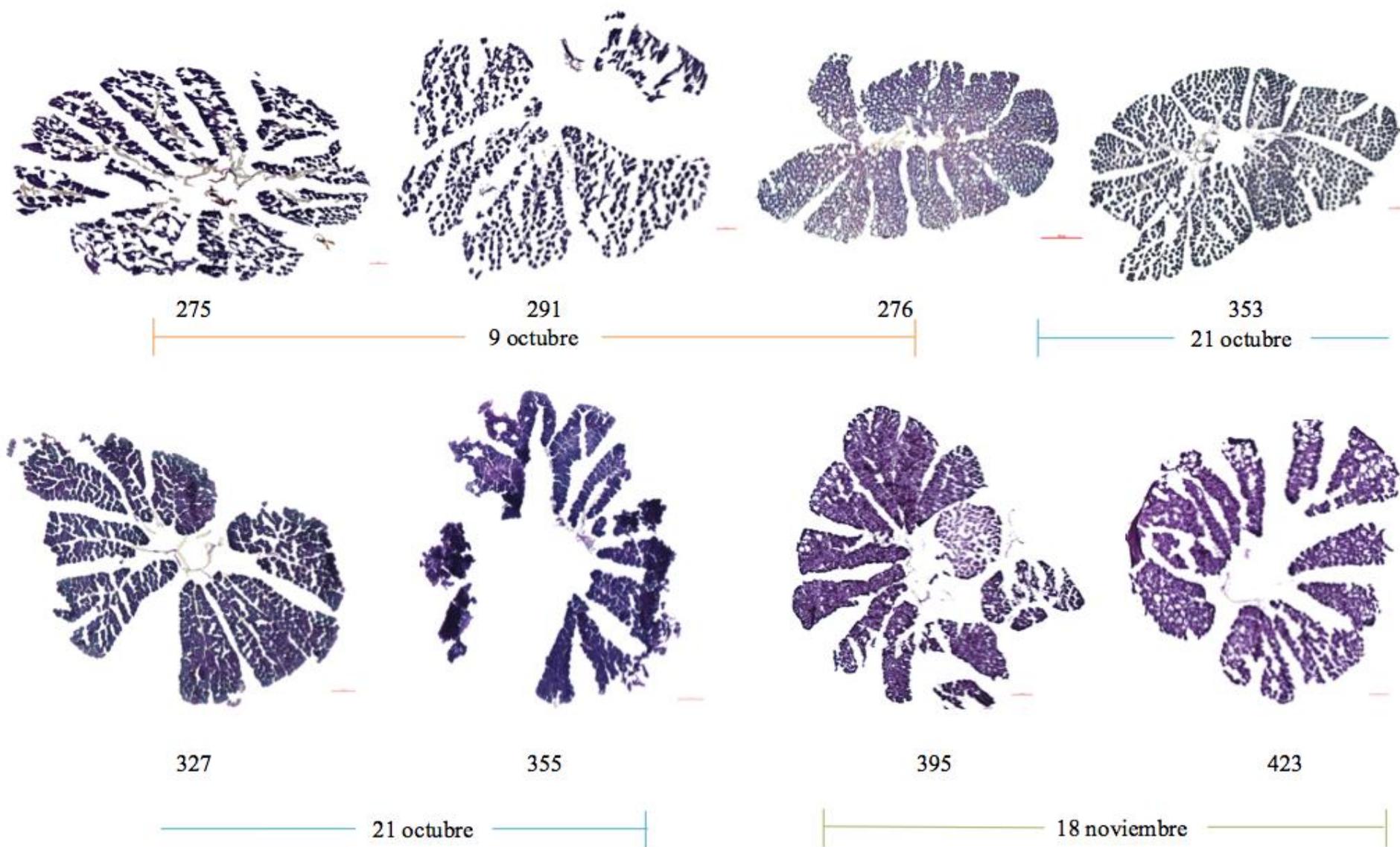


Figura 18. Reconstrucción de uno de los músculos del vuelo de los individuos no territoriales de *Hetaerina vulnerata* con la histoquímica NADTH-TR. Los números debajo de cada imagen representan el ID del individuo. La fecha representa el día de captura. Escala: 100 μ m.

8.3.2. Determinación de la actividad enzimática de la ATPasa miofibrilar de las fibras: Histoquímica para ATPasa básica (pH 9.4)

Los resultados de la caracterización de la actividad de la ATPasa miofibrilar muestran que las fibras de los músculos del vuelo de los machos de *H. vulnerata* capturados en el mes de octubre fueron incoloras en ambos grupos (fig. 19); mientras que las fibras de los músculos de los machos capturados en el mes de noviembre, así como en uno de los capturados en el mes de octubre, adquirieron una coloración negra independientemente de la táctica exhibida: territoriales (fig. 20) y no territoriales (fig. 21). Con base en estos resultados se puede decir que las fibras de los músculos de los machos capturados en la primera fase de colecta son lentas, mientras que aquellas fibras de los músculos de los individuos colectados en la segunda fase de colecta son fibras intermedias independientemente de la táctica reproductiva empleada por los individuos. Cualitativamente también podemos observar en las figuras de la reconstrucción de los músculos en los que hay un predominio de fibras lentas, una coloración negra en el centro y en las principales ramas traqueales, lo que indica que esas fibras son del fenotipo intermedio (fig. 19 A).

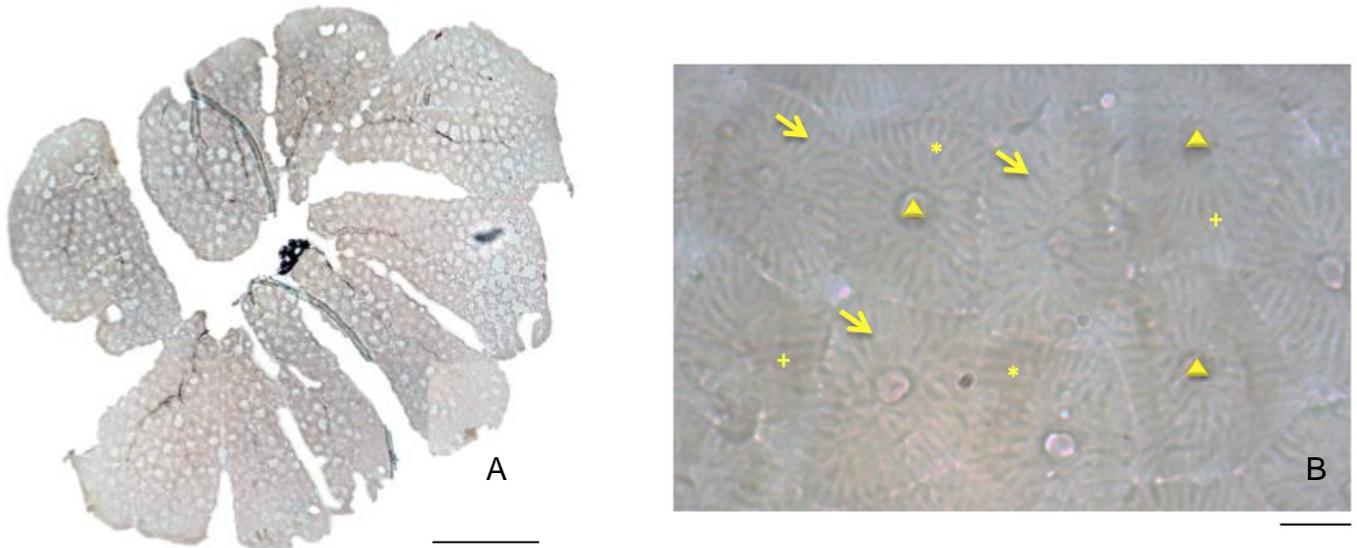


Figura 19. Caracterización de la actividad ATPasa miofibrilar de las fibras de *H. vulnerata* con la histoquímica de ATPasa básica (pH 9.4). Corte transversal del músculo de vuelo. A) Reconstrucción del músculo completo; B) fibras lentas. Sarcosomas (+), mitocondrias (*), fibras (↘) y núcleo (▲). Escala: 10 μ m.

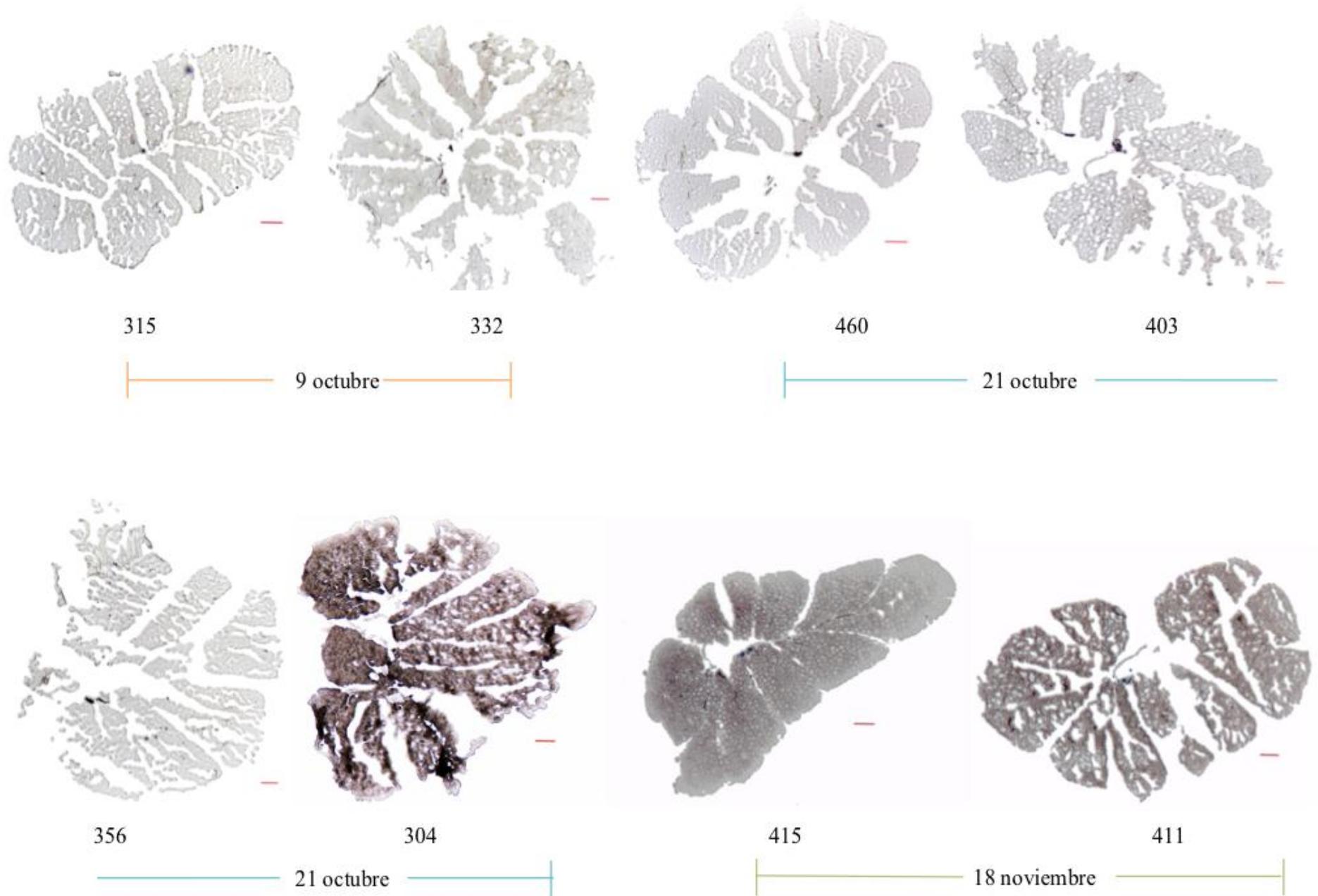


Figura 20. Reconstrucción de uno de los músculos del vuelo de los individuos no territoriales de *Hetaerina vulnerata* con la histoquímica ATPasa. Los números debajo de cada imagen representan el ID del individuo. La fecha representa el día de captura. Escala: 100 μ m.

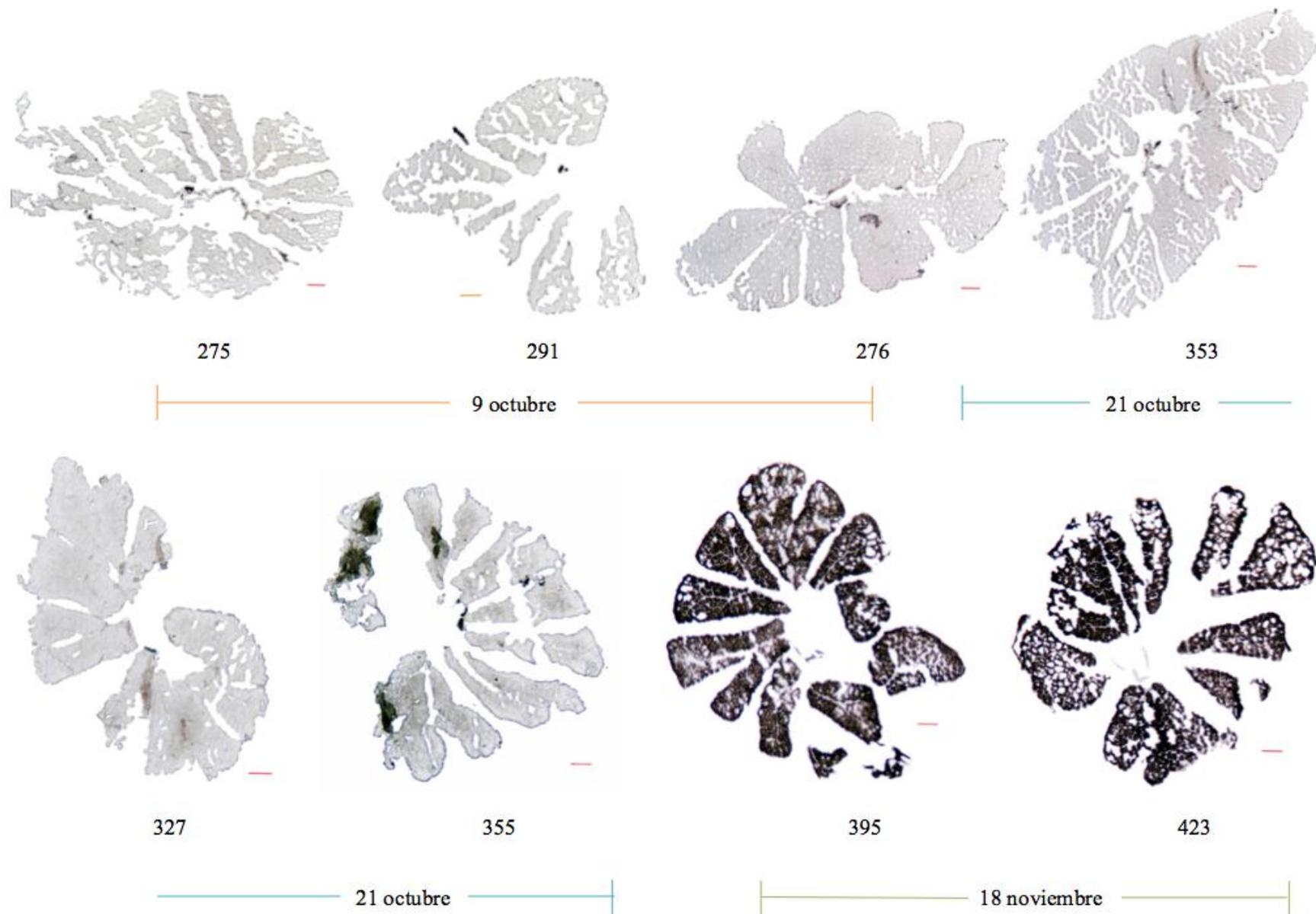


Figura 21. Reconstrucción de uno de los músculos del vuelo de los individuos no territoriales de *Hetaerina vulnerata* con la histoquímica ATPasa. Los números debajo de cada imagen representan el ID del individuo. La fecha representa el día de captura. Escala: 100 μ m.

9. Discusión

En estudios anteriores se ha descrito que el tamaño corporal es importante, tanto para ganar un territorio, como para mantenerlo. Así, en *Calopteryx virgo* los machos territoriales son más grandes y más pesados que los no territoriales, sugiriendo que el tamaño corporal puede predecir la táctica utilizada en algunos odonatos (Koskimäki 2009). Asimismo, en *Hetaerina americana* los machos territoriales presentan mayor tamaño corporal que los machos de táctica no territorial (Raihani y cols. 2008, Álvarez y cols. 2013), ya que pueden mantener sus territorios por más tiempo que los machos pequeños (Serrano-Meneses y cols. 2007). En este sentido, mis resultados concuerdan con esto, ya que los machos territoriales tienen mayor tamaño corporal -longitud alar- que los machos no territoriales en *H. vulnerata*. Sin embargo, difiere, por un lado, de lo encontrado en la misma especie por Vega-Sánchez y cols. (2011) y Ramírez-Delgado y cols. (2015), donde no se encontraron diferencias en el tamaño de los machos entre las tácticas reproductivas alternativas. Y por el otro, de lo observado en otras especies de *Hetaerina* como en *H. miniata* (Lefevre y Muehter 2004) y *H. americana* (Serrano-Meneses y cols. 2007), donde tampoco hallaron diferencias significativas entre el tamaño de los machos de ambas tácticas. Con base en lo anterior, puedo sugerir que en la población estudiada de *H. vulnerata* y en dicha temporada, la longitud alar se relaciona con la táctica reproductiva empleada.

Otra de las características morfológicas evaluadas en este trabajo muestra que el tamaño del tórax no difiere entre los machos de ambas tácticas en *H. vulnerata*. Esto concuerda con lo reportado por Vega-Sánchez y cols. (2011), los cuales no encontraron diferencias significativas en la longitud del tórax entre los machos territoriales y no territoriales de *H. vulnerata*. No obstante, se han reportado diferencias de la musculatura ubicada en el tórax, como la asociada al vuelo, entre las tácticas reproductivas exhibidas por los machos. De esta manera, en investigaciones donde se comparó la masa muscular del tórax entre tácticas reproductivas, se encontró que la cantidad de masa muscular del vuelo es mayor en machos territoriales comparado con los no territoriales en *Mnais costalis* (Plaistow y Tsubaki 2000). De manera similar, Marden (1989) descubrió que los machos territoriales tienen mayor proporción del músculo de vuelo que los machos inmaduros en *Plathemis lydia* y que al

relacionarla con el éxito de apareamiento que obtuvieron los machos, sugirió que la capacidad competitiva de éstos se relaciona con la proporción del músculo de vuelo. Contrario a esto, otros estudios sugieren que la cantidad de músculo asociado al vuelo no difiere entre tácticas (Plaistow y Siva-Jothy 1996, Serrano-Meneses y cols. 2007, Raihani y cols. 2008). Sin embargo, músculos del vuelo más largos son muy probablemente beneficiosos debido a que la aceleración aérea (rasgo clave en las interacciones aéreas depredadoras, competitivas y en la maniobrabilidad) depende de la proporción del músculo de vuelo (Marden 2008). Posiblemente, hayan diferencias en la musculatura asociada al vuelo entre los machos territoriales y no territoriales de *H. vulnerata* que no pudimos detectar indirectamente con la medida de la longitud del tórax.

En cuanto a la caracterización muscular, se puede clasificar el músculo de acuerdo a la disposición de las miofibrillas, núcleos y sarcosomas dentro de la fibra. De esta manera, tenemos los músculos de paquetes cerrados, fibrilar y tubular (Nation 2008). El *músculo tubular* ha sido encontrado en el músculo del vuelo de las libélulas *Aeshna sp.* (Smith 1961) y *Brachythemis contaminata* (Bhat 1968), el cual se caracteriza por tener filamentos de proteínas contráctiles orientadas radialmente alrededor de un núcleo central, y un gran desarrollo tanto de los sarcosomas, como del RS (Pringle 1957, Smith 1961, Nation 2008). Este tipo de distribución permite una mayor eficiencia en la salida de calcio, lo que ayuda a que se produzca una contracción rápida, por lo que ha sido encontrado en la musculatura del vuelo de diversos insectos, típicamente, en la musculatura de Orthopteros y Odonatos (Nation 2008). Finalmente, mis resultados confirman que los músculos del vuelo de machos territoriales y no territoriales de *H. vulnerata* tienen una distribución tubular que les favorece mediante una rápida contracción para el movimiento alar.

El área transversal de las fibras de los músculos anteriores es más grande que el área de los músculos posteriores. En los machos territoriales esta diferencia es mayor que en los machos no territoriales de *H. vulnerata*. Las alas anteriores y posteriores funcionan de manera independiente (Alexander 1983, Nation 2008) y no siempre tienen la misma frecuencia de batido (Rüppell 1989). De esta forma, las alas anteriores participan en el movimiento lateral y frontal del individuo, mientras que las posteriores generan la mayor parte de la fuerza vertical para la elevación (Sato y Azuma 1997). Además, la musculatura del vuelo en Odonata es

abundante y compleja (Wakeling y Ellington 1996 b, Wootton y Newman 2008), por lo que es posible que hayan diferencias en los músculos asociados a las alas. Por un lado, las alas con áreas más grandes desarrollan mayor fuerza aerodinámica (Wakeling y Ellington 1996 b) debido a que tienen un mayor área de exposición al viento. Esta fuerza aerodinámica es igual a la fuerza mecánica producida por los músculos (Wakeling y Ellington 1996 b), y a su vez, la fuerza generada por el músculo depende principalmente de su área transversal (Marden 2008). Así, músculos relativamente grandes aumentan la fuerza y por lo tanto la velocidad y la aceleración desarrollada por estos (Wootton y Newman 2008). De esta manera, es probable que el área transversal de los músculos anteriores sea mayor que el de los posteriores debido a la diferencia en el área entre las alas anteriores y posteriores que presentan los machos de *H. vulnerata*. Por otro lado, Vega-Sánchez y cols. (2011) reportaron que el área de las alas anteriores es mayor en los machos territoriales en comparación con los machos no territoriales en dos poblaciones de *H. vulnerata*. Esto concuerda con nuestros resultados al ser los machos territoriales quienes presentan una mayor diferencia en el área de las fibras de los músculos anteriores con respecto a los posteriores. Entonces, al tener las alas anteriores un mayor área en los machos territoriales (Vega-Sánchez y cols. 2011), estos individuos pueden presentar mayor maniobrabilidad y agilidad durante los combates debido a que alas más grandes tienen un mayor ángulo de rotación (Wootton y Newman 2008). Y al presentar un área fibrilar mayor en los músculos que sostienen estas alas, los machos territoriales pueden desarrollar mayor aceleración, potencia y fuerza. Esto, en conjunto, les facilitaría ganar y defender un territorio.

Algunos insectos han desarrollado el movimiento alar *clap and fling* (Weis-Fogh 1973, Marden 1987). En este movimiento, las alas anteriores se impulsan durante el ascenso y se juntan sobre el dorso (*clap*), se mantienen por unos segundos y se despliegan como un libro durante el descenso (*fling*) (Alexander 1984, Dickinson y cols. 1999). Este movimiento permite al individuo aumentar la elevación total hasta en un 17% (Lehmann y cols. 2005). Además, los grupos que realizan esta maniobra tienen 25% más de masa muscular del vuelo que los que no la realizan (Marden 1987). En Odonata, se calculó que el caballito del diablo *C. splendens* —que usa *clap and fling*— alcanza 44% más de masa del músculo elevador y un mayor coeficiente de ascenso (Wakeling y Ellington 1997 a y b) que la libélula *Sympetrum sanguineum*, la cual no utiliza la maniobra. De esta manera, el mayor desarrollo de las fibras

en los músculos anteriores de los machos de *H. vulnerata* también podría relacionarse con la fuerza necesaria para realizar el movimiento alar *clap and fling* (obs. personales). Además, esta maniobra puede ser utilizada para exhibir la pigmentación del ala durante los enfrentamientos territoriales (Grether 1996), ya que ésta se relaciona positivamente con la capacidad del macho para ganar un territorio (Siva-Jothy 1999, Contreras-Garduño y cols. 2006). Sin embargo, esto no sucede en *H. vulnerata* (Vega-Sánchez y cols. 2011, Ramírez-Delgado y cols. 2015). Mis resultados muestran una posible explicación de la ausencia de esta relación: debido a que los machos territoriales tienen una mayor variación en el área de las fibras musculares asociadas al vuelo, los músculos anteriores pueden generar proporcionalmente mayor fuerza durante la elevación al realizar el movimiento “*clap*” y sostener las alas juntas por más tiempo comparado con los machos no territoriales. Si este movimiento que permite exhibir la pigmentación alar, la cual es mayor en las alas anteriores, se mantiene durante más segundos, mayor será el tiempo de exposición de la pigmentación por lo que se reflejaría una mayor capacidad de combate frente a otros machos. Con este punto de vista, sería más eficiente invertir en la hipertrofia de los músculos anteriores del vuelo que en la pigmentación alar, lo cual posiblemente esté ocurriendo en los machos de *H. vulnerata*.

La capacidad de desplazamiento aéreo es importante en los odonatos ya que facilita la captura de presas y favorece el éxito reproductivo (Marden 2008). Así, se han encontrado machos adultos cuyos músculos encargados del movimiento alar llegan a ocupar un 60 % de la masa corporal total (Marden 1989). Sin embargo, se calculó un peso mínimo entre 12 y 16 % de la masa corporal necesaria para soportar la carga del individuo durante el vuelo (Marden 2000). Por esta razón, el gran tamaño de los músculos utilizados en el vuelo se correlaciona con la necesidad de una alta tasa metabólica que proporcione la cantidad de energía necesaria para sostener el vuelo (Pringle 1957). Se sabe que los insectos pueden obtener energía derivada de carbohidratos, oxidación de lípidos e incluso algunos pueden utilizar ambos (Beenakkers 1969, Beenakkers y cols. 1984). En especies migratorias como *Schistocerca gregaria* (Orthoptera) y *Pantala flavescens* (Odonata), el utilizar un metabolismo oxidativo durante el vuelo economiza carbohidratos y favorece la resistencia a la fatiga lo que les permite mantener un vuelo prolongado durante la migración (Weis-Fogh 1952, Beenakkers y cols. 1984, Pflüger y Duch 2011).

En el presente estudio evidencio que el metabolismo de las fibras de los músculos del vuelo de *H. vulnerata* es oxidativo tanto para machos territoriales, como para los no territoriales. No obstante, no hay reportes de la determinación del tipo de metabolismo en las fibras musculares de insectos. Por lo que, considero este trabajo novedoso en la estandarización de la técnica histoquímica NADH-TR para *H. vulnerata*, y el conocimiento que a este respecta. Estos resultados, concuerdan con los depósitos de lípido encontrados en el músculo de vuelo de *B. contaminata* (Bhat 1968) y de *Aeshna sp.* (Smith 1961), lo que nos sugiere la importancia de la grasa en los mecanismos para la obtención de energía dentro del músculo.

Por un lado, al encontrar que no hay diferencia en el metabolismo de los músculos del vuelo entre las tácticas, sugiero que la diferencia metabólica entre machos territoriales y no territoriales de *H. vulnerata* podría estar en la cantidad de grasa torácica disponible. Si bien no realicé las técnicas necesarias para determinar la cantidad de grasa que se encuentra en los músculos del vuelo, hay estudios en los que encontraron que esta reserva energética es significativamente mayor en machos territoriales comparado con los machos no territoriales en *H. americana* (Contreras-Garduño y cols. 2006, Serrano-Meneses y cols. 2007, Raihani y cols. 2008). De manera similar, los machos que ganaron enfrentamientos por un territorio presentaron más grasa torácica que los machos que perdieron en *C. maculata* (Marden y Waage 1990), *C. splendens* (Plaistow y Siva-Jothy 1996) y *C. virgo* (Koskimäki y cols. 2004). Además, Plaistow y Siva-Jothy (1996) encontraron que las reservas de grasa decrecen significativamente con la edad de los machos, por lo que se hace más difícil y costoso mantener un territorio al envejecer. De esta manera, creo que las cantidades de reservas energéticas difieren entre los machos de las tácticas de *H. vulnerata*. Donde los machos territoriales al tener mayor área en las fibras de los músculos del vuelo pueden almacenar más cantidad de lípidos que serían utilizados como fuente energía mediante un metabolismo oxidativo, por lo que probablemente la capacidad de combate para ganar y defender un territorio es mayor en estos machos que en los no territoriales.

Por otro lado, se ha encontrado que el metabolismo energético en Odonata puede ser afectado negativamente por parásitos gregarinos (Suhonen y cols. 2008). Los gregarinos son parásitos intestinales que se desarrollan y se reproducen en el intestino de los adultos después

de ser ingeridos (Corbet 1999). La infección causada por estos protozoos tiene consecuencias metabólicas en los individuos. La inhabilidad de para oxidar los ácidos grasos es una de ellas (Marden y Cobb 2004). De esta manera, el desempeño de los músculos del vuelo se ve afectado al disminuir la cantidad de lípidos en el tórax (Schilder y Marden 2006). Marden y Cobb (2004) encontraron que los machos no territoriales estuvieron significativamente más parasitados que los no territoriales en *Libellula pulchella*. Además, la fuerza del músculo del vuelo se relacionó positivamente con la cantidad de grasa en machos territoriales, mientras que en machos no territoriales no hubo relación. Esto sugiere que los machos territoriales fueron capaces de ajustar el consumo de energía de los músculos del vuelo con la tasa de oxidación de los ácidos grasos para poder ganar y mantener los territorios; mientras que los machos no territoriales pudieron compensar los gastos metabólicos del vuelo al evitar enfrentamientos por territorios (Marden y Cobb 2004, Suhonen y cols. 2008). Por lo anterior, creo que la cantidad de grasa disponible y la capacidad de metabolizarla podrían estar implicadas en el rendimiento de los músculos del vuelo de los machos de *H. vulnerata*, favoreciendo la adquisición de territorios y por ende el aumento en las cópulas. Sin embargo, para *H. vulnerata* no se ha identificado la existencia de estos parásitos ni el posible papel que estos pudieran efectuar sobre las reservas energéticas, el vuelo y la competencia por territorios.

Las fibras de los músculos del vuelo de los machos de *H. vulnerata* capturados en octubre presentaron fibras lentas; mientras que los machos colectados en noviembre tuvieron fibras intermedias con la histoquímica de ATPasa. Estos resultados son congruentes con lo encontrado en la histoquímica de NADH-TR, ya que las fibras lentas e intermedias poseen un metabolismo oxidativo (Jolesz y Sreter 1981, Blaauw y cols. 2013). De esta forma, los músculos del vuelo en *H. vulnerata* son más eficientes durante el desplazamiento aéreo al tener resistencia a la fatiga y, en el caso de los individuos de noviembre, generar mayor fuerza y velocidad de contracción muscular para realizar los movimientos alares. Sin embargo, no encontramos reportes de caracterización histoquímica en la musculatura de insectos. No obstante, se han caracterizado los músculos involucrados en el vuelo de animales voladores. Precisamente, Armstrong y cols. (1977) descubrieron un metabolismo oxidativo y fibras predominantemente intermedias en los músculos pectorales (encargados de la generación de fuerza para el movimiento alar) del murciélago *Myotis lucifugus*. Asimismo, Kenneth y

Douglas (2009) encontraron que los músculos del pectoral y las alas del colibrí *Calypte anna* y el pinzón cebra (*Taeniopygia guttata*) poseen todas las fibras intermedias y de metabolismo exclusivamente oxidativo. Estos estudios y nuestros resultados nos sugieren que los músculos utilizados en el vuelo se han especializado en un metabolismo mayormente oxidativo y con fibras resistentes a la fatiga, que compensen el costo energético del desplazamiento aéreo.

Debido a que el músculo esquelético tiene la capacidad de adaptarse a diversas condiciones internas o externas (p. ej. actividad física), las fibras musculares pueden modificar tanto su área, como el fenotipo (rápidas o lentas o intermedias) (Blaauw y cols. 2013), de esta manera, podemos esperar que las fibras de los músculos del vuelo de los machos de *H. vulnerata* varíen según el comportamiento aéreo ejecutado.

Por un lado, al ser noviembre el último mes de la temporada reproductiva, la densidad de los individuos en la población disminuye (obs. personales). Es probable que el riesgo de depredación incremente, por lo que los machos tendrían que realizar maniobras aéreas rápidas para evadir a los depredadores, por lo cual es posible que el fenotipo de las fibras cambie de lento a intermedio. Por otro lado, el tamaño corporal en algunos odonatos disminuye a medida que avanza la temporada reproductiva (Wong-Muñoz y cols. 2011). Esta modificación morfológica posiblemente se relaciona con alteraciones fisiológicas como el cambio en el fenotipo de las fibras del músculo del vuelo, lo que les favorecería en movimientos más rápidos y con mayor fuerza.

Además de la termorregulación ectotérmica, a través del intercambio de calor con el ambiente, los odonatos pueden generar calor metabólico utilizando los músculos del vuelo (Corbet 1999). Sin embargo, a temperaturas ambientales bajas, no pueden empezar el vuelo. Debido a esto, contracciones simultáneas de los músculos del vuelo (similar a los temblores en mamíferos) les permite generar el calor inicial para alcanzar una temperatura óptima y producir elevación (Klowden 2007). Dado que la temperatura ambiental disminuye hacia el mes de noviembre, supongo que esta variación ambiental también puede influir en la expresión del fenotipo de las fibras de los músculos del vuelo. Ya que un fenotipo intermedio (presentado por los machos de noviembre) hidroliza más rápido el ATP, comparado con uno lento, y genera mayor energía disponible para realizar la contracción muscular (Blaauw y cols.

2013). De esta forma, podrían alcanzar la temperatura necesaria para emprender el vuelo en menor tiempo.

10. Conclusiones

- Las fibras de los músculos del vuelo tienen un metabolismo oxidativo homogéneo, son lentas e intermedias y no difieren entre machos territoriales y no territoriales de *H. vulnerata*. Posiblemente estas características le proporcionan resistencia a la fatiga al músculo y facilitan un vuelo prolongado.
- El área de las fibras es mayor en los músculos anteriores que en los posteriores y esta diferencia es mayor en machos territoriales, lo que probablemente se relaciona con el incremento en la generación de fuerza para combatir por un territorio.

11. Perspectivas

- Para futuros trabajos con *Hetaerina vulnerata* se recomienda integrar a los análisis características morfológicas como el peso de los individuos, el área alar, la pigmentación alar, el tamaño de la musculatura del vuelo y la grasa muscular para llegar a resultados más concretos y conclusiones más acertadas acerca de las tácticas reproductivas alternativas no fijas y las variaciones intraespecíficas que se puedan encontrar.
- Dado que la actividad de vuelo de las hembras difiere a la de los machos, sería interesante caracterizar la musculatura asociada al vuelo en las hembras, tanto el fenotipo de las fibras como el metabolismo de las mismas, y descubrir las posibles variaciones entre sexos.
- Queda abierta la posibilidad de investigar si la estacionalidad tiene alguna influencia en la expresión del fenotipo de las fibras de los músculos de vuelo en *H. vulnerata*.

12. Referencias

Alexander DE. 1984. Unusual phase relationships between the forewings and hindwings in flying dragonflies. *J Exp Biol* 109: 379-383.

Álvarez HA, Serrano-Meneses MA, Reyes-Márquez I, Jiménez-Cortés JG y Córdoba-Aguilar A. 2013. Allometry of a sexual trait in relation to diet experience and alternative mating tactics in two rubyspot damselflies (Calopterygidae: Hetaerina). *Biol J Linn Soc* 108: 521–533.

Armstrong RB, Ianuzzo CD y Kunz TH. 1977. Histochemical and biochemical properties of flight muscle fibers in the little brown bat, *Myotis lucifugus*. *J Comp Physiol* 119: 141-154.

Beenackers AM, Van Der Horst DJ y Van Marrewijk WJA .1984. Insect flight muscle metabolism. *Insect Biochem* 14: 243-260.

Beenackers AM. 1969. Carbohydrate and fat as a fuel for insect flight: A comparative study. *J Insect Physiol* 15: 353-361.

Bhat U. 1968. Distribution of fat and glycogen in the flight muscle of *Brachythemis contaminata*. *Ann Entomol Soc Am* 61: 1033-1034.

Blaauw B, Schiaffino S y Reggiani C. 2013. Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. *Compr Physiol* 3:1645-1687.

Büsse S, Genet C y Hörnschemeyer T. 2013. Homologization of the flight musculature of Zygoptera (Insecta: Odonata) and Neoptera (Insecta). *PLoS ONE* 8: e55787.

Contreras-Garduño J, Buzatto BA, Serrano-Meneses MA, Nájera-Cordero K y Córdoba-Aguilar A. 2008. The size of the red wing spot of the American rubyspot as a heightened condition-dependent ornament. *Behav Ecol* 19: 724-732.

Contreras-Garduño J, Canales-Lazcano J y Córdoba-Aguilar A. 2006. Wing pigmentation, immune ability, fat reserves and territorial status in males of the ruby spot damselfly, *Hetaerina americana*. *J Ethol* 24: 165-173.

Corbet PS. 1999. *Dragonflies: Behavior and Ecology of Odonata*. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press. Ithaca, New York.

Cordero A. 1999. Forced copulations and female contact guarding at a high male density in a *Calopterygid damselfly*. *J Insect Behav* 12: 27-37.

Cordero-Rivera A y Stoks R. Mark-recapture studies and demography. En: Córdoba-Aguilar, A. 2008. *Dragonflies and Damselflies: Model Organisms for Ecological and Evolutionary Research*. New York. Oxford University Press. 8-10.

Córdoba-Aguilar A y Cordero-Rivera A. 2005. Evolution and ecology of Calopterygidae (Zygoptera: Odonata): status of knowledge and research perspectives. *Neotrop Entomol* 34: 861-879.

Córdoba-Aguilar A. 1994. Male substrate use in relation to age and size in *Hetaerina cruentata* (Rambur) (Zygoptera: Calopterygidae). *Odonatologica* 23: 399-403.

Dickinson MH, Lehmann FO y Sane SP. 1999. Wing rotation and the aerodynamic basis of insect flight. *Science*, 284: 1954-1960.

Emlen DJ. 1997. Alternative reproductive tactics and male-dimorphism in the horned beetle *Onthophagus acuminatus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Behav Ecol Sociobiol* 41: 335-341.

Emlen ST y Oring LW. 1997. Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science* 197: 215-223.

Grether GF. 1996. Intrasexual competition alone favors a sexually dimorphic ornament in the rubyspot damselfly *Hetaerina americana*. *Evolution* 50: 1949-1957.

Hatch G. 1966. Structure and Mechanics of the Dragonfly Pterothorax. *Ann Entomol Soc Am* 59: 702–714.

Jolesz F y Sreter FA. 1981. Development, innervation, and activity-pattern induced changes in skeletal muscle. *Annu Rev Physiol* 43:531-52.

Josephson RK. 2006. Comparative Physiology of Insect Flight Muscle. En: Vigoreaux JO. Ed. *Nature 's Versatile Engine: Insect Flight Muscle Inside and Out*. Springer/Landes Bioscience, New York/Georgetown.

Kallapur VL y George CJ. 1973. Fatty acid oxidation by the flight muscles of the dragonfly, *Pantala flavescens*. *J Insect Physiol* 19: 1035-1040.

Kenneth CWJ y Douglas LA. 2009. Fiber type homogeneity of the flight musculature in small birds. *Comp Biochem Physiol, Part B* 152. 324–331.

Klowden M J. 2007. *Physiological Systems in Insects*. 2nd Edition, Academic Press.

Koskimäki J, Rantala MJ y Suhonen J. 2009. Wandering males are smaller than territorial males in the damselfly *Calopteryx virgo* (L.) (Zygoptera: Calopterygidae). *Odonatologica* 38: 159-165.

Koskimäki J, Rantala MJ, Taskinen J, Tynkkynen K, Suhonen J. 2004. Immunocompetence and resource holding potential in the damselfly, *Calopteryx virgo* L. *Behav Ecol* 15: 169-173.

Lefevre KL, Muehter VR. 2004. Competition for mating resources in a territorial damselfly (Odonata: Calopterygidae). *Stud Neotrop Fauna E* 39: 159-165.

Lehmann FO, Sane SP y Dickinson M. 2005. The aerodynamic effects of wing-wing interaction in flapping insect wings. *J Exp Biol* 208: 3075-3092.

López-García K, Cuevas E, Corona-Quintanilla DL, Jiménez I, Martínez-Gómez M, Castelán F. 2013. Effect of multiparity on morphometry and estrogen receptor expression of pelvic- and perineal- striated muscles in rabbits; is serum estradiol relevant?. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 169: 113-120.

Marden JH y Cobb JR. 2004. Territorial and mating success of dragonflies that vary in muscle power output and presence of gregarine gut parasites. *Anim Behav* 68: 657–665.

Marden JH y Waage JK. 1990. Escalated damselfly territorial contests are energetic wars of attrition. *Anim Behav* 39: 954–959.

Marden JH. 1989. Body building dragonflies: costs and benefits of maximising flight muscle. *Physiol Zool* 62: 505-521.

Marden J H. 2000. Variability in the size, composition, and function of insect flight muscles. *Ann Rev Physiol* 62: 157-178.

Marden JH. 2008. *Dragonfly Flight Performance: A Model System for Biomechanics, Physiological Genetics, and Animal Competitive Behaviour*. En: Córdoba-Aguilar, A. Ed. – *Dragonflies and Damselflies: Model Organisms for Ecological and Evolutionary Research*. Oxford University Press, Oxford.

Nation J L. 2008. *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC press.

Oliveira RF, Taborsky M y Brockmann HJ. 2008. *Alternative Reproductive Tactics: An Integrative Approach*. Cambridge University Press, New York.

Orr AG. 2003. *A Guide to the Dragonflies of Borneo: Their Identification and Biology*. Natural History Publications (Borneo) Sdn. Bhd.

Pflüger HJ, Duch C. 2011. Dynamic Neural Control of insect muscle metabolism related to motor. *Behav. Physiol* 26:293-303.

Plaistow SJ y Tsubaki Y. 2000. A selective trade-off for territoriality and non-territoriality in the polymorphic damselfly *Mnais costalis*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 267: 969-975.

Plaistow S y Siva-Jothy MT. 1996. Energetic constraints and male mate-securing tactics in the damselfly *Calopteryx splendens xanthostoma* (Charpentier). *Biol Sci* 263: 1233-1239.

Pringle JWS. 1957. In *Insect Flight*, Cambridge Monographs in Experimental Biology, No. 9, Cambridge University Press, ch. 3.

Raihani G, Serrano-Meneses MA y Córdoba-Aguilar A. 2008. Male mating tactics in the American rubyspot damselfly: territoriality, nonterritoriality and switching behavior. *Anim Behav* 75: 1851-1860.

Ramírez A. 2010. Capítulo 5: Odonata. *Revista de Biología Tropical*, 58 (Suppl. 4), 97-136.

Ramírez-Delgado J, López-García K, Lara C, Serrano-Meneses MA. 2015. Wing pigmentation in males of a territorial damselfly: alternative reproductive tactics, allometry and mating success. *J. Insect Behav* 28: 569-581.

Rohlf FM y Sokal RR. 1995. *Statistical Tables*. 3d ed. Freeman y Company.

Rüppell G. 1989. Kinematic analysis of symmetrical flight manoeuvres of Odonata. *J Exp Biol* 144: 13-42.

Sanz JJ. 2002. Evolución de los sistemas de apareamiento. En Soler, M. Ed. - Evolución La Base de la Biología. Proyecto Sur de Ediciones, S.L.

Sato M y Azuma A. 1997. The flight performance of a damselfly *Ceriagrion melanurum* Selys. *J Exp Biol* 200: 1765-1779.

Schilder RJ y Marden JH. 2006. Metabolic syndrome and obesity in an insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103, 18805–18809.

Serrano-Meneses MA, Córdoba-Aguilar A, Méndez V, Layen SJ y Székely T. 2007. Sexual size dimorphism in the American Rubyspot: male body size predicts male competition and mating success. *Anim Behav* 73: 987-997.

Silby J. 2001. Dragonflies of the world. Smithsonian Institution Press. 216 p.

Sinervo B y Zamudio K. 2001. The evolution of alternative reproductive strategies: fitness differential, heritability and genetic correlation between the sexes. *Am Genet Assoc* 92:198-205.

Siva-Jothy MT. 1999. Male wing pigmentation may affect reproductive success via female choice in a calopterygid damselfly (zygoptera). *Behaviour* 136: 1365-1377.

Smith DS. 1961. The organization of the flight muscle in a dragonfly, *Aeshna* sp. (Odonata). *J Biophys Biochem Cytol* 11: 119-145.

Smith D S. 1966. The organization of flight muscle fibers in the Odonata. *J Cell Biol* 28: 109-126.

Suhonen J, Rantala M y Honkavaara J. 2008. Territoriality in Odonates. En Córdoba-Aguilar, A. Ed. – Dragonflies and Damselflies: Model Organisms for Ecological and Evolutionary Research. Oxford University Press, Oxford.

Vega-Sánchez Y, Isarrarás-Hernández L, Castillo-Ayala P y Mendoza-Cuenca L. 2011. Morfología alar y territorialidad en *Hetaerina vulnerata*. *Biológicas*. 13: 29-35.

Wakeling JM y Ellington CP .1997 a. Dragonfly flight. II. Velocities, accelerations and kinematics of flapping flight. *J Exp Biol* 200: 557-582.

Wakeling JM y Ellington CP .1997 b. Dragonfly flight. III. Lift and power requirements. *J Exp Biol* 200: 583-600.

Weis-Fogh T. 1952. Fat combustion and metabolic rate of flying locusts (*Schistocerca gregaria*). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 237: 1–36.

Weis-Fogh T. 1973. Quick estimates of flight fitness in hovering animals, including novel mechanisms for lift production. *J Exp Biol* 59: 169-230.

Wolak ME, Fairbairn DJ y Paulsen YR. 2012. Guidelines for estimating repeatability. *Methods Ecol Evol* 3: 129–137.

Wong-Muñoz J, Córdoba-Aguilar A, Cueva del Castillo R, Serrano-Meneses MA y Payne J. 2011. Seasonal changes in body size, sexual size dimorphism and sex ratio in relation to mating system in an adult odonate community. *Evol Ecol* 25: 59-75.

Wootton RJ y Newman DJS. 2008. Evolution, diversification, and mechanics of dragonfly wings. En Córdoba-Aguilar A. Ed. – Dragonflies and Damselflies: Model Organisms for Ecological and Evolutionary Research. Oxford University Press, Oxford.

13. Publicaciones

Ramírez-Delgado J, López-García K, Lara C, Serrano-Meneses MA. 2015. Wing pigmentation in males of a territorial damselfly: alternative reproductive tactics, allometry and mating success. *J. Insect Behav* 28: 569-5.

Wing Pigmentation in Males of a Territorial Damselfly: Alternative Reproductive Tactics, Allometry and Mating Success

Jennifer Ramírez-Delgado^{1,4} ·
Kenia López-García² · Carlos Lara³ ·
Martín Alejandro Serrano-Meneses⁴

Revised: 30 September 2015 / Accepted: 1 October 2015 /
Published online: 8 October 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Alternative reproductive tactics (ARTs) evolve to maximise fitness by favouring alternative phenotypes when high variance in relative fitness occurs amongst individuals. In the damselfly *Hetaerina vulnerata* males occur as either territorial or nonterritorial, depending on whether males acquire and defend an area to which females are attracted for copulation. Territorial males are usually larger, more pigmented and more successful in obtaining copulations than nonterritorial males. Several studies further suggest that territorial males are in overall better condition than nonterritorial ones. Other studies have investigated whether wing pigmentation, a sexual trait in damselflies, scales hyperallometrically with body size, and asked whether this pattern is related to fitness—nonetheless, a clear answer to this question remains elusive. Here we investigate whether i) territorial and nonterritorial males differed in body size and wing pigmentation; ii) body size, wing pigmentation and/or male status (male ART) predicted male mating success; and iii) the allometry of wing pigmentation in territorial and nonterritorial males, and amongst mated and unmated males. We first found that territorial and nonterritorial males did not differ in body size. Second,

✉ Martín Alejandro Serrano-Meneses
serrano.meneses@bath.edu

¹ Programa de Biología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad del Quindío, Carrera 15 Calle 12 Norte, Armenia, Quindío, Colombia

² Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, Avenida IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, 07360 México, D. F., Mexico

³ Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Autopista Tlaxcala-San Martín Texmelucan Km 10.5, C. P. 90120 San Felipe Ixtacuixtla, Tlaxcala, Mexico

⁴ Laboratorio de Biología Evolutiva, Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Carretera Tlaxcala-Puebla Km. 1.5, 90062 Tlaxcala, Mexico

contrary to what occurs in other damselflies, territorial and nonterritorial males exhibited similar amounts of wing pigmentation. Third, only territory tenure, but not body size or wing pigmentation, predicted male mating success. Finally, with the exception of the relationship exhibited by mated males, which exhibited isometry, wing pigmentation was hyperallometric in all groups of males tested. The latter result suggests that hyperallometry of the sexual trait in this damselfly may not be selectively advantageous.

Keywords Alternative reproductive tactics · sexually selected traits · mating success · territoriality · allometry

Introduction

Darwin (1871) recognised that certain individuals have an advantage over others of the same sex and species in terms of mating. Thus, it is likely that within a single population certain individuals attain a higher number of mates than others. In order to overcome this asymmetry in mating success, alternative reproductive tactics (ARTs) evolve. ARTs maximise the fitness of individuals (Taborsky et al. 2008; Taborsky and Brockmann 2010) by favouring alternative phenotypes with distinct morphological, behavioural, and/or physiological traits when high variance in relative fitness occurs amongst them (Shuster and Wade 2003). For example, in some scarab beetles (*Onthophagus* sp.), larger-than-average males develop horns and guard the entrance to the tunnel where the female is contained; conversely, smaller males do not develop horns and dig side tunnels that are used to reach and copulate with the females (Emlen 1997). Typically, when certain males monopolise access to females by establishing and defending an area to which females are attracted (i.e., territory), other males adopt different ARTs (Thornhill and Alcock 1983), which are characterised by non-aggressive behaviour, cryptic morphologies and quick and furtive copulations with females (Gross 1996). In many animal taxa, territorial males have higher encounter rates with females than wandering males who are not territorial and/or actively search for females (reviewed by Andersson 1994). Nonetheless, establishing and defending a territory is very costly in terms of energy (Taborsky et al. 2008; see below), thus only those males in overall better conditions will be able to withstand the costs associated with territorial defence, whereas other males will adopt an alternative and less expensive mating tactic (e.g., nonterritoriality; Taborsky and Brockmann 2010). For instance, in the damselfly *Mnais costalis*, males occur in two morphs: orange-winged, territorial males (OW), and clear-winged, nonterritorial males (CW) (Tsubaki et al. 1997; Plaistow and Tsubaki 2000). OW males are larger than CW males and have higher daily mating rates (Plaistow and Tsubaki 2000); however, the former have a shorter lifespan than the latter. Such disparity in survival arises given the energetic costs associated with territoriality (e.g., Plaistow and Siva-Jothy 1996): when males adopt this tactic, they will sustain a higher number of fights than nonterritorial ones (Nomakuchi et al. 1984; Serrano-Meneses et al. 2007). These agonistic encounters may last from a few seconds to hours, and only those males with higher amounts of metabolic fat will be able to remain territorial (Marden and Waage 1990; Plaistow and Siva-Jothy 1996; Koskimäki et al. 2004; Contreras-Garduño et al. 2006a; Serrano-Meneses et al. 2007).

In other odonates, male mating success is further improved by the amount of male wing pigmentation (WP) (reviewed by Córdoba-Aguilar and Cordero-Rivera 2005). Studies in *Hetaerina* and *Calopteryx* species show that males with more WP are more likely to win contests over territories (Grether 1996a; Siva-Jothy 1999; Córdoba-Aguilar 2002; Contreras-Garduño et al. 2006a; Serrano-Meneses et al. 2007). Pigmentation and fat reserves in *H. americana* are in fact closely correlated (Contreras-Garduño et al. 2006a; Serrano-Meneses et al. 2007), since WP is known to signal the energy status of males (Contreras-Garduño et al. 2006a). Thus, males with higher amounts of WP are likely to communicate a larger availability of metabolic fat. Albeit an ornament such as WP entails costs to its bearers: it reduces the survival of males by increasing both their conspicuousness to prey (Grether and Grey 1996) and to predators (Grether 1997; Svensson and Friberg 2007).

A common pattern in the scaling relationship between sexual traits and body size is hyperallometry (the relative greater increase in sexual traits' expression, when modelled as a function of body size; e. g., Kodric-Brown et al. 2006) (but see Bonduriansky 2007). This allometric pattern is detected when the slope (β) between the sexual trait of interest and body size is >1 (provided that both variables are in the same units of measurement, or are dimensionless; Warton et al. 2006; Sokal and Rohlf 2012). The evolution of such pattern is generally thought to be driven by directional sexual selection acting on the trait in question (Kodric-Brown et al. 2006) (but see Bonduriansky and Day 2003 and Bonduriansky 2007 for contrasting empirical and theoretical evidence) and it is commonly modelled in terms of resource-allocation trade-offs (Bonduriansky and Day 2003; Kodric-Brown et al. 2006), so that individuals are expected to invest heavily in structures that enhance mating success (Kodric-Brown et al. 2006) compared to other traits, such as body size. In a study that investigated the allometry of WP in two *Hetaerina* species (Odonata: Calopterygidae), *H. americana* and *H. vulnerata* (Álvarez et al. 2013), it was found that WP scales hyperallometrically with body size in territorial and nonterritorial males. Similarly, Bello-Bedoy et al. (2015) found a hyperallometric pattern in the WP of *H. americana*, albeit ARTs were not identified. Nonetheless, although hyperallometry of sex traits is relatively common, little is known on the adaptive significance of such pattern (but see Bello-Bedoy et al. 2015).

Here we investigated the determinants of male mating success in the territorial damselfly *Hetaerina vulnerata*, an insect with non-fixed reproductive tactics. Males of *Hetaerina* damselflies exhibit a red, pigmented spot at the base of the wings, which is a sexual trait maintained via male-male competition (Grether 1996a, b; Contreras-Garduño et al. 2006a, 2008). Typically, males establish territories along the shore of rivers or streams to which females are attracted (e.g., Serrano-Meneses et al. 2007), although a fraction of males fails to establish territories and adopt a nonterritorial tactic. By applying these considerations and using data from two field seasons, the objectives of our study were to investigate whether i) body size and WP were different amongst territorial and nonterritorial males; ii) WP, body size and/or male status (male ART) predicted male mating success; and iii) the allometry of WP was different amongst territorial and nonterritorial males, and amongst mated and unmated males.

Materials and Methods

We studied adult males from a natural population of *Hetaerina vulnerata* located in San Tadeo Huiloapan (19° 23' 53" N, 98° 15' 51" W), Tlaxcala, Mexico, in two different seasons. The first season was carried out from June 4th to July 7th, 2011, and the second one from May 17th to June 10th, 2013. Both seasons encompass the reproductive season of the species in the population studied. Unmarked males were caught on a daily basis (except during rainy days, when damselflies are not active) using aerial entomological nets. Once a male was caught, it was marked with an indelible marker on the right anterior wing with a unique combination of three digits (for a similar procedure see Serrano-Meneses et al. 2007), which were easily readable through binoculars (Pentax Papilio 8.5x21 mm). All males were photographed from a constant distance (≈ 30 cm) with a digital camera (Canon Powershot SX 100 IS) against a gray card (neutral gray, 18 % reflectance) placed next to a scale in mm. We then used the software ImageJ 1.47 t (National Institutes of Health, Maryland, USA) to measure wing length (our *proxy* for body size; the right anterior wing, from the insertion of the wing to the thorax to the tip of the wing) and the length of the pigmented patch (WP; from the insertion of the wing to the thorax to the pigmented patch's distal end, following an imaginary straight line traced over the posterior cubital vein; see Álvarez et al. 2013 for a similar procedure) from these photographs.

Determination of Age, Male Reproductive Tactics and Mating Success

We performed surveys on a daily basis from 11:00 to 14:00 h every day (Central Standard Time), which is the time when *H. vulnerata* males are most active. During the surveys we recorded the identity (three-digit combinations) of each male along the study site and noted (i) the age of males, and (ii) whether they followed a territorial or nonterritorial tactic (henceforth male status). First, the age of a given male was estimated from morphological cues (see Córdoba-Aguilar 1994): (1) juvenile mature individuals have a bright, intense body colouration and highly transparent wings; (2) mature individuals show less brightness and intensity in body colouration and have less transparent wings; (3) old individuals have dark body colouration and the tips of their wings are usually torn or missing. In our analyses we only included individuals from age classes 1 and 2, since most individuals belonging to age class 3 exhibit nonterritorial mating strategies (M. A. S.-M. pers. obs.). It is difficult to determine whether individuals belonging to age class 3 defended territories at earlier stages of their lives, which would add further uncertainty to our results, should these be included in analyses. Second, territorial males (T), on the one hand, defend a given area against conspecifics and remain faithful to the area for at least 1 day. Nonterritorial males (NT), on the other hand, are not particularly attached to any area and instead wander along the stream, and are commonly chased away by territory owners (see similar rationale in Serrano-Meneses et al. 2007). Also, during the surveys, we determined mating success by direct observations. Thus, whenever a male was observed in copulation, we noted the male's identity. When a copulating male was unmarked, we captured the pair and marked and measured the male. Male mating success, however, was only determined during 2013. Given that the number of times *Hetaerina* males mate during a day is very low (see daily mating rates in *H. americana* reported by Serrano-Meneses et al. 2007) in our analyses we used mating success as a binary variable (see below).

Statistical Analyses

Before carrying out statistical tests, we assessed the frequency distributions of all continuous variables using Q-Q plots. In the case of the data analysed using major axis regressions, we tested for the normality of residuals via the *plot* function implemented in the R (version 3.1.1; R Development Core Team 2014) package ‘smatr’ (Warton et al. 2006, 2012), which did not depart from normality in any case. We therefore analysed our data using General Linear Models (GLMs); in the models we tested all first order interaction terms and further removed statistically non-significant terms by backward elimination, starting from saturated models. When an interaction term was significant, it was retained in the model. With the exception of the models in which we investigate the determinants of mating success (see below) here we show only the reduced models, however, all models are available from the corresponding author upon request.

We investigated differences in *body size* between *male status* (1, 2; territorial, nonterritorial males; respectively) and *seasons* (2011, 2013) using a GLM. In this analysis, *body size* was used as the independent variable and *male status* and *seasons* were used as factors. We then tested for differences in WP in two ways. First, we used WP as an independent variable, and *male status* and *seasons* as factors. Note that in this analysis the allometric relationship between WP and *body size* (see Álvarez et al. 2013) was not accounted for, given that we were interested in testing for differences in absolute values of WP between *male status* and *seasons*. Second, we constructed a model to account for the allometric relationship between WP and *body size*. In our model, WP was modelled as a function of *male status* and *seasons* (factors) and *body size* (covariate). This procedure allowed us to test whether T and NT males differed in relative WP, by considering *seasons*. Given that in this model the interaction term *body size*seasons* was significant (see Results), we tested the allometry of WP separately for 2011 and 2013 (see below).

To investigate the determinants of mating success, we built two binomial Generalised Linear Models, given that two of the variables of interest (*body size* and WP) were correlated ($r_{131}=0.594$, $P=0.001$). Therefore, in order to avoid any biases arising from collinearity, we tested their effects on mating success separately. Model 1 included *mating success* as a binary, response variable (1, 0; mated, unmated; respectively), and *body size* and *male status* as main effects. Model 2 included *mating success* as a response variable, and WP and *male status* as main effects. The *logit* canonical link function was used, given the error structure specified for the GLMs.

Lastly, we investigated the scaling relationship between WP and *body size* in (i) T and NT males, and (ii) in mated and unmated males by fitting six major axis regressions (MA regression; model II regression; Sokal and Rohlf 2012) to our \log_{10} transformed data. We used MA regressions to estimate allometric slopes because this method has several advantages over others, such as ordinary least squares regression and reduced MA. The advantages of MA have been discussed elsewhere (e.g., Fairbairn 1997; Warton et al. 2006; Sokal and Rohlf 2012; Álvarez et al. 2013). We tested the allometry of WP between T and NT males separately for 2011 and 2013 for two reasons. First, we were interested in testing for intra seasonal variation in WP allometry, and second, in whether WP relates differently to wing length between seasons (see Results).

MA regressions were performed in R, version 3.1.1 (R Development Core Team 2014), using the ‘smatr’ package, which calculates allometric slopes between two variables, as well as their 95 % confidence intervals (CIs; upper CI – lower CI). ‘smatr’ further implements a procedure that allows to test whether the slope from a statistically significant MA regression differs from a given slope value (‘slope.test’). The procedure is described in Warton et al. (2006). A slope was considered to be significantly different from 1 if the confidence intervals excluded $\beta=1$, and the associated P value was ≤ 0.050 .

All statistical analyses and figures were produced in R.

Results

Body Size and WP in Relation to Male Status and Seasons

T males were not larger than NT males (GLMs; $\beta=0.039$, S.E. = 0.128, $t=0.309$, $P=0.757$); however, males collected in 2011 were on average larger than those collected in 2013 ($\beta=-1.038$, S.E. = 0.063, $t=16.405$, $P=0.001$). Similarly, in an analysis in which we investigated differences in absolute values of WP, we found that T males were not more pigmented than NT males ($\beta=-0.007$, S.E. = 0.046, $t=0.171$, $P=0.864$), but males collected in 2011 were more pigmented than those collected in 2013 ($\beta=-0.522$, S.E. = 0.022, $t=22.947$, $P=0.001$). Also, in an analysis in which we accounted for the effect of body size on WP, we found that T and NT males had similar amounts of WP ($\beta=-0.009$, S.E. = 0.038, $t=0.255$, $P=0.798$), albeit in this analysis, WP related differently to body size amongst seasons (seasons, $\beta=1.042$, S.E. = 0.497, $t=2.095$, $P=0.036$; body size, $\beta=0.990$, S.E. = 0.360, $t=2.747$, $P=0.006$; seasons*body size, $\beta=-0.049$, S.E. = 0.017, $t=2.742$, $P=0.006$; Fig. 1).

Determinants of Male Mating Success

The two models in which we investigated the potential determinants of male mating success suggest that only male status (territory tenure) predicts whether males are able to obtain copulations, since body size and WP do not contribute significantly to the models (Model 1: male status: $\beta=-1.283$, S.E. = 0.502, $Z=-2.552$, $P=0.011$; body size: $\beta=-0.044$, S.E. = 0.153, $Z=-0.291$, $P=0.771$; Model 2: male status: $\beta=-1.294$, S.E. = 0.503, $Z=-2.573$, $P=0.010$; WP: $\beta=0.061$, S.E. = 0.539, $Z=0.113$, $P=0.910$).

Allometry of WP

Table 1 summarises the calculated MA slopes between WP and body size for T and NT males, as well as for mated and unmated males. With the exception of the relationship exhibited by mated males, WP scaled hyperallometrically with body size in all groups tested. In 2011, T and NT males exhibited similar hyperallometric slopes (Fig. 2a), whereas T males showed a steeper slope than NT males in 2013 (Fig. 2b). When we compared the allometry of WP of mated vs unmated males we found no significant differences. Although the calculated slope for mated males seems higher than the slope

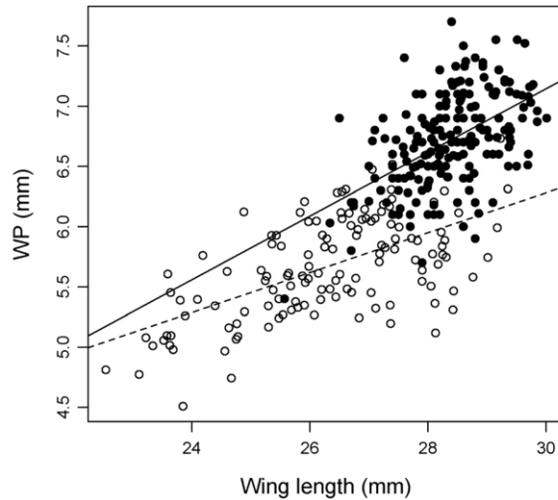


Fig. 1 Wing pigmentation (WP) in relation to male body size (wing length) in *Hetaerina vulnerata*. The closed dots and the continuous line describe the relationship for males collected in 2011, whilst the open dots and the dashed line detone the relationship for males collected in 2013

of unmated males at first sight (Table 1; Fig. 3), the CIs of such slope are highly variable (lower – upper CIs; 0.967 – 11.116). Note that out of 27 mated males, 6 were NT males.

Discussion

Males of *Hetaerina vulnerata* exhibit two non-genetically distinct ARTs: T males, that establish and defend areas along rivers or streams; and NT males, that wander along sections of such habitats but do not establish or defend territories. T and NT males of

Table 1 Slopes, 95 % confidence intervals (CIs), R^2 and P values obtained from MA regressions (see Materials and methods) fitted between WP and body size (\log_{10} transformed values) of territorial (T) and nonterritorial (NT) and mated (Mated) and unmated (Unmated) males of *Hetaerina vulnerata*

Model	Male status	Slope	Lower CI- Upper CI	R^2	P value	Slope test P value
Season 2011	T	3.136	2.524–4.085	0.330	0.001	0.201
	NT	4.262	2.720–9.162	0.188	0.001	
Season 2013	T	1.819	1.262–2.871	0.270	0.001	0.032
	NT	1.317	1.006–0.761	0.481	0.001	
Mating success	Mated	2.093	0.968–11.116	0.194	0.022	0.327
	Unmated	1.439	1.149–1.834	0.416	0.001	

Slope comparison P value refers to a procedure which tests whether two MA slopes are significantly different (see Warton et al. 2006). Sample sizes are 144 territorial and 61 nonterritorial males in 2011, 73 territorial and 60 nonterritorial males in 2013, and 27 mated and 106 unmated males

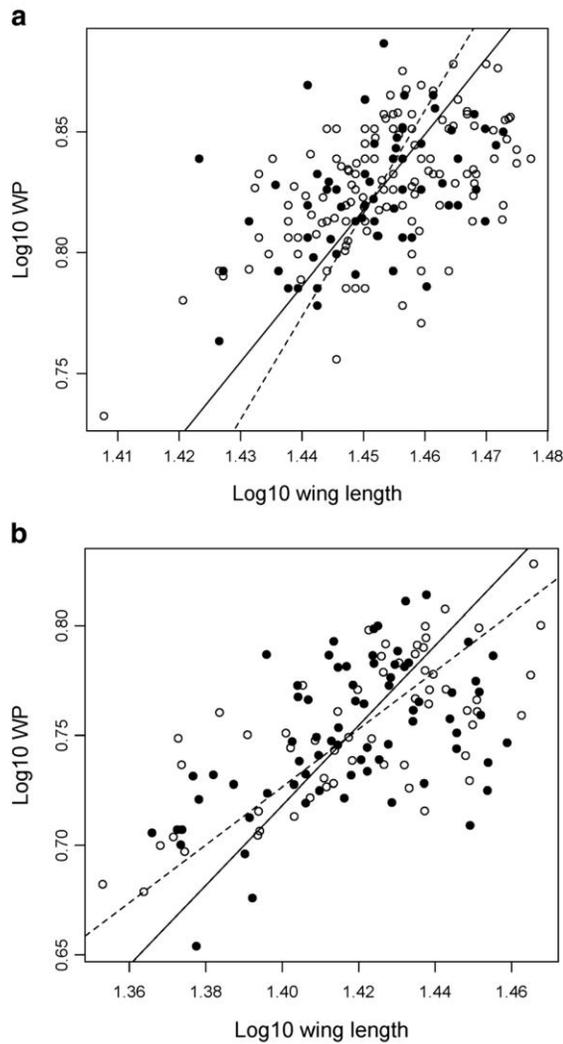


Fig. 2 Wing pigmentation (WP) in relation to male body size (wing length) in individuals collected during **a** 2011 and **b** 2013. The *closed dots* and the *continuous line* describe the relationship for territorial males, whilst the *open dots* and the *dashed line* denote the relationship for nonterritorial males. The data were \log_{10} transformed prior to analyses (see *Materials and methods*)

this species are not present in different discrete morphs, and according to our results, there were no evident morphological differences between these males. We found that T and NT males had similar body sizes (for similar findings see Lefevre and Muehter 2004; Serrano-Meneses et al. 2007). This contradicts a number of studies, which have reported that T males are generally larger than NT males (for studies in *Hetaerina* see Raihani et al. 2008; Álvarez et al. 2013; for studies in other odonates see Tsubaki et al. 1997; Beck and Pruett-Jones 2002; Koskimäki et al. 2009; Romo-Beltrán et al. 2009).

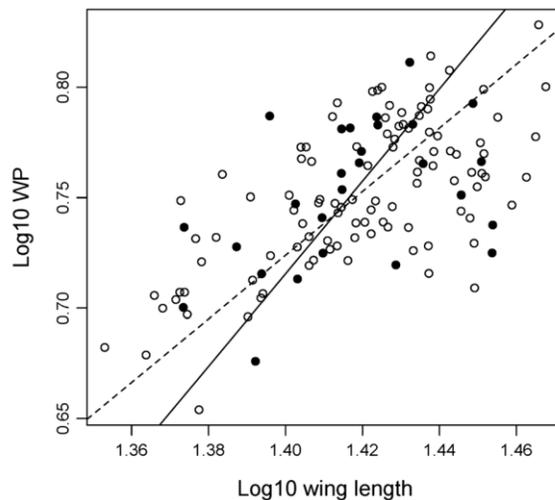


Fig. 3 Wing pigmentation (WP) in relation to male body size (wing length) in mated and unmated males. Mated males were observed copulating at least once, whereas unmated males were never observed *in copula*. The *closed dots* and the *continuous line* describe the relationship for mated males, whilst the *open dots* and the *dashed line* denote the relationship for unmated males. The data were \log_{10} transformed prior to analyses (see [Materials and methods](#))

Large size in T males amongst Zygopteran males is expected because it may enable them to store a larger amount of fat reserves, which are necessary for territorial defence (e.g., Serrano-Meneses et al. 2007; Raihani et al. 2008). For NT males, small body size may be more advantageous given the lower flying costs per unit time associated with small body size. Such males may be able to allocate more time to searching for potential mates rather than defending a territory or foraging ('Ghiselin-Reiss' small male hypothesis; Blanckenhorn et al. 1995). Nonetheless, body size selection is known to operate primarily on NT males at the clasping stage of the mating sequence (Grether 1996a). When attempting to mate, males commonly try to clasp females by pinning them against a surface (such as the ground or surrounding vegetation; Grether 1996a). Although males cannot force females to copulate (Corbet 1963), they can hold them long enough for them to accept the *copula*. Also, large male body size may be advantageous in intrasexual competition, given that it is common to find several males trying to mate with the same female simultaneously (Grether 1996a). Under both circumstances, larger-than-average body size in NT males may be selectively advantageous because it may allow large males to attain a considerable number of copulations, which in turn may explain why NT males are as large as T males. Note that this pattern was maintained in both seasons studied, albeit males studied in 2011 were larger than those studied in 2013. The latter finding is not uncommon in studies of Odonata that consider data from different seasons. Size at emergence is greatly influenced by the duration of development (Crowley and Johansson 2002; Strobbe and Stoks 2004), so that the larvae of species with flexible developmental times emerging early in the reproductive season may bear smaller sizes compared to those emerging later in the season. This pattern is known to occur in the closely related *H. americana*, whose

males are known to emerge at smaller sizes during the winter months, reaching a peak in the months of July–October (Córdoba-Aguilar et al. 2009). The first individuals of *H. vulnerata* emerge during early April in our study site, and they are last seen up until mid December (M. A. S.-M. pers. obs.). Our results may thus reflect the fact that males from the 2011 season were collected later (June–July) than those collected in 2013 (May–June). The former may have had more time to develop and reach larger sizes than the latter, but further experimental studies are needed to support this hypothesis.

Both T and NT males had similar amounts of WP. This finding is similar to other studies in damselflies (e.g., Tynkkynen et al. 2006) that contradict what is commonly found in Zygoptera, given that T males are usually more pigmented than NT males (e.g., Grether 1996a; Siva-Jothy 1999; Córdoba-Aguilar 2002; Contreras-Garduño et al. 2006a; Córdoba-Aguilar et al. 2007). WP, as it is expected for sexual traits, is costly to produce, so that only males in overall high conditions are expected to exaggerate its expression (Andersson 1994). In *Hetaerina* damselflies, WP is known to convey information on the resource-holding ability of its bearers: males with large amounts of fat reserves have large amounts of WP (Contreras-Garduño et al. 2008) so that only males with such amounts of WP would be expected to defend a territory. Furthermore, it is likely that high amounts of WP correlate with immune defence components (Contreras-Garduño et al. 2006b; Córdoba-Aguilar et al. 2009; but see González-Santoyo et al. 2010; Rantala et al. 2011); therefore, males with higher amounts of WP will deal with pathogen infestation more efficiently. Both relationships are usually put forward to explain why T males bear larger pigmented patches than NT males. Our results, however, suggest that T and NT males are able to invest similarly in WP, to the extent that both types of males exhibit similar amounts of WP (but see below).

The morphological characteristics of males (body size, WP) did not predict mating success, but territory tenure did. That is, T males were more likely to copulate than NT males. This is fully consistent with results from other studies carried out in territorial odonates (reviewed by Suhonen et al. 2008) which highlight the fact that territoriality greatly increases male mating success. It is interesting that it was not possible to separate the morphologies of T and NT males using “conventional” statistical tests, given that when we investigated the allometry of WP, we found that for T males studied in 2013, WP increased faster per body size unit, compared to NT males. This means that at least during one season, T males were able to invest more in WP than NT males. This pattern has been a standing topic of discussion and the platform of studies that investigate the adaptive significance of hyperallometry of sexual traits (e.g., Bello-Bedoy et al. 2015). In our study we also investigated whether mated males had higher allometric slopes than unmated ones. We found that both males exhibited similar allometric slopes, with mated males exhibiting more variability in the expression of WP. This suggests that males that are able to mate do not exhibit higher allometric slopes, like it would be expected if hyperallometry of sexual traits were adaptive (via enhanced mating success). These results may have three explanations. First, we obtained a relatively small sample size of mated males ($N=27$ males). Second, we are very likely to have missed a significant number of copulations and the identities of the males, given the difficulty to detect matings by direct observations (i.e., an unknown number of copulations remained undetected; see Cordero Rivera and Egidio Pérez 1998). Finally, it may be the result of including both T and NT males in a single analysis. It has to be realised that although T males attain a significantly larger number

of copulations, NT males still manage to obtain mates. Note that our test of the relationship between allometry and mating success is an indirect one. A direct test would, for instance, require a modification of the regression equation included in methods such as General Lineal Models or Generalised Linear Mixed Models, given that in order to properly estimate allometry, the fact that the X variable is measured with error must be taken into account (see Álvarez et al. 2013 for a discussion on the topic). Therefore our results and those of other studies that have attempted to link hyperallometry of sexual traits to fitness (e.g., Bello-Bedoy et al. 2015) (but that have failed to carry out direct tests) should be interpreted with care.

Very commonly, in studies of odonates, NT males are expected to have lower condition than T males (reviewed by Córdoba-Aguilar and Cordero-Rivera 2005), but we argue that there must still be a positive correlation between WP and condition in these animals. This may be possible, given that they are able to produce the same amount of WP than T males. This suggests that although NT males are often assumed to do “the best of a bad job” because of their inability to acquire and defend a territory (Forsyth and Montgomerie 1987; Córdoba-Aguilar and Cordero-Rivera 2005), their “job” seems to be as good as that of T males (Tsubaki et al. 1997), specially in species in which lifetime reproductive success does not differ between morphs (e.g., Tsubaki et al. 1997). However, to our knowledge, no study has investigated differences in lifetime reproductive success amongst T and NT males in *Hetaerina* damselflies. Such studies would allow us to grasp a better understanding of the forces that shape the evolution of ARTs and their distinct morphologies and behaviour in taxa with non-fixed tactics.

Acknowledgments J. R.-D. was supported by a) the multilateral agreement RUDECOLOMBIA between the Universidad del Quindío (Colombia) and the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (México), which provided her with the Movilidad Académica Estudiantil grant (oficio número 3201/DGR/IA/2012), and b) an MSc scholarship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México; registro de beca 627278). K. L.-G. was supported by a Postdoctoral Fellowship from CONACYT (México; CVU 265483). This work was supported by CACyPI-UATx-2015, Universidad Autónoma de Tlaxcala. M. A. S.-M. was supported by the Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala. Fieldwork was greatly assisted by Hugo A. Álvarez and Isidora Reyes Márquez. We finally thank two anonymous reviewers for the comments and suggestions provided on earlier versions of this MS, which greatly improved its quality.

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Álvarez HA, Serrano-Meneses MA, Reyes-Márquez I, Jiménez-Cortés JG, Córdoba-Aguilar A (2013) Allometry of a sexual trait in relation to diet experience and alternative mating tactics in two rubyspot damselflies (Calopterygidae: *Hetaerina*). *Biol J Linn Soc* 108:521–533
- Andersson M (1994) *Sexual selection*. Princeton University Press, New Jersey
- Beck ML, Pruett-Jones S (2002) Fluctuating asymmetry, sexual selection, and survivorship in male dark-winged damselflies. *Ethology* 108:779–791
- Bello-Bedoy R, González-Santoyo I, Serrano-Meneses MA, Vrech D, Rivas M, Munguía-Steyer R, Córdoba-Aguilar A (2015) Is allometry of sexual traits adaptive? A field test with territorial damselflies. *Biol J Linn Soc* 114:327–334

- Blanckenhorn WU, Preziosi RF, Fairbairn DJ (1995) Time and energy constraints and the evolution of sexual size dimorphism: to eat or to mate? *Evol Ecol* 9:369–381
- Bonduriansky R (2007) Sexual selection and allometry: a critical reappraisal of the evidence and ideas. *Evolution* 61:838–849
- Bonduriansky R, Day T (2003) The evolution of static allometry in sexually selected traits. *Evolution* 57:2450–2458
- Contreras-Garduño J, Canales-Lazcano J, Córdoba-Aguilar A (2006a) Wing pigmentation, immune ability, fat reserves and territorial status in males of the rubyspot damselfly, *Hetaerina americana*. *J Ethol* 24:165–173
- Contreras-Garduño J, Lanz-Mendoza H, Córdoba-Aguilar A (2006b) The expression of a sexually selected trait correlates with different immune defense components and survival in males of the American rubyspot. *J Insect Physiol* 53:612–621
- Contreras-Garduño J, Buzatto B, Serrano-Meneses MA, Nájera-Cordero K, Córdoba-Aguilar A (2008) The size of the red wing spot as a heightened condition dependent trait in the American rubyspot. *Behav Ecol* 19:724–732
- Corbet PS (1963) *A biology of dragonflies*. Quadrangle Books, Chicago
- Cordero Rivera A, Egido Pérez FJ (1998) Mating frequency, population density and female polychromatism in the damselfly *Ischnura graellsii*: an analysis of four natural populations. *Etología* 6:61–67
- Córdoba-Aguilar A (1994) Male substrate use in relation to age and size in *Hetaerina cruentata* (Rambur) (Zygoptera: Calopterygidae). *Odonatologica* 23:399–403
- Córdoba-Aguilar A (2002) Wing pigmentation in territorial male damselflies, *Calopteryx haemorrhoidalis*: a possible relation to sexual selection. *Anim Behav* 63:759–766
- Córdoba-Aguilar A, Cordero-Rivera A (2005) Evolution and ecology of Calopterygidae (Zygoptera: Odonata): status of knowledge and research perspectives. *Neotrop Entomol* 34:861–879
- Córdoba-Aguilar A, Leshner-Treviño AC, Anderson CN (2007) Sexual selection in *Hetaerina titia* males: a possible key species to understand the evolution of pigmentation in calopterygid damselflies (Odonata: Zygoptera). *Behaviour* 144:931–952
- Córdoba-Aguilar A, Jiménez-Cortés JG, Lanz-Mendoza H (2009) Seasonal variation in ornament expression, body size, energetic reserves, immune response, and survival in males of a territorial insect. *Ecol Entomol* 34:228–239
- R Core Team (2014) *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>
- Crowley PH, Johansson F (2002) Sexual dimorphism in Odonata: age, size and sex ratio at emergence. *Oikos* 96:364–378
- Darwin C (1871) *The descent of man and selection in relation to sex*. John Murray, London
- Emlen DJ (1997) Alternative reproductive tactics and male-dimorphism in the horned beetle *Ontophagus acuminatus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Behav Ecol Sociobiol* 41:335–341
- Fairbairn DJ (1997) Allometry for sexual size dimorphism: pattern and process in the coevolution of body size in males and females. *Annu Rev Ecol Syst* 28:659–687
- Forsyth A, Montgomerie RD (1987) Alternative reproductive tactics in the territorial damselfly *Calopteryx maculata*: sneaking by older males. *Behav Ecol Sociobiol* 21:73–81
- González-Santoyo I, Córdoba-Aguilar A, González-Tokman DM, Lanz-Mendoza H (2010) Phenoloxidase activity and melanization do not always covary with sexual trait expression in *Hetaerina* damselflies (Insecta: Calopterygidae). *Behaviour* 147:1285–1307
- Grether GF (1996a) Intrasexual competition alone favors a sexually dimorphic ornament in the rubyspot damselfly *Hetaerina americana*. *Evolution* 50:1949–1957
- Grether GF (1996b) Sexual selection and survival selection on wing coloration and body size in the rubyspot damselfly *Hetaerina americana*. *Evolution* 50:1939–1948
- Grether GF (1997) Survival cost of an intrasexually selected ornament in a damselfly. *P Roy Soc Lond B Biol* 264:207–210
- Grether GF, Grey RM (1996) Novel cost of a sexually selected trait in the rubyspot damselfly *Hetaerina americana*: conspicuousness to prey. *Behav Ecol* 7:465–473
- Gross MR (1996) Alternative reproductive strategies and tactics: diversity within sexes. *Trends Ecol Evol* 11:92–98
- Kodric-Brown A, Sibly RM, Brown JH (2006) The allometry of ornaments and weapons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8733–8738
- Koskimäki J, Rantala MJ, Taskinen J, Tynkkynen K, Suhonen J (2004) Immunocompetence and resource holding potential in the damselfly, *Calopteryx virgo* L. *Behav Ecol* 15:169–173

- Koskimäki J, Rantala MJ, Suhonen J (2009) Wandering males are smaller than territorial males in the damselfly *Calopteryx virgo* (L.) (Zygoptera: Calopterygidae). *Odonatologica* 38:159–165
- Lefevre KL, Muechter VR (2004) Competition for mating resources in a territorial damselfly (Odonata: Calopterygidae). *Stud Neotrop Fauna E* 39:159–165
- Marden JH, Waage JK (1990) Escalated damselfly territorial contests are energetic wars of attrition. *Anim Behav* 39:954–959
- Nomakuchi S, Higashi K, Harada M, Maeda M (1984) An experimental study of territoriality in *Mnais pruinosa pruinosa* Selys (Zygoptera: Calopterygidae). *Odonatologica* 13:259–267
- Plaistow S, Siva-Jothy MT (1996) Energetic constraints and male mate securing tactics in the damselfly *Calopteryx splendens xanthostoma* (Charpentier). *P Roy Soc Lond B Biol* 263:1233–1238
- Plaistow SJ, Tsubaki Y (2000) A selective trade-off for territoriality and non-territoriality in the polymorphic damselfly *Mnais costalis*. *P Roy Soc Lond B Biol* 267:969–975
- Raihani G, Serrano-Meneses MA, Córdoba-Aguilar A (2008) Male mating tactics in the American rubyspot damselfly: territoriality, nonterritoriality and switching behaviour. *Anim Behav* 75:1851–1860
- Rantala MJ, Honkavaara J, Dunn DW, Suhonen J (2011) Predation selects for increased immune function in male damselflies, *Calopteryx splendens*. *P Roy Soc Lond B Biol* 278:1231–1238
- Romo-Beltrán A, Macías-Ordóñez R, Córdoba-Aguilar A (2009) Male dimorphism, territoriality and mating success in the tropical damselfly, *Paraphlebia zoe* Selys (Odonata: Megapodagrionidae). *Evol Ecol* 23:699–709
- Serrano-Meneses MA, Córdoba-Aguilar A, Méndez V, Layen S, Székely T (2007) Sexual size dimorphism in the American rubyspot: male body size predicts male competition and mating success. *Anim Behav* 73:987–997
- Shuster SM, Wade MJ (2003) Mating system and strategies. Princeton University Press, New Jersey
- Siva-Jothy M (1999) Male wing pigmentation may affect reproductive success via female choice in a calopterygid damselfly (Zygoptera). *Behaviour* 136:1365–1377
- Sokal RR, Rohlf FJ (2012) Biometry: the principles and practice of statistics in biological research, 4th edn. Freeman, San Francisco
- Stobbe F, Stoks R (2004) Life history reaction norms to time constraints in a damselfly: differential effects on size and mass. *Biol J Linn Soc* 83:187–196
- Suhonen J, Rantala MJ, Honkavaara J (2008) Territoriality in odonates. In: Córdoba-Aguilar A (ed) Dragonflies and damselflies: model organisms for ecological and evolutionary research. Oxford University Press, Oxford, pp 203–217
- Svensson EI, Friberg M (2007) Selective predation on wing morphology in sympatric damselflies. *Am Nat* 170:101–112
- Taborsky M, Brockmann HJ (2010) Alternative reproductive tactics and life history phenotypes. In: Kappeler PM (ed) Animal behaviour: evolution and mechanisms. Springer, Heidelberg, pp 537–586
- Taborsky M, Oliveira RF, Brockmann HJ (2008) The evolution of alternative reproductive tactics: concepts and questions. In: Oliveira RF, Taborsky M, Brockmann HJ (eds) Alternative reproductive tactics: an integrative approach. Cambridge University Press, New York, pp 1–21
- Thornhill R, Alcock J (1983) The evolution of insect mating systems. Harvard University Press, Cambridge
- Tsubaki Y, Hooper RE, Siva-Jothy MT (1997) Differences in adult and reproductive lifespan in the two male forms of *Mnais pruinosa costalis* Selys (Odonata: Calopterygidae). *Res Popul Ecol* 39:149–155
- Tynkkynen K, Kotiaho JS, Luojumäki M, Suhonen J (2006) Interspecific territoriality in *Calopteryx* damselflies: the role of secondary sexual characters. *Anim Behav* 71:299–306
- Warton DI, Wright IJ, Falster DS, Westoby M (2006) Bivariate line-fitting methods for allometry. *Biol Rev* 81:259–291
- Warton DI, Duursma RA, Falster DS, Taskinen S (2012) SMATR 3 – an R package for estimation and inference about allometric lines. *Methods Ecol Evol* 3:257–259