



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Factores y reglas de decisión involucrados en la elección de pareja sexual en el insecto hematófago *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae)**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Biól. Gabriel Alejandro De Simone**

Directores de Tesis: Dr. Gabriel Manrique  
Dra. Lorena Pompilio

Consejero de Estudios: Dr. Walter Farina

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiología de Insectos. Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental (DBBE). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires. IBBEA, CONICET-UBA. Ciudad Universitaria, Pabellón II. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2018

Fecha de Defensa: 20 de Marzo de 2018

## **Factores y reglas de decisión involucrados en la elección de pareja sexual en el insecto hematófago *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae)**

El objetivo de la presente tesis fue comprender los factores y reglas de decisión involucradas en la elección de pareja sexual de triatomíneos, utilizando como modelo experimental al insecto hematófago *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). Para ello se aplicó un enfoque novedoso, integrando conocimientos y metodologías provenientes tanto del campo de la Fisiología del Comportamiento, como de la Ecología del Comportamiento Animal. La especie seleccionada es un modelo clásico de estudios en Fisiología de Insectos y tiene la ventaja de que se conocen amplios aspectos morfo-fisiológicos. Además, es un excelente modelo para estudiar el comportamiento de elección de pareja por parte de la hembra, ya que en la naturaleza la misma es en general sutil, mientras que las hembras de *R. prolixus* son capaces de exhibir comportamientos estereotipados de rechazo a la cópula posibles de ser evaluados a través de la simple observación. En el Capítulo 1 se realizó una descripción sistemática del comportamiento de apareamiento de *Rhodnius prolixus*. A tal fin se determinaron dos etogramas: uno en base a la observación de parejas focales (un macho y una hembra), y otro en base a la observación de parejas focales expuestas a estímulos olfativos y visuales indicativos de la presencia de otros machos. Se encontró que el comportamiento de apareamiento se modifica en función de la presencia de otros individuos (aun cuando se encuentran físicamente inaccesibles), evidenciándose comportamientos estereotipados de rechazo a la cópula por parte de las hembras, que no habían sido exhibidos en situaciones en las que la pareja focal se encontraba en completo aislamiento. En los capítulos siguientes se evaluó de qué factores depende la expresión del comportamiento de rechazo de la hembra. En el Capítulo 2 se estudió si la decisión de la hembra de aceptar o rechazar una oportunidad de cópula se encuentra influenciada por sus ciclos ovulatorios. Se encontró que las hembras vírgenes que se encuentran cursando su segundo ciclo ovárico y que tienen un mayor riesgo de oviponer huevos infértiles, disminuyen drásticamente su umbral de selectividad al elegir pareja sexual. En el Capítulo 3 se estudió si la presencia de potenciales parejas de diferentes calidades afecta la probabilidad de comportamientos de rechazo por parte de la hembra. Se mostró que las hembras son capaces de evaluar la calidad de los machos (determinada por su estado nutricional) y que la probabilidad de rechazar una oportunidad de cópula depende tanto de la calidad del macho que la corteja como de la calidad de los machos potencialmente disponibles. En el Capítulo 4 se exploró tanto en machos como en hembras la posible existencia de elección a nivel postcopulatorio. A tal fin, se estudiaron los mecanismos de producción, transferencia y almacenamiento de espermatozoides y se analizó qué ocurre con los mismos cuando se manipula la calidad de los individuos y la presencia de potenciales competidores/parejas. Los resultados mostraron que independientemente de su calidad, los machos producen y transfieren la misma cantidad de espermatozoides a las hembras y, a pesar de ello, las cópulas con machos de baja calidad resultan en un menor éxito reproductivo (menor cantidad de huevos ovipuestos). En los capítulos siguientes se estudió la elección de pareja por parte del macho de *R. prolixus*. En el Capítulo 5 se mostró que los machos no eligen azarosamente a las hembras que cortejan, siendo capaces de discriminar entre vírgenes y no vírgenes, y exhibiendo preferencia absoluta por las primeras. En el Capítulo 6 se descubrió que el interés sexual de los machos se renueva ante la presencia de una nueva pareja (efecto *Coolidge*), evidenciándose una disminución considerablemente del intervalo de tiempo en que los machos vuelven a copular en función de la cantidad de hembras disponibles. Finalmente, tras la evaluación combinada de los factores estudiados, se avanzó en la construcción de un modelo de toma de decisiones para hembras y machos, que permitirá predecir a futuro la elección de pareja cuando dichos factores relevantes varían conjuntamente como ocurre en la naturaleza.

Palabras claves: Triatominae, Comportamiento sexual, Elección de pareja, Selección sexual, Toma de decisiones.

## **Factors and decision rules involved in the sexual mate choice in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae)**

The purpose of this thesis was to understand the factors and decision making rules underlying mate choice in triatomines, using the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) as experimental model. To this end, a novel approach was applied, integrating knowledge and methodologies from the field of Behavioral Physiology and Behavioral Ecology. *Rhodnius prolixus* is a classic model to study Insect Physiology. As a consequence, broad morpho-physiological aspects of this species are known. In addition, it is an appropriated model to study female mating choice, since in nature it is generally subtle, while the females of *R. prolixus* exhibit stereotyped behaviors to reject undesired copula attempts, possible to be evaluated through simple observation. Chapter 1 comprises a systematic description of the mating behavior of *Rhodnius prolixus*. Two ethograms were built: one based on the observation of focal couples (a male and a female), and another based on the observation of focal couples exposed to olfactory and visual stimuli indicative of the presence of other males. It was found that mating behavior changed depending on the presence of other individuals (even when they were physically inaccessible). Specifically, females showed stereotyped rejection behavior, which had not been exhibited in situations in which the focal couple was completely isolated. Possible factors affecting female rejection behavior were addressed in the following chapters. In Chapter 2, the effects of female ovulatory cycles were studied. It was found that virgin females on their second ovarian -and at higher risk of ovipositing infertile eggs- drastically decrease their selectivity threshold when choosing a sexual partner. Chapter 3 addressed whether and how male quality influences the exhibition of female rejection behavior. The results show that females were able to evaluate male quality (based on their nutritional status) and that the probability of rejecting a copula opportunity depends both on the quality of the confronted male and on the quality of the males potentially available. Chapter 4 explored post-copulatory mate choice in males and females. To this end, the mechanisms of production, transfer and storage of sperm were studied and the effects of male quality and the presence of potential competitors/partners were analyzed. The results showed that regardless of their quality, males produce and transfer the same amount of sperm to females and, in spite of this, copulations with low quality males result in a lower reproductive success (fewer oviposited eggs). The following chapters addressed mating choice in males. Chapter 5 showed that males do not randomly choose females. Instead, they are able to discriminate between virgins and non-virgins, preferring the virgin ones. Chapter 6 showed that the sexual interest of males is renewed in the presence of new females (Coolidge effect), evidenced through a considerable reduction in the time between copula when more females are available. Finally, the combined evaluation of the studied factors, allowed building the bases of a decision-making model to predict mate choice when these relevant factors vary together as occurs in nature.

**Keywords:** Triatominae, Sexual behavior, Mate choice, Sexual selection, Decision making.

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN .....  | 2  |
| AGRADECIMIENTOS .....  | 8  |
| INTRODUCCIÓN GENERAL .....   | 10 |
| <b>Capítulo 1.</b>   |    |
| <b>Comportamiento de apareamiento en función del contexto social en <i>Rhodnius prolixus</i></b> |    |
| Introducción .....   | 14 |
| Materiales y Métodos .....   | 15 |
| Insectos .....   | 15 |
| Diseño experimental .....  | 15 |
| Grupos experimentales .....  | 16 |
| Procedimiento .....  | 16 |
| Análisis de datos .....  | 17 |
| Resultados .....   | 17 |
| Discusión .....  | 21 |
| Referencias .....  | 23 |
| <b>Capítulo 2.</b>   |    |
| <b>Selectividad sexual en hembras y riesgo de oviposición de huevos infértiles</b>               |    |
| Introducción .....   | 26 |
| Materiales y Métodos .....   | 27 |
| Insectos .....   | 27 |
| Estudio previo: ciclo ovulatorio y dinámica de oviposición en hembras de <i>R. prolixus</i> ..   | 27 |
| Diseño experimental .....  | 28 |
| Grupos experimentales .....  | 28 |
| Procedimiento .....  | 29 |
| Análisis de datos .....  | 30 |
| Resultados .....   | 30 |
| Discusión .....  | 33 |
| Referencias .....  | 34 |

**Capítulo 3.****Selectividad sexual en hembras en función de la calidad absoluta y relativa de los machos**

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| Introducción .....          | 38 |
| Materiales y Métodos .....  | 39 |
| Insectos .....              | 39 |
| Diseño experimental .....   | 40 |
| Grupos experimentales ..... | 40 |
| Procedimiento .....         | 41 |
| Análisis de datos .....     | 41 |
| Resultados .....            | 42 |
| Discusión .....             | 44 |
| Referencias .....           | 46 |

**Capítulo 4.****Inversión espermática y éxito reproductivo en función de la calidad de los individuos y del contexto social**

|  |    |
|--|----|
| Introducción .....                               | 51 |
| Materiales y Métodos .....                       | 54 |
| Insectos .....                                   | 54 |
| Diseño experimental .....                        | 55 |
| Grupos experimentales .....                      | 55 |
| Procedimiento .....                              | 56 |
| Estudio comportamental .....                     | 56 |
| Inversión espermática y éxito reproductivo ..... | 56 |
| Análisis de datos .....                          | 57 |
| Resultados .....                                 | 58 |
| Estudio comportamental .....                     | 58 |
| Inversión espermática y éxito reproductivo ..... | 60 |
| Discusión .....                                  | 62 |
| Referencias .....                                | 65 |

**Capítulo 5.****Selectividad sexual de machos en función del estatus reproductivo de la hembra**

|  |    |
|--|----|
| Introducción .....                               | 71 |
| Materiales y Métodos .....                       | 72 |
| Insectos .....                                   | 72 |
| Diseño experimental .....                        | 73 |
| Grupos experimentales .....                      | 73 |
| Procedimiento .....                              | 73 |
| Estudio comportamental .....                     | 73 |
| Inversión espermática y éxito reproductivo ..... | 74 |
| Análisis de datos .....                          | 75 |
| Resultados .....                                 | 75 |
| Estudio comportamental .....                     | 75 |
| Inversión espermática y éxito reproductivo ..... | 78 |
| Discusión .....                                  | 79 |
| Referencias .....                                | 82 |

**Capítulo 6.****Efectos de la disponibilidad de múltiples hembras sobre el comportamiento sexual del macho**

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| Introducción .....          | 87 |
| Materiales y Métodos .....  | 88 |
| Insectos .....              | 88 |
| Diseño experimental .....   | 89 |
| Grupos experimentales ..... | 89 |
| Procedimiento .....         | 89 |
| Análisis de datos .....     | 90 |
| Resultados .....            | 90 |
| Discusión .....             | 94 |
| Referencias .....           | 97 |

|  |            |
|--|------------|
| <b>DISCUSIÓN GENERAL .....</b>                                       | <b>102</b> |
| Elección de pareja sexual desde el punto de vista de la hembra ..... | 104        |
| Elección de pareja sexual desde el punto de vista del macho .....    | 106        |
| Consideraciones finales .....  | 108        |
| <br>   |            |
| <b>REFERENCIAS GENERALES .....</b>                                   | <b>110</b> |

## AGRADECIMIENTOS

A los Doctores Gabriel Manrique y Lorena Pompilio por dirigir el presente trabajo de investigación. Su paciencia, apoyo y comprensión constantes me hicieron crecer mucho como científico, pero sobre todo como persona.

A los Doctores Ignacio Soto, Rubén Muzio y Valeria Sfara por aceptar ser parte del Comité Evaluador de la presente Tesis Doctoral. Estoy seguro que sus aportes enriquecerán el enfoque y entendimiento que poseo sobre los temas investigados.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (FCEyN - UBA), que hicieron económicamente posible la realización de esta Tesis.

A todos los integrantes del Laboratorio de Fisiología de Insectos y del Laboratorio de Ecofisiología de Insectos, por el constante apoyo, consejos y discusiones que aportaron enormemente a mi formación académica. Gran parte de la minuciosidad aplicada en todos los experimentos se debe a la óptica amplia que poseen estas personas.

A los Doctores Gerardo Cueto y José Crespo por su asistencia en gran parte de los análisis estadísticos realizados. Sin su ayuda no me hubiera sido posible interpretar de forma íntegra los resultados de varios Capítulos.

A todos los integrantes del Laboratorio de Ecofisiología de Parasitoides por tener siempre la palabra justa, en el momento justo, esas que yo no quería oír pero que necesitaba para salir a flote y seguir adelante.

En especial a Sebas por sus eternos mates y charlas de la vida, delires y volar con nuevas ideas; y a Claudia, Alicia y Agustina por las incontables tarde de cafecitos, golosinas y apoyo que me dieron, son invaluable.

A Marcela, José, Mono, Gustavo y Paula, por ser amigos de fierro que nunca me dejaron bajar los brazos, ya sea con ánimos o con retos.

A Anita Aisenberg por ser una constante mentora y modelo de persona y científico a seguir.

A todo el equipo de Expedición Ciencia, en particular a Gabriel Gellón, Joselina Cassarini, Marisa Díaz y Verónica Seara. Ustedes despertaron en mí la pasión por la Educación en Ciencias.

A Fernanda, Luciano y Ricardo, por ser esos hermanos de la vida que nunca se apartan de tu lado, por más kilómetros de distancia que nos separen.

A Graciela, Mariano y Tatiana, por ser mi familia adoptiva desde que vivo en Buenos Aires, pero en particular a Graciela, sos la mamá que no tengo.

Finalmente a mi familia, mi papá Marcelo y mi hermana Patricia. Ellos son mi todo, y aunque no se los digo seguido, lo saben.



# Introducción General

*"Knowledge is a feast for the mind.*

*Savor every swallow..."*

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La selección sexual es uno de los mecanismos propuestos originalmente por Charles Darwin (1871) para explicar la evolución de las especies. La misma ocurre cuando existen diferencias en las habilidades de los individuos para competir por las parejas disponibles y/o en lograr atraer al sexo opuesto (Ruhela & Sinha, 2010). Su consecuencia es que aquellos individuos poseedores de características o comportamientos que les otorgue una ventaja en la competencia reproductiva, obtendrán un aumento en su éxito reproductivo (Birkhead, 2007). Tal competencia sería el resultado de dos procesos: la selección intra-sexual, que implica la competencia entre los miembros de un mismo sexo para aparearse con el sexo opuesto; y la selección inter-sexual, en la cual los miembros de un sexo ejercen fuertes presiones selectivas sobre características del sexo opuesto mediante la elección de sus parejas (Gould & Gould, 1989; Arnqvist & Rowe, 2005). Los atributos y comportamientos susceptibles de ser moldeados por selección sexual incluyen características físicas, cortejos elaborados, luchas entre rivales, posesión de territorio, entre otros (Ruhela & Sinha, 2010).

Si bien la visión androcéntrica de la reproducción ha sido históricamente la preponderante - un macho que copule y fecunde tantas hembras como sea posible producirá más descendientes que otro que no lo haga (Parker, 2006) -, en los últimos años se ha comenzado a enfatizar el rol que cumplen las hembras en el proceso de elección de pareja (Eberhard, 1996; Birkhead, 2007; Peretti & Aisenberg, 2011). Dichos estudios evidencian que las hembras son selectivas al elegir a los machos que compiten por ellas (Barnard, 2004). Esta selectividad en la elección de pareja repercute positivamente en el éxito reproductivo de la hembra (Ruhela & Sinha, 2010).

Entre los insectos, los triatominos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) representan un grupo interesante para estudiar los mecanismos que subyacen a la elección de pareja sexual, dado que en algunos se conoce ampliamente su fisiología por ser utilizados como especie modelo, pero se desconocen aún los factores fisiológicos y ecológicos que inciden en dicha elección. A su vez el modelo tiene una clara ventaja, ya que permite evaluar no solo la elección de pareja por parte del macho (medida a través de tiempos de acercamiento, intentos de cópula, tiempo postcópula, etc.), sino también por parte de la hembra, ya que la misma exhibe comportamientos de discriminación activa en respuesta a intentos copulatorios del macho. Estudios previos en algunas especies de triatominos, muestran que las hembras rechazan activamente a potenciales candidatos a través de la exhibición de comportamientos estereotipados, como ser el achatamiento del abdomen contra el substrato, la estridulación, la evasión y movimientos abdominales (Manrique & Lazzari, 1994; Pires et al., 2004; Vitta & Lorenzo, 2009). Estos comportamientos dificultan el contacto físico con el macho y limitan el acceso a la *genitalia* femenina, disminuyendo la probabilidad de cópula o retrasando la misma (Pompilio et al., 2016).

Es esperable que el grado de selectividad de las hembras se vea afectada por la variabilidad en la calidad de los machos potencialmente disponibles (Bleu et al., 2012). Bajo esa circunstancia, los costos

para la hembra de rechazar una oportunidad de cópula podrían ser menores que los beneficios por copular con un macho de mayor calidad. El grado de selectividad de las hembras también debería verse afectado por la disponibilidad de oportunidades de apareamiento, que depende fundamentalmente de la proporción de machos y hembras sexualmente activos (referido al *sex ratio* operacional, OSR) (Emlen & Oring, 1977). Cuanto mayor es el desbalance en el OSR, mayor es la competencia entre los miembros del sexo limitado (Emlen, 1976). Experimentos previos realizados por nuestro grupo, confirman que la disponibilidad de potenciales parejas afecta la incidencia de comportamientos asociados al rechazo a la cópula en hembras de *R. prolixus* (Pompilio et al., 2016).

Sobre esta base, la presente Tesis propone estudiar los factores involucrados en el comportamiento de elección de pareja sexual, utilizando como modelo experimental a la especie *Rhodnius prolixus* Stål (1859) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Este insecto hemimetábolo posee un ciclo biológico caracterizado por cinco estadios ninfales inmaduros y un adulto maduro sexualmente (Fig. 1). Su alimentación es exclusivamente hematófaga (Lent & Wygodzinsky, 1979), necesitando entre una y varias ingestas de sangre entre cada uno de sus estadios para poder mudar. Es de hábito nocturno y gregario, tanto silvestre como doméstico (Fitzpatrick et al., 2008). En la naturaleza vive asociado a nidos de aves y roedores en las copas de diversas especies de palmeras del género *Attalea* (Gamboa, 1963), mientras que también se encuentra adaptado a vivir en residencias rurales (Lent & Wygodzinsky, 1979). Allí suele encontrárselo en diversos refugios, que abandona para alimentarse en los momentos de reposo de sus hospedadores (principalmente vertebrados endotérmicos, entre ellos el hombre) retornando nuevamente antes de las primeras horas de luz (Bodin et al., 2008). Es uno de los principales triatominos con importancia epidemiológica debido a que es transmisor del parásito *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), agente causante de la enfermedad de Chagas (Zeledón & Ravinovich, 1981; Monteiro et al., 2003). Su distribución abarca desde el Norte de América del Sur (Venezuela y Colombia) hasta América Central (Honduras, Guatemala, Nicaragua, El Salvador, entre otros) (Schofield, 1994). Cabe destacar que hasta donde sabemos, no existe evidencia sobre el comportamiento sexual de *R. prolixus* en condiciones naturales, seguramente debido a dificultades desde el punto de vista metodológico.



**Figura 1.** Ciclo biológico del insecto hemimetábolo *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Se destacan los diferentes estadios ninfales y el adulto maduro.

En una primera instancia, la Tesis plantea estudiar los patrones comportamentales del apareamiento en esta especie, analizando en detalle el comportamiento pre y post-copulatorio. En una segunda instancia, el objetivo es estudiar el efecto del contexto social y factores fisiológicos sobre el comportamiento de elección de pareja.

La serie de experimentos realizados contempla un detallado análisis de los factores que influyen en la elección de pareja sexual tanto de hembras como machos de *R. prolixus* (e.g. estado nutricional, momento del ciclo ovárico de las hembras, edad, rasgos comportamentales, contexto social, entre otros). Una vez identificados dichos factores se avanzó en la construcción del algoritmo inherente a la toma de decisiones. Tal algoritmo permitirá predecir la elección de pareja para cada sexo, cuando todos los factores relevantes varían en forma conjunta como ocurre en la naturaleza.

## **OBJETIVO GENERAL**

Como objetivo general se plantea en esta Tesis estudiar los factores involucrados en el comportamiento de elección de pareja sexual en *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae).

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Los objetivos específicos fueron:

- Describir los patrones y secuencias comportamentales que ocurren en el apareamiento (cortejo-cópula) de *Rhodnius prolixus*.
- Analizar los efectos del contexto social (presencia/ausencia de potenciales parejas y/o competidores) sobre el comportamiento de elección de pareja sexual.
- Estudiar la selectividad de las hembras por una pareja sexual en distintos momentos de su ciclo ovulatorio.
- Determinar si la hembra considera el estado nutricional del macho como indicador de calidad, y si su evaluación es absoluta y/o relativa respecto de la presencia de otras potenciales parejas sexuales.
- Analizar la inversión espermática en *R. prolixus*, de acuerdo a la calidad de los machos y al contexto social presente.
- Determinar si el macho considera el estatus reproductivo de la hembra (virgen o copulada) como indicador de calidad, y si existe una relación con su inversión espermática.
- Analizar la influencia de la presencia de múltiples hembras disponibles en el comportamiento reproductivo del macho, determinando su ajuste en la evaluación e inversión realizada en cada evento de apareamiento.
- Comprender las reglas generales de toma de decisión involucradas en el comportamiento de elección de pareja.

**Capítulo 1.**  
**Comportamiento de apareamiento**  
**en función del contexto social**  
**en *Rhodnius prolixus***

*"Don't worry. I'm not going to deprive you of all your secrets.*

*Just your most precious one."*

*—Liliana Vess*

## Capítulo 1. Comportamiento de apareamiento en función del contexto social en *Rhodnius prolixus*

### Introducción

El primer paso para estudiar el comportamiento reproductivo de una especie es analizar los patrones instintivos que ocurren entre sus miembros bajo circunstancias específicas. Para ello se utiliza una metodología clásica de la Etología, que es la construcción de etogramas (Ruhela & Sinha, 2010). Éstos consisten en una descripción detallada del flujo continuo de sucesos comportamentales llevados a cabo por los individuos, divididos en unidades discretas características - unidades comportamentales -, junto a sus respectivas frecuencias de ocurrencias (Martin & Bateson, 1993; Barnard, 2004; Ruhela & Sinha, 2010). Toda esta información se ordena en secuencias generalmente repetitivas que constituyen el repertorio comportamental básico de una especie.

Idealmente, la construcción de etogramas reproductivos deberían realizarse en el entorno natural de la especie, dado que es en ese contexto en que evolucionaron dichos comportamientos (Ruhela & Sinha, 2010). Sin embargo, es muy común que se realicen bajo condiciones de laboratorio con parejas aisladas de su entorno y/o de sus conespecíficos, afectando la validez externa de los resultados para aquellas especies que viven en grupos o que se agrupan durante la época reproductiva.

El objetivo del presente Capítulo fue estudiar el comportamiento de apareamiento del triatmino *Rhodnius prolixus* Stål (1859) (Hemiptera: Reduviidae). Esta especie es utilizada como modelo clásico de la Fisiología de Insectos, conociéndose ampliamente detalles de su fisiología reproductiva (e.g. Buxton, 1930; Khalifa, 1950; Davey, 1967; Pratt & Davey, 1972a; Pratt & Davey, 1972b; Wang & Davey, 1993; Chiang & Chiang, 2017). Sin embargo, aún no se ha realizado un etograma descriptivo completo de su comportamiento reproductivo. A su vez, el comportamiento de apareamiento de la especie en cuestión ha demostrado ser sensible a los efectos del contexto social, definido como la presencia de otras potenciales parejas y/o competidores. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio muestran que las hembras de *R. prolixus* presentan la particularidad de exhibir una serie de comportamientos estereotipados que cumplen la función de rechazo a la cópula. Estos comportamientos de discriminación activa sólo se evidencian en presencia de otros individuos (Pompilio et al., 2016), por lo que el contexto social es clave para esta especie.

A partir de estos antecedentes, se consideró pertinente la realización de dos etogramas, uno realizado sobre la base de una pareja focal (macho y hembra) aislada y otro realizado en presencia de un contexto social (otros machos potencialmente disponibles). Para ello, trabajamos bajo la hipótesis de que el comportamiento de apareamiento de las hembras se modifica en función de la disponibilidad de potenciales parejas, ya que el costo de rechazar una oportunidad de cópula es menor cuando existen otras oportunidades de apareamiento. La predicción que se desprende es que las hembras exhibirán comportamientos de discriminación activa únicamente en presencia de contexto social. Si ello fuera así

quedaría en evidencia la influencia de considerar una variable como ser la disponibilidad potencial de otras parejas (que forma parte del entorno natural de una especie), para la construcción de etogramas descriptivos.

## **Materiales y Métodos**

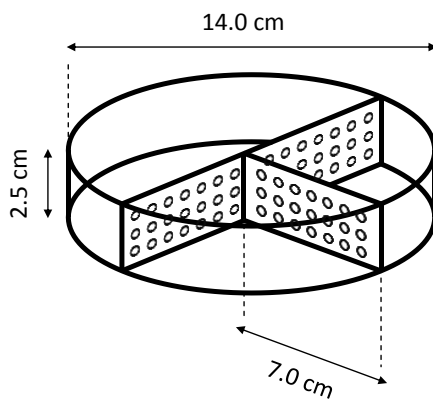
### *Insectos*

Se utilizaron individuos de *R. prolixus* criados desde huevo bajo condiciones de laboratorio, a una temperatura de  $28 \pm 1$  °C, humedad relativa de 30-40 % y siguiendo un régimen de iluminación de 12:12 hs (L:O). Todos los estadios fueron alimentados semanalmente *ad libitum* sobre gallinas vivas por el lapso de una hora. Durante dicha alimentación, los insectos fueron colocados en recipientes cilíndricos de acrílico (9.5 x 8.5 cm) con un trozo de papel de filtro como substrato, y una cubierta de tela de nylon en ambas bases. Cada recipiente fue colocado en contacto con la piel de la gallina, permitiendo a los individuos caminar libremente por el substrato y alcanzar la fuente de alimento. Una vez ocurrida la ecdisis imaginal, los insectos fueron clasificados por sexo y separados en recipientes plásticos individuales (3.5 x 3.0 cm) con un nuevo substrato de papel de filtro, manteniéndose vírgenes hasta el momento de llevar a cabo los experimentos. Previo a su utilización, cada ejemplar adulto fue alimentado sobre gallinas vivas, registrando su peso antes y después de la alimentación (Mettler AJ100, Mettler Instrument Corporation, Hightstown, New Jersey, USA). Luego de la diuresis (aproximadamente 4 hs posterior a la ingesta), se descartaron aquellos individuos que ingirieron menos de 55.6 mg de sangre y/o menos del 81.4% de su peso en sangre, ya que estos valores representan el mínimo alimento necesario para que los individuos estén aptos reproductivamente y las hembras puedan producir huevos (Goodchild, 1955; Friend et al., 1965).

Todos los experimentos fueron llevados a cabo utilizando insectos vírgenes, maduros sexualmente, de 12 días de edad y 7 días de ayuno, durante las primeras horas de la escotofase, de forma tal de coincidir con el máximo período de actividad observado en los triatomos (Lazzari, 1992). A su vez, cada individuo fue utilizado una única vez y luego descartado, siendo siempre manipulado siguiendo las reglas de bioseguridad del Servicio de Higiene y Seguridad de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

### *Dispositivo experimental*

Para estudiar el comportamiento de los insectos se utilizó una arena experimental consistente en un recipiente acrílico circular de 2.5 cm de alto y 14.0 cm de diámetro, subdividido en dos secciones semicirculares iguales por medio de un tabique transparente perforado (14.0 x 2.5 x 0.8 cm), que permitía el paso de claves visuales y olfativas. A su vez, un segundo tabique removible de menor tamaño (7.0 x 2.5



**Figura 1.** Esquema de la arena experimental utilizada en los ensayos comportamentales.

x 0.8 cm), dividía una de las secciones en dos partes idénticas. De este modo tres compartimentos quedaron definidos: uno mayor y dos menores (Fig. 1).

En la base de dicho dispositivo se colocó un papel de filtro como substrato, el cuál fue reemplazado por uno nuevo al finalizar cada experiencia para evitar la contaminación química entre las diferentes mediciones. La temperatura del cuarto experimental se estableció previo a cada ensayo en  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , a través de un calentador eléctrico, el cual fue apagado antes de comenzar las mediciones. La humedad relativa varió entre 45-60%.

### *Grupos experimentales*

Cada experimento consistió de dos fases: evaluación previa y *test*. Durante la fase de evaluación, una hembra focal fue expuesta simultáneamente a la presencia de un macho focal y a la presencia (P) o ausencia (A) de un contexto social, representado por tres machos extras. Todos los insectos se encontraban contenidos dentro de uno de los compartimentos definidos anteriormente, separados por los tabiques transparentes perforados removibles. Durante la fase de *test*, los insectos focales fueron liberados.

De esta forma, dos grupos experimentales quedaron definidos: parejas focales en presencia de otros machos (presencia de contexto social) y parejas focales en ausencia de otros machos (ausencia de contexto social).

### *Procedimiento*

Para el estudio del comportamiento de apareamiento se realizaron 40 ensayos de cortejo-cópula, 20 en presencia (P) y 20 en ausencia de contexto social (A). Al comienzo de cada experimento los insectos fueron introducidos individualmente en cada uno de los tres compartimentos: tres machos en la sección mayor, y una hembra y un macho focal en las secciones menores. De forma tal de evitar la perturbación mecánica de los individuos que pudiera desencadenar la descarga de sus glándulas metasternales y de Brindley, se transportó a los mismos desde sus recipientes de contención hasta el *set* experimental utilizando un trozo de papel de filtro, permitiendo posteriormente que descendieran libremente (Manrique et al., 2006).

A continuación se permitió a todos los insectos explorar cada una de sus respectivas secciones, familiarizándose con la arena y con los restantes individuos contenidos en los cubículos adyacentes. Dos minutos después se retiró el tabique menor que separaba los adultos focales, comenzando el registro etológico. Dicho registro se continuó desde el acercamiento de los insectos hasta la finalización de la



cópula y la posterior separación de los adultos. Al finalizar cada experimento todos los individuos fueron cuidadosamente retirados de la arena utilizando un nuevo trozo de papel de filtro para evitar cualquier perturbación.

A través de la observación directa y de video-filmaciones se registró el comportamiento de los insectos, determinando la frecuencia y duración de cada unidad comportamental, ocurrencias de rechazos a la cópula por parte de la hembra, latencia al primer intento de monta por parte del macho, latencia a la cópula, y duración de la cópula y postcópula. Todos los experimentos fueron grabados utilizando una cámara web Genius FaceCam 1010 HD (KYE Systems Corp., Taipei, Taiwan), colocada a 35 cm sobre la arena, y bajo una intensidad de luz homogénea de 15 lux, permitiendo al experimentador observar los insectos sin perturbarlos (Pompilio et al., 2016).

### *Análisis de datos*

Para la elaboración y comparación de los etogramas descriptivos, se consideraron aquellas unidades comportamentales que estuvieron presentes en al menos el 10% de los experimentos realizados. A su vez, se registró la frecuencia de ocurrencia y secuencia de comportamientos utilizando el programa JWatcher© v1.0 (Blumstein & Evans, 2000), a través de un Análisis de Markov. Cabe destacar que se siguió la nomenclatura de unidades de comportamiento reproductivo definidas por autores previos (e.g. Lima et al., 1986; Rojas et al., 1990; Manrique & Lazzari 1994; Pires et al., 2004; Vitta & Lorenzo, 2009; Pompilio et al., 2016), para facilitar su comparación. Finalmente, se contrastaron las frecuencias de dichos comportamientos mediante pruebas de  $\chi^2$  aplicando la corrección de Bonferroni. Para el estudio de las latencias y duraciones de los comportamientos se verificó normalidad (Shapiro-Wilk *test*) y homogeneidad de varianza (Levene *test*) de los datos, comparando posteriormente entre los grupos experimentales (P vs. A) mediante un ANOVA de dos colas. En los casos en que fue requerido, se efectuaron contrastes a *posteriori* a través del *test* de Tukey. Todos los resultados fueron analizados utilizando el paquete estadístico InfoStat® v2016p (Di Rienzo et al., 2016).

### **Resultados**

Del total de los 40 ensayos realizados (20 por cada grupo) se obtuvieron 15 cópulas en presencia de contexto social (P) y 19 en ausencia del mismo (A). Si bien no se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de ocurrencia de cópula entre los grupos experimentales (P=75%, A=95%), se observó una tendencia a que cuando existen otros machos disponibles se reduce en un 20% la ocurrencia de cópula ( $\chi^2$  H=3.14, p=0.0765, N=40).

El comportamiento de apareamiento de *R. prolixus* resultó altamente estereotipado, presentando variaciones de acuerdo a la presencia/ausencia de contexto social. Se distinguieron doce unidades



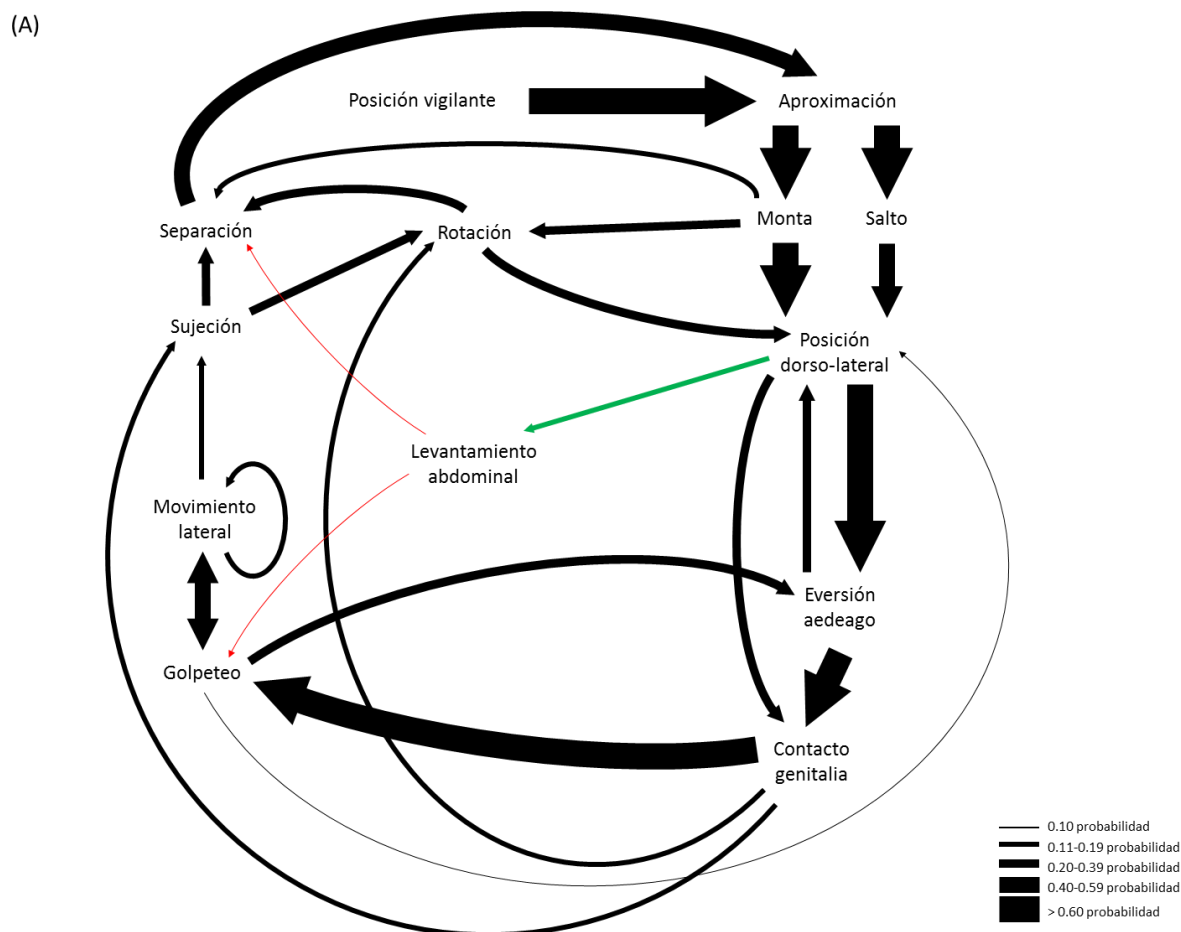
**Figura 4.** Pareja de *R. prolixus* en cópula. El macho (izquierda), en posición dorso-lateral, se encuentra sujetando a dorsal y a ventral a la hembra (derecha) con sus tres pares de patas. Escala: 0.5 cm. Tomado de Chiang & Chiang (2017).

comportamentales relacionadas con el cortejo-cópula: posición vigilante, aproximación, monta, salto, rotación, posición dorso-lateral, eversión del *aedeago*, contacto de *genitalia* (cópula), golpeteo, movimiento lateral, sujeción, y separación (Fig. 2). A su vez se reconocieron tres unidades comportamentales asociadas al rechazo de la cópula por parte de la hembra: evasión, levantamiento abdominal y achatamiento (Fig. 3).

El apareamiento comenzó típicamente por iniciativa del macho, dado que éste manifiesta las primeras señales comportamentales de detección del otro sexo. Luego de un breve período en que los insectos exploraron la arena, el macho dejó de moverse, adoptando una posición vigilante (apuntando sus antenas en dirección a la hembra, siguiendo sus movimientos). Posteriormente, el macho se aproximó

hacia la hembra e intentó montarla, ya sea lentamente trepando o velozmente a través de un salto a corta distancia. En algunos pocos casos se observó una rotación de 360° del macho sobre el dorso de la misma. Una vez posicionado sobre la hembra, se colocó en posición dorso-lateral respecto de ella, con su cabeza mirando en la misma dirección y sujetándola dorsal y ventralmente con sus tres pares de patas (Fig. 4). En esta posición la hembra suele permanecer inmóvil durante toda la cópula, aunque tiene libertad de movimiento por la arena si lo requiere. Una vez que el macho se encontró afirmado, acercó su extremo abdominal posterior hacia el de la hembra asistiéndose con su último par de patas, y evertió su *aedeago*. Con ayuda de sus parámetros aseguró la *genitalia* femenina e introdujo su órgano copulador, iniciándose la cópula. Ya avanzada la misma (aproximadamente desde la mitad del apareamiento), el macho realizó una serie de golpeteos con su primer par de patas en el dorso de la hembra, alternando con movimientos abdominales laterales hacia la misma. Estos comportamientos se repitieron alternados, cesando hacia el final de la cópula, momento en que el macho separó su *genitalia*, y se posicionó nuevamente sobre el dorso de la hembra (unidad comportamental: *sujeción*). En estos momentos el macho suele realizar un nuevo giro de 360° sobre la hembra, previo a separarse y a alejarse de ella al cabo de un breve período de tiempo (Fig. 2).

En respuesta a los intentos de cópula por parte del macho, se observó una serie de comportamientos estereotipados característicos de rechazo que variaron en frecuencia de acuerdo a la presencia/ausencia de contexto social. En ausencia del mismo (A), se observó en pocos ensayos (2 de 20) que la hembra elevó su abdomen (unidad comportamental: *levantamiento abdominal*) en respuesta al intento de colocarse en posición dorso-lateral del macho, impidiendo el contacto de las *genitalia*. Este respondió en todos los casos realizando golpeteos en el dorso de la hembra con su primer par de patas.

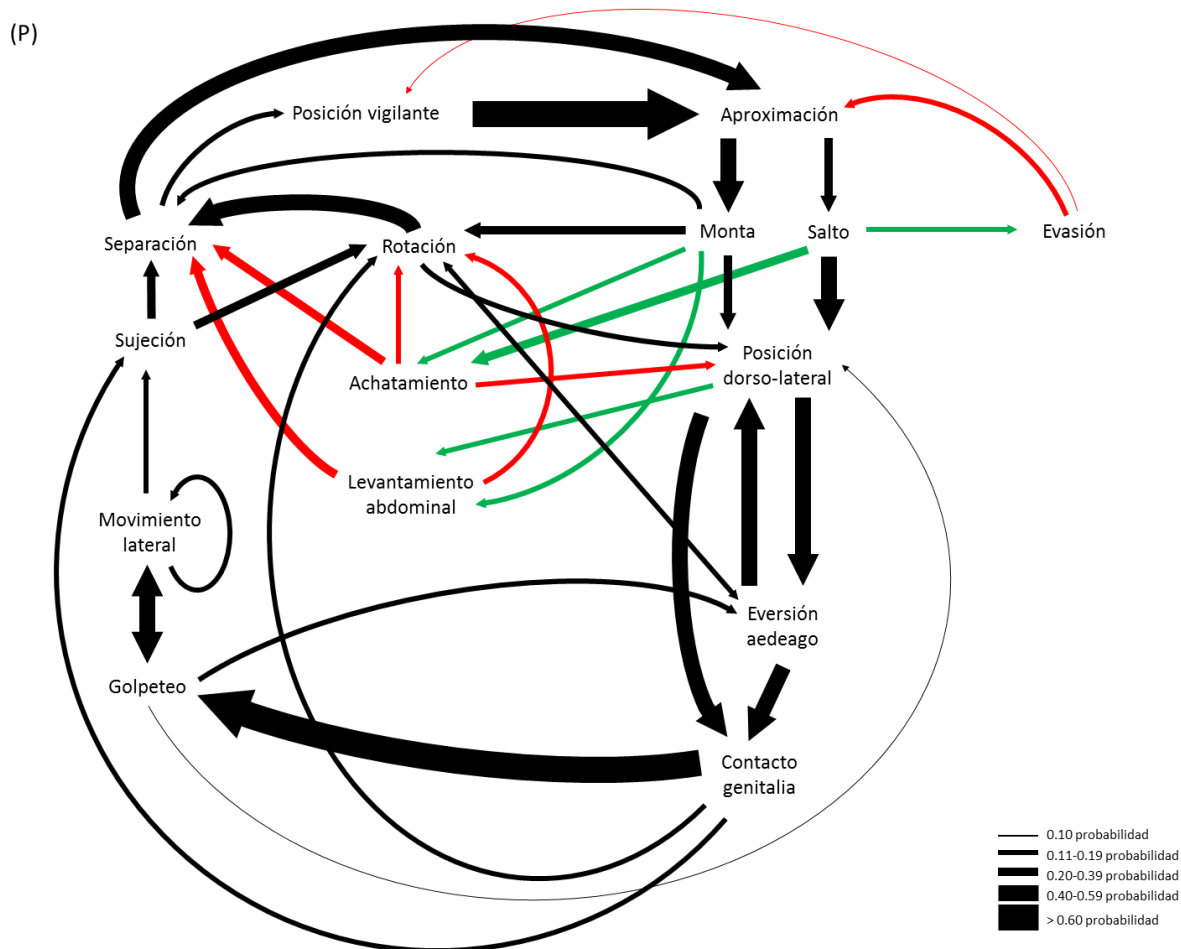


**Figura 2.** Diagrama de flujo mostrando la probabilidad de transición (espesor de la flecha) entre cada unidad comportamental. Se representan los comportamientos del macho (líneas negras) y hembra (líneas de color) de *R. prolixus*, en ausencia de contexto social (A) (n=20).

De persistir el levantamiento abdominal, los insectos se separaron, retomando el macho sus intentos de monta posteriormente (Fig. 2). Cuando el contexto social estuvo presente, se observaron modificaciones significativas en el comportamiento de la hembra. Ante intentos de monta a través del *salto* por parte del macho, la hembra usualmente realizó un comportamiento de *evasión*, alejándose del mismo. En otras ocasiones, la hembra acható su cuerpo contra el sustrato (unidad comportamental: *achatamiento*), impidiendo al macho alcanzar la posición dorso-lateral y afirmarse a la hembra con sus patas, o levantó su abdomen (unidad comportamental: *levantamiento abdominal*), evitando el contacto genital. Ambos comportamientos finalizaron con la interrupción de los intentos de cópula del macho, la separación de los individuos y el reinicio de los intentos de monta (16 rechazos sobre 20 ensayos) (Fig. 3).

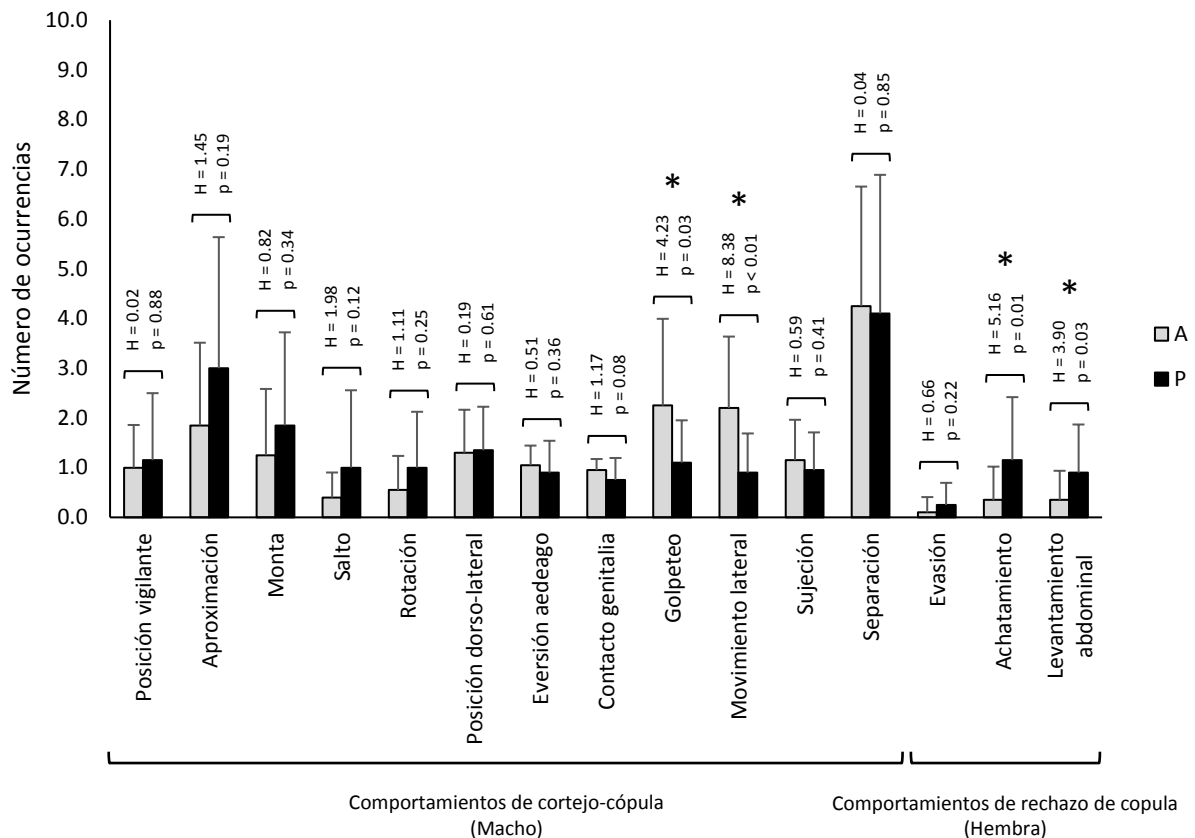
Al analizar el número medio de ocurrencias de cada comportamiento, en presencia/ausencia de contexto social, se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. En presencia de machos extra, los comportamientos de rechazo a la cópula “*achatamiento*” y “*levantamiento abdominal*” aumentaron significativamente ( $\chi^2$ :  $H=5.16$ ,  $p<0.01$ ,  $N=40$ ;  $H=3.90$ ,  $p=0.03$ ,  $N=40$ , respectivamente) (Fig. 4). Mientras que en ausencia de otras parejas disponibles, los comportamientos

asociados a la cópula “*movimiento lateral*” y “*golpeteo*” son los que aumentaron significativamente ( $\chi^2$ :  $H=8.38$ ,  $p<0.01$ ,  $N=40$ ;  $H=4.23$ ,  $p=0.03$ ,  $N=40$ , respectivamente) (Fig. 5).



**Figura 3.** Diagrama de flujo mostrando la probabilidad de transición (espesor de la flecha) entre cada unidad comportamental. Se representan los comportamientos del macho (líneas negras) y hembra (líneas de color) de *R. prolixus*, en presencia de contexto social (P) ( $n=20$ ).

Finalmente, al contrastar la frecuencia de ocurrencia de los comportamientos de rechazo a la cópula en presencia y ausencia de contexto social, se observó que son significativamente más habituales cuando existen otras potenciales parejas disponibles ( $\chi^2$ :  $H=19.80$ ,  $p<0.0001$ ,  $N=40$ ). Al comparar la duración de la cópula entre los grupos experimentales (P vs. A), se observó que ante la presencia de contexto social, la misma se prolonga significativamente un 7.14% más que en su ausencia (ANOVA:  $F=5.46$ ,  $p=0.0249$ ,  $N=40$ ;  $A=37.14\pm 0.80$  min,  $P=39.79\pm 0.80$  min,  $\text{Media}\pm\text{EE}$ ) (Tukey:  $p<0.05$ ,  $N=40$ ). Al evaluar la duración de la “*sujeción*” no se encontraron diferencias significativas entre la presencia y ausencia de contexto social (ANOVA:  $F=0.63$ ,  $p=0.4324$ ,  $N=40$ ;  $A=8.03\pm 1.12$  min,  $P=8.63\pm 1.12$  min,  $\text{Media}\pm\text{EE}$ ).



**Figura 5.** Valores medios y desvió estándar del número de ocurrencias de unidades comportamentales asociadas con el comportamiento de apareamiento de *R. prolixus*, distinguiendo entre presencia (P) y ausencia de contexto social (A). \* indican diferencias significativas entre grupos.

## Discusión

En la especie en estudio analizada en el presente Capítulo, *Rhodnius prolixus*, se comprobó que el comportamiento de apareamiento de machos y hembras es altamente estereotipado, siguiendo una secuencia determinada de unidades comportamentales en un ciclo repetitivo. Esto concuerda con lo descrito para otras especies de triatominos en condiciones de laboratorio (Lima et al., 1986; Rojas et al., 1990; Manrique & Lazzari, 1994; Pires et al., 2004; Vitta & Lorenzo, 2009; Chiang & Chiang, 2017), lo que indicaría que dicho comportamiento de apareamiento, más allá de algunas diferencias inter específicas, sería un carácter muy conservativo del grupo.

Los comportamientos descritos exhibidos por machos forman parte del cortejo-cópula, mientras que los comportamientos descritos exhibidos por hembras cumplen la función de rechazo a la cópula, ya que derivan en la separación física de los individuos. Estos resultados concuerdan con los reportados por Pompilio et al. (2016) en *R. prolixus*, en donde encuentran un decremento significativo en la incidencia de cópula y un aumento en la latencia a la cópula ante la exhibición de estos mismos comportamientos estereotipados por parte de la hembra. Estudios previos en otras especies de triatominos muestran que

las hembras rechazan activamente a potenciales candidatos a través de la exhibición de comportamientos estereotipados, como ser el achatamiento del abdomen contra el substrato, la estridulación, la evasión y los movimientos abdominales (Manrique & Lazzari, 1994; Pires et al., 2004; Vitta & Lorenzo, 2009). Dichos comportamientos dificultan el contacto físico con el macho y limitan el acceso a la *genitalia* femenina, disminuyendo la probabilidad de cópula o retrasando la misma. En otros insectos o grupos de animales no es frecuente que se reporten comportamientos de discriminación activa en hembras. Las pocas evidencias halladas provienen de la observación de hembras vírgenes de *Drosophila melanogaster*, que también exhiben comportamientos (como pataleo) que podrían prevenir la cópula y repeler los intentos de monta del macho (Bastock & Manning, 1955; Spieth, 1966).

En relación a los dos etogramas realizados, se observaron importantes variaciones en los patrones comportamentales hallados y sus respectivas frecuencias de ocurrencia. Las diferencias observadas serían consecuencia de las condiciones experimentales utilizadas para realizar cada uno de ellos. En el caso del etograma realizado en presencia de contexto social (otros machos potencialmente disponibles) se evidenció que un alto porcentaje de hembras rechazaron intentos copulatorios por parte del macho (16 sobre 20), incrementándose significativamente los comportamientos de “*evasión*”, “*levantamiento abdominal*” y “*achatamiento*”. Tal como se esperaba, en ausencia de contexto social, pocas hembras rechazaron los intentos de cópula del macho (2 sobre 20). El hecho de que la hembra modifique significativamente su grado de selectividad en función de la potencial oferta de machos refuerza la hipótesis de que el comportamiento de rechazo es flexible y depende del costo asociado a tal decisión. Shelly & Bailey (1992) y Berglund (1995) sugieren que en escenarios donde el número de machos potenciales disponibles es escaso, el costo de búsqueda de nuevas parejas para la hembra es elevado, y en consecuencia, las hembras disminuyen su grado de selectividad. En nuestro caso, el costo de rechazar a un macho para la hembra en ausencia de otros potenciales candidatos es más elevado que para la hembra en presencia de ellos. Esta diferencia repercute claramente en el tipo y frecuencia de aparición de comportamientos estereotipados exhibidos por las hembras en presencia y ausencia de contexto social. Estos resultados muestran la importancia de evaluar a los individuos en un entorno similar al natural. Dado que las vinchucas son insectos gregarios, un etograma reproductivo en presencia de dicho contexto sería el que mayor validez externa le confiere, aportando una comprensión más amplia del comportamiento de apareamiento de la especie.

Una de las razones por las que los etogramas bajo condiciones de laboratorio no suelen realizarse en presencia de contexto social es su dificultad práctica, en el sentido de que si todos los individuos se desplazan libremente por la arena experimental es muy difícil evaluar de manera clara y precisa cada comportamiento a causa de la múltiple interacción. Para sortear tales inconvenientes, en el presente trabajo se diseñó y construyó especialmente un dispositivo que permite a los insectos percibir la presencia de otros individuos cercanos a través de claves visuales y olfativas, evitando el contacto físico. Consideramos que esta metodología podría aplicarse o adaptarse a otras especies que viven en grupos o

se agrupan para la reproducción, con el objetivo de observar en un contexto más natural los comportamientos asociados al cortejo, apareamiento y posible rechazo a cópula.

## REFERENCIAS

- Barnard C.J.** 2004. *Animal Behaviour: Mechanism, Development, Function and Evolution*. London: Pearson Prentice Hall. 726p.
- Bastock M. & Manning A.** 1955. The courtship of *Drosophila melanogaster*. *Behaviour*. 8: 85-111.
- Berglund A.** 1995. Many mates make male pipefish choosy. *Behaviour*. 131 (3): 213-218.
- Blumstein D. T., Daniel J. C. & Evans C. S.** 2000. JWatcher© v1.0. Dan Blumstein's Lab University of California, Los Angeles & The Animal Behaviour Lab, Macquarie University, Sydney. URL <http://www.jwatcher.ucla.edu/>
- Borges da Silva E.; Branco M.; Mendel Z. & Franco J.C.** 2013. Mating behavior and performance in the two cosmopolitan mealybug species *Planococcus citri* and *Pseudococcus calceolariae* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Journal of Insect Behavior*. 26: 304-320.
- Buxton P. A.** 1930. The biology of a blood-sucking *Rhodnius prolixus*. *Translations of the Entomological Society of London*. 78(2): 227-236.
- Chiang R. G. & Chiang J. A.** 2017. Reproductive physiology in the blood feeding insect, *Rhodnius prolixus*, from copulation to the control of egg production. *Journal of Insect Physiology*. 97: 27-37.
- Davey K. G.** 1967. Some Consequences Of Copulation in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology*. 13: 1629-1636.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W.** InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Khalifa A.** 1950. Spermatophore production and egg-laying behaviour in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Parasitology*. 40(3-4): 283-289.
- Lima M. M., Jurberg P. & de Almeida J. R.** 1986. Behavior of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas' disease. I. Courtship and copulation of *Panstrongylus megistus* (Burm., 1835) in the laboratory. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 81(1): 1-5.
- Manrique G. & Lazzari C. R.** 1994. Sexual Behaviour and Stridulation during Mating in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 89(4): 629-633.

- Martin P. & Bateson P.** 1993. Measuring of behavior: an introductory guide. Cambridge University Press. 222p.
- Pires H. H. R., Lorenzo M. G., Lazzari C. R., Diotaiuti L. & Manrique G.** 2004. The Sexual Behaviour of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): an Experimental Study. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 99(3): 295-300.
- Pratt G. E. & Davey K. G.** 1972a. The corpus allatum and oogenesis in *Rhodnius prolixus* (Stal.) II. The effect of starvation. *Journal of Experimental Biology.* 56: 215-221.
- Pratt G. E. & Davey K. G.** 1972b. The corpus allatum and oogenesis in *Rhodnius prolixus* (Stal.) III. The effect of mating. *Journal of Experimental Biology.* 56: 223-237.
- Pompilio L., González Franco M., Chisari L. B. & Manrique G.** 2016. Female choosiness and mating opportunities in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Behaviour.* 153(15): 1863-1878.
- Rojas J. C., Malo E. A., Gutierrez-Martinez A. & Ondarza R. N.** 1990. Mating Behavior of *Triatoma mazzottii* Usinger (Hemiptera: Reduviidae) Under Laboratory Conditions. *Annals of the Entomological Society of America.* 83(3): 598-602.
- Ruhela A. & Sinha M.** 2010. Recent Trends in Animal Behaviour. Published by Oxford Book Company, Jaipur.
- Spieth, H. T.** 1966. Courtship behavior of Hawaiian Drosophilidae. University of Texas Publication. 6615: 245-313.
- Shelly T. E. & Bailey W. J.** 1992. Experimental manipulation of mate choice by male katydids: the effect of female encounter rate. *Behavioural Ecology Sociobiology.* 30 (3): 277-282.
- Vitta A. C. R. & Lorenzo M. G.** 2009. Copulation and Mate Guarding Behavior in *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medicine Entomology.* 46(4): 789-795.
- Wang Z. & Davey K. G.** 1993. The role of juvenile hormone in vitellogenin production in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology.* 39 (6): 471-476.



***Capítulo 2.***  
**Selectividad sexual en hembras  
y riesgo de oviposición  
de huevos infértiles**

*"The rules of logic and order have already  
made the choice for you."*

*—Isperia*

## Capítulo 2. Selectividad sexual en hembras y riesgo de oviposición de huevos infértiles

### Introducción

A diferencia del macho, las hembras producen una limitada cantidad de gametas y, como consecuencia, son selectivas a la hora de elegir la pareja sexual que fecundará sus huevos. La selectividad de las hembras se evidencia a través del desarrollo de mecanismos ya sea para atraer buenos candidatos y/o rechazar a aquellos de baja calidad. Sin embargo, la decisión de aceptar o rechazar un macho no depende exclusivamente de su calidad, ya que un mismo candidato puede ser aceptado por una hembra y rechazado por otra. Una posible explicación es que existan diferencias en las preferencias de las hembras. Pero la explicación más factible es que lo que varía entre ellas no son sus preferencias sino su grado de selectividad a la hora de decidir aceptar o rechazar una pareja sexual. Estudios previos apoyan justamente esta última hipótesis, mostrando la existencia de variabilidad en el grado de selectividad de las hembras ya sea dentro de una misma población o entre diferentes poblaciones (Kodric-Brown & Nicoletto, 1996).

La variación en el grado de selectividad de las hembras puede ser consecuencia tanto de factores extrínsecos y/o intrínsecos. Como factores extrínsecos se encuentran aspectos ambientales o ecológicos, como ser el riesgo de predación o los cambios estacionales (Hedrick & Dill, 1993; Borg et al., 2006). Como factores intrínsecos se incluyen la carga parasitaria de la hembra (Poulin, 1994; López, 1999; Pfennig & Tinsley, 2002), su experiencia previa (Collins, 1995; Hebets, 2003; Hebets & Vink, 2007) y su estatus reproductivo (Moore & Moore, 2001; Coleman et al., 2004; Uetz & Norton, 2007).

En base a estos antecedentes, el presente Capítulo estudia si el grado de selectividad de las hembras de *R. prolixus* se modifica de acuerdo a los costos que tiene rechazar un macho en distintos momentos del ciclo ovulatorio. En particular, nos preguntamos si las hembras que corren un alto riesgo de oviponer sus huevos infértiles disminuyen su grado de selectividad y, en consecuencia, exhiben en menor proporción comportamientos de rechazo a la cópula.

Como se ha explicado en el Capítulo 1, las hembras de *R. prolixus* exhiben comportamientos de discriminación activa en respuesta a intentos de cópula por parte del macho. Estos comportamientos de rechazo dificultan o previenen el contacto con la *genitalia* y conducen a una disminución significativa en la incidencia de cópula (Pompilio et al., 2016). Asimismo, en un experimento previo realizado por el grupo en *R. prolixus* se ha encontrado una fuerte correlación negativa entre el peso de la hembra y la probabilidad de rechazar al macho (Pompilio et al., 2016). Las hembras con mayor peso prácticamente no exhiben comportamientos de rechazo a la cópula. Dado que las diferencias en el peso no estaban correlacionadas con el grado de alimentación, nos preguntamos si las hembras más pesadas tendrían una mayor cantidad de huevos infértiles retenidos próximos a oviponer. Es sabido que las hembras de *R. prolixus* son capaces de retener huevos viables por determinada cantidad de tiempo que oscila entre 7 y

10 días. Luego de este período los huevos son ovipuestos y/o reabsorbidos independientemente de que haya habido fecundación (Buxton, 1930; Davey, 1967).

En base a estos antecedentes, la hipótesis planteada en este Capítulo es que las hembras modifican su grado de selectividad en función de cambios en los costos de aceptar o rechazar una oportunidad de cópula. Dichos cambios en los costos se manipularán a través de variaciones en el nivel de riesgo de oviposición de huevos infértiles. Para poner a prueba esta hipótesis se estudió primero la dinámica de oviposición de hembras de *R. prolixus*. En base a la información obtenida, se seleccionaron dos grupos de hembras: hembras con alto riesgo de oviponer huevos infértiles y hembras con bajo riesgo de oviponer huevos infértiles. La predicción es que el comportamiento de rechazo de hembras con alto riesgo se reducirá debido al elevado costo que significa perder una oportunidad de apareamiento con la consecuente pérdida de gametas.

## **Materiales y Métodos**

### *Insectos*

Se utilizaron individuos de *R. prolixus* criados y mantenidos en condiciones de laboratorio siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 1 (pág. 15). Previo a su utilización experimental, todos los adultos fueron alimentados siguiendo un régimen determinado que se describirá en próximas secciones (ver más abajo).

### *Estudio previo: ciclo ovulatorio y dinámica de oviposición en hembras de R. prolixus*

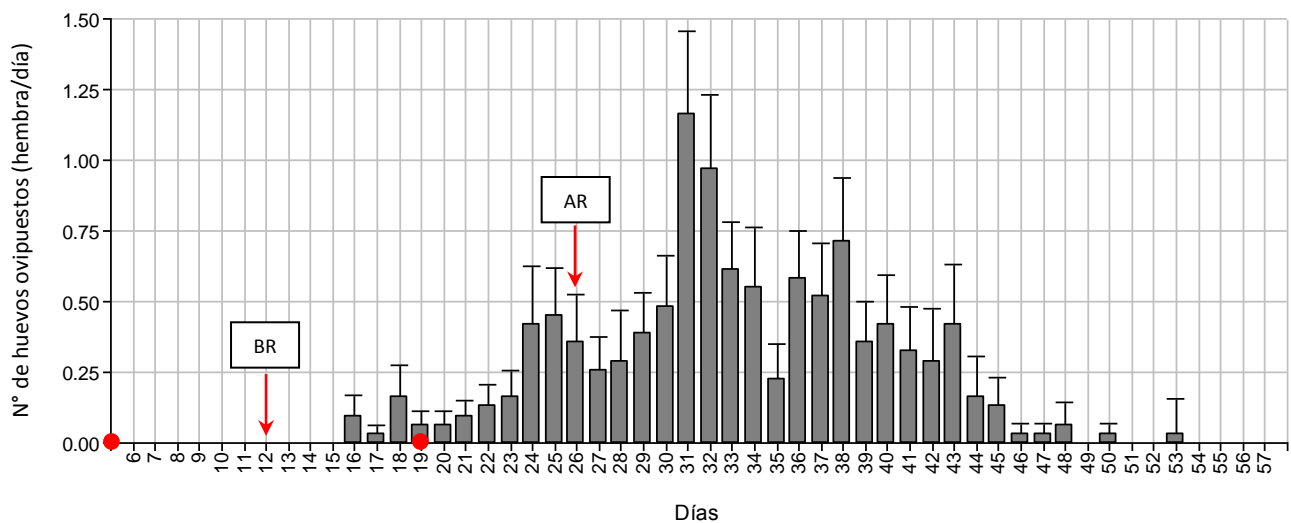
Sobre un total de 35 hembras vírgenes recientemente mudadas, se realizó un estudio de la dinámica de oviposición a lo largo de su primer y segundo ciclo ovárico, con el fin de obtener dos grupos de hembras lo más cercanas en edad posible, que difieran en su cantidad de huevos retenidos. Para ello, todas las hembras fueron alimentadas al quinto día postecdisis, descartando aquellas que no cumplieron con los criterios previamente descritos en el Capítulo 1 (Goodchild, 1955; Friend et al., 1965, pág. 15). Luego de dicha alimentación, las mismas se separaron en dos grupos: hembras con una única alimentación (Grupo 1) y hembras con dos alimentaciones (segunda alimentación a los 19 días postecdisis, Grupo 2).

A partir del sexto día se cuantificó el número de huevos ovipuestos por hembra por día, hasta evidenciarse 4 días consecutivos sin oviposición, alcanzando el ensayo una duración de 60 días. A lo largo del experimento, todos los insectos se mantuvieron individualmente en sus recipientes plásticos de contención y bajo condiciones de laboratorio controladas ( $28 \pm 1$  °C, 30-40% HR, 12:12 hs L/O).

La dinámica observada mostró que las hembras comenzaron a oviponer sus huevos como infértiles a partir del día 16, alcanzando un valor mayor el día 31, y culminando la oviposición el día 54 (Figura 1). A partir de estos resultados, determinamos dos grupos de hembras:

**Hembras de bajo riesgo (BR):** hembras sexualmente maduras de 12 días postecdisis de edad, que no comenzarán a ovipositar sus huevos hasta el día 16. Estas han desarrollado los huevos de su primer ciclo ovárico y pueden retenerlos por más tiempo, es decir, tienen bajo riesgo de ovipositarlos como infértiles.

**Hembras de alto riesgo (AR):** hembras sexualmente maduras de 26 días postecdisis de edad, que ya iniciaron el proceso de oviposición de los huevos pertenecientes al primer ciclo ovárico. Estas poseen huevos desarrollados del primer ciclo ovulatorio que no puede seguir siendo retenidos por más tiempo, ya que la segunda alimentación desencadenó un nuevo ciclo ovulatorio (Friend et al., 1965). Por lo tanto, estas hembras tienen alto riesgo de ovipositar sus huevos como infértiles.



**Figura 1.** Número medio de huevos ovipuestos por hembra/día (Media+DS) a lo largo del primer y segundo ciclo ovárico de hembras vírgenes de *R. prolixus*. Las flechas indican la edad que identifica a los grupos de hembras de bajo riesgo (BR) y alto riesgo (AR). Los círculos rojos señalan la alimentación que dispara el 1er y 2do ciclo ovárico, (5° y 19° día, respectivamente).

### *Riesgo de oviposición y su relación con los comportamientos de rechazo a la cópula*

#### *Dispositivo experimental*

Para estudiar el comportamiento de los insectos se utilizó la misma arena experimental descrita en el Capítulo 1 (ver pág. 15), que consistía en un recipiente acrílico circular, subdividido en tres secciones por medio de dos tabiques transparentes perforados que permitía el paso de claves visuales y olfativas. En la base de dicho dispositivo se colocó un papel de filtro como sustrato, el cuál fue reemplazado por uno nuevo al finalizar cada experimento. La temperatura del cuarto experimental se estableció en  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , y la humedad relativa varió entre 45-60%.

#### *Grupos experimentales*

Cada experimento consistió de dos fases: evaluación previa y *test*. Durante la fase de evaluación, cada hembra fue expuesta simultáneamente a la presencia de un macho focal y a la presencia (P) o

ausencia (A) de contexto social, representado por tres machos extras. Todos los insectos se encontraban contenidos dentro de los compartimientos definidos previamente, separados por los tabiques transparentes perforados removibles. Durante la fase de *test*, la hembra y el macho focal fueron liberados.

De esta forma, dos factores fueron definidos “riesgo de oviposición” y “contexto social”, cada uno con dos niveles: “hembras de alto y bajo riesgo”, y “contexto social presente y ausente”, respectivamente. Los grupos intersexuales se establecieron al azar siguiendo un diseño factorial entre ambos factores, probándose todas las combinaciones posibles y determinando cuatro grupos experimentales: hembras de bajo riesgo en presencia de contexto social (BR-P), hembras de bajo riesgo en ausencia de contexto social (BR-A), hembras de alto riesgo en presencia de contexto social (AR-P) y hembras de alto riesgo en ausencia de contexto social (AR-A).

### *Procedimiento*

Para determinar si existe relación entre el riesgo de oviposición y la ocurrencia de comportamientos de rechazo a la cópula se realizaron 80 ensayos comportamentales (20 para cada grupo experimental), utilizando hembras de alto y bajo riesgo y machos vírgenes, maduros sexualmente y en condiciones de alta disposición para la cópula.

Previo a la utilización de los insectos en los experimentos, los mismos fueron pesados para confirmar su estado nutricional (Mettler AJ100, Mettler Instrument Corporation, Hightstown, New Jersey, USA). Al comienzo de cada ensayo se los introdujo individualmente en cada uno de los compartimientos: tres machos en la sección mayor, y una hembra y un macho focal en las secciones menores. De forma tal de evitar la perturbación mecánica de los individuos, se transportó a los mismos desde sus recipientes de contención hasta el *set* experimental utilizando un trozo de papel de filtro (Manrique et al., 2006).

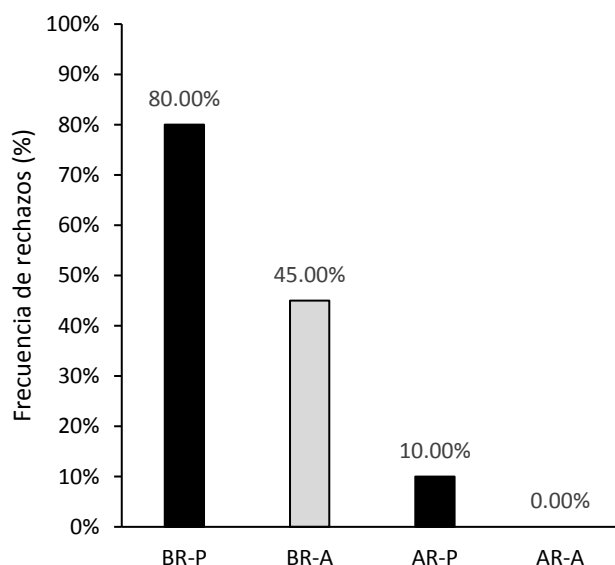
A continuación se permitió a los insectos explorar dentro de sus secciones, familiarizándose con la arena y con los restantes individuos contenidos. Dos minutos después se retiró el tabique menor que separaba los adultos focales, comenzando el registro etológico. Dicho registro se continuó desde el acercamiento de los insectos focales hasta evidenciarse la cópula (contacto de *genitalia*), o en su defecto hasta 60 minutos. Al finalizar cada experimento todos los individuos fueron cuidadosamente retirados de la arena utilizando un trozo de papel de filtro. Cabe destacar que entre cada experimento, se procedió al lavado del *set* (utilizando Alcohol 70%) y a la ventilación del cuarto experimental.

A través de la observación directa y de video-filmaciones se registró el comportamiento de los insectos, cuantificando intentos de monta del macho, ocurrencia de rechazos a la cópula por parte de la hembra, latencia a la monta por parte del macho y latencia a la cópula. Finalmente, se realizó la disección abdominal de todas las hembras para cuantificar la cantidad de huevos retenidos. Todos los experimentos fueron grabados utilizando una cámara web Genius FaceCam 1010 HD (KYE Systems Corp., Taipei, Taiwan), colocada a 35 cm sobre la arena, y bajo una intensidad de luz homogénea de 15 lux, permitiendo al experimentador observar los insectos sin perturbarlos (Pompilio et al., 2016).

### Análisis de datos

Se evaluó la existencia de diferencias en la frecuencia de rechazos a la cópula por parte de la hembra entre los diferentes grupos experimentales, utilizando un modelo de regresión logística en donde las variables explicativas fueron el riesgo de oviposición en la hembra (alto riesgo/bajo riesgo) y el contexto social (presente/ausente), mientras que la variable dependiente fue el comportamiento de rechazo (Si/No). A su vez, para confirmar que hembras de alto y bajo riesgo se encontraban cursando su segundo y primer ciclo ovárico respectivamente, se comparó la cantidad de huevos retenidos de las mismas mediante un ANOVA de dos factores. A continuación, se investigó si la cantidad de huevos retenidos es predictora del peso corporal de las hembras, utilizando un modelo de regresión lineal. Finalmente, para el estudio de la latencia del macho al primer intento de monta y a la cópula, se compararon los distintos grupos experimentales mediante un ANOVA de dos factores. En los casos en que fue requerido, se efectuaron contrastes *a posteriori* a través del *test* de Tukey. Todos los resultados fueron analizados utilizando el paquete estadístico InfoStat® v2016p (Di Rienzo et al., 2016).

### Resultados



**Figura 2.** Porcentaje de rechazo por parte de la hembra de acuerdo al riesgo de oviposición de sus huevos como infértiles (BR/AR), de acuerdo al contexto social (P/A) (N=80).

Al analizar los ensayos realizados, se encontraron diferencias en la frecuencia de comportamientos de rechazos a la cópula entre los distintos tratamientos aplicados (BR-P, BR-A, AR-P y AR-A). Dichos comportamientos de rechazo fueron más frecuentes en hembras de bajo riesgo (BR), tomando valores intermedios en ausencia de contexto social (BR-A, 45%), y volviéndose máximos en presencia del mismo (BR-P, 80%). En hembras de alto riesgo, los comportamientos de rechazo a la cópula fueron mínimos o nulos tanto en presencia como en ausencia de contexto social (>10%) (Fig. 2).

Los resultados de la regresión logística, con las variables explicativas “riesgo de oviposición en la hembra” (AR/BR) y “contexto social” (P/A), y la variable dependiente “comportamiento de rechazo” (Si/No), mostraron que la exhibición de rechazos por parte de la hembra aumentó significativamente cuando el riesgo de oviposición es bajo (BR) ( $p < 0.0001$ ), y cuando el contexto social está presente (P)

( $p=0.0107$ ) (Tabla 1). Dado que la interacción entre los tratamientos no fue significativa ( $p=0.3876$ ), solo se consideraron los efectos principales para analizar el comportamiento de la hembra. Así, la probabilidad de observar rechazos aumentó a 65% en hembras de bajo riesgo (BR), resultado que disminuyó a 4% en hembras de alto riesgo (AR). A su vez, cuando el contexto social estaba presente (P) la probabilidad de rechazar un macho focal aumentó a 39%, mientras que decayó a 10% en ausencia del contexto (A) (Tabla 2, Fig. 3).

|                              | Estimador | Z     | p-valor  |
|------------------------------|-----------|-------|----------|
| <b>Riesgo de oviposición</b> | 3.87      | 4.44  | <0.0001* |
| <b>Contexto social</b>       | -1.75     | -2.55 | 0.0107*  |
| <b>Riesgo*Contexto</b>       | 14.78     | 0.01  | 0.3876   |

**Tabla 1.** Resultados de la regresión logística para la frecuencia de rechazos por la hembra en función del riesgo de oviposición de acuerdo al contexto social (N=80).

| Riesgo de oviposición | Media | E.E. |          |
|-----------------------|-------|------|----------|
| <b>Bajo riesgo</b>    | 0.65  | 0.08 | <b>A</b> |
| <b>Alto riesgo</b>    | 0.04  | 0.03 | <b>B</b> |

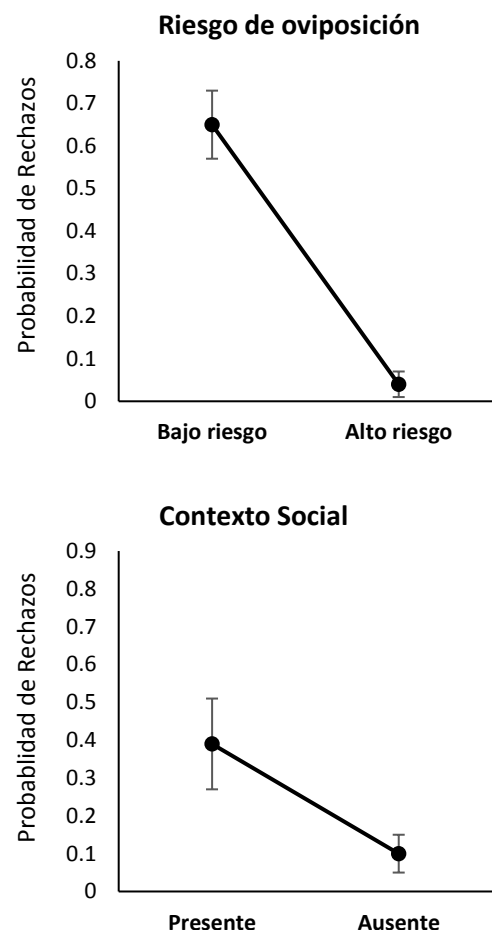
  

| Contexto social | Media | E.E. |          |
|-----------------|-------|------|----------|
| <b>Presente</b> | 0.39  | 0.12 | <b>A</b> |
| <b>Ausente</b>  | 0.10  | 0.05 | <b>B</b> |

**Tabla 2.** Probabilidad de rechazos por la hembra de acuerdo al riesgo de oviposición y al contexto social (efectos principales). EE: Error Estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $p<0.05$ ) (N=80).

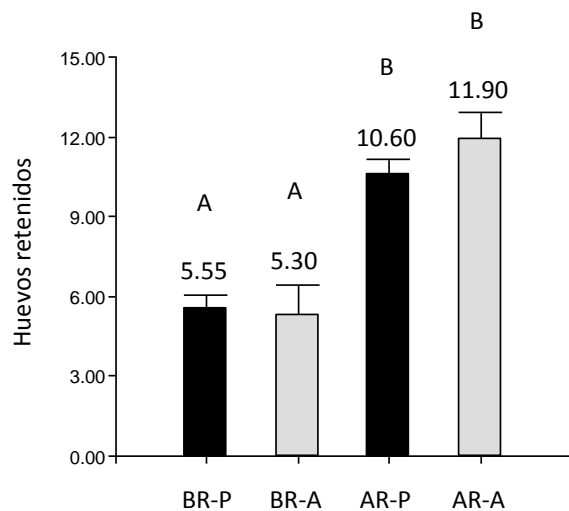
Por otro lado, se observó que la cantidad de huevos retenidos siempre fue mayor en hembras de alto riesgo (AR) (ANOVA:  $F=49.13$ ,  $p<0.0001$ ) (Tukey:  $p<0.05$ , N=80) (Fig. 4 y 5), y que dicha retención se correlacionó negativamente con la frecuencia de rechazos a la cópula (Correlación de Pearson:  $r=-0.34$ , N=80,  $p=0.0023$ ). Cabe destacar, a su vez, que la cantidad de huevos retenidos se correlacionó positivamente con el peso corporal de las hembras (Correlación de Pearson:  $r=0.37$ , N=80,  $p=0.0007$ ; Regresión lineal:  $R^2=0.14$ ,  $F=12.34$ , N=80,  $p=0.0007$ ) (Fig. 6).

Finalmente, considerando la latencia del macho focal al primer intento de monta, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA:  $F=9.13$ ,  $p=0.0034$ ) (Tukey:  $p<0.05$ , N=80), destacándose que los machos se aproximaron en un menor intervalo de tiempo (37.5% menor) a la hembra focal en presencia de contexto social (P), independientemente del riesgo de oviposición que ésta



**Figura 3.** Probabilidad de rechazo a la cópula ( $M\pm EE$ ) de acuerdo al riesgo de oviposición y al contexto social (Presente/Ausente) (N=80).

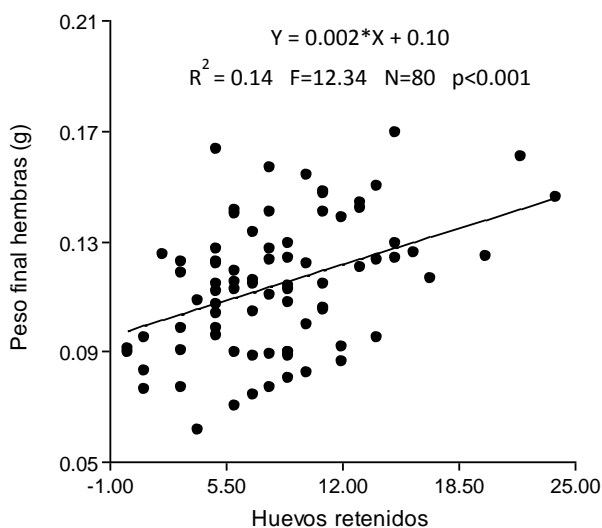
posea (Fig. 7). Al considerar la latencia a la cópula del macho focal, no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos (ANOVA:  $F=1.00$ ,  $N=80$ ,  $p=0.3993$ , BR-P= $276.91\pm 149.16$  seg, BR-A= $292.93\pm 236.08$  seg, AR-P= $198.81\pm 171.98$  seg, AR-A= $264.61\pm 153.51$  seg). Sin embargo, al evaluar la influencia de los comportamientos de rechazo en la latencia a la cópula, se observó que la presencia de dichos comportamientos retarda la ocurrencia de la misma (ANOVA:  $F=7.59$ ,  $N=80$ ,  $p=0.0074$ , Rechazo presente= $345.39\pm 226.56$  seg, Rechazo ausente= $221.41\pm 149.74$  seg) (Tukey:  $p<0.05$ ,  $N=80$ ).



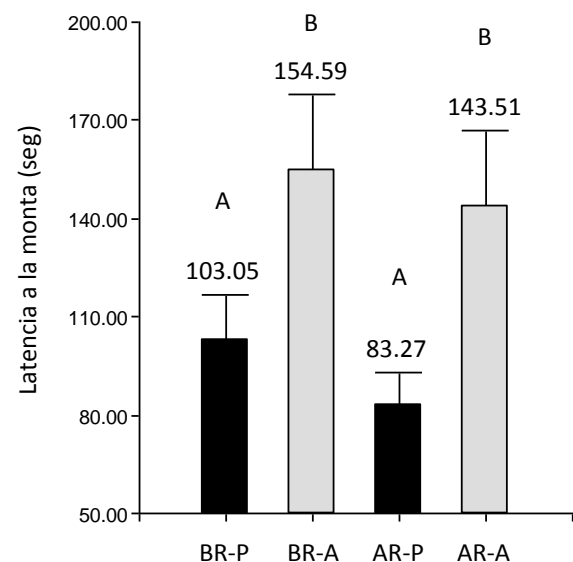
**Figura 4.** Número de huevos retenidos ( $M\pm EE$ ) en hembras de acuerdo al riesgo de oviposición y al contexto social. Letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $N=80$ ).



**Figura 5.** Detalle de huevos retenidos en hembras de *R. prolixus* de acuerdo a su riesgo de oviposición. Derecha: hembra de alto riesgo (AR). Izquierda: hembra de bajo riesgo (BR).



**Figura 6.** Número de huevos retenidos en función del peso corporal en hembras focales ( $N=80$ ).



**Figura 7.** Latencia ( $M\pm EE$ ) del macho a la monta de acuerdo al riesgo de oviposición y al contexto social. Letras distintas representan diferencias significativas entre grupos ( $N=80$ ).



## Discusión

La ocurrencia de comportamientos de rechazo a la cópula en hembras de *R. prolixus* se vio significativamente afectada por ambas variables manipuladas: el contexto social y por el riesgo de oviposición de huevos infértiles de la hembra.

En relación al contexto social, los resultados indican que la presencia de otros machos incrementa significativamente (en aproximadamente un 20%) la frecuencia y probabilidad de ocurrencia de rechazo por parte de la hembra. Ello favorece la hipótesis de que el comportamiento de rechazo es flexible y depende del costo que tenga para la hembra la pérdida de una oportunidad de cópula. En el caso de hembras en escenarios con mayor cantidad de machos potencialmente disponibles, el costo de rechazar al macho focal es claramente menor y ello se vio reflejado en un incremento en su grado de selectividad.

Recientemente, Westerman et al. (2014) estudiaron en el lepidóptero *Bicyclus anynana* el efecto del contexto social en las interacciones macho-hembra, observando y comparando el comportamiento de parejas con el de tríadas conteniendo un macho o una hembra extra. Sorprendentemente, encontraron que en presencia de individuos adicionales tanto machos como hembras copularon menos que cuando la pareja estaba aislada. Al igual que nuestros estudios, este sugiere que la influencia del contexto social es un fenómeno más generalizado y no sólo presente en *R. prolixus*.

En relación al riesgo de oviposición de huevos infértiles, el grupo de hembras con bajo riesgo de perder sus huevos fue extremadamente selectivo, rechazando a los machos con una probabilidad del 65%. Por otro lado, el grupo de hembras con alto riesgo de perder sus huevos como infértiles fue muy poco selectivo, siendo la probabilidad de rechazo del 5%.

No se encontró una interacción significativa entre el contexto social y el riesgo de oviposición de huevos infértiles, con lo cual los efectos de ambas variables simplemente se suman. Los resultados muestran claramente que el efecto más dramático que afecta el grado de selectividad de la hembra es el riesgo de oviposición de huevos infértiles. Con lo cual podemos predecir que ante situaciones en donde ambas variables fluctúen en la naturaleza, la que tendrá mayor peso en el algoritmo de toma de decisión utilizado por la hembra será el riesgo de oviposición de huevos infértiles. A partir de ello podemos inferir que los costos por la pérdida de huevos infértiles son más altos para la hembra que los costos asociados a la falta de otros candidatos al momento de tomar la decisión. Esta inferencia, sumado al hecho de que las hembras de bajo riesgo sin contexto social rechazan al macho con una probabilidad del 45%, sugiere que la ausencia total de otros candidatos creada artificialmente en el laboratorio, si bien representa para las hembras un costo (y ejerce un efecto significativo), la misma no es percibida por las hembras como ausencia permanente a futuro (de lo contrario, no habrían exhibido tal grado de selectividad).

Existen al momento pocos estudios que abordan el tema de la plasticidad fenotípica de la hembra en relación a su estado reproductivo. Cambios en el estado reproductivo han sido evaluados en algunos casos a través de diferencias significativas en la edad de las hembras evaluadas. Se espera que hembras

de mayor edad sean menos selectivas ya que se encuentran más cerca de la muerte o tienen un valor reproductivo residual menor (Real, 1990). Existe evidencia empírica a favor de esta hipótesis. Hembras mayores de edad de grillos (*Acheta domesticus*), por ejemplo, no muestran preferencias significativas por cantos de llamado de machos más atractivos comparadas con las de hembras jóvenes (Gray, 1999). De la misma manera, hembras de *guppies* de mayor edad son menos selectivas que las jóvenes aun cuando han permanecido vírgenes (Kodric-Brown & Nicoletto, 2001). Otra serie de trabajos han estudiado específicamente los efectos de los ciclos ovulatorios sobre las preferencias de las hembras. Lea et al. (2000), por ejemplo, ha mostrado que la fase ovulatoria impacta en la consistencia de las preferencias de las hembras en sapos *midwife*. Sin embargo, para aquellos que viven en Mallorca, en donde la hembra no paga un costo adicional por ser selectiva ya que puede mantener sus huevos por más tiempo en sus oviductos, su grado de selectividad es elevado a lo largo de todo su ciclo ovulatorio.

Los resultados de la disección y conteo de huevos retenidos realizado al finalizar cada ensayo confirmó que, efectivamente, existen diferencias significativas en dicha cantidad entre los grupos de alto y bajo riesgo de oviposición, siendo en el caso de hembras de alto riesgo prácticamente el doble que en el de hembras de bajo riesgo. Por otra parte, se confirma la relación positiva entre el peso y número de huevos retenidos. Estos resultados concuerdan con los datos anteriores mencionados en la Introducción (Pompilio et al., 2016), que fueron los que sugirieron la posible existencia de esta relación.

Los resultados obtenidos en el presente Capítulo tienen una importante relevancia metodológica, ya que existen grandes diferencias entre las decisiones que pueden tomar hembras que se encuentren cursando distintos ciclos ováricos. Como en esta especie es posible desencadenar y controlar a través de la alimentación los ciclos ováricos de las hembras (Friend et al., 1965), consideramos crucial que las hembras evaluadas a futuro en temas ligados a elección de pareja sean de una edad precisa y se encuentren bajo las mismas condiciones de alimentación.

En relación a los machos, los mismos no han evidenciado preferencias por alguno de los tipos de hembras presentados, ya que la latencia a la monta fue similar para ambos grupos (alto y bajo riesgo). Sin embargo esta misma latencia sí es menor en presencia de contexto social, lo que sugiere que ante la presencia de potenciales competidores los machos reaccionan con mayor rapidez, anticipándose al acercamiento de otros machos. En Capítulos siguientes exploraremos si existen variables que indiquen la “calidad” de los machos, y si tanto hembras como machos son sensibles a ellas para utilizarlas a la hora de la elección de pareja sexual.

## REFERENCIAS

**Buxton P. A.** 1930. The biology of a blood-sucking *Rhodnius prolixus*. Translations of the Entomological Society of London. 78(2): 227-236.

- Borg A. A., Forsgren E. & Amundsen T.** 2006. Seasonal change in female choice for male size in the two-spotted goby. *Animal Behaviour*. 72: 763-771.
- Coleman S. W., Patricelli G. L. & Borgia G.** 2004. Variable female preferences drive complex male displays. *Nature*. 428: 742-745.
- Collins S. A.** 1995. The effect of recent experience on female choice in zebra finches. *Animal Behaviour*. 49: 479-486.
- Davey K. G.** 1967. Some Consequences Of Copulation in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology*. 13: 1629-1636.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W.** InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Friend W., Choy C. & Cartwrigth E.** 1965. The effect of nutrient intake on the development and the egg production of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Canadian Journal of Zoology*. 43: 891-904.
- Goodchild A. J. P.** 1955. Some observations on growth and egg production of the blood-sucking Reduviids, *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series A, General Entomology*. 30: 137-144.
- Gray D. A.** 1997. Female House crickets, *Acheta domesticus*, prefer the chirps of large males. *Animal Behaviour*. 54: 1553-1562.
- Hebets E. A.** 2003. Subadult experience influences adult mate choice in an arthropod: exposed female wolf spiders prefer males of a familiar phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100: 13390-13395.
- Hebets E. A. & Vink C.J.** 2007. Experience leads to preference: experienced females prefer brush-legged males in a population of syntopic wolf spiders. *Behavioral Ecology*. 18: 1010-1020.
- Hedrick A. & Dill L. M.** 1993. Mate choice by female crickets is influenced by predation risk. *Animal Behaviour*. 46: 193-196.
- Kodric-Brown A. & Nicoletto P. F.** 1996. Consensus among females in their choice of males in the guppy *Poecilia reticulata*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 39: 395-400.
- Kodric-Brown A. & Nicoletto P. F.** 2001. Age and experience affect female choice in the guppy (*Poecilia reticulata*). *The American Naturalist*. 157(3): 316-23.

- Lea J., Halliday T. & Dyson M.** 2000. Reproductive stage and history affect the phonotactic preferences of male midwife toads, *Alytes muletensis*. *Animal Behaviour*. 60: 423-427.
- López S.** 1999. Parasitized female guppies do not prefer showy males. *Animal Behaviour*. 57: 1129-1134.
- Manrique G., Vitta A. C. R., Ferreira R. A., Zani C. L., Unelius C. R., Lazzari C. R., Diotaiuti L., Lorenzo M. G.** 2006. Chemical communication in Chagas disease vectors. Source, identity and potential function of volátiles released by the metasternal and Brindley's glands of *Triatoma infestans* adults. *Journal of Chemical Ecology* 32: 2035-2052.
- Moore P. J. & Moore A. J.** 2001. Reproductive aging and mating: the ticking of the biological clock in female cockroaches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98: 9171-9176.
- Pfennig K. S. & Tinsley R. C.** 2002. Different mate preferences by parasitized and unparasitized females potentially reduces sexual selection. *Journal of Evolutionary Biology*. 15: 399-406.
- Pompilio L., González Franco M., Chisari L. B. & Manrique G.** 2016. Female choosiness and mating opportunities in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Behaviour*. 153 (15): 1863-1878.
- Poulin R.** 1994. Mate Choice Decisions by Parasitized Female Upland Bullies, *Gobiomorphus breviceps*. *Proceedings of The Royal Society. Series B, Biological Sciences*. 256: 183-187.
- Real L. A.** 1990. Search Theory and Mate Choice. I. Models of Single-Sex Discrimination. *The American Naturalist*. 136(3): 376-405.
- Uetz G. W. & Norton S.** 2007. Preference for male traits in female wolf spiders varies with the choice of available males, female age and reproductive state. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 6: 631-641.
- Westerman E.L., Chirathivat N., Schyling E. & Monteiro A.** 2014. Mate preference for a phenotypically plastic trait is learned, and may facilitate preference-phenotype matching. *Evolution*. 68(6): 1661-1670.

***Capítulo 3.***  
**Selectividad sexual en hembras en  
función de la calidad absoluta  
y relativa de los machos**

*"Life is a series of choices between bad and worse."*

*—Toshiro Umezawa*

### Capítulo 3. Selectividad sexual en hembras en función de la calidad absoluta y relativa de los machos

#### Introducción

Existe un amplio conocimiento sobre los atributos y claves utilizadas por las hembras para evaluar la calidad de los machos. Sin embargo, poco se sabe sobre las reglas de decisión utilizadas por ellas para aceptar o rechazar una pareja sexual, en particular en escenarios donde existen otros potenciales candidatos disponibles. Rechazar a un macho que la corteja puede ser beneficioso para la hembra si existen otras oportunidades de apareamiento, y a su vez si estos varían en su calidad (Bleu et al., 2012). De esta manera, el beneficio de encontrar una pareja sexual de mayor calidad puede superar el costo de rechazar una oportunidad de cópula.

Resultados previos son consistentes con la idea de que las hembras se vuelven más selectivas en escenarios de alta densidad de machos, aumentando su esfuerzo en la búsqueda y evaluación de la pareja. Dicha alta densidad reduce los costos asociados al rechazo (ya que es sencillo para la hembra conseguir otra pareja sexual), mientras que al incrementarse el número de candidatos aumenta también la probabilidad de obtener un macho de mejor calidad. (Berglund, 1995; Shelly & Bailey, 1992).

En relación a la especie elegida en estudio, es conocido que las hembras de *R. prolixus* sólo rechazan a un macho que la corteja cuando están expuestas a estímulos que señalan la presencia de conespecíficos (Pompilio et al., 2016), sugiriendo que la disponibilidad de potenciales parejas es un factor de importancia considerado por las hembras a la hora de tomar sus decisiones de apareamiento. Otro factor crucial que puede incidir en la toma de decisiones es utilizar información actual para estimar la probabilidad de encontrar un macho de mejor calidad. Para alcanzar ese objetivo, las hembras deben ser capaces de evaluar la calidad de potenciales parejas y usarla como una referencia para aceptar o rechazar un macho que la corteja. Aún se desconoce cómo las hembras evalúan diferencias de calidad entre machos. Usualmente se asume que la elección de la hembra está basada en una preferencia absoluta, dónde éstas evalúan asignando un valor fijo independientemente a cada macho que encuentran (Real, 1990; Crowley et al., 1991; Jennions & Petrie, 1997). Sin embargo, algunos estudios sugieren que las hembras pueden realizar una evaluación comparativa de potenciales parejas (Reaney, 2009; Locatello et al., 2015). Actualmente, la influencia de procesos perceptivos y cognitivos en la expresión de las decisiones de apareamiento de la hembra ha sido poco estudiada, y aún hay poco conocimiento sobre las reglas de decisión básicas que las mismas usan cuando seleccionan una pareja (Griggio et al., 2016).

Sobre esta base, se investigó si la decisión de la hembra de aceptar o rechazar una oportunidad de cópula depende exclusivamente de la calidad del macho que la corteja o si ésta es afectada por la calidad de machos potencialmente disponibles. Con tal fin, hembras *naïve* de *R. prolixus* fueron simultáneamente expuestas a un macho focal (disponible) y a un macho *background* (potencialmente disponible). La calidad de los machos fue manipulada a través de cambios en el régimen de alimentación

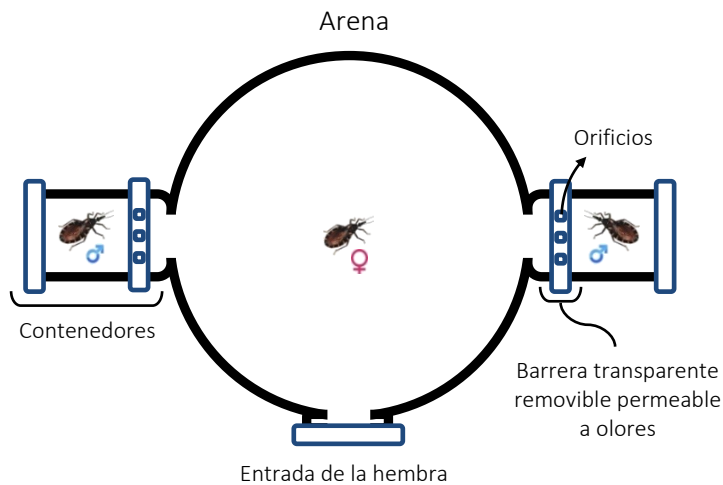
previamente al experimento. Dicha calidad podía ser baja (M-) o alta (M+), poniendo a prueba todas las combinaciones posibles de macho focal y macho *background* (M- vs. M+, M+ vs. M-, M+ vs. M+, y M- vs. M-). Sobre esta base, se analizó si el comportamiento de rechazo de la hembra depende de la calidad absoluta y/o relativa del macho que la corteja. Una posibilidad (Evaluación absoluta) es que la hembra compare al macho que la corteja contra un modelo de referencia (“*template*”) innato y tome una decisión basada en el grado de similitud entre el macho que la corteja y el modelo de referencia. Si ello fuera así, la decisión de las hembras no debería verse afectada por la calidad del macho *background*. Otra posibilidad (Evaluación relativa) es que no exista ningún modelo de referencia innato con el que las hembras comparen al macho. La decisión de aceptar o rechazar a quien la corteja dependería, en este caso, de la comparación entre la calidad del macho focal vs. la del macho *background*. La ausencia de un modelo de referencia innato predice que las hembras reaccionarían similarmente frente a los machos focales M+ y M- cuando estén en presencia de machos *background* M+ y M-, respectivamente. Finalmente, se considera la posibilidad de que en las hembras exista un modelo de referencia innato, pero que el mismo se ajuste en base a la propia experiencia (Evaluación absoluta + relativa). De esta manera, la decisión de las hembras de aceptar o rechazar a quien la corteja debería estar afectada tanto por la calidad del macho focal como por la calidad del macho *background*.

Como hipótesis se propone que el comportamiento de rechazo evolucionó como un rasgo flexible maximizando en las hembras su *fitness* al considerar la relación costo/oportunidad a la hora de decidir aceptar o rechazar una oportunidad de apareamiento.

## **Materiales y Métodos**

### *Insectos*

Se utilizaron individuos de *R. prolixus* criados y mantenidos en condiciones de laboratorio siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 1 (pág. 15). Previo a su utilización experimental, todos los adultos fueron alimentados siguiendo un régimen determinado. La calidad del macho fue manipulada mediante cambios en el estado nutricional. Los machos de alta calidad (M+) utilizados fueron machos de 35 días de edad, alimentados semanalmente 4 veces postecdisis y que tuvieron un ayuno de 7 días previo a los experimentos. Los machos de baja calidad utilizados (M-) fueron machos de 35 días de edad, alimentados una única vez al 5to día postecdisis y ayunados 28 días previamente a los experimentos. Las hembras utilizadas pertenecieron al grupo de *bajo riesgo* (BR) descrito en el Capítulo 2 (pág. 27), caracterizadas por tener 12 días de edad y un ayuno de 7 días previo a los experimentos. Bajo todas estas condiciones los insectos estuvieron aptos para la cópula.



**Figura 1.** Diagrama del *set up* experimental. Los insectos fueron puestos a prueba en una arena circular con dos contenedores adosados, separados por una barrera transparente y permeable a olores. La arena experimental permitió medir las interacciones comportamentales entre macho y hembra.

### *Dispositivo experimental*

El comportamiento de los insectos fue puesto a prueba utilizando una arena experimental consistente en un recipiente acrílico circular de 5.0 cm alto y 15.0 cm diámetro, que tenía a su vez dos frascos contenedores de acrílico de 5.0 cm alto y 3.0 cm diámetro fijados en lados opuestos de la caja por una de sus bases (Fig. 1). Así, tres compartimientos fueron definidos. La base interna de cada frasco contenedor tenía una partición removible transparente con orificios

que permitían el paso de claves visuales y la difusión de olores. A su vez, el recipiente era cubierto por una tapa removible luego de liberar a los insectos. Un papel de filtro sobre la base de la arena fue utilizado como substrato para evitar la posible contaminación química entre ensayos. El mismo era cambiado cada vez que nuevos insectos eran liberados en la arena. La temperatura del cuarto experimental se estableció previo a cada ensayo en  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , mientras que la humedad relativa varió entre 45-60%.

### *Grupos experimentales*

El experimento consistió en tres fases: evaluación, elección secuencial y elección simultánea. Durante la fase de evaluación, las hembras fueron simultáneamente expuestas a dos machos separados de la hembra por la barrera transparente de cada frasco contenedor, con numerosos orificios que permitían la observación y percepción de olores de los machos. Durante la elección secuencial, uno de los machos (de aquí en más, macho focal) fue liberado, mientras que el otro macho (de aquí en más, macho *background*) permaneció en su frasco contenedor. Finalmente, en la fase de elección simultánea el macho *background* también fue liberado.

De esta manera, dos tratamientos fueron definidos “macho focal” y “macho *background*”, en los que dos posibles calidades (M-/M+) fueron asignadas a cada tratamiento. Así, los grupos intersexuales fueron definidos al azar siguiendo un diseño factorial - macho focal (M-/M+) y macho *background* (M-/M+) -, poniendo a prueba todas las combinaciones posibles y determinando cuatro grupos experimentales: M- vs. M-, M+ vs. M+, M- vs. M+ y M+ vs. M-.



### *Procedimiento*

Previo a los experimentos los insectos fueron pesados para confirmar su estado nutricional (Mettler AJ100, Mettler Instrument Corporation, Hightstown, New Jersey, USA). Al comienzo de cada ensayo, los mismos fueron individualmente liberados en la arena, siendo los dos compartimientos menores asignados al azar al macho focal o al macho *background* y el compartimiento mayor asignado a la hembra. Esta última fue liberada en primer lugar, el macho focal en segundo y el macho *background* en tercer lugar. Para evitar la perturbación mecánica que pueda disparar la descarga de las glándulas de Brindley y metasternales al liberar los insectos, a cada individuo se le permitió subir a un pequeño trozo de papel de filtro que luego fue colocado en cada compartimiento, dejando que los mismos descendieran libremente (Manrique et al., 2006).

Luego de su liberación, la hembra podía explorar la arena libremente por 5 minutos, incluyendo el área inmediatamente adyacente a la base interna de los compartimientos que contenía a cada macho. Posteriormente, una de las barreras menores era removida permitiendo la interacción entre la hembra y el macho focal. Una vez observado el primer intento de copula y el consecuente comportamiento de aceptación/rechazo por la hembra, el macho *background* fue liberado. El comportamiento de interacción de la hembra/macho fue monitoreado y registrado (ver Pompilio et al., 2016) desde el comienzo de la fase de evaluación hasta la ocurrencia de la primera cópula en la fase de evaluación simultánea.

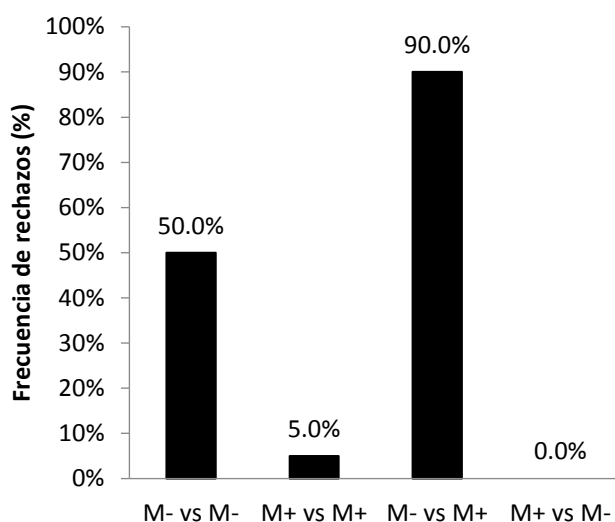
A través de la observación directa y de video-filmaciones se cuantificó el comportamiento de los insectos, registrando intentos de monta del macho focal, ocurrencia de rechazos a la cópula por parte de la hembra, latencia al primer intento de monta por parte del macho focal, latencia a la cópula, y duración de la cópula. Todos los experimentos fueron grabados utilizando una cámara web Genius FaceCam 1010 HD (KYE Systems Corp., Taipei, Taiwan), colocada a 35 cm sobre la arena, y bajo una intensidad de luz homogénea de 15 lux, permitiendo al experimentador observar los insectos sin perturbarlos (Pompilio et al., 2016). Luego de cada ensayo, los insectos fueron cuidadosamente removidos de la arena mediante un trozo de papel de filtro para evitar su perturbación.

### *Análisis de datos*

La preferencia de la hembra por un macho de cierto estado nutricional (macho focal) contrastado con otro macho disponible que funciona como *background* fue analizado usando un modelo de regresión logística, en la que las variables explicativas fueron “macho focal (M-/M+)” y “macho *background* (M-/M+)” y la variable dependiente fue “comportamiento de rechazo (Si/No)”. La elección de la hembra para copular con un macho de acuerdo a los tratamientos (focal/*background*) fue analizada mediante una prueba de  $\chi^2$  aplicando la corrección de Bonferroni. Se analizó también las latencias al primer intento de monta y cópula entre tratamientos a través de un ANOVA de 2 factores. En los casos en que fue requerido, se efectuaron contrastes *a posteriori* a través del *test* de Tukey. Las diferencias de pesos entre machos de distinto estado nutricional (M+ y M-) fue confirmada (ANOVA:  $F = 5.25$ ,  $p < 0.0001$ ,  $N = 80$ ;

$M+=0.088\pm 0.001$  g,  $M-=0.057\pm 0.001$  g, Media $\pm$ EE), siendo el peso de M+ 35.06% mayor que el de M-. Todos los resultados fueron analizados utilizando el paquete estadístico InfoStat® v2016p (Di Rienzo et al., 2016).

## Resultados



**Figura 2.** Porcentaje de rechazo por parte de la hembra de acuerdo a la calidad (M-/M+) del macho focal (liberado en primer lugar) vs. la calidad del macho background (liberado en segundo lugar). (N=80).

Al analizar los ensayos realizados, se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de los comportamientos de rechazo de la hembra entre los tratamientos (macho focal y macho *background*) (Fig. 2). Dichos comportamientos alcanzaron un máximo (90%) cuando el macho focal fue de baja calidad y el macho *background* fue de alta calidad (M- vs. M+). Por otra parte, el 50% de las hembras exhibió comportamientos de rechazo cuando ambos, tanto el macho focal como el *background*, fueron de baja calidad (M- vs. M-). Finalmente, en los casos en que el macho focal fue de alta calidad el

comportamiento de rechazo de la hembra fue mínimo o nulo (M+ vs. M+ y M+ vs. M) (Fig. 2).

Los resultados de la regresión logística, con tratamientos “macho focal” (M+/M-) y “macho *background*” (M+/M-) como variable explicativa, y “comportamiento de rechazo” (Si/No) como variable dependiente, mostraron que el comportamiento de rechazo exhibido por las hembras aumentó significativamente cuando la calidad del macho focal fue baja (M-) ( $p<0.0001$ ), y cuando la calidad del macho *background* fue alta (M+) ( $p<0.0022$ ) (Tabla 1). Dado que la interacción entre los tratamientos fue no significativa ( $p>0.6449$ ), sólo los efectos principales fueron considerados para analizar el comportamiento de rechazo de la hembra. Así, la probabilidad de que la hembra exhiba rechazos se incrementó a 75% cuando el macho focal fue de baja calidad (M-), resultado que disminuyó a 1% cuando el macho focal fue de alta calidad (M+). Por otro lado, cuando el macho *background* es de alta calidad (M+) la probabilidad de rechazar al macho focal se incrementó a 40%, mientras que la probabilidad de rechazo disminuyó a 6% cuando el macho *background* fue de baja calidad (M-) (Tabla 2, Fig. 3).

Para analizar si la selectividad de la hembra fue afectada por el orden en que los machos fueron presentados, se comparó el número de machos que copularon en escenarios donde ambos tuvieron la misma calidad (M- vs. M- y M+ vs. M+). En ambas situaciones la hembra eligió aparearse con el primer

macho (i.e, el macho focal) ( $\chi^2$ :  $H=0.92$ ,  $p=0.3363$ ) (Fig. 4). Sin embargo, cuando se compararon escenarios en los que la calidad del macho varió, dos situaciones ocurrieron. Las hembras siempre eligieron copular con el de alta calidad cuando el segundo macho liberado tenía baja calidad (M+ vs. M-). Sin embargo, la hembra rechazó significativamente en el 45% de los casos al macho presentado en primer lugar (focal) cuando uno de alta calidad fue presentado en segundo lugar (*background*), copulando finalmente con este último (M- vs. M+) ( $\chi^2$ :  $H=11.61$ ,  $p=0.0007$ ) (Fig. 4).

|                         | Estimador | Z     | p-valor  |
|-------------------------|-----------|-------|----------|
| <b>Macho Focal</b>      | -19.59    | -4.46 | <0.0001* |
| <b>Macho Background</b> | 2.20      | 2.66  | 0.0022*  |
| <b>Focal*Background</b> | 14.42     | 0.01  | 0.6449   |

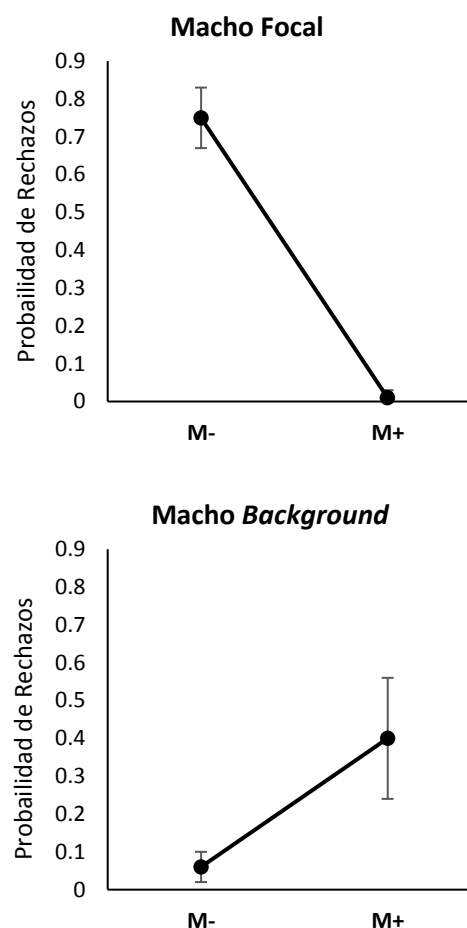
**Tabla 1.** Resultados de la regresión logística para la frecuencia de rechazos por la hembra en función de la calidad del macho focal y macho background. \* indican diferencias significativas (N=80).

| Macho Focal | Probabilidad | E.E. |          |
|-------------|--------------|------|----------|
| M-          | 0.75         | 0.08 | <b>A</b> |
| M+          | 0.01         | 0.02 | <b>B</b> |

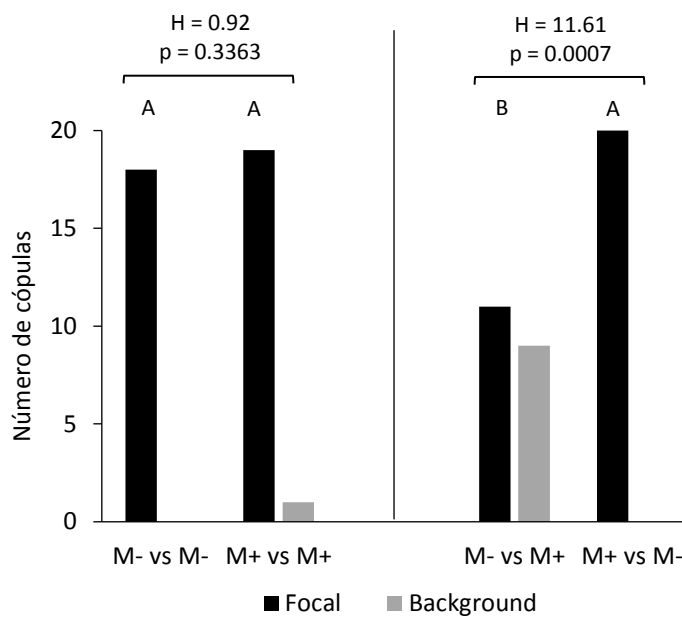
| Macho Background | Probabilidad | E.E. |          |
|------------------|--------------|------|----------|
| M-               | 0.06         | 0.04 | <b>A</b> |
| M+               | 0.40         | 0.16 | <b>B</b> |

**Tabla 2.** Probabilidad de rechazo por la hembra de acuerdo a la calidad del macho focal y del macho *background* (efectos principales). EE: Error Estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $p<0.05$ ) (N=80).



**Figura 3.** Probabilidad de rechazos a la cópula ( $M \pm EE$ ) de acuerdo al estado nutricional del macho focal, y del macho *background* (N=80).

Adicionalmente, no se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos experimentales para la latencia a la primera monta (ANOVA:  $F=0.20$ ,  $p=0.8933$ ,  $N=80$ , M-/M- =  $245.73 \pm 37.33$  seg, M+/M+ =  $207.08 \pm 35.73$  seg., M-/M+ =  $220.61 \pm 35.93$  seg., M+/M- =  $229.76 \pm 34.68$  seg., Media  $\pm$  EE). Sin embargo, la latencia a la cópula fue marginalmente mayor cuando el macho focal fue de baja calidad (M-) y el macho *background* fue de alta calidad (M+) (ANOVA:  $F=2.60$ ,  $p=0.0581$ ,  $N=80$ ; M-/M- =  $359.83 \pm 39.97$  seg., M+/M+ =  $357.80 \pm 58.04$  seg., M-/M+ =  $512.01 \pm 65.74$  seg., M+/M- =  $312.36 \pm 39.61$  seg., Media  $\pm$  EE) (Tukey:  $p<0.05$ ,  $N=80$ ).



**Figura 4.** Número de cópulas del macho focal y macho *background* para todas las posibles combinaciones de calidad (M- vs. M-, M+ vs. M+, M- vs. M+ y M+ vs. M-). Letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos (N = 80).

## Discusión

Los resultados muestran que las hembras de *R. prolixus* fueron sensibles a las diferencias en el estado nutricional de los machos, prefiriendo a aquellos mejor alimentados. Dicha variable podría considerarse entonces como un estimador de calidad desde el punto de vista de las hembras. El hecho de que éstas sean capaces de reconocer el estado nutricional de los machos (aun cuando algunos se encontraron físicamente inaccesibles durante la fase de evaluación y elección secuencial) es compatible con la

observación de que durante la fase de evaluación todas las hembras exploraron, acercándose y permaneciendo un tiempo junto a cada una de las barreras que contenían tanto al macho focal como al macho *background*.

Durante la fase de elección secuencial, que consistió en la liberación del macho focal, la probabilidad de aceptarlo o rechazarlo dependió no sólo de su calidad sino también de la calidad del macho *background*. Los resultados de la fase de elección simultánea mostraron que, en la mayoría de los casos, las hembras copularon con el macho liberado en primer lugar (el macho focal) excepto en la situación en que el copular con el segundo macho fue más ventajoso (i.e. cuando el macho *background* tenía una mejor calidad que el macho focal).

La evidencia obtenida apoya la hipótesis de que las hembras ajustan sus decisiones de apareamiento en base a la calidad de la pareja que la corteja, teniendo también en cuenta la calidad de las otras potenciales parejas. Este resultado es compatible con la idea que las hembras comparan a cada macho que las corteja con un marco de referencia innato ("*template*") y que el umbral de aceptación/rechazo se ajusta en base a la calidad de los restantes machos potencialmente disponibles. Las hembras utilizadas en el experimento eran *naïve*, ya que fueron separadas en recipientes individuales durante toda su vida adulta, con lo cual no poseían experiencia previa que les permitiera comparar entre machos al momento del experimento. Aun así, fueron capaces de diferenciar machos de alta y baja calidad, dado que se comportaron diferencialmente cuando fueron expuestos a escenarios M- vs. M- y M+ vs. M+, sugiriendo la existencia de un "*template*" innato. Dicho "*template*" permitiría a las hembras reconocer la calidad del macho en forma absoluta. Sin embargo, el comportamiento de rechazo de la

hembra se ajustó de acuerdo a la calidad de las parejas potenciales, ya que el umbral de aceptación/rechazo fue flexible. Esta flexibilidad en el grado de selectividad de la hembra le permite optimizar sus decisiones de apareamiento y tiene implicancias directas en la evolución dado que las condiciones que causan que las hembras se apareen de forma menos o más discriminativa puede afectar la fuerza de la selección sexual y, como consecuencia, la tasa de dispersión de rasgos masculinos preferidos (Poulin & Vickery, 1996; Kudo & Karino, 2012).

Resultados previos apoyan también, aunque de manera indirecta, la idea de que a mayor disponibilidad de parejas las hembras se vuelven más selectivas en sus decisiones de apareamiento (Berglund et al., 2005; Willis et al., 2011; Atwell & Wagner, 2014). Hembras jóvenes de grillos (*Gryllus lineaticeps*), por ejemplo, permanecen más tiempo cerca de ambientes con mayor densidad de machos emitiendo sonidos (canto de apareamiento) (Atwell & Wagner, 2014). En la misma línea, hembras de ranas (*Hyla cinerea*) aumentan sus comportamientos de evaluación y selección cuando están expuestas a *playbacks* que señalan la presencia de machos atractivos (Neelon & Höbel, 2017). Estos resultados muestran que las hembras reaccionan positivamente tanto a los escenarios con altas densidades de machos como a la presencia de machos de mayor calidad, incrementando sus esfuerzos de apareamiento.

Las hembras pueden usar un número de señales fidedignas con el fin de seleccionar la mejor pareja disponible. Los machos candidatos despliegan sus atributos mediante la exhibición de claves honestas como ser tamaño corporal, cantos o coloración (Zahavi, 1975; Andersson, 1994). Aunque trabajos previos han provisto ideas sobre los factores que afectan las preferencias de apareamiento de la hembra, es menos conocido cómo los fenotipos dependientes de la nutrición influyen su elección de pareja en insectos (Xie et al., 2015). Hasta donde sabemos, esta es la primera evidencia en triatomíneos que muestra una preferencia de la hembra por un macho de mejor condición nutricional. Dicho estado del macho podría ser tanto un indicador honesto de su calidad - alcanzar una buena condición nutricional en la naturaleza no es sencillo dada la escasez de recursos y que los individuos compiten por ellos -, como un predictor significativo de su calidad - un estado nutricional pobre puede estar relacionado con una baja calidad y/o cantidad de esperma (Aluja et al., 2009; Fricke et al., 2008; Kahrl & Cox, 2015) -.

Cabe destacar que tanto los machos de baja como de alta calidad utilizados en nuestro experimento fueron capaces de copular y producir un espermatozoido viable (Khalifa, 1950). Evidencias previas en *R. prolixus* mostraron que son capaces de copular luego de aproximadamente 60 días de privación de alimento (Khalifa, 1950), mientras que nuestros sujetos experimentales fueron privados por solo 28 días previos al inicio de los ensayos. De esta manera, el rechazo de la hembra a machos de baja calidad no puede ser explicado por su imposibilidad de aparearse. En el Capítulo 4 se evaluarán los efectos de la privación de alimento, como la aquí utilizada, sobre la cantidad de esperma producido y transferido a la hembra.

Aunque la condición nutricional como indicador de la calidad del macho no ha sido frecuentemente explorada, algunos pocos estudios obtuvieron resultados similares. Hembras de tilapia

del Nilo (*Oreochromis niloticus*), por ejemplo, prefieren claves químicas de machos que estuvieron bien alimentados con una dieta rica en proteínas sobre aquellos que fueron alimentados con una dieta baja en proteínas. Estas hembras no sólo discriminaron entre machos sino que también mostraron una preferencia por aquellos bien alimentados, discriminando entre olores relacionados con el estado nutricional, sugiriendo que respondían a una clave química específica de alimento (Cardoso Giaquinto et al., 2010). Es por lo tanto probable que la condición nutricional esté relacionada con la producción de feromonas en machos. En insectos, Xie et al. (2015) encontraron que hembras del coccinélido *Cryptolaemus montrouzieri* prefirieron aparearse con machos criados con dietas altamente nutritivas, independientemente de las condiciones alimenticias a las que fueron sometidos durante sus propias etapas larvales, indicando que la elección de pareja de estas hembras es no azarosa y dependiente del fenotipo.

La selección favorece a aquellas hembras sensibles a señales honestas relacionadas con la calidad genética del macho. Bajo esta fuerte presión selectiva, las hembras han desarrollado un amplio rango de claves de distinta modalidad sensorial, incluyendo visuales, olfativas, auditivas y táctiles, entre otras (Mérot et al., 2015). Por esta razón, gran parte de las señales de apareamiento que emiten los machos son de tipo multimodal, pudiendo ser dificultosa la separación de la contribución relativa de cada componente (visual, químico y/o auditivo) relacionado en el reconocimiento sexual. La elección de pareja basada en la condición nutricional del macho depende generalmente de claves visuales (tamaño del cuerpo o de la *genitalia*) y/o claves químicas (feromonas). En el apareamiento de triatominos son las claves químicas las que se encuentran fuertemente involucradas. En *Triatoma infestans* y *R. prolixus*, por ejemplo, han sido descritas feromonas asociadas con la agregación de machos en el contexto sexual. Sin embargo, las hembras han mostrado ser indiferentes a los volátiles liberados (Lazzari & Manrique, 1995; Crespo & Manrique, 2007; Pontes & Lorenzo, 2012). La razón puede deberse al hecho de que las hembras simplemente no se agregan, pero podrían ser capaces de detectar y considerar claves olfativas y/o visuales a fin de tomar una decisión en la elección de pareja.

## REFERENCIAS

- Aluja M., Rull J. Sivinski J. Trujillo G. & Pérez-Staples D.** 2009. Male and female condition influence mating performance and sexual receptivity in two tropical fruit flies (Diptera: Tephritidae) with contrasting life histories. *Journal of Insect Physiology*. 55(12): 1091-1098.
- Andersson M. B.** 1994. *Sexual selection*. New Jersey. UK: Princeton University Press.
- Atwell A. & Wagner W. E.** 2014. Female mate choice plasticity is affected by the interaction between male density and female age in a field cricket. *Animal Behaviour*. 98: 177-183.

- Berglund A.** 1995. Many mates make male pipefish choosy. *Behaviour*. 131(3): 213-218.
- Berglund A., Widemo M. S. & Rosenqvist G.** 2005. Sex-role reversal revisited: choosy females and ornamented, competitive males in a pipefish. *Behavioral Ecology*. 16(3): 649-655.
- Bleu J., Bessa-Gomes C. & Laloia D.** 2012. Evolution of female choosiness and mating frequency: effects of mating cost, density and sex ratio. *Animal Behaviour*. 83: 131-136.
- Cardoso Giaquinto P., da Silva Berbert C. M. & Delicio H. C.** 2010. Female preferences based on male nutritional chemical traits. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 64(6): 1029-1035.
- Crespo J. G. & Manrique G.** 2007. Mating behavior of the haematophagous bug *Triatoma infestans*: Role of Brindley's and metasternal glands. *Journal of Insect Physiology*. 53: 708-714.
- Crowley P. H., Travers S. E., Linton M. C, Cohn S. L., Sih A. & Craig Sargent R.** 1991. Mate density, predation risk, and the seasonal sequence of mate choices: A dynamic game. *The American Naturalist* 137(4): 567-596.
- Fricke C., Bretman A. & Chapman T.** 2008. Adult male nutrition and reproductive success in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*. 62(12): 3170-3177.
- Friend W., Choy C. & Cartwright E.** 1965. The effect of nutrient intake on the development and the egg production of *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *Canadian Journal of Zoology*. 43: 891-904.
- Goodchild A. J. P.** 1955. Some observations on growth and egg production of the blood-sucking Reduviids, *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. *Physiological Entomology*. 30: 137-144.
- Griggio M., Hoi H., Lukasch B. & Pilastro A.** 2016. Context-dependent female preference for multiple ornaments in the bearded reedling. *Ecology and Evolution*. 6: 493-501.
- Jennions M. D. & Petrie M.** 1997. Variation in mate choice and mating preferences: a review of causes and consequences. *Biological Reviews*. 72(2): 283-327.
- Kahrl A. F. & Cox R. M.** 2015. Diet affects ejaculate traits in a lizard with condition-dependent fertilization success. *Behavioral Ecology*. 26(6): 1502-1511.
- Khalifa A.** 1950. Spermatophore production and egg-laying behaviour in *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera; Reduviidae). *Parasitology*. 40(3-4): 283-289.
- Kudo H. & Karino K.** 2012. Short-term change in male sexually selected traits and female mate preference in the guppy *Poecilia reticulata*. *Ichthyological Research*. 59(1): 1-7.

- Lazzari C. R.** 1992. Circadian organization of locomotion activity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *Journal of Insect Physiology*. 38: 895-903.
- Locatello L., Poli F. & Rasotto M. B.** 2015. Context-dependent evaluation of prospective mates in a fish. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 69(7): 1119-1126.
- Manrique G. & Lazzari C. R.** 1994. Sexual behaviour and stridulation during mating in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 89: 629-633.
- Manrique G. & Lazzari C. R.** 1995. Existence of a sex pheromone in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae): I Behavioural evidences. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 90(5): 645-648.
- Manrique G., Vitta A. C. R., Ferreira R. A., Zani C. L., Unelius C. R., Lazzari C. R., Diotaiuti L. & Lorenzo M. G.** 2006. Chemical communication in Chagas disease vectors. Source, identity and potential function of volatiles released by the metasternal and Brindley's glands of *Triatoma infestans* adults. *Journal of Chemical Ecology*. 32: 2035-2052.
- Mérot C., Frérot B., Leppik E. & Joron M.** 2015. Beyond magic traits: Multimodal mating cues in *Heliconius* butterflies. *Evolution*. 69(11): 2891-904.
- Neelon D. P. & Höbel G.** 2017. Social plasticity in choosiness in green tree frogs, *Hyla cinerea*. *Behavioral Ecology*. 28(6): 1540-1546.
- Pires H. H. R., Lorenzo M. G., Lazzari C. R., Diotaiuti L. & Manrique G.** 2004. The sexual behaviour of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): an experimental study. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 99: 295-300.
- Pompilio L., González Franco M., Chisari L. B. & Manrique G.** 2016. Female choosiness and mating opportunities in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Behaviour*. 153(15): 1863-1878.
- Pontes G. B. & Lorenzo M. G.** 2012. Female metasternal gland odours mediate male aggregation in *Rhodnius prolixus*, a triatomid bug. *Medical and Veterinary Entomology*. 26(1): 33-36.
- Poulin R. & Vickery W. L.** 1996. Parasite-mediated sexual selection: just how choosy are parasitized females? *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 38:43-49.
- Real L.** 1990. Search theory and mate choice. I. Models of single-sex discrimination. *The American Naturalist*. 136(3): 376-405.
- Reaney T.** 2009. Female preference for male phenotypic traits in a fiddler crab: do females use absolute or comparative evaluation? *Animal Behaviour*. 7(1): 139-143.



- Roces F. & Manrique G.** 1996. Different stridulatory vibrations during sexual behaviour and disturbance in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Insect Physiology*. 42(3): 231-238.
- Shelly T. E. & Bailey W. J.** 1992. Experimental manipulation of mate choice by male katydids: the effect of female encounter rate. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 30(3): 277-282.
- Vitta A. C. R. & Lorenzo M. G.** 2009. Copulation and mate guarding behavior in *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*. 46(4): 789-795.
- Willis P. M., Ryan M. J. & Rosenthal G. G.** 2011. Encounter rates with conspecific males influence female mate choice in a naturally hybridizing fish. *Behavioral Ecology*. 22(6): 1234-1240.
- Xie J., De Clercq P., Zhang Y., Wu H., Pan C. & Pangb H.** 2015. Nutrition-dependent phenotypes affect sexual selection in a ladybird. *Scientific Reports*. 7(2): 159-170.
- Zahavi A.** 1975. Mate selection-a selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology*. 53(1): 205-214.

**Capítulo 4.**  
**Inversión espermática y éxito  
reproductivo en función de la calidad de  
los individuos y del contexto social**

*"I do as I choose with what is mine. And it is all mine."*

—*Nicol Bolas*

## Capítulo 4. Inversión espermática y éxito reproductivo en función de la calidad de los individuos y del contexto social

### Introducción

En los Capítulos previos exploramos algunos de los factores considerados por las hembras de *R. prolixus* en su elección de pareja sexual. Sobre estos, podemos destacar que al momento de evaluar a los machos disponibles, se encontró que el estado nutricional de los mismos resulta una variable clave para la hembra, dado que la utiliza como un indicador de calidad seleccionando a los machos en mejores condiciones nutricionales. Dado que el alimento es un componente esencial para la supervivencia, crecimiento y reproducción de los organismos (Boggs, 2009), una posible explicación de esta preferencia, podría estar asociada a una mayor capacidad para competir por recursos escasos en machos mejor alimentados. Dicha capacidad podría traer beneficios inmediatos para el caso de especies que realizan inversión parental, o beneficios posteriores a través de rasgos heredados a la descendencia (Andersson, 1994). Así, la reproducción sería una variable fuertemente condicionada por la disponibilidad y calidad del alimento. Aunque usualmente machos y hembras difieren en su interés reproductivo (Andersson, 1994), ambos sexos dependen de la disponibilidad de este recurso para poder reproducirse (Boggs, 1992; Hodin, 2009).

Desde el punto de vista del macho, se sabe que su calidad genética es una variable considerada por las hembras a la hora de seleccionarlo como pareja sexual. Dicha variable se traduce generalmente en la expresión de caracteres sexuales secundarios en los machos, que dependen a su vez de la condición en la que se encuentren (Kaldun & Otti, 2016). En este sentido, se asume que los machos en buena condición expresan su calidad a través de caracteres sexuales más marcados y/o a través de comportamientos de cortejo más enérgicos. En cambio, los machos de baja condición no serían capaces de afrontar los costos asociados a la amplificación de estos caracteres y/o comportamientos (Cotton et al. 2004). Al considerar caracteres sexuales primarios como la producción de espermatozoides, es menos conocido si éstos dependen también de la condición de los machos. Relacionado a esto, se demostró en el coccinélido *Adalia bipunctata* que el tamaño y la composición del eyaculado depende del estado de los machos (Perry & Rowe, 2010).

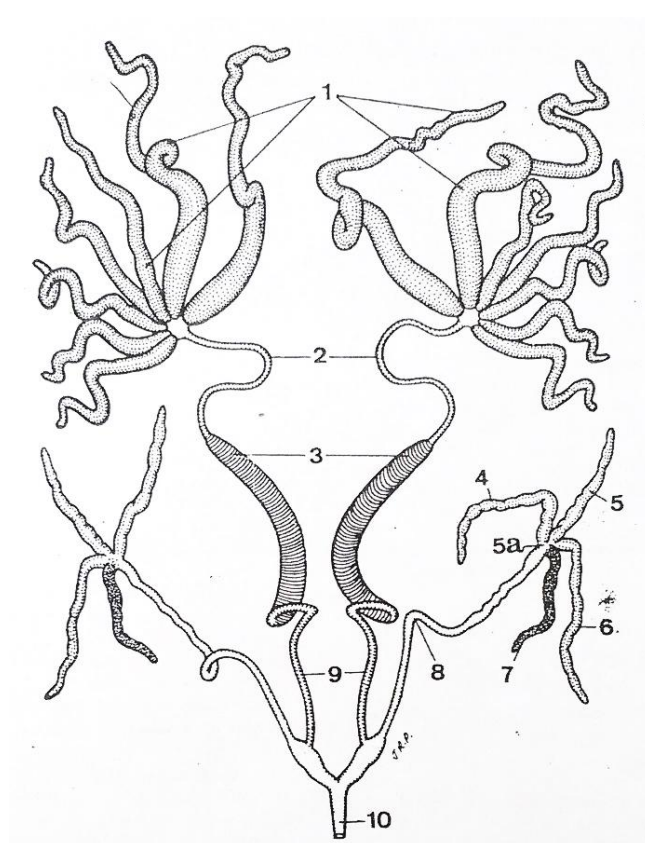
Considerando la producción de gametas, la anisogamia plantea una disparidad de costos entre la producción de óvulos y espermatozoides (Parker et al., 1972). Si consideramos el costo gameta a gameta, los espermatozoides son mucho más pequeños y económicos de producir que los óvulos. Este hecho ha llevado a la generalización de que la producción de esperma es ilimitada. Sin embargo, el espermatozoide individual no es la unidad funcional al momento de considerar la evolución del comportamiento de apareamiento de una especie. Los espermatozoides se transfieren de a millones empaquetados en eyaculados y/o en espermatóforos al momento de la cópula (Cohen, 1975; Trimberger, 1962). De esta

forma, los eyaculados son la unidad funcional apropiada, resultando energéticamente costosos (Dewsbury, 1982; Reznick, 1985; Simmons, 2001; Parker & Pizzarri, 2010).

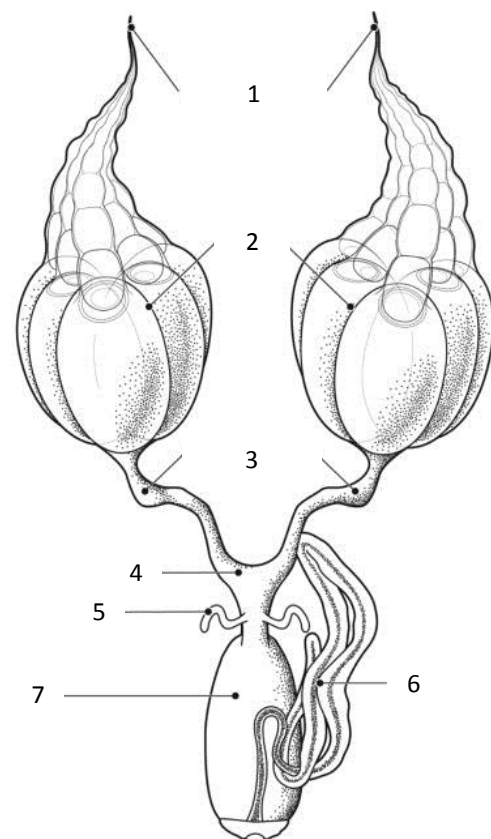
En este sentido, los machos poseen una cantidad de energía y nutrientes limitada que pueden dedicar a la producción de espermatozoides, por lo que su estado nutricional determinaría tanto el número como la viabilidad de los mismos. Esto se hace evidente en machos que experimentan restricciones en su dieta, observándose una reducción en el número de espermatozoides producidos (Gage & Cook, 1994; Fedina & Lewis, 2006; McGraw et al., 2007; Bunning et al., 2015). Sin embargo, aún se desconocen las consecuencias de tal reducción sobre el *fitness* del macho (Morehouse et al., 2010). Sí existen evidencias que muestran que en varias especies los machos ajustan su gasto en el eyaculado de acuerdo a la condición de las hembras con las que se aparean (Simmons, 2001; Sirot et al. 2011). Si la restricción de alimento influencia la cantidad de esperma y fluido seminal producido, la condición alimenticia del macho podría también afectar el comportamiento reproductivo, la tasa de apareamiento o hasta la duración de la cópula. De acuerdo a su estado nutricional, los machos podrían ajustar su gasto en el eyaculado, es decir, la cantidad de espermatozoides disponibles, para optimizar su estrategia de apareamiento. Una posibilidad sería utilizar la totalidad de espermatozoides lo más rápido posible reduciendo el número de apareamientos, volviendo máximo su éxito con pocas parejas sexuales. Otra sería reducir su inversión de espermatozoides en cada encuentro reproductivo, ahorrando gametas para aparearse todas las veces que sea posible (Wedell et al., 2002; Hodgson & Hosken, 2006). La estrategia reproductiva óptima dependería, por lo tanto, de la presencia de potenciales parejas y/o competidores. Resultados anteriores presentados en Capítulos previos muestran la importancia del contexto social sobre el comportamiento reproductivo de *R. prolixus*. En sistemas poliándricos, donde más de un macho copula con la misma hembra existen dos posibilidades: de haber muchas hembras, sería más ventajoso para el macho destinar un número mínimo de espermatozoides que aseguren su paternidad en tantas hembras como sea posible; mientras que si existen otros machos, la estrategia más ventajosa sería monopolizar a la hembra por un mayor tiempo e invertir un mayor número de espermatozoides en ella aumentando su probabilidad de éxito reproductivo (Dewsbury, 1982).

En este marco, *R. prolixus* resulta un interesante modelo para estudiar la influencia del estado nutricional de los machos, como estimador de calidad, y de la presencia de un contexto social, sobre el comportamiento de apareamiento relacionado con la inversión espermática. Dicho modelo se presume que sigue un sistema reproductivo poliándrico (Manrique & Lorenzo, 2012), donde las hembras pueden aceptar cópulas de varios machos previo a la fecundación de sus huevos. Típicamente, el aparato reproductor de los machos comprende un par de testículos, dos canales deferentes, un par de vesículas seminales, dos glándulas accesorias (cada una formada por cuatro estructuras tubulares), y un canal eyaculador que desemboca en el *aedeago* u órgano copulador (Fig. 1). Por su parte, el aparato reproductor de la hembra comprende un par de ovarios situados uno a cada lado del tubo digestivo, un oviducto común que se bifurca anteriormente formando los oviductos laterales, comunicados con la

vagina, que origina en su extremo anterior las dos espermatecas y en el extremo posterior una glándula accesoria impar (Ramírez Pérez, 1969) (Fig. 2). Si bien el comportamiento de apareamiento ya fue descrito en el Capítulo 1, cabe destacar que durante la cópula, el macho forma el espermatóforo dentro del atrio genital femenino por medio de secreciones de sus glándulas accesorias, transfiriendo así el esperma (Khalifa, 1950; Pereira, 2013). Una vez finalizada la cópula, la hembra abre el espermatóforo a través de contracciones musculares de las paredes de su abdomen, y almacena parte del espermatozoides transferido por el macho en sus espermatecas, descartando posteriormente el espermatóforo con parte del material genético (Davey, 1958; Davey, 1959).



**Figura 1.** Esquema del aparato reproductivo de machos de *R. prolixus*. Referencias: 1. Testículos, 2. Canal deferente anterior, 3. Vesículas seminales, 4 al 7. Glándulas accesorias, 8. Conducto glandular, 9. Canal deferente anterior, 10. Conducto eyaculador. Tomado de Ramírez Pérez (1969).



**Figura 2.** Esquema del aparato reproductivo de hembras de *R. prolixus*. Referencias: 1. Filamento terminal, 2. Ovariolas, 3. Oviductos laterales, 4. Oviducto común, 5. Espermatecas, 6. Glándula accesoria, 7. Vagina. Tomado de Sedra & Lange (2014).

Sobre esta base, el presente Capítulo estudia si la inversión del macho y su éxito reproductivo son condición-dependiente. Cabe destacar que, si bien el foco se centró en la evaluación e inversión que realiza el macho, se consideró también la elección de la hembra por una determinada pareja sexual, dado que la expresión de su selección a través de comportamientos de discriminación activa, genera una presión sobre los machos que podrían responder modificando su comportamiento de apareamiento y quizás también su inversión espermática.

En primer lugar, se realizaron estudios a nivel comportamental en los que un macho focal (de baja o alta calidad), en presencia de una hembra focal accesible para la cópula, fue expuesto a distintos contextos sociales (individuos no accesibles pero potencialmente disponibles): una hembra extra, representando otra potencial pareja para el macho focal; un macho extra, representando un potencial competidor para el macho focal; o ausencia de contexto. Se cuantificaron distintas variables comportamentales (i.e. intentos de monta del macho focal, latencia a la monta y a la cópula, duración de la cópula y postcópula, ocurrencia de rechazos por parte de la hembra). Posteriormente, a través de una muestra de machos y hembras focales utilizados en los estudios comportamentales, se investigó si el estado nutricional de los machos - definido previamente como alta y baja calidad (M+ y M-, respectivamente) - influyó en la cantidad de espermatozoides producidos y disponibles al momento de la cópula.

A su vez, se evaluó si la presencia de un determinado contexto social afecta cuántos de estos espermatozoides son transferidos en el apareamiento con una hembra focal de acuerdo a la presencia o ausencia de otros individuos potencialmente disponibles. También investigamos la existencia de efectos de la restricción de alimento sobre el éxito reproductivo del macho, comparando la fecundidad de hembras apareadas con machos de alta o baja calidad. Finalmente, se evaluó en la hembra cuánto de los espermatozoides transferidos por los machos focales fueron almacenados en sus espermatecas y cuántos se encontraban en los espermátóforos descartados, con el fin de analizar si existe un almacenamiento diferencial de acuerdo a la calidad del macho y al contexto social.

En base a información previa (Birkhead, 2007), planteamos la hipótesis de que los machos de baja calidad (M-) son menos competitivos al momento de la reproducción que los de alta calidad (M+) (i.e. menor producción de espermatozoides y menor éxito reproductivo). La predicción es que un macho de baja calidad invertirá el total de espermatozoides que posea en la hembra presente al tener menor probabilidad de recopular nuevamente. Respecto al contexto social, existirán tres escenarios posibles para un macho: en ausencia de otros individuos transferirá un número basal de espermatozoides; en presencia de otra hembra distribuirá el total entre ambas potenciales parejas; y en presencia de otro macho invertirá un mayor número para evitar el ingreso potencial de esperma del otro macho, o transferirá aún menos que el basal, reservando material genético para una futura cópula.

## **Materiales y Métodos**

### *Insectos*

Se utilizaron individuos de *R. prolixus* criados y mantenidos en condiciones de laboratorio siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 1 (pág. 15). Las hembras utilizadas tuvieron las condiciones establecidas para el grupo de *bajo riesgo* (BR) descrito en el Capítulo 2 (pág. 27),

caracterizadas por tener 12 días de edad y un ayuno de 7 días previo a los experimentos. A su vez, los machos focales utilizados tuvieron las condiciones establecidas para a los grupos de *alta calidad* (M+) y *baja calidad* (M-) descritos en el Capítulo 3 (pág. 39). Los machos extra tuvieron las condiciones establecidas para el grupo de *alta calidad* (M+). Bajo todas estas condiciones los insectos son aptos para la cópula.

#### *Dispositivo experimental*

Para estudiar el comportamiento de los insectos se utilizó la misma arena experimental descrita en el Capítulo 3 (pág. 40). Brevemente, la misma consistió en un recipiente acrílico circular con dos frascos contenedores de acrílico fijados en lados opuestos del *set* por una de sus bases, separados por una barrera removible transparente perforada que permitía el paso de claves visuales y olfativas. En la base de dicho dispositivo se colocó un papel de filtro como substrato, el cuál fue reemplazado por uno nuevo al finalizar cada experimento. La temperatura del cuarto experimental se estableció en  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , y la humedad relativa varió entre 45-60%.

#### *Grupos experimentales*

Cada experimento consistió de dos fases: evaluación previa y *test*. Durante la fase de evaluación, un macho focal fue liberado en la arena experimental y expuesto simultáneamente a la presencia de una hembra focal y a la presencia/ausencia de otro individuo *background*: un macho de alta calidad extra, para generar un contexto social competitivo al macho focal; una hembra de bajo riesgo extra, que poseía un alto grado de selectividad y estaba en la misma condición que la hembra focal, para generar un contexto con otra potencial oportunidad de cópula para el macho focal; o ausencia de contexto. A excepción del macho focal, el resto de los individuos permaneció durante esta fase dentro de su respectivo compartimiento, separados por las barreras transparentes perforadas removibles. Durante la fase de *test*, la hembra focal fue liberada.

De esta forma, dos factores fueron definidos: “calidad del macho focal”, con niveles consistentes en macho de baja calidad (M-) y de alta calidad (M+); y “*background*”, con niveles consistentes en una hembra extra (H), un macho extra (M) y ausencia de contexto (A). Los grupos intersexuales se establecieron al azar siguiendo un diseño factorial entre ambos factores, probándose todas las combinaciones posibles y determinando seis grupos experimentales: machos de baja calidad en presencia de otro macho (M- M), machos de baja calidad en presencia de otra hembra (M- H), machos de baja calidad en ausencia de contexto (M- A), machos de alta calidad en presencia de otro macho (M+ M), machos de alta calidad en presencia de otra hembra (M+ H), y machos de alta calidad en ausencia de contexto (M+ A).

## *Procedimiento*

### Estudio comportamental

Se realizaron 180 ensayos comportamentales (30 para cada grupo experimental). Previo a su utilización, los insectos fueron pesados para confirmar su estado nutricional (Mettler AJ100, Mettler Instrument Corporation, Hightstown, New Jersey, USA). De forma tal de evitar la perturbación mecánica de los insectos, se transportó a los mismos desde sus recipientes de contención hasta el *set* experimental utilizando un trozo de papel de filtro (Manrique et al., 2006). Al comienzo de cada ensayo se introdujo individualmente a cada insecto en su compartimiento correspondiente: una hembra focal en uno de los frascos contenedores laterales, un individuo *background* en el otro frasco contenedor y el macho focal fue liberado en el compartimiento mayor. Luego de su liberación, el macho podía explorar la arena libremente por 5 minutos, incluyendo el área inmediatamente adyacente a la base interna de los compartimientos que contenía a la hembra focal y al individuo *background*. Transcurrido ese tiempo, se removió la barrera que separaba a la hembra focal permitiendo la interacción con el macho focal. El comportamiento de interacción macho/hembra fue monitoreado y registrado desde el comienzo de la fase de evaluación hasta la finalización de la cópula y postcópula (Pompilio et al., 2016).

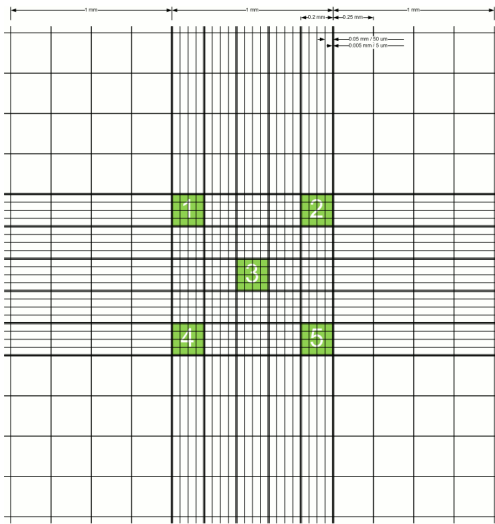
A través de la observación directa y de video-filmaciones se cuantificó el comportamiento de los insectos, registrando intentos de monta del macho focal, ocurrencia de rechazos a la cópula por parte de la hembra, latencia a la monta y a la cópula, y duración de la cópula y postcópula. Todos los experimentos fueron grabados utilizando una cámara web Genius FaceCam 1010 HD (KYE Systems Corp., Taipei, Taiwan), colocada a 35 cm sobre la arena, y bajo una intensidad de luz homogénea de 15 lux, permitiendo al experimentador observar los insectos sin perturbarlos (Pompilio et al., 2016). Luego de cada ensayo, los insectos fueron cuidadosamente removidos de la arena mediante un trozo de papel de filtro.

### Inversión espermática y éxito reproductivo

El objetivo principal fue determinar si existen diferencias en el número de espermatozoides producidos, transferidos, y luego almacenados por la hembra, entre machos de distinta calidad (M+/M-) y ante diversos contextos sociales, i.e. *backgrounds* (M/H/A). Para ello, se contabilizó y comparó entre los grupos experimentales: el total de espermatozoides almacenados en las vesículas seminales del macho, los transferidos dentro del espermatóforo a la hembra, los almacenados por ésta al finalizar la cópula, y por último los descartados junto con los restos del espermatóforo, alrededor de 6hs de finalizada la cópula.

Posteriormente al ensayo comportamental, sobre una muestra de 10 machos y hembras focales por cada grupo experimental, se realizó la disección abdominal y la extracción de las vesículas seminales de machos, las espermitecas de hembras y los restos del espermatóforo descartado. Cada una de estas muestras fue depositada en viales de acrílico de 3 ml, con 1 ml de solución *Ringer*. En dichos viales se desmenuzó cuidadosamente el material y luego se realizó una homogeneización de la solución por 5





**Figura 3.** Representación esquemática de una *Cámara de Neubauer*. Se destaca en su cuadrante central con números del 1 al 5 los cuadrados utilizados en el conteo de espermatozoides.

minutos. A continuación, se le adicionó 1 ml de agua destilada para inmovilizar a los espermatozoides y se procedió con una nueva homogeneización durante 5 minutos. Finalmente, se tomó una alícuota de 0.01 ml de la solución del centro, y una segunda del fondo del vial, y se depositaron en una *Cámara de Neubauer* de doble cámara para su posterior conteo bajo microscopio óptico a 400X.

Para el conteo de espermatozoides se consideraron solo aquellos que presentaban su cabeza visible, registrando del cuadrante central de la cámara el total de 5 cuadrados pequeños (cuadrados 1 a 5 en Fig. 3). Si se observaban espermatozoides sobre la línea que divide dos cuadrados adyacentes, como criterio sólo se consideraron aquellos que se encontraban sobre el lado inferior y derecho de dicho cuadrado. Los resultados de ambos lados de la cámara se promediaron, estimando la cantidad de espermatozoides contenidos en cada muestra utilizando la siguiente fórmula:

$$((\# \text{ espermatozoides} \times 5 \text{ cuadrados}) \times 2 \text{ ml de solución}) \times 0.01 \text{ ml alícuota}$$

Finalmente, integrando todos los conteos se reconstruyó el número de espermatozoides producidos y transferidos por machos y almacenados por hembras, de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\text{Espermatóforo del macho} = \text{Espermatecas de la hembra} + \text{Espermatóforo descartado}$$

$$\text{Total del macho} = \text{Espermatóforo del macho} + \text{Vesículas seminales}$$

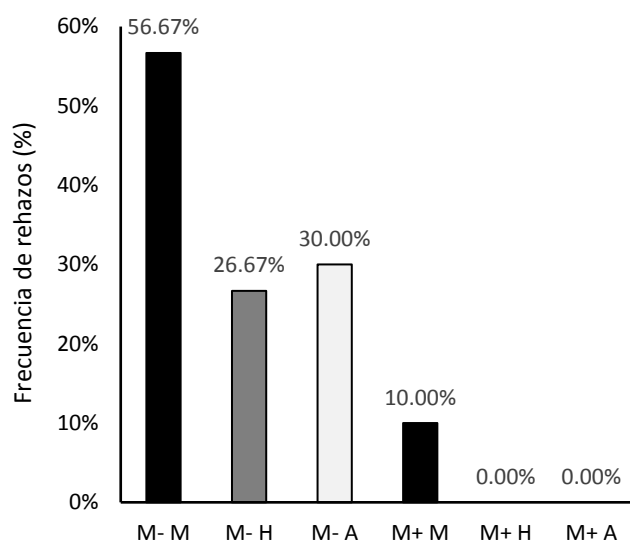
Por otro lado, para estimar el éxito reproductivo de los insectos, a una muestra de 20 hembras focales de cada grupo experimental se las dejó individualmente en sus frascos de cría sin ser disecionadas, contabilizando diariamente el número de huevos ovipuestos y la eclosión de los mismos, durante 7 días consecutivos.

### *Análisis de datos*

La existencia de diferencias en la frecuencia de rechazos a la cópula por parte de la hembra entre los grupos experimentales se evaluó utilizando un modelo de regresión logística, en el que las variables explicativas fueron “macho focal (M-/M+)” y “background (M/H/A)”, y la variable dependiente fue “comportamiento de rechazo (Si/No)”. Para el análisis de la latencia del macho al primer intento de monta y a la cópula, y la duración de la cópula y de la postcópula, se compararon las mediciones entre los grupos experimentales mediante ANOVAs de dos factores. Similarmente, para contrastar entre los diferentes tratamientos, la producción, transferencia y almacenamiento de espermatozoides por machos y hembras focales, y su éxito reproductivo final (n° de huevos ovipuestos y eclosionados), se realizaron también

ANOVAs de dos factores. En los casos en que fue requerido, se efectuaron contrastes a *posteriori* a través del *test* de Tukey. Todos los resultados fueron analizados utilizando el paquete estadístico InfoStat® v2016p (Di Rienzo et al., 2016).

## Resultados



**Figura 4.** Frecuencia de rechazo por parte de la hembra de acuerdo a la calidad del macho focal vs. el *background*. Legendas: M- macho de baja calidad, M+ macho de alta calidad, M macho *background* extra, H hembra *background* extra, A *background* ausente (N=180).

### Estudio comportamental

Considerando a la hembra focal, los experimentos realizados mostraron diferencias significativas en la frecuencia de los comportamientos de rechazo entre los distintos tratamientos (calidad del macho focal e individuo *background*) (Fig. 4). Como se esperaba estos comportamientos fueron mucho más frecuentes (56.67%) cuando el macho focal fue de baja calidad, en presencia de otro macho *background* (M- M). A su vez, cerca del 30% de los machos de baja calidad fueron rechazados por las hembras en presencia de otras como *background* (M- H), así como en ausencia de contexto social (M- A). Finalmente, en los casos en que el macho focal fue de alta calidad el comportamiento de rechazo de la hembra fue mínimo o nulo (M+ M, M+ H y M+ A) (Fig. 4).

Los resultados de la regresión logística, con tratamientos "macho focal" (M+/M-) y "background" (M/H/A) como variables explicativas, y "comportamiento de rechazo" (Si/No) como variable dependiente, mostraron que el rechazo exhibido por las hembras aumentó significativamente cuando la calidad del macho focal fue baja (M-) ( $p < 0.0001$ ), y cuando el *background* consistía en otro macho (M) ( $p < 0.0047$ ) (Tabla 1). Dado que la interacción entre los tratamientos fue no significativa ( $p > 0.7793$ ), sólo los efectos principales fueron considerados para analizar el comportamiento de rechazo de la hembra. Así, la probabilidad de que el macho focal sea rechazado por la hembra se incrementó a 37% cuando dicho macho fue de baja calidad (M-), resultado que se redujo a 3% cuando fue de alta calidad (M+). Por otro lado, cuando existía un macho extra como *background* (M) la probabilidad de que el macho focal fuese rechazado fue del 25%, mientras que ésta probabilidad disminuyó a 8% cuando fue otra hembra la utilizada de *background* (H), o hubo ausencia del mismo (A) (Tabla 2, Fig. 5).

Al evaluar la latencia del macho focal a la primera monta y a la cópula, se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales (ANOVA Lat. 1° monta:  $F=485.77$ ,  $p < 0.0001$ ,  $N=180$ ; ANOVA

Lat. Cópula:  $F=405.08$ ,  $p<0.0001$ ,  $N=180$ ), resaltando que siempre fueron más cortas cuando el macho era de alta calidad (M+), y aún más en presencia de otra hembra como *background* (H) (Tukey:  $p<0.05$ ,  $N=180$ ). Los machos de baja calidad (M-), por su parte, mantuvieron latencias mayores tanto a la monta como a la cópula ante todos los contextos sociales (Fig. 6 y 7). Cabe destacar que en machos de baja calidad en presencia de otra hembra como *background* (M- H), la latencia a la monta y a la cópula fue aproximadamente 2.5 veces más larga que en machos focales de alta calidad bajo el mismo contexto (M+ H) (Fig. 7).

|                         | Estimador | Z     | p-valor  |
|-------------------------|-----------|-------|----------|
| <b>Macho Focal</b>      | -3.05     | -4.72 | <0.0001* |
| <b>Background</b>       | 1.50      | 2.83  | 0.0047*  |
| <b>Focal*Background</b> | 0.16      | 0.28  | 0.7793   |

**Tabla 1.** Resultados de la regresión logística para la frecuencia de rechazos de la hembra en función de la calidad del macho focal y el *background*. \* indican diferencias significativas ( $N=180$ ).

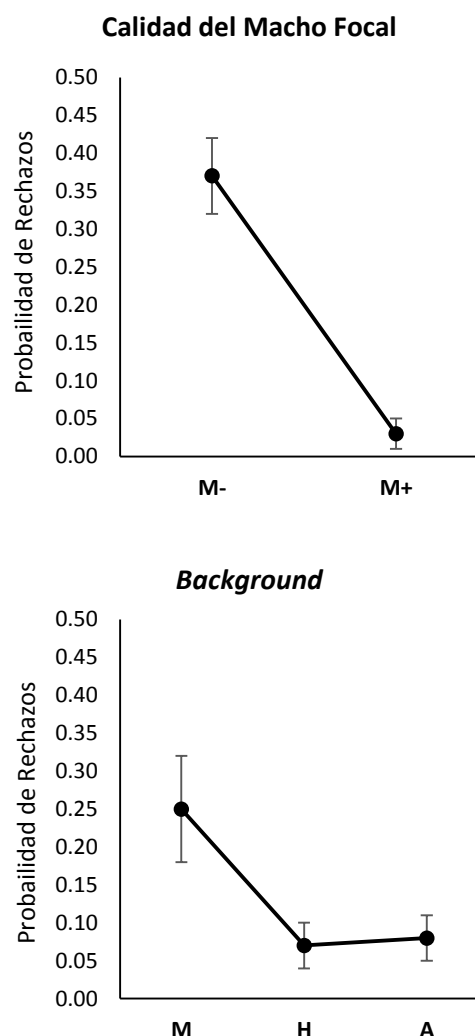
| Macho Focal | Probabilidad | E.E. |   |
|-------------|--------------|------|---|
| M-          | 0.37         | 0.05 | A |
| M+          | 0.03         | 0.02 | B |

| Background | Probabilidad | E.E. |   |
|------------|--------------|------|---|
| M          | 0.25         | 0.07 | A |
| H          | 0.07         | 0.03 | B |
| A          | 0.08         | 0.03 | B |

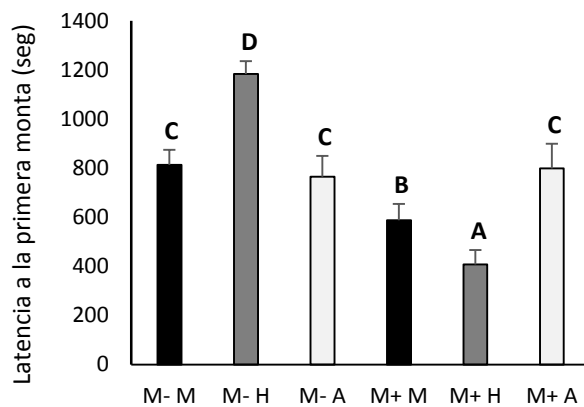
**Tabla 2.** Probabilidad de rechazo por la hembra de acuerdo a la calidad del macho focal y al *background* (efectos principales). EE: Error Estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $p<0.05$ ) ( $N=180$ ).

Al analizar la duración de la cópula entre los distintos grupos experimentales se observó que la misma siempre fue más corta en presencia de otras hembras, tanto para machos de alta como de baja calidad (M+ H, M- H, respectivamente) (ANOVA:  $F=5.63$ ,  $p=0.0043$ ,  $N=180$ ) (Tukey:  $p<0.05$ ,  $N=180$ ) (Fig. 8). Sin embargo, al considerar la duración de la postcópula se observó que la presencia de otro macho como *background* produjo un aumento significativo en la permanencia del macho focal sobre el dorso de la hembra, una vez finalizada la cópula (ANOVA:  $F=377.84$ ,  $p<0.0001$ ,  $N=180$ ) (Tukey:  $p<0.05$ ,  $N=180$ ). Dichos valores, a su vez, fueron aproximadamente 2 veces más largos

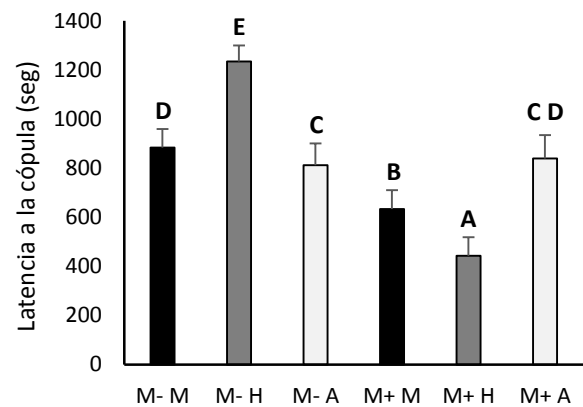


**Figura 5.** Probabilidad de rechazos a la cópula (Media $\pm$ EE) de acuerdo a la calidad del macho focal y al *background*. ( $N=180$ ).

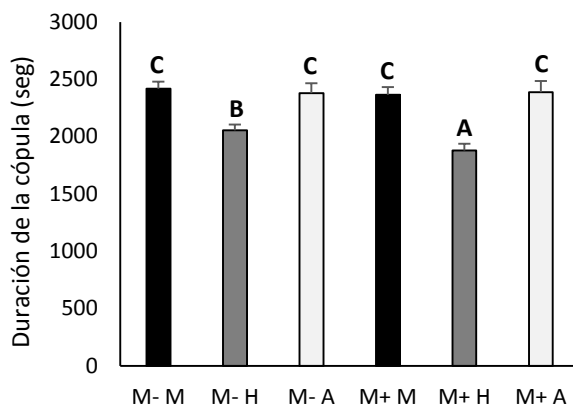
cuando el macho focal fue de baja calidad (M-), respecto a lo observado para machos de alta calidad (M+) (Fig. 9).



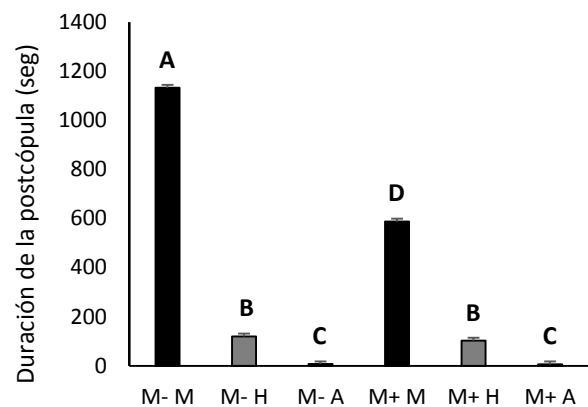
**Figura 6.** Latencia a la primera monta del macho de acuerdo a su calidad y al *background*. Leyendas: M- macho de baja calidad, M+ macho de alta calidad, M macho *background* extra, H hembra *background* extra, A *background* ausente. Letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $p < 0.05$ ) (N=180).



**Figura 7.** Latencia a la cópula del macho focal de acuerdo a su calidad y al *background*. Leyendas: M- macho de baja calidad, M+ macho de alta calidad, M macho *background* extra, H hembra *background* extra, A *background* ausente. Letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $p < 0.05$ ) (N=180).



**Figura 8.** Duración de la cópula en machos focales de acuerdo a su calidad y al *background*. Leyendas: M- macho de baja calidad, M+ macho de alta calidad, M macho *background* extra, H hembra *background* extra, A *background* ausente. Letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $p < 0.05$ ) (N=180).

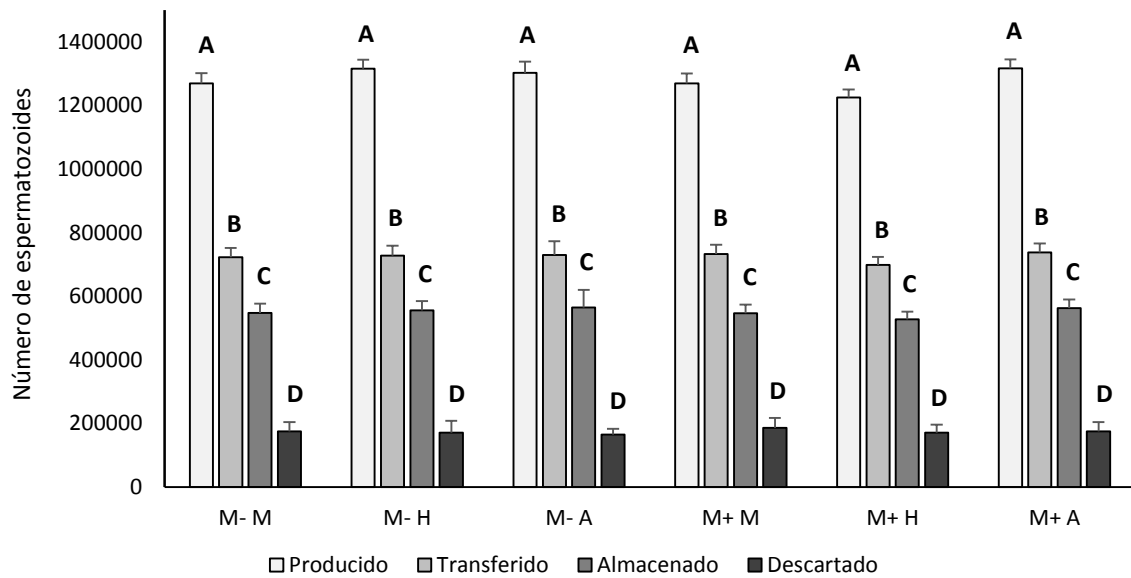


**Figura 9.** Duración de la postcópula en machos focales de acuerdo a su calidad y al *background*. Leyendas: M- macho de baja calidad, M+ macho de alta calidad, M macho *background* extra, H hembra *background* extra, A *background* ausente. Letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $p < 0.05$ ) (N=180).

### *Inversión espermática y éxito reproductivo*

Al comparar la producción y transferencia de espermatozoides en los machos, y el almacenamiento en las hembras, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales (ANOVA:  $F=0.47$ ,  $p=0.8005$ ,  $N=60$ ) (Fig. 10). Se destaca que del total de espermatozoides producidos por los machos, éstos transfirieron el 56.49% al momento de la cópula, mientras que la

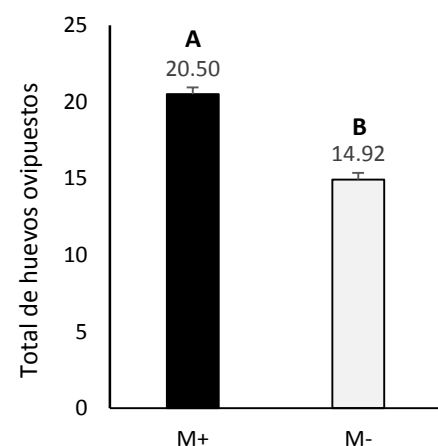
hembra almacenó el 75.99% de dicha cantidad descartando el resto junto con el espermátforo, independientemente de la calidad de la pareja y del contexto social, i.e. del *background* (Tabla 3). Sin embargo, cuando evaluamos el éxito reproductivo, se encontró que se reduce significativamente un 27.22% cuando el macho focal es de baja calidad (M-), independientemente del contexto social (ANOVA:  $F=77.92$ ,  $p<0.0001$ ,  $N=120$ ) (Tukey:  $p<0.05$ ,  $N=180$ ) (Fig. 11). Esta diferencia se debió al porcentaje de huevos fecundados y no al porcentaje de huevos eclosionados.



**Figura 10.** Número de espermatozoides producidos y transferidos por los machos, almacenados por las hembras y descartados dentro del espermátforo posteriormente al apareamiento, de acuerdo a la calidad del macho focal y al *background*. Leyendas: M- macho de baja calidad, M+ macho de alta calidad, M macho *background* extra, H hembra *background* extra, A *background* ausente. Letras diferentes representan diferencias significativas dentro de cada grupo ( $p<0.05$ ) ( $N=60$ ).

| Macho Focal                | # espermatozoides | %       |
|----------------------------|-------------------|---------|
| Producido previamente      | 1283416.67        | 100.00% |
| Transferido (espermátforo) | 725000.00         | 56.49%  |
| Restante en vesículas      | 558416.67         | 43.51%  |
| Hembra Focal               | # espermatozoides | %       |
| Retiene en espermatecas    | 550916.67         | 75.99%  |
| Descarta en espermátforo   | 174083.33         | 24.01%  |

**Tabla 3.** Número de espermatozoides producidos y transferidos por machos, y almacenados por hembras, independientemente de la calidad del macho focal y del contexto social, i.e. del *background* ( $N=60$ ).



**Figura 11.** Número total de huevos ovipuestos de acuerdo a la calidad del macho focal. Leyendas: M- macho de baja calidad, M+ macho de alta calidad. Letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $p<0.05$ ) ( $N=120$ ).

## Discusión

En el presente Capítulo se estudió si la inversión espermática de machos de *R. prolixus* es condición-dependiente, considerando como variables el estado nutricional de los mismos y la presencia de un contexto social. Tal inversión puede descomponerse en cuántos espermatozoides tienen los machos previo al momento de la cópula (i.e. producción espermática), cuántos de éstos son depositados en el espermatóforo al momento del apareamiento (i.e. transferencia), y en cuántos retiene la hembra para la futura fecundación de los oocitos (i.e. almacenamiento). En este sentido, cuando analizamos cada componente de la inversión espermática entre los distintos grupos experimentales, no encontramos diferencias significativas respecto al estado nutricional de los machos, ni de acuerdo al contexto social presente. Tanto machos de alta como de baja calidad contaron, previo al momento de la cópula, con el mismo número de espermatozoides disponibles en sus vesículas seminales. A su vez, siempre transfirieron cerca de 50% de éstos dentro del espermatóforo al momento del apareamiento, y de ese valor las hembras almacenaron cerca del 75%. En otras palabras, la inversión espermática no se vio influenciada por la calidad de los machos ni por el contexto social.

Estos valores tan conservados e invariables, sumados al gran repertorio de comportamientos de discriminación activa que despliegan hembras de distintas especies de triatomíneos (Manrique & Lazzari, 1994; Pires et al., 2004; Vitta & Lorenzo, 2009; Pompilio et al., 2016), sugieren que las hembras de *R. prolixus* no habrían desarrollado mecanismos fisiológicos postcopulatorios de selección de pareja. Rechazar una potencial pareja sexual es una decisión que implica un costo elevado (pérdida de oportunidad de cópula) que se compensa con un beneficio mayor a futuro (cópula con un individuo de mayor calidad) (Bleu et al., 2012). Si a lo largo de su historia evolutiva las hembras de una especie han desarrollado mecanismos comportamentales efectivos para evitar y/o retrasar el apareamiento a nivel precopulatorio, no habría razón para suponer la existencia de una presión de selección para el desarrollo de mecanismos fisiológicos postcopulatorios de elección de pareja (e.g. retención diferencial de espermatozoides, eliminación selectiva de espermatóforos, emisión de feromonas disuasorias de apareamiento) (Gilbert, 1976; Eberhard & Cordero, 1995). Tales tipos de mecanismos suelen ser más frecuentes en aquellas especies donde no existen claros comportamientos de discriminación, y/o donde lo que prevalece es un conflicto entre los sexos por el control de la fecundación de los oocitos (Birkhead, 2007; Garbaczewska et al., 2013; Hooper et al., 2016; Rouse & Bretman, 2016; Gress & Pitnick, 2017; Schütz et al., 2017).

Un resultado sumamente interesante que observamos fue la existencia de diferencias significativas en el éxito reproductivo entre los distintos grupos experimentales, siendo significativamente menor en machos de baja calidad, independientemente del contexto social. Dado que las hembras utilizadas en el experimento eran de *bajo riesgo*, que anteriormente determinamos que poseen huevos recientemente desarrollados del primer ciclo ovárico y que pueden retenerlos por aproximadamente una

semana hasta comenzar a oviponerlos como infértiles (Capítulo 2), y que encontramos en el presente Capítulo que no hay diferencias en la transferencia y almacenamiento de espermatozoides entre los tratamientos; la única posible explicación para que exista una diferencia en el éxito reproductivo es que la hembra esté fecundando una menor cantidad de oocitos con espermatozoides provenientes de los machos de baja calidad. Antecedentes previos sugieren que dentro del espermatóforo del macho se transfieren secreciones de sus glándulas accesorias relacionadas con la nutrición y motilidad de los espermatozoides, y un “factor de oviposición” que junto a un ecdisteroide del ovario generan como respuesta que el *Corpora Cardiac*a libere un factor miotrópico que aumenta la motilidad de los músculos del oviducto (Davey, 1958, 1965, 1967; Kriger & Davey, 1982; Chiang & Chiang, 1995), estimulando la oviposición de la hembra. Estas sustancias están fuertemente condicionadas por la alimentación de los insectos (Davey, 2007). Queda sin embargo el interrogante de si es la hembra, el macho o ambos quienes tienen el control de la fecundación de los oocitos. Si especulamos con que los machos de baja calidad transfirieron una menor cantidad de este factor, o no lo transfirieron, o lo hicieron pero con alguna modificación en su composición, podría ser que la hembra se encuentre menos estimulada para la oviposición. Otra posibilidad es que la hembra, al censar que el macho es de baja calidad, destine un menor número de oocitos a ser fecundados. Futuros estudios fisiológicos y comportamentales son necesarios para poder acercarse a la respuesta ante estas posibilidades.

Considerando la evaluación de la pareja sexual al momento del apareamiento, el comportamiento del macho se vio influenciado por la presencia del contexto social. Ante la ausencia de *background*, tanto machos de alta como de baja calidad evalúan a la hembra por un tiempo prolongado (aproximadamente 13 min.), copulando con ella y abandonándola luego sin realizar ningún cuidado de pareja postcópula (i.e. *sujeción*). A su vez, ante la presencia de otra hembra potencialmente disponible, los machos de alta calidad redujeron significativamente el tiempo de evaluación y de cópula. Este resultado sugiere que machos más veloces, en cuanto a la monta y la duración de la cópula, estarían antes disponibles para copular con otra nueva potencial pareja, lo cual aumentaría su éxito reproductivo respecto de otros machos. En cambio, los machos de baja calidad mantuvieron siempre constante y elevada su latencia a la monta y a la cópula. Esto podría deberse a que no se encontraban nutricionalmente aptos para copular inmediatamente, dados los costos de producir un nuevo espermatóforo funcional (Khalifa, 1950; Davey, 1959; Pereira-Lourenço et al., 2013), y por lo tanto se detendrían un mayor tiempo en evaluar y copular con la pareja sexual presente. Antecedentes en otros animales muestran que la limitación de alimento reduce el éxito reproductivo de los machos (e.g. Kodric-Brown, 1989; Xie et al., 2015; Kaldun & Otti, 2016; Dávila & Aron, 2017). Por último, cuando existía otro macho como contexto social, la duración de la postcópula (i.e. *sujeción*) fue significativamente más larga respecto de los otros contextos sociales, siendo máxima en machos de baja calidad. Estos resultados confirman que la presencia de otros machos es interpretada por el macho focal como potenciales competidores. Resultados similares fueron reportados por Vitta & Lorenzo (2009) en *Triatoma brasiliensis*, donde observaron un aumento en la duración del

cuidado postcopulatorio de la pareja en presencia de otros machos. Dado que cortejar una pareja sexual cuando existen otros potenciales competidores es costoso (Birkhead, 2007), una vez monopolizada una hembra, es de esperarse que los machos mantengan una guardia prolongada para evitar que otro macho se aproxime e intente copular (Jarrige et al., 2016). Esto sería aún mucho más evidente para el caso de machos de baja calidad, los cuales ya deben soportar un costo muy elevado al ser relativamente más rechazados por las hembras. Existen otras estrategias posibles ampliamente difundidas entre los artrópodos para asegurarse la fecundación de los oocitos, como ser la remoción de esperma de machos previos (e.g. Ono et al., 1989; Córdoba-Aguilar et al., 2003) o hasta la producción de tapones copulatorios (e.g. Contreras-Garduño et al., 2006). Sin embargo, tales estrategias son más bien típicas de especies promiscuas, con abundantes cópulas extra pareja y buscando cada sexo maximizar su propio *fitness* reproductivo (Birkhead, 2007).

Respecto a la elección de la hembra por una determinada pareja sexual, se confirmó lo encontrado en el Capítulo 3 donde se observó que éstas son sensibles al estado nutricional de los machos utilizándolo como un estimador de calidad, rechazando significativamente menos a aquellos con mejor condición (i.e. con un menor ayuno). A su vez, el contexto social fue clave modificando el comportamiento de elección de la hembra. Así, la presencia de otro macho como *background* (el cuál pertenecía al grupo de machos de alta calidad) fue censada por la hembra focal como otra potencial pareja sexual disponible, observándose la expresión de comportamientos de rechazo a la cópula cuando el macho focal era de baja calidad. Cuando el *background* era otra hembra potencialmente disponible o se encontraba ausente, los comportamientos de rechazo de la hembra focal se redujeron (en M- como macho focal) o volvieron nulos (en M+ como macho focal), dado que no tenía otra pareja sexual potencialmente disponible para elegir. Estos resultados novedosos difieren de lo observado por Pompilio et al. (2016), donde encontraron que las hembras de *R. prolixus* exhiben comportamientos de rechazo en presencia de un contexto social, independientemente de si éste estaba conformado por machos o hembras. Tal diferencia podría deberse a que los insectos utilizados en aquel estudio no presentaban condiciones fisiológicas tan controladas, habiendo una mayor dispersión en edad, en el riesgo de oviposición de huevos como infértiles en las hembras y en el estado nutricional de los machos, por lo que los distintos insectos no evaluarían la pareja sexual y el contexto social homogéneamente.

La evidencia observada al analizar las variables comportamentales - frecuencia de rechazo, latencia a la monta y a la cópula, y duración de la cópula y postcópula - amplía la hipótesis planteada en el Capítulo 3 que postula que las hembras ajustan sus decisiones de apareamiento en base a la calidad del contexto social presente. Estos resultados nos permiten sugerir que tanto machos como hembras ajustan su comportamiento de apareamiento en base a la calidad e identidad sexual de los restantes individuos potencialmente disponibles. Para las hembras sería la existencia de otra potencial pareja sexual de mayor calidad la variable clave que modifica su elección. En este caso, al ser ambos machos de similar y buena calidad no se espera un incremento de rechazos al macho focal en presencia del macho *background*. Para



los machos, sería la existencia de otro potencial competidor la variable clave. Esto determinaría que los machos reduzcan su tiempo de evaluación, y se apresuren a monopolizar el recurso limitado que es la hembra, cuidando de ella por más tiempo para asegurar su inversión espermática.

Los resultados obtenidos a lo largo de estos Capítulos muestran que los comportamientos pre y postcopulatorios estarían involucrados en la elección de pareja sexual tanto en hembras como en machos de *R. prolixus*. Por otra parte, no hemos hallado al momento mecanismos fisiológicos postcopulatorios que impliquen un ajuste en la transferencia y almacenamiento de espermatozoides. Respecto a la transferencia de esperma, es importante considerar que si bien los machos comparados poseían calidades distintas, las hembras con las que copulaban poseían calidades similares. La pregunta que surge es si ante hembras de calidades distintas los machos son capaces de administrar su inversión de esperma. El próximo Capítulo responde a este interrogante.

## REFERENCIAS

- Andersson M. B.** 1994. Sexual selection. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.
- Birkhead T.** 2007. Promiscuidad: Una historia evolucionista de la competencia entre espermatozoides. Colección Las Dos Culturas. Vol. N°8. Ed. Laetoli - España & Ed. Oceano - México. 316p.
- Bleu J., Bessa-Gomes C. & Laloia D.** 2012. Evolution of female choosiness and mating frequency: effects of mating cost, density and sex ratio. *Animal Behaviour*. 83: 131-136.
- Boggs C. L.** 1992. Resource allocation: exploring connections between foraging and life history. *Functional Ecology* 6: 508.
- Boggs C. L.** 2009. Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. *Functional Ecology*. 23: 27-37.
- Bunning H., Rapkin J., Belcher L., Archer C.R., Jensen K. & Hunt J.** 2015. Protein and carbohydrate intake influence sperm number and fertility in male cockroaches, but not sperm viability. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 282: 1802.
- Chiang R. G. & Chiang J. A.** 1995. Fecundity of the blood-feeding insect *Rhodnius prolixus* increases in successive periods of egg production. *Experientia*. 51(3): 289-292.
- Cohen J.** 1975. Gamete redundancy-wastage or selection? Pages 99-112, in Mulcahy D. L., Gamete competition in plants and animals. North Holland, Amsterdam.
- Contreras-Garduño J., Peretti A. V. & Córdoba-Aguilar A.** 2006. Evidence that Mating Plug is Related to Null Female Mating Activity in the Scorpion *Vaejovis punctatus*. *Ethology*. 112(2): 152-163.

- Córdoba-Aguilar A., Uhía E. & Cordero Rivera A.** 2003. Sperm competition in Odonata (Insecta): the evolution of female sperm storage and rivals' sperm displacement. *Journal of Zoology*. 261(4): 381-398.
- Cotton S., Fowler K. & Pomiankowski A.** 2004. Do sexual ornaments demonstrate heightened condition-dependent expression as predicted by the handicap hypothesis? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 271: 771-783.
- Davey K. G.** 1958. The Migration of Spermatozoa in the Female of *Rhodnius Prolixus* Stal. *Journal of Experimental Biology*. 35: 694-701.
- Davey K. G.** 1959. Spermatophore Production in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Cell Science*. 3(100): 221-230.
- Davey K. G.** 1965. Copulation and egg-production in *Rhodnius prolixus*: The role of the spermathecae. *Journal of Experimental Biology*. 42: 373-378.
- Davey K. G.** 1967. Some Consequences Of Copulation in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology*. 13: 1629-1636.
- Davey K. G.** 2007. The interaction of feeding and mating in the hormonal control of egg production in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology*. 53: 208-215.
- Dávila F. & Aron S.** 2017. Protein restriction affects sperm number but not sperm viability in male ants. *Journal of Insect Physiology*. 100: 71-76.
- Dewsbury D.** 1982. Ejaculate cost and male choice. *The American Naturalist*. 119: 601-610.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W.** InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Eberhard W. G. & Cordero C.** 1995. Sexual selection by cryptic female choice on male seminal products - a new bridge between sexual selection and reproductive physiology. *Trends in Ecology & Evolution*. 10(12): 493-496.
- Fedina T. Y. & Lewis S. M.** 2006. Proximal traits and mechanisms for biasing paternity in the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 60(6): 844-853.
- Gage M. J. G. & Cook P. A.** 1994. Sperm Size or Numbers? Effects of Nutritional Stress Upon Eupyrene and Apyrene Sperm Production Strategies in the Moth *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidea). *Functional Ecology*. 8(5): 594-599.

- Garbaczewska M., Billeter J.C. & Levine J. D.** 2013. *Drosophila melanogaster* males increase the number of sperm in their ejaculate when perceiving rival males. *Journal of Insect Physiology*. 59: 306-310.
- Gilbert L. E.** 1976. Postmating female odor in *Heliconius butterflies*: a male-contributed antiaphrodisiac? *Science*. 193(4251): 419-420.
- Gress B. E. & Pitnick S.** 2017. Size-dependent ejaculation strategies and reproductive success in the yellow dung fly, *Scathophaga stercoraria*. *Animal Behaviour*. 127: 281-287.
- Hodin J.** 2009. She shapes events as they come: plasticity in female insect reproduction. Pages 423-521 in D. W. Whitman and T. N. Ananthakrishnan. *Phenotypic plasticity of insects mechanisms and consequences*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Hooper A. K., Wegener B. J. & Wong B. B. M.** 2016. When should male squid prudently invest sperm. *Animal Behaviour*. 112: 163-167.
- Jarrige A., Kassis A., Schmoll T. & Goubault M.** 2016. Recently mated males of a lek-mating insect intensify precopulatory mate guarding under male competition. *Animal Behaviour*. 117: 21-34.
- Kaldun B. & Otti O.** 2016. Condition-dependent ejaculate production affects male mating behavior in the common bedbug *Cimex lectularius*. *Ecology and Evolution*. 14;6(8): 2548-2558.
- Khalifa A.** 1950. Spermatophore production and egg-laying behaviour in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Parasitology*. 40(3-4): 283-289.
- Kodric-Brown A.** 1989. Dietary carotenoids and male mating success in the guppy: an environmental component to female choice. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 25: 393-401.
- Kruger F. L. & Davey K. G.** 1982. Ovarian motility in mated *Rhodnius prolixus* requires an intact cerebral neurosecretory system. *General and Comparative Endocrinology*. 48(1): 130-134.
- Manrique G. & Lazzari C. R.** 1994. Sexual behavior and stridulation during mating in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Memorias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 89(4): 629-633.
- Manrique G & Lorenzo M. G.** 2012. The Sexual Behaviour of Chagas Disease Vectors: Chemical Signals Mediating Communication between Male and Female Triatomine Bugs. *Psyche*. 1-8.
- Manrique G., Vitta A. C. R., Ferreira R. A., Zani C. L., Unelius C. R., Lazzari C. R., Diotaiuti L., Lorenzo M. G.** 2006. Chemical communication in Chagas disease vectors. Source, identity and potential function of volátiles released by the metasternal and Brindley's glands of *Triatoma infestans* adults. *Journal of Chemical Ecology* 32: 2035-2052

- McGraw L.A., Fiumera A.C., Ramakrishnan M., Madhavarapu S., Clark A. G. & Wolfner M. F.** 2007. Larval rearing environment affects several post-copulatory traits in *Drosophila melanogaster*. *Biology Letters*. 3: 607-610.
- Morehouse N. I., Nakazawa T., Booher C. M., Jeyasingh P. D. & Hall M. D.** 2010. Sex in a material world: why the study of sexual reproduction and sex-specific traits should become more nutritionally explicit. *Oikos*. 119: 766-778.
- Ono T., Siva-Jothy M. T. & Kato A.** 1989. Removal and subsequent ingestion of rivals' semen during copulation in a tree cricket. *Physiological Entomology*. 14(2): 195-202.
- Parker G. A. & Pizzari T.** 2010. Sperm competition and ejaculate economics. *Biological Reviews*. Cambridge Philosophical Society. 85(4): 897-934.
- Parker G. A., Baker R.R. & Smith V.G.F.** 1972. The origin and evolution of gamete dimorphism and the male-female phenomenon. *Journal of Theoretical Biology*. 36(3): 529-553.
- Pereira-Lourenço A. S., Santos-Mallet J. R. & Freitas S. P. C.** 2013. Anatomy of the Spermatophore in Triatomines (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) and Its Applications to the Study of Chagas Disease Vector. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 89(4): 775-780.
- Perry J. C & Rowe L.** 2010. Condition-dependent ejaculate size and composition in a ladybird beetle. *Proceedings of the Royal Society. B: Biological Sciences*. 277: 3639-3647.
- Pires H. H. R., Lorenzo M. G., Lazzari L. D. & Manrique G.** 2004. The Sexual Behaviour of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): an Experimental Study. *Memories Institute Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 99(3): 295-300.
- Pompilio L., González Franco M., Chisari L. B. & Manrique G.** 2016. Female choosiness and mating opportunities in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Behaviour*. 153(15): 1863-1878.
- Ramírez Pérez J.** 1969. Estudio sobre la anatomía de *Rhodnius prolixus*. *Revista Venezolana de Sanidad y Asistencia Social*. 34: 10-98.
- Reznick D.** 1985. Costs of Reproduction: An Evaluation of the Empirical Evidence. *Oikos*. 44(2): 257-267.
- Rouse J. & Bretman A.** 2016. Exposure time to rivals and sensory cues affect how quickly males respond to changes in sperm competition threat. *Animal Behaviour*. 122: 1-8.
- Schütz D., Tschirren L., Pachler G., Grubbauer P. & Taborsky M.** 2017. Sperm-limited males save ejaculates for future matings when competing with superior rivals. *Animal Behaviour*. 125: 3-12.

- Sedra L. & Lange A. B.** 2013. The female reproductive system of the kissing bug, *Rhodnius prolixus*: arrangements of muscles, distribution and myoactivity of two endogenous FMRFamide-like peptides. *Peptides*. 53: 140-147.
- Simmons L. W.** 2001. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Monographs in Behavior and Ecology*. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ.
- Trimberger G. W.** 1962. Artificial insemination. Pages 144-162 in E. S. E. Hafez. *Reproduction in farm animals*. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Vitta A. C. R. & Lorenzo M.** 2009. Copulation and Mate Guarding Behavior in *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medicin Entomology*. 46(4): 789-795.
- Xie J., De Clercq P., Zhang, Y., Wu H., Pan C. & Pangb H.** 2015. Nutrition-dependent phenotypes affect sexual selection in a ladybird. *Scientific Reports*. 7(2): 159-170.

***Capítulo 5.***  
**Selectividad sexual de machos en  
función del estatus reproductivo  
de la hembra**

*The gods are fascinated by innocence,  
perhaps because it's a quality  
they themselves lack...*

## Capítulo N°5. Selectividad sexual de machos en función del estatus reproductivo de la hembra

### Introducción

En Capítulos anteriores se han descrito comportamientos pre y postcopulatorios involucrados en la elección de pareja sexual en *R. prolixus*. Además, al momento no se hallaron mecanismos fisiológicos postcopulatorios que impliquen un ajuste en la transferencia y almacenamiento de espermatozoides. Sin embargo, aún no hemos ahondado en los efectos de posibles atributos que evalúan los machos en las hembras, como variables estimadoras de calidad, al momento de seleccionarlas como potenciales parejas sexuales. En este sentido, consideramos al estatus reproductivo de la hembra (i.e. virgen o con experiencia previa de apareamiento) como candidato a ser una variable decisiva para los machos, ya que ésta se encuentra fuertemente ligada al valor reproductivo de la hembra.

La relevancia del estatus reproductivo de la hembra radica en las consecuencias negativas que tiene el apareamiento poliándrico sobre el éxito reproductivo de los machos, especialmente en especies con hembras capaces de almacenar esperma, ya que la competencia espermática generada por múltiples apareamientos aumenta el riesgo de paternidad de los machos (Parker, 1970; Simmons, 2001; Wedell et al., 2002). En estas especies, entre las cuales se incluye a *R. prolixus*, existe una gran presión selectiva hacia el macho que podría verse reflejada tanto en sus preferencias (e.g. elección de la hembra a la cual cortejar) como en su inversión reproductiva (e.g. cantidad de esperma invertido en una hembra virgen vs. con experiencia previa de apareamiento).

En sistemas reproductivos promiscuos, donde tanto machos como hembras tienen múltiples parejas sexuales a lo largo de su ciclo reproductivo, se espera que cada sexo haya desarrollado estrategias que maximicen su éxito reproductivo minimizando el costo posible en cada evento de apareamiento (Arnqvist & Rowe, 2005). En el caso de las hembras, se espera una fuerte presión selectiva para elegir machos de mayor calidad, asumiendo que dicha calidad se traducirá en ventajas adaptativas para su descendencia (Andersson, 1994). En el caso de los machos, la estrategia óptima sería aparearse con tantas hembras como sea posible de forma tal de maximizar su éxito reproductivo (Parker & Pizzari, 2010). Finalmente, en ambos casos, la fecundación de los oocitos luego del apareamiento es la que determinará dicho éxito en cada sexo.

En estos sistemas poliándricos existen dos tipos de fecundación, una que beneficia al primer macho y otra que beneficia al último macho con los que la hembra copula. El primer tipo, que confiere una ventaja al primer macho a través de un incremento en el éxito de fecundación, predice la existencia de machos con claras preferencias por hembras vírgenes (Bonduriansky, 2001; Simmons, 2001; Wedell et al., 2002; Knell & Webberley, 2004). En contraste, el sistema que confiere una ventaja al último macho que copula predice la evolución de rasgos que contribuyen a preservar la paternidad a través de prevenir o dificultar el desarrollo de futuras cópulas (Bonduriansky, 2001; Simmons, 2001; Wedell et al., 2002).

Podemos mencionar algunos ejemplos como el cuidado de la pareja (*mate guarding*) y/o la utilización de tapones copulatorios (e.g. Contreras-Garduño et al., 2006; Jarrige et al., 2016).

Estudios previos en algunos invertebrados muestran que los machos son capaces de distinguir entre hembras vírgenes y hembras ya apareadas, ajustando la intensidad del cortejo y el volumen de su eyaculado (Martin & Hosken, 2002; Siva-Jothy & Stutt, 2003; Carazo et al., 2004; Friberg, 2006; Thomas & Simmons, 2007). Sin embargo, en los triatominos - cuyas hembras de varias especies copulan de manera poliándrica (e.g. *T. infestans*, Manrique & Lazzari, 1995; *T. brasiliensis*, Vitta & Lorenzo, 2009; *R. prolixus*, Pontes & Lorenzo, 2012) - se desconoce al momento si los machos son capaces de regular su inversión reproductiva, ajustando sus preferencias de pareja e inversión espermática, de acuerdo al estatus de la hembra.

Sobre esta base, en el presente Capítulo se investigó si los machos de *R. prolixus* son sensibles al estatus reproductivo de las hembras, distinguiendo entre vírgenes *versus* recientemente apareadas. Específicamente, se estudió si los machos presentan preferencias por algún estatus reproductivo en particular de la hembra, expresada a través de cambios en su comportamiento de apareamiento y/o inversión espermática, así como en su éxito reproductivo. Al igual que en el Capítulo 4, se realizó una evaluación exhaustiva del comportamiento de la hembra, dado que los machos podrían modificar su elección e inversión espermática en base al mismo.

Como hipótesis se propone que los machos de *R. prolixus* prefieren hembras vírgenes como parejas sexuales. La predicción es que de existir al menos una hembra virgen disponible, los machos reducirán sus latencias de acercamiento, elegirán montarlas en primer lugar y les transferirán una mayor cantidad de espermatozoides. En cambio, cuando sólo existan disponibles hembras recientemente apareadas, su latencia de acercamiento se prolongará, copularán aleatoriamente con cualquiera de las potenciales parejas e invertirán una menor cantidad de espermatozoides en comparación con el invertido en hembras vírgenes.

## **Materiales y Métodos**

### *Insectos*

Se utilizaron individuos de *R. prolixus* criados y mantenidos en condiciones de laboratorio siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 1 (pág. 15). Las hembras utilizadas pertenecieron al grupo de *bajo riesgo* (BR) (Capítulo 2, pág. 27), mientras que los machos correspondieron al grupo de *alta calidad* (M+) (Capítulo 3, pág. 39), dado que éstos son los adultos selectivos o que se encuentran en mejores condiciones fisiológicas para afrontar los gastos que implica no aceptar una potencial pareja sexual. Brevemente, las hembras contaban con 12 días de edad y los machos con 28 días de edad, ambos



con un ayuno de 7 días previo a los experimentos. Bajo estas condiciones los insectos estuvieron aptos para la cópula.

### *Dispositivo experimental*

Para estudiar el comportamiento de los insectos se utilizó la arena experimental descrita en el Capítulo 3 (pág. 40). Brevemente, la misma consistió en un recipiente acrílico circular con dos frascos contenedores de acrílico fijados en lados opuestos del *set* por una de sus bases, separados por una barrera removible transparente perforada que permitía el paso de claves visuales y olfativas. En la base de dicho dispositivo se colocó un papel de filtro como substrato, el cuál fue reemplazado por uno nuevo al finalizar cada experimento. La temperatura del cuarto experimental se estableció en  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , y la humedad relativa varió entre 45-60%.

### *Grupos experimentales*

Cada experimento consistió de dos fases: evaluación previa y *test*. Durante la fase de evaluación, un macho focal fue expuesto simultáneamente a la presencia de dos hembras focales que podían o no diferir en su estatus reproductivo: hembras vírgenes o hembras recientemente apareadas. Todos los insectos se encontraban contenidos dentro de sus compartimientos, separados por barreras transparentes perforadas removibles. Durante la fase de *test*, los insectos focales fueron liberados.

De esta forma, se definió el tratamiento “estatus reproductivo de la hembra” con dos posibles niveles: hembra virgen (V) y hembra recientemente apareada (C). Los grupos intersexuales se establecieron al azar definiendo dos grupos experimentales: hembras con distinto estatus reproductivo (vírgenes vs. recientemente copuladas, V vs. C), y hembras con igual estatus reproductivo (recientemente copuladas vs. recientemente copuladas, C vs. C). Cabe destacar que analizar qué sucede en el grupo de recientemente copuladas vs. recientemente copuladas, nos permite establecer si una hembra ya apareada es receptiva y capaz de aceptar otra nueva pareja sexual, y por otro lado, estudiar la evaluación e inversión espermática que realiza el macho en tales hembras, para poder compararla con la de hembras vírgenes.

### *Procedimiento*

#### Estudio comportamental

Se realizaron 60 ensayos comportamentales (30 para cada grupo experimental). Previo a su utilización, todos los insectos fueron pesados para confirmar su estado nutricional (Mettler AJ100, Mettler Instrument Corporation, Hightstown, New Jersey, USA). Para obtener las hembras recientemente copuladas, se establecieron parejas de machos de alta calidad (M+) y hembras de bajo riesgo de oviposición de huevos infértiles (BR) en recipientes acrílicos de reducidas dimensiones (i.e. frascos de cría), de forma tal de maximizar el encuentro entre los sexos y que ocurra la cópula. Una vez finalizada la

misma - aproximadamente una hora después - y separados los insectos, se retiró la hembra y se la transportó a la arena experimental para los ensayos comportamentales.

Al comienzo de cada experimento se introdujo individualmente a cada insecto en su compartimiento correspondiente: una hembra focal en cada frasco contenedor lateral (2 en total), y un macho focal en el compartimiento mayor. Este último fue liberado en primer lugar y las hembras focales en segundo. De forma tal de evitar la perturbación mecánica de los insectos, se transportó a los mismos desde sus recipientes de contención hasta el *set* experimental utilizando un trozo de papel de filtro (Manrique et al., 2006).

Luego de su liberación, el macho podía explorar la arena libremente por 5 minutos, incluyendo el área inmediatamente adyacente a la base interna de los compartimientos que contenía a cada hembra focal. Posteriormente, se removieron simultáneamente las barreras permitiendo la interacción entre los insectos. El comportamiento de interacción macho/hembras fue monitoreado y registrado desde el comienzo de la fase de evaluación hasta la finalización de la cópula y postcópula (Pompilio et al., 2016).

A través de la observación directa y de video-filmaciones se cuantificó el comportamiento de los insectos, registrando el primer intento de monta del macho focal, su latencia a la monta, la ocurrencia de rechazos a la cópula por parte de la hembra, con quién finalmente copula, la latencia a la cópula, y la duración de la cópula y postcópula. Todos los experimentos fueron grabados utilizando una cámara web Genius FaceCam 1010 HD (KYE Systems Corp., Taipei, Taiwan), colocada a 35 cm sobre la arena, y bajo una intensidad de luz homogénea de 15 lux, permitiendo al experimentador observar los insectos sin perturbarlos (Pompilio et al., 2016). Luego de cada ensayo, los insectos fueron cuidadosamente removidos de la arena mediante un trozo de papel de filtro.

#### Inversión espermática y éxito reproductivo

Para investigar si existen diferencias en la inversión espermática de los machos entre los grupos experimentales de acuerdo al estatus reproductivo de las hembras, se consideró el número total de espermatozoides almacenados en las vesículas seminales de los machos, y se contabilizó los transferidos dentro del espermatóforo a las hembras, los almacenados por éstas al finalizar la cópula, y por último los descartados junto con los restos del/los espermatóforo/s, alrededor de 6hs de finalizada la cópula. Cabe destacar que se consideró de los resultados obtenidos previamente en el Capítulo 4 (pág. 61), el número de espermatozoides inicial que poseían los machos al momento del apareamiento.

Posteriormente al ensayo comportamental, sobre una muestra de 15 machos y hembras focales con las que éstos se aparearon, se realizó la disección abdominal y la extracción de las vesículas seminales de los machos, de las espermatecas de las hembras y los restos del/los espermatóforo/s descartado/s, por cada grupo experimental. Cada una de estas muestras fue procesada siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 4 (pág. 57), utilizando posteriormente una *Cámara de Neubauer* de doble cámara para el conteo de espermatozoides bajo microscopio óptico a 400X.

Por último, para estimar el éxito reproductivo de los insectos de cada grupo experimental, se seleccionó una muestra de 15 hembras apareadas con el macho focal y se las dejó en sus frascos de cría individualmente sin ser diseccionadas, contabilizando diariamente el número de huevos ovipuestos y eclosionados, durante 7 días consecutivos.

### *Análisis de datos*

Para estudiar la selectividad de los machos por hembras de un determinado estatus reproductivo, se comparó cuál fue aquella elegida en el primer intento de monta entre los grupos experimentales y con cuál copuló finalmente, mediante pruebas de  $\chi^2$  aplicando la corrección de Bonferroni. La existencia de diferencias en la frecuencia de rechazos a la cópula por parte de las hembras entre los tratamientos se evaluó utilizando un modelo de regresión logística, en el que la variable explicativa fue “estatus reproductivo (virgen/recientemente copulada)” y la variable dependiente fue “comportamiento de rechazo (Si/No)”. Para el análisis de la latencia del macho al primer intento de monta y a la cópula, y la duración de la cópula y de la postcópula, se compararon las mediciones entre los grupos experimentales mediante ANOVAs de un factor. Similarmente, para contrastar entre los diferentes tratamientos la transferencia de espermatozoides por los machos y el almacenamiento de los mismos por las hembras, y su éxito reproductivo final (n° de huevos ovipuestos y eclosionados), se realizaron también ANOVAs de un factor. En los casos en que fue requerido, se efectuaron contrastes a *posteriori* a través del *test* de Tukey. Todos los resultados fueron analizados utilizando el paquete estadístico InfoStat® v2016p (Di Rienzo et al., 2016).

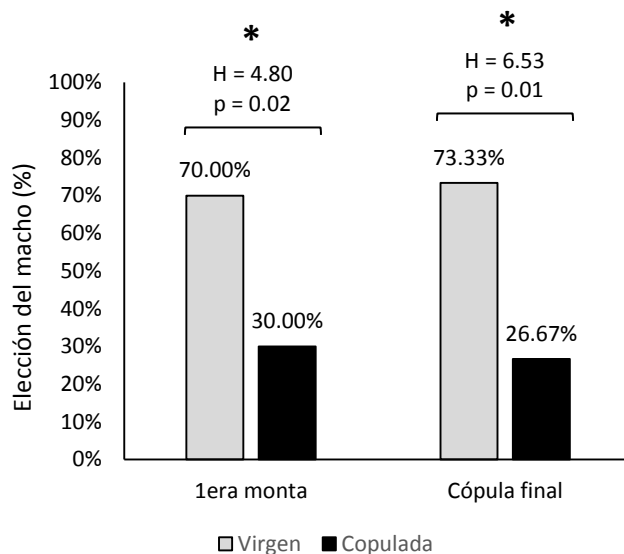
## **Resultados**

### *Estudio comportamental*

Al evaluar la preferencia del macho por una hembra de determinado estatus reproductivo como pareja sexual, se encontró que los machos eligieron primero a las hembras vírgenes en un 70% de las veces ( $\chi^2$ :  $H=4.80$ ,  $p=0.02$ ,  $N=60$ ), intentando montarlas e iniciar el apareamiento. Esta elección se mantuvo aún en presencia de comportamientos de rechazo de la hembra, observándose que los machos copularon en un 73.33% de las veces con las hembras vírgenes ( $\chi^2$ :  $H=6.53$ ,  $p=0.01$ ,  $N=60$ ) (Fig. 1).

Considerando la frecuencia de los comportamientos de rechazo en las hembras en función de su estatus reproductivo, los resultados mostraron que un 80% de las hembras recientemente copuladas expresaron tales comportamientos de discriminación activa, en comparación con las vírgenes donde solo lo hizo el 25% (Fig. 2). Los resultados de la regresión logística, con tratamiento “estatus reproductivo” (virgen/recientemente copulada) y “comportamiento de rechazo” (Si/No) como variable dependiente, mostraron que la exhibición de rechazos por parte de la hembra aumentó significativamente cuando ésta

se encuentra recientemente copulada ( $p=0.0016$ ) (Tabla 1). Así, la probabilidad de que el intento de apareamiento del macho focal sea rechazado por la hembra se incrementó a 73% cuando dicha hembra fue recientemente copulada, resultado que se redujo a 30% cuando ésta era virgen (Tabla 2, Fig. 3).



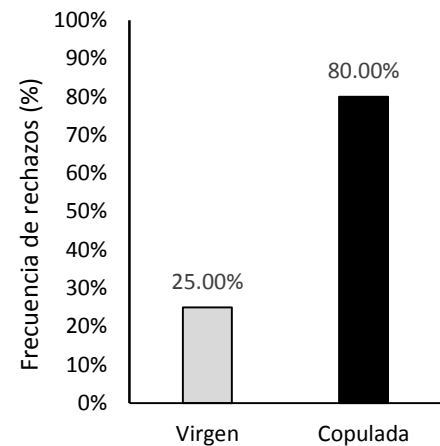
**Figura 1.** Selección del macho focal por una pareja sexual de determinado estatus reproductivo. 1era monta: primera hembra elegida por el macho para aparearse. Cópula final: pareja sexual con la que el macho se apareó finalmente. \* indican diferencias significativas (N=60).

|                             | Estimador | Z     | p-valor |
|-----------------------------|-----------|-------|---------|
| <b>Estatus reproductivo</b> | -1.83     | -2.67 | 0.0016* |

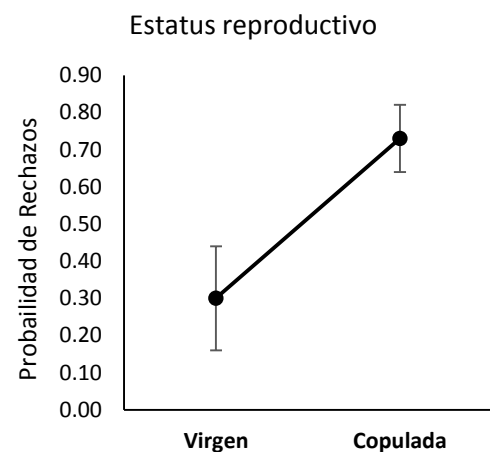
**Tabla 1.** Resultados de la regresión logística para la frecuencia de rechazos de la hembra en función de su estatus reproductivo. \* indican diferencias significativas (N=60).

| Estatus reproductivo | Probabilidad | E.E. |          |
|----------------------|--------------|------|----------|
| <b>Virgen</b>        | 0.30         | 0.14 | <b>A</b> |
| <b>Copulada</b>      | 0.73         | 0.09 | <b>B</b> |

**Tabla 2.** Probabilidad de rechazo por la hembra de acuerdo a su estatus reproductivo. EE: Error Estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $p<0.05$ ) (N=60).



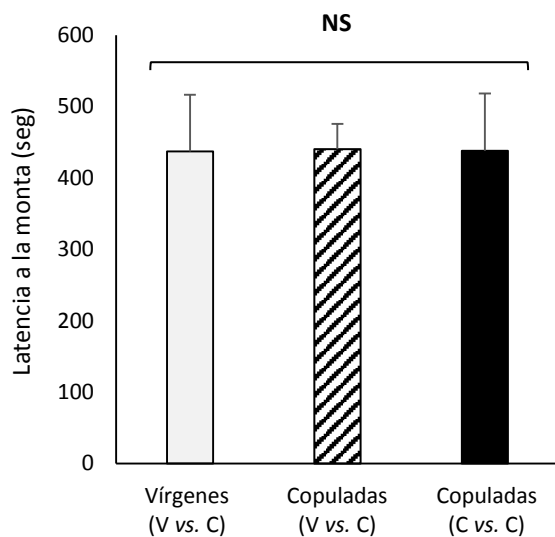
**Figura 2.** Frecuencia de rechazos por parte de la hembra de acuerdo a su estatus reproductivo. (N=60).



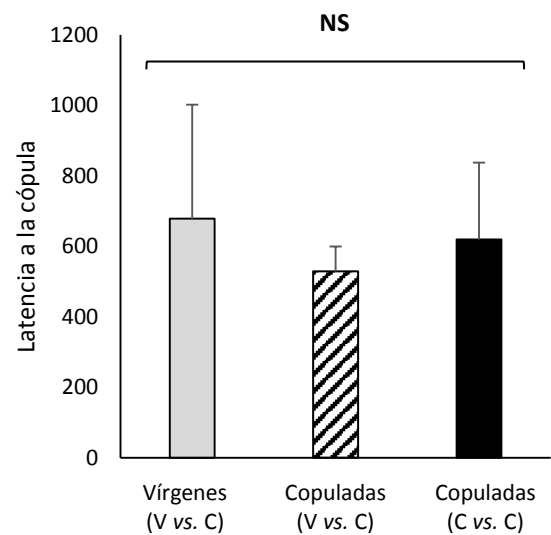
**Figura 3.** Probabilidad de rechazos a la cópula (Media $\pm$ EE) de acuerdo al estatus reproductivo de las hembras (N=60).

Al evaluar las latencias comportamentales del macho, se observaron tres escenarios: elección de la hembra virgen en presencia de una recientemente apareada (V vs. C) (25 de 30 casos), elección de la hembra recientemente copulada en presencia de una virgen (V vs. C) (5 de 30 casos), y elección de una

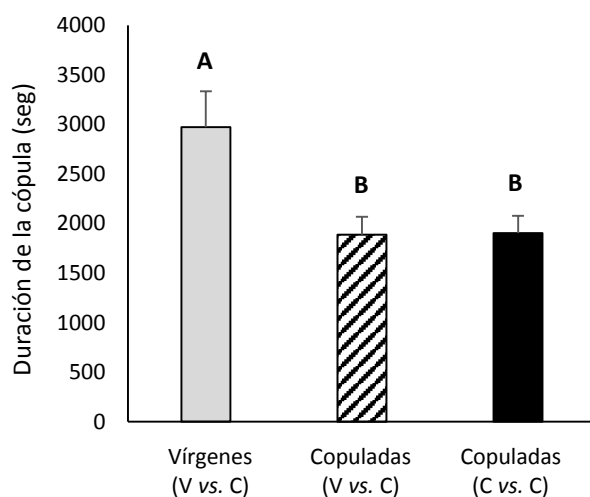
hembra recientemente apareada en presencia de otra similar (C vs. C) (30 de 30 casos). Contrastando las latencia a la primera monta y a la cópula entre los grupos experimentales no se encontraron diferencias significativas (ANOVA Lat. 1° monta:  $F=0.01$ ,  $p=0.9132$ ,  $N=60$ ; ANOVA Lat. Cópula:  $F=1.21$ ,  $p=0.2111$ ,  $N=60$ ), destacándose que el tiempo de evaluación tanto para hembras vírgenes como para hembras recientemente copuladas fue similar, independientemente en éstas últimas de si la otra hembra era virgen o con experiencia reproductiva previa (Fig. 4 y 5).



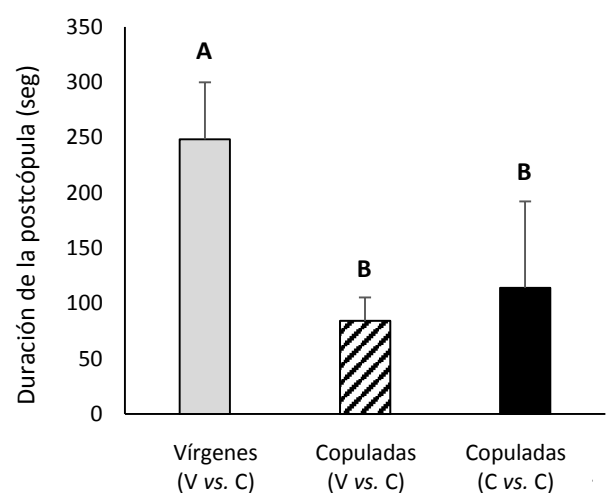
**Figura 4.** Latencia a la primera monta del macho en función del estatus reproductivo de las hembras. NS: No significativo ( $p>0.05$ ) ( $N=60$ ).



**Figura 5.** Latencia a la cópula en función del estatus reproductivo de las hembras. NS: no significativo ( $p>0.05$ ) ( $N=60$ ).



**Figura 6.** Duración de la cópula en machos focales de acuerdo al estatus reproductivo de su pareja sexual. Letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $p<0.05$ ) ( $N=60$ ).

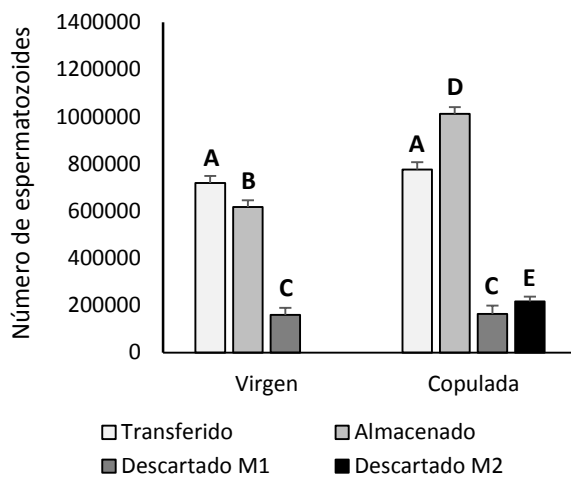


**Figura 7.** Duración de la postcópula en machos focales de acuerdo al estatus reproductivo de su pareja sexual. Letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $p<0.05$ ) ( $N=60$ ).

Al analizar la duración de la cópula entre los distintos grupos experimentales se observó que la misma fue significativamente más corta cuando el macho se apareaba con hembras recientemente

copuladas (ANOVA:  $F=64.89$ ,  $p<0.0001$ ,  $N=60$ ) (Tukey:  $p<0.05$ ,  $N=60$ ) (Fig. 6). A su vez, al considerar la duración de la postcópula, se evidenció un aumento significativo en la permanencia del macho sobre el dorso de la hembra seleccionada como pareja sexual una vez finalizada la cópula, cuando ésta era virgen (ANOVA:  $F=75.25$ ,  $p<0.0001$ ,  $N=60$ ) (Tukey:  $p<0.05$ ,  $N=60$ ).

### Inversión espermática y éxito reproductivo

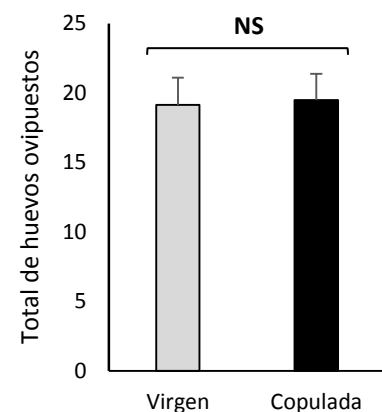


**Figura 8.** Número de espermatozoides transferidos por los machos, y almacenados y descartados por las hembras de acuerdo a su estatus reproductivo. Letras distintas representan diferencias significativas entre grupos ( $p<0.05$ ) ( $N=30$ ).

Para comparar la inversión espermática de acuerdo al estatus reproductivo de las hembras, se utilizó el número de espermatozoides inicial que poseían los machos al momento del apareamiento, determinado en el Capítulo 4 (pág. 57, Tabla N°3, *Producido*). A partir de este valor y de los conteos realizados en el presente Capítulo, se procedió a reconstruir el número de espermatozoides transferidos por los machos y los almacenados por las hembras, destacando que las recientemente apareadas poseían espermatozoides retenidos de dos cópulas (i.e. una previa a su utilización experimental y otra obtenida con el macho focal) (Tabla 3).

| Macho focal                   | # espermatozoides | %       |
|-------------------------------|-------------------|---------|
| Producido                     | 1283416.67        | 100.00% |
| Transferido (espermátforo)    | 775583.33         | 60.43%  |
| Restante en vesículas         | 507833.33         | 39.57%  |
| Hembra virgen                 | # espermatozoides | %       |
| Retiene en espermatecas       | 616372.81         | 79.47%  |
| Descarta en espermátforo      | 159210.53         | 20.53%  |
| Hembra recientemente copulada | # espermatozoides | %       |
| Retiene en espermatecas       | 603869.18         | 77.86%  |
|                               | 533135.98         | 68.74%  |
| Descarta en espermátforo 1    | 163000.00         | 22.14%  |
| Descarta en espermátforo 2    | 217105.26         | 31.26%  |

**Tabla 3.** Número de espermatozoides producidos y transferidos por machos, y almacenados por hembras de distinto estatus reproductivo. Se destaca en hembras recientemente copuladas el número de espermatozoides retenidos en cada una de sus oportunidades de apareamiento ( $N=30$ ).



**Figura 9.** Número total de huevos ovipuestos en función del estatus reproductivo de la hembra. NS: no significativo ( $p>0.05$ ) ( $N=30$ ).

Así, al contrastar la transferencia de espermatozoides en los machos no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales (ANOVA:  $F=0.57$ ,  $p=0.4550$ ,  $N=30$ ) (Fig. 8), siendo invariable de acuerdo al estatus reproductivo de su pareja sexual. Sin embargo, al analizar el almacenamiento en las espermatecas por parte de las hembras, se encontró que aquellas recientemente copuladas retienen significativamente una mayor cantidad de esperma (correspondiente a la suma de los eyaculados de los dos eventos de apareamiento) (ANOVA:  $F=82.70$ ,  $p<0.0001$ ,  $N=30$ ) (Tukey:  $p<0.05$ ,  $N=30$ ) (Fig. 8). Se destaca, a través de la reconstrucción realizada aplicando las fórmulas expuestas en el Capítulo 4 (ver pág. 57), que del total de espermatozoides que poseían los machos al momento del apareamiento, éstos transfirieron el 60.43% en la cópula. Por su parte, las hembras recientemente apareadas almacenaron de uno de los machos el 77.86% y del otro el 68.74%, descartando los restantes espermatozoides junto con los espermatóforos correspondientes a las dos cópulas (Tabla 3, *Espermatóforo 1* y *Espermatóforo 2*, respectivamente).

Por último, al evaluar el éxito reproductivo de los individuos no se encontraron diferencias significativas entre el número de huevos fecundados y eclosionados por hembras vírgenes y recientemente copuladas (ANOVA:  $F=0.04$ ,  $p<0.8411$ ,  $N=30$ ), observándose que las hembras ovipusieron entre 19 y 20 huevos al cabo de una semana (Fig. 9).

## Discusión

En el presente Capítulo se estudió si los machos de *R. prolixus* consideran atributos biológicamente relevantes de las hembras al momento de seleccionarlas como potenciales parejas sexuales. La variable manipulada, el estatus reproductivo de la hembra (virgen vs. con experiencia reproductiva previa), resultó ser claramente una variable clave para los machos, observándose que la mayoría de ellos exhiben una preferencia por hembras vírgenes. Tal elección se hizo evidente a través de una mayor cantidad de primeros intentos de apareamiento por parte del macho focal en situaciones de elección simultánea (hembra virgen vs. hembra recientemente copulada). Específicamente, el 70% de los machos se aproximó e intentó montar en primer lugar a las hembras vírgenes, observándose finalmente que el 73% de las cópulas ocurrió con tales hembras. Este pequeño aumento en el porcentaje se debió a que cinco machos intentaron aparearse en primer lugar con hembras recientemente copuladas, que luego de haber sido rechazados por las mismas se aproximaron a las vírgenes. En relación a este punto, la frecuencia de exhibición de comportamientos de rechazo difirió entre hembras vírgenes y recientemente copuladas, siendo en estas últimas significativamente mayor. Es importante aclarar que la medida utilizada para evaluar preferencia del macho (primer intento de monta) no se vio afectada por el comportamiento de la hembra, ya que fue siempre el macho quien tomó la iniciativa y ninguna hembra se acercó espontáneamente al macho. Por otra parte, el primer intento de monta se dio en forma previa

al comportamiento de aceptación/rechazo de la hembra. Con lo cual la preferencia del macho no se vio influenciada por la decisión de la hembra (no ocurre lo mismo con el segundo intento de cópula o con la cópula, que sí dependen del comportamiento de aceptación/rechazo de la hembra y por eso no se consideraron como medidas de preferencia).

La preferencia del macho por hembras vírgenes se selecciona a nivel evolutivo cuando existe una variación en el valor reproductivo de las hembras, y cuando el costo de discriminarlas por parte de los machos es reducido (Andersson, 1994; Dewsbury, 1982; Bonduriansky, 2001; Servedio & Lande, 2006). Esto se debería a que si un macho invierte tiempo cortejando a una hembra copulada o no receptiva, incursionaría en gastos energéticos que no se traducirán en un aumento de su éxito reproductivo (Kelso & Verrell, 2002).

Cuando evaluamos la inversión del macho de *R. prolixus* de acuerdo al estatus reproductivo de las hembras, observamos en primer lugar que la duración de la cópula y postcópula fue significativamente mayor cuando los machos se aparearon con hembras vírgenes. Cabe destacar que tales duraciones, en el caso en que el macho copuló con hembras ya apareadas, resultaron similares entre sí en ambos grupos (i.e. vírgenes vs. recientemente copuladas, y recientemente copuladas vs. recientemente copuladas). Esto significa que aún en la minoría de los casos en los que el macho eligió a la hembra ya copulada, se comportó igual que con las del grupo control (donde ambas hembras habían sido copuladas). Podemos especular entonces que estos machos reconocieron el estatus reproductivo de la hembra elegida, y que una duración de la cópula y postcópula más prolongada, podría relacionarse a un cuidado de la pareja y el resguardo de su éxito reproductivo (Alcock, 1994). Como se mencionó anteriormente, en sistemas poliándricos donde existe un alto riesgo de competencia espermática generada por múltiples apareamientos (Parker, 1970; Simmons, 2001), aquellas estrategias del macho que prevengan o dificulten futuras cópulas de su pareja sexual contribuirán a preservar su paternidad (Bonduriansky, 2001; Simmons, 2001; Wedell et al., 2002).

En segundo lugar, cuando evaluamos la inversión espermática de los machos, la preferencia por las hembras vírgenes no se vio reflejada en el número de espermatozoides transferidos, ya que éstos transfirieron la misma cantidad de esperma independientemente del estatus de la hembra, rechazando, por lo tanto, la hipótesis planteada. Estos resultados, sumados a los del Capítulo anterior, refuerzan la idea de que los machos de *R. prolixus* no administran la cantidad de esperma invertido en las hembras, aun siendo capaces de reconocer y exhibir claras preferencias comportamentales asociadas al estatus de las mismas.

Por el lado de las hembras, se halló que las recientemente apareadas no retuvieron exactamente la misma cantidad de esperma entre su primera y segunda cópula. Si bien la diferencia fue mínima (aproximadamente 8%), la misma fue estadísticamente significativa. Se desconoce, sin embargo, si esta diferencia puede llegar a repercutir en el éxito reproductivo de los machos. La metodología utilizada no permitió tampoco discernir cuál de los dos machos se benefició con el almacenamiento diferencial de



esperma, dado que no fue posible identificar a qué macho correspondía cada uno de los espermatozoides descartados por las hembras con experiencia reproductiva previa. Sin embargo, a juzgar por la preferencia que los machos evidenciaron por hembras vírgenes se podría especular con que el sistema de fecundación estaría favoreciendo al primer macho que copula.

Un resultado interesante que podemos rescatar sobre los comportamientos de rechazo a la cópula observados en hembras recientemente apareadas - tanto en presencia de una virgen como cuando ambas eran recientemente copuladas -, es que la experiencia reproductiva reciente de una hembra redujo su motivación a la cópula. Esta inducción de un período refractario luego del apareamiento se encuentra ampliamente documentada en diversas especies de insectos (Thornhill & Alcock, 1983). Fowler & Partridge (1989) por ejemplo, mencionan que en *Drosophila melanogaster* la explicación podría estar relacionada con evitar constantes apareamientos con múltiples parejas sexuales, que impliquen una reducción en la sobrevivencia de la hembra. Otras explicaciones se relacionarían con el macho persiguiendo mantener el control de su pareja sexual, sea mediante la transferencia de compuestos químicos en su eyaculado que reducirían la motivación a la cópula de la hembra, o inclusive a través de estimulaciones mecánicas del propio espermatozoide dentro del atrio femenino, que evitarían el ingreso de esperma de nuevos machos (Sugawara, 1979; Leopold, 1976; Chen, 1984; Simmons & Gwynne, 1991).

Poco se conoce acerca de las claves que utilizan los machos para evaluar el estatus de las hembras. Se sabe, sin embargo, que las feromonas liberadas por ellas cumplen un rol clave en la comunicación intersexual, señalizando la receptividad sexual e influenciando la elección de pareja (Johansson & Jones, 2007). En arañas, por ejemplo, la composición y/o concentración de compuestos químicos depositados en los hilos de seda o presentes en la cutícula pueden cambiar con la edad o el estado reproductivo de la hembra (Trabalon et al., 1997; Papke et al., 2001). Por otra parte, los machos son capaces de percibir variaciones estado-dependientes en las claves químicas asociadas a variaciones en el estatus de las hembras (Andrade & Kasumovic, 2005; Roberts & Uetz, 2005; Stoltz et al., 2007; Baruffaldi & Costa, 2010).

Se desconoce en triatominos cuáles son las claves que permiten a los machos distinguir el estatus reproductivo de las hembras. Se sabe que los machos son atraídos a través de feromonas sexuales emitidas por las hembras en varias especies, incluyendo a *R. prolixus* (Manrique & Lazzari, 1995; Manrique et al., 2006; Crespo & Manrique, 2007; Pontes et al., 2008; Vitta et al., 2009; Pontes & Lorenzo, 2012; Zacharias et al., 2010; May-Concha et al., 2012). Si existe una liberación diferencial de los compuestos volátiles presentes en el *blend* de estas feromonas que indiquen al macho si una hembra ha sido o no copulada, permanece al presente en el terreno especulativo. En *R. prolixus*, experimentos en curso muestran que el macho podría distinguir una hembra de un macho a través de la composición diferencial de sus lípidos cuticulares (Alicia Lorenzo Figueiras, comunicación personal), similar a lo ya observado en *Triatoma infestans* (Cocchiararo-Bastias et al., 2011). Sin embargo, no se conoce si el macho de *R. prolixus* podría distinguir distintos estados reproductivos de la hembra a través de estas claves de quimio-recepción de contacto. Como mencionamos previamente, en nuestro *set-up* experimental los machos no

tenían acceso al contacto físico con las hembras, pudiendo percibir las a través de claves volátiles y/o visuales, con lo cual especulamos con que éstas serían las potencialmente involucradas en la evaluación de la calidad de una pareja sexual.

## REFERENCIAS

- Alcock J.** 1994. Postinsemination Associations Between Males and Females in Insects: The Mate-Guarding Hypothesis. *Annual Review of Entomology*. 39(1): 1-21.
- Andersson M. B.** 1994. Sexual selection. Princeton University Press. Princeton, New Jersey. 624pp.
- Andrade M. C. B. & Kasumovic M. M.** 2005. Terminal Investment Strategies and Male Mate choice: Extreme Tests of Bateman. *Integrative and Comparative Biology*. 45(5): 838-847.
- Arnqvist G. & Rowe L.** Sexual Conflict. Biological Sciences Monographs in Behavior and Ecology. Princeton University Press. Princeton, New Jersey. 352 pp.
- Baruffaldi L. & Costa F. G.** 2010. Changes in male sexual responses from silk cues of females at different reproductive states in the wolf spider *Schizocosa malitiosa*. *Journal of Ethology*. 28: 75.
- Bonduriansky, R.** 2001. The evolution of male mate choice in insects: a synthesis of ideas and evidence. *Biological Reviews*, 76: 305-339.
- Carazo P., Sanchez E., Font E. & Desfilis E.** 2004. Chemosensory cues allow male *Tenebrio molitor* beetles to assess the reproductive status of potential mates. *Animal Behaviour*. 68(1): 123-129.
- Chen P. S.** 1984. The functional-morphology and biochemistry of insect male accessory-glands and their secretions. *Annual Review of Entomology*. 29: 233-255.
- Cocchiararo-Bastias L. M., Mijailovsky S. J., Calderon-Fernández G. M., Lorenzo Figueiras A. N. & Juárez M. P.** 2011. Epicuticle Lipids Mediate Mate Recognition in *Triatoma infestans*. *Journal of Chemical Ecology*. 37(3): 246-252.
- Contreras-Garduño J., Peretti A. V. & Córdoba-Aguilar A.** 2006. Evidence that Mating Plug is Related to Null Female Mating Activity in the Scorpion *Vaejovis punctatus*. *Ethology*. 112(2): 152-163.
- Crespo J. G. & Manrique G.** 2007. Mating behavior of the haematophagous bug *Triatoma infestans*: Role of Brindley's and metasternal glands. *Journal of Insect Physiology*. 53: 708-714.
- Dewsbury D.** 1982. Ejaculate cost and male choice. *The American Naturalist*. 119: 601-610.

- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W.** InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Fowler K. & Partridge L.** 1989. A cost of mating in female fruitflies. *Nature*. 338: 760-761.
- Friberg U.** 2006. Male perception of female mating status: its effect on copulation duration, sperm defence and female fitness. *Animal Behaviour*. 72: 1259-1268.
- Jarrige A., Kassis A., Schmoll T. & Goubault M.** 2016. Recently mated males of a lek-mating insect intensify precopulatory mate guarding under male competition. *Animal Behaviour*. 117: 21-34.
- Johansson B. G. & Jones T. M.** 2007. The role of chemical communication in mate choice. *Biological Reviews*. 82(2): 265-289.
- Kelso E. C. & Verrell P. A.** 2002. Do male veiled chameleons, *Chamaeleo calyptratus*, adjust their courtship displays in response to female reproductive status? *Ethology*. 108: 495-512.
- Knell R. J. & Webberley K. M.** 2004. Sexually transmitted diseases of insects: distribution, evolution, ecology and host behaviour. *Biological Reviews*. 79: 557-581.
- Leopold R. A.** 1976. The role of male accessory glands in insect reproduction. *Annual Review of Entomology*. 21: 199-221.
- Manrique G. & Lazzari C. R.** 1995. Existence of a sex pheromone in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae): I Behavioural evidences. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 90(5): 645-648.
- Manrique G., Vitta A. C. R., Ferreira R. A., Zani C. L., Unelius C. R., Lazzari C. R., Diotaiuti L., Lorenzo M. G.** 2006. Chemical communication in Chagas disease vectors. Source, identity and potential function of volátiles released by the metasternal and Brindley's glands of *Triatoma infestans* adults. *Journal of Chemical Ecology* 32: 2035-2052
- Martin O. Y. & Hosken D. J.** 2002. Strategic ejaculation in the common dung fly *Sepsis cynipsea*. *Animal Behaviour*. 63(3): 541-546.
- May-Concha I., Rojas J. C., Cruz-López L., Millar J. G. & Ramsey J. M.** 2012. Volatile compounds emitted by *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease: chemical analysis and behavioural evaluation. *Medical and Veterinary Entomology*. 27(2): 165-174.
- Papke M. D., Riechert S. E. & Schulz S.** 2001. An airborne female pheromone associated with male attraction and courtship in a desert spider. *Animal Behaviour*. 61(5): 877-886.
- Parker G. A.** 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews*. 45: 525-567.

- Parker G. A. & Pizzari T.** 2010. Sperm competition and ejaculate economics. *Biological Reviews*. Cambridge Philosophical Society. 85(4): 897-934.
- Pompilio L., González Franco M., Chisari L. B. & Manrique G.** 2016. Female choosiness and mating opportunities in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Behaviour*. 153(15): 1863-1878.
- Pontes G. B. & Lorenzo M. G.** 2012. Female metasternal gland odours mediate male aggregation in *Rhodnius prolixus*, a triatomid bug. *Medical and Veterinary Entomology*. 26(1): 33-36.
- Pontes G. B., Bohman B., Unelius C. R. & Lorenzo M. G.** 2008. Metasternal Gland Volatiles and Sexual Communication in the Triatomine Bug, *Rhodnius prolixus*. *Journal of Chemical Ecology*. 34(4): 450-457.
- Roberts J. A. & Uetz G. W.** 2005. Information content of female chemical signals in the wolf spider, *Schizocosa ocreata*: male discrimination of reproductive state and receptivity. *Animal Behaviour*. 70(1): 217-223.
- Servedio M. R. & Lande R.** 2006. Population genetic models of male and mutual mate choice. *Evolution*. 60(4): 674-685.
- Simmons L. W.** 2001. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Monographs in Behavior and Ecology*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.
- Simmons L. W. & Gwynne D. T.** 1991. The refractory period of female katydids (Orthoptera: Tettigoniidae): sexual conflict over the remating interval? *Behavioral Ecology*. 2(4): 276-282.
- Siva-Jothy M. T. & Stutt A. D.** 2003. A matter of taste: direct detection of female mating status in the bedbug. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 270: 649-652.
- Stoltz J. A., McNeil J. N. & Andrade M. C. B.** 2007. Males assess chemical signals to discriminate just-mated females from virgins in redback spiders. *Animal Behaviour*. 74: 1669-1674.
- Sugawara T.** 1979. Stretch reception in the bursa copulatrix of the butterfly, *Pieris rapae crucivora*, and its role in behavior. *Journal of Comparative Physiology*. 130: 191-199.
- Thomas M. & Simmons L.** 2007. Male crickets adjust the viability of their sperm in response to female mating status. *American Naturalist*. 170: 190-195.
- Thornhill R. & Alcock J.** 1983. *The evolution of insect mating systems*. Harvard University Press. Cambridge, Mass. 547 pp.
- Trabalon M., Bagnères A. G. & Roland C.** 1997. Contact Sex Signals in Two Sympatric Spider Species, *Tegenaria domestica* and *Tegenaria pagana*. *Journal of Chemical Ecology*. 23(3): 747-758.

- Vitta A. C. R. & Lorenzo M.** 2009. Copulation and Mate Guarding Behavior in *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medicin Entomology*. 46(4): 789-795.
- Vitta A. C. R., Bohman B., Unelius C. R. & Lorenzo M. G.** 2009. Behavioral and Electrophysiological Responses of *Triatoma brasiliensis* Males to Volatiles Produced in the Metasternal Glands of Females. *Journal of Chemical Ecology*. 35(10): 1212-1221.
- Wedell N., Gage M. J. G. & Parker G. A.** 2002. Sperm competition, male prudence and sperm-limited females. *Trends in Ecology & Evolution*. 17: 313-320.
- Zacharias C. A., Pontes G. B., Lorenzo M. G. & Manrique G.** 2010. Flight Initiation by Male *Rhodnius prolixus* is Promoted by Female Odors. *Journal of Chemical Ecology*. 36(4): 449-451.

***Capítulo 6.***  
**Efectos de la disponibilidad de múltiples  
hembras sobre el comportamiento  
sexual del macho**

*"Eyes see only what is possible.*

*A trained mind can explore the impossible."*

*—Kefnet, god of knowledge*

## Capítulo 6. Efectos de la disponibilidad de múltiples hembras sobre el comportamiento sexual del macho

### Introducción

Para estudiar el comportamiento reproductivo de una especie resulta clave considerar la influencia del entorno natural que la rodea (Ruhela & Sinha, 2010). En este sentido, *R. prolixus* es una especie gregaria y la presencia de un contexto social (definido ya sea por la presencia de machos y/o hembras extras) es crucial para expresión de comportamientos ligados a la elección de pareja, como por ejemplo, el rechazo a la cópula exhibido por las hembras (Pompilio et al., 2016). Es por esta razón que el contexto social ha sido incluido a lo largo de los distintos experimentos realizados. A tal fin, los diseños aplicados permitieron evaluar a una pareja focal en un contexto social sin que el mismo interfiriera en la claridad y precisión de los resultados, ya que los individuos que conformaban tal contexto se encontraban presentes pero físicamente inaccesibles. A diferencia de los Capítulos anteriores, en el presente Capítulo se decidió evaluar a un conjunto controlado de individuos que interactúan libremente entre sí, con el objetivo de estudiar los efectos de la disponibilidad de múltiples hembras sobre el comportamiento sexual del macho. Este tipo de abordaje no sólo es adecuado para responder las preguntas planteadas en este Capítulo sino que también implica un mayor acercamiento hacia el entorno natural de los individuos (Martin & Bateson, 1993; Barnard, 2004; Ruhela & Sinha, 2010).

Al estudiar el comportamiento reproductivo de un conjunto de individuos, el *sex ratio* resulta una variable clave a considerar. Esto se debe a que la disponibilidad de oportunidades de apareamiento van a depender fundamentalmente de la proporción de machos y hembras sexualmente activos (i.e. *sex ratio* operacional, OSR) (Emlen & Oring, 1977). Cuanto mayor es el desbalance en el OSR, mayor es la competencia entre los miembros del sexo limitado (Emlen, 1976). Dado que en la mayoría de las especies es el macho el sexo móvil y quien inicia el cortejo y la cópula (Andersson, 1994), existen incontables estudios que consideran la competencia entre machos cuando son las hembras el sexo limitado, y a su vez, cómo esto se traduce en modificaciones de su comportamiento pre y postcopulatorio (Parker, 1970; Dewsbury, 1982; Clark, 1988; Berglund, 1993; Alcock, 1994; Jirotkul, 1999; Mills & Reynolds, 2003; Arnqvist & Rowe, 2005; Weir et al., 2011; Rosa et al., 2017). Sin embargo, no existe tan amplio conocimiento sobre qué sucede cuando es el macho el sexo limitado.

En escenarios con un *sex ratio* sesgado hacia las hembras, serán los machos los que verán afectado su grado de selectividad debido a que poseen múltiples parejas sexuales disponibles. Así, la estrategia de apareamiento que maximiza su éxito reproductivo sería la de aparearse con tantas hembras como sea posible (Parker & Pizzari, 2010). Si consideramos que la producción del eyaculado es algo costoso para el macho (Dewsbury, 1982; Reznick, 1985; Simmons, 2001; Parker & Pizzari, 2010), aparearse repetidamente con la misma hembra no se traduce en un aumento de tal éxito. La consecuencia que se observa es que el macho disminuye su interés reproductivo por dicha hembra, reduciendo su inversión

espermática (Koene & Ter Maat, 2007), su esfuerzo en realizar cortejos elaborados (Kelley et al., 1999), y finalmente su frecuencia de cópula (Hettzey et al., 2009).

Esta modificación de la selectividad del macho se la conoce como efecto *Coolidge* y se caracteriza por una disminución de la motivación del macho por copular reiteradamente con hembras con las que se ha apareado, combinado con un aumento de su interés sexual por hembras novedosas, lo que contribuiría a distribuir de forma más óptima su inversión espermática, maximizando el éxito reproductivo (Wilson et al., 1963; Dewsbury, 1981; Jordan & Brooks, 2010). Este efecto fue observado inicialmente en ratas (Beach & Jordan, 1956) y luego en otros mamíferos (Dewsbury, 1981). También se halló en aves (Pizzari et al., 2003), reptiles (Tokarz, 1992), anfibios (Donovan & Verrell, 1991), peces (Kelley et al., 1999) y en algunos grupos de insectos, como abejas (Barrows, 1975; Wcislo, 1992), moscas (Ödeen & Moray, 2008) y escarabajos (Arnaud & Haubruge, 1999). Sin embargo, a pesar de que existen numerosos estudios sobre elección de pareja y los efectos del *sex ratio* sesgado hacia los machos, llamativamente han habido muy pocos que investiguen el efecto *Coolidge per se* en insectos.

En este Capítulo investigamos la posible influencia de la disponibilidad de múltiples parejas sexuales sobre el comportamiento reproductivo de machos de *R. prolixus*. Específicamente, se analizaron cambios en los tiempos de inicio del cortejo, inicio a la cópula y duración del apareamiento. También se estudió si la inversión espermática se modifica de acuerdo a la presencia de un mayor número de hembras (i.e. cantidad final de espermatozoides transferidos). Como hipótesis se postula que los machos tenderán a reducir al mínimo el tiempo de inicio al cortejo y cópula ante una mayor disponibilidad de parejas, seleccionando para cada evento de apareamiento a una nueva hembra. Se predice también que cuando el macho se haya apareado con todas las hembras, la latencia al siguiente comportamiento de cortejo y a la cópula se prolongará, eligiendo aleatoriamente a cualquiera de las hembras.

Por otra parte, el diseño implementado permitió evaluar en un contexto más cercano al natural, un dato que hasta ahora se desconoce y es el tiempo que un macho necesita para volver a formar un espermatozoides y copular. El diseño planteado potencia en grupos con múltiples hembras vírgenes la motivación del macho por volver a aparearse. La predicción es que los resultados de una evaluación clásica (macho y hembra focales) arrojarán resultados muy diferentes a los obtenidos en situaciones de interacción múltiple con más de una hembra disponible.

## **Materiales y Métodos**

### *Insectos*

Se utilizaron individuos de *R. prolixus* criados y mantenidos en condiciones de laboratorio siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 1 (pág. 15). Las hembras utilizadas pertenecieron al grupo de *bajo riesgo* (BR) (Capítulo 2, pág. 27), mientras que los machos correspondieron al grupo de *alta*



*calidad* (M+) (Capítulo 3, pág. 39), dado que éstos son los adultos selectivos. Brevemente, las hembras contaban con 12 días de edad y los machos con 28 días de edad, ambos con un ayuno de 7 días previo a los experimentos. Bajo estas condiciones los insectos estuvieron aptos para la cópula.

#### *Dispositivo experimental*

Para estudiar el comportamiento de los insectos se utilizó una arena experimental consistente en un recipiente de vidrio circular de 10.0 cm de diámetro y 1.5 cm de alto, cubierto por una tapa transparente removible. En la base del dispositivo se colocó un papel de filtro como sustrato, el cuál fue reemplazado por uno nuevo al finalizar cada experimento. La temperatura del cuarto experimental se estableció en  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , y la humedad relativa varió entre 45-60%.

#### *Grupos experimentales*

En cada experimento un macho focal fue expuesto a la presencia de un número variable de hembras focales, todas en un comienzo *naïve* y con el mismo estatus reproductivo (vírgenes).

De esta forma, se definió el tratamiento “número de hembras disponibles” con tres posibles niveles: una hembra focal (H1), dos hembras focales (H2) y tres hembras focales (H3). Los grupos intersexuales se establecieron al azar definiendo tres grupos experimentales: un macho focal en presencia de una (H1), de dos (H2) o de tres hembras focales (H3), respectivamente. Cabe destacar que en este diseño el macho focal puede evaluar y seleccionar a las hembras simultáneamente disponibles.

#### *Procedimiento*

Se realizaron 30 ensayos comportamentales, correspondiendo 10 a cada grupo experimental. Previo a su utilización, todos los insectos fueron pesados para confirmar su estado nutricional (Mettler AJ100, Mettler Instrument Corporation, Hightstown, New Jersey, USA). Al comienzo de cada ensayo se depositó a cada individuo en el centro de la arena, transportándolo desde sus recipientes de contención hasta el *set* experimental, utilizando un trozo de papel de filtro de forma tal de evitar la perturbación mecánica de los insectos (Manrique et al., 2006). En este momento, todos los individuos eran capaces de explorar la arena libremente, al igual que interaccionar con los restantes insectos. El experimento tuvo una duración de 7 días consecutivos, a lo largo de los cuales se monitoreó y registró el comportamiento de machos y hembras desde el momento de su liberación, incluyendo cada cópula y postcópula.

A través de video-filmaciones se cuantificó el comportamiento de los insectos, registrando intentos de monta del macho focal, latencia a cada monta, ocurrencia de rechazos a la cópula por parte de las hembras, latencia entre cada cópula y duración de cada cópula. A su vez se contabilizó el total de apareamientos realizados por los machos en los distintos grupos experimentales. Todos los experimentos fueron grabados utilizando una videocámara infrarroja (CCTV CCD 420 TVL, Monitor, China), colocada a

35 cm sobre la arena, conectada a una grabadora digital (4CH-H.264 DVR, China), bajo un régimen de iluminación de 12:12 hs (L:O).

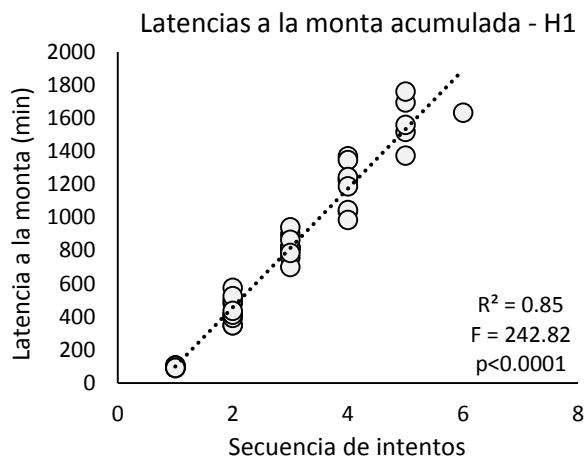
### *Análisis de datos*

Para estudiar las latencias del macho a la monta y entre cada cópula, se aplicaron modelos lineales sobre los tiempos acumulados a lo largo de todo el ensayo para cada grupo experimental. Luego, se realizó un contraste entre las dinámicas de las variables estudiadas (i.e. latencia a la monta y latencia entre cópulas) de los distintos tratamientos aplicando modelos lineales generalizados mixtos (GLMM). Para analizar la duración de las cópulas se compararon las mediciones entre los diferentes grupos mediante ANOVAs de un factor, efectuando contrastes a *posteriori* a través del *test* de Tukey. Por último se analizó el número total de apareamientos observados en cada tratamiento mediante pruebas de  $\chi^2$  aplicando la corrección de Bonferroni. Todos los resultados fueron analizados utilizando el paquete estadístico InfoStat® v2016p (Di Rienzo et al., 2016).

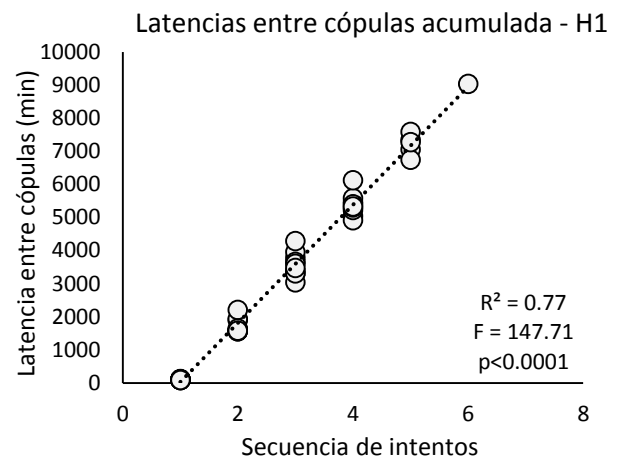
### **Resultados**

Al estudiar la latencia a la primera monta y a la primera cópula de cada macho entre los distintos grupos experimentales, no se observaron diferencias significativas (ANOVA Lat. 1° monta:  $F=2.66$ ,  $p=0.0822$ ,  $N=30$ ; ANOVA Lat. Cópula:  $F=0.74$ ,  $p=0.4853$ ,  $N=30$ ), es decir que todos los machos se aproximaron y montaron en un mismo intervalo de tiempo a la primera pareja sexual que seleccionaron, copulando inmediatamente con ellas. Al evaluar la dinámica de reapareamiento entre los distintos tratamientos, se observó que cuando existe una única hembra disponible (H1), los machos tardaron constantemente más en montar y copular repetidamente con la misma hembra (Fig. 1 y 2), comparado con aquellos escenarios donde el número de parejas disponibles fue mayor (H2 y H3). En estos últimos, los machos redujeron sus latencias con las distintas hembras iniciando más rápidamente los apareamientos, alcanzando valores cercanos a los observados en presencia de una única pareja sexual hacia el final del experimento (Fig. 3 a 6). Cabe destacar que en la totalidad de ensayos realizados donde había más de una hembra, los machos intentaron copular primero con aquellas hembras vírgenes disponibles, y una vez agotado este recurso, se aproximaron al azar a cualquier hembra.

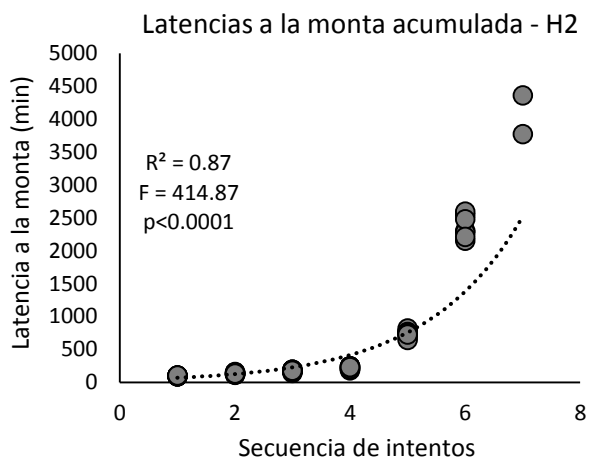
Para contrastar las dinámicas de evaluación y apareamiento seguidas por los machos de acuerdo a la presencia de un distinto número de hembras disponibles, se construyeron dos modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) que estimaron el efecto de sumar nuevas hembras en la tasa de incremento y/o disminución de las latencias. Así, se compararon por un lado los modelos de latencias a la monta acumuladas realizados previamente en cada grupo experimental (Fig. 1, 3 y 5), y por otro lado, los modelos de latencias entre cópulas estimados para los mismos grupos (Fig. 2, 4 y 6).



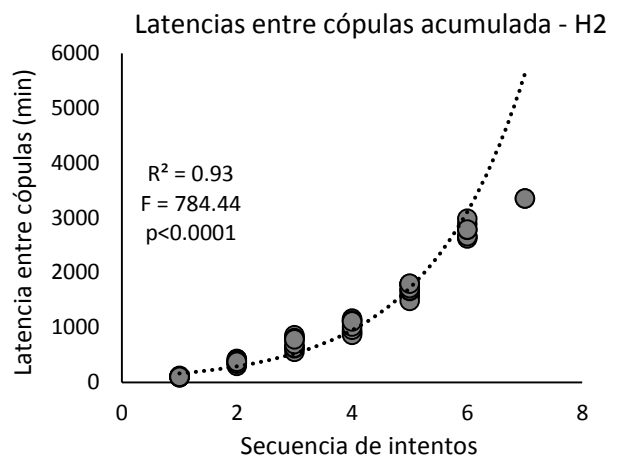
**Figura 1.** Latencia a la monta (acumulada) en función de la secuencia de intentos de monta del macho focal en presencia de una única hembra (H1), a lo largo del experimento (N=10).



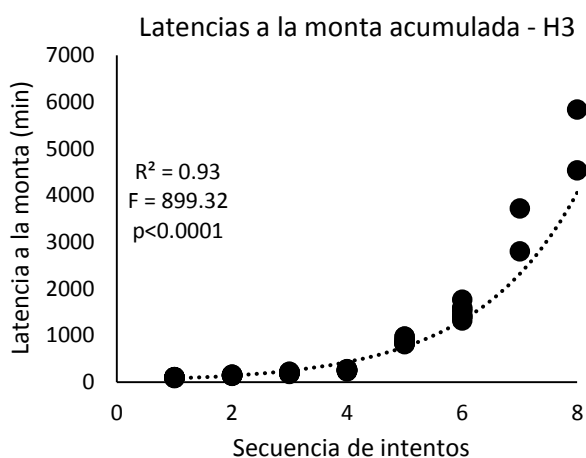
**Figura 2.** Latencia entre cópulas (acumulada) en función de la secuencia de intentos de cópula del macho focal en presencia de una única hembra (H1), a lo largo del experimento (N=10).



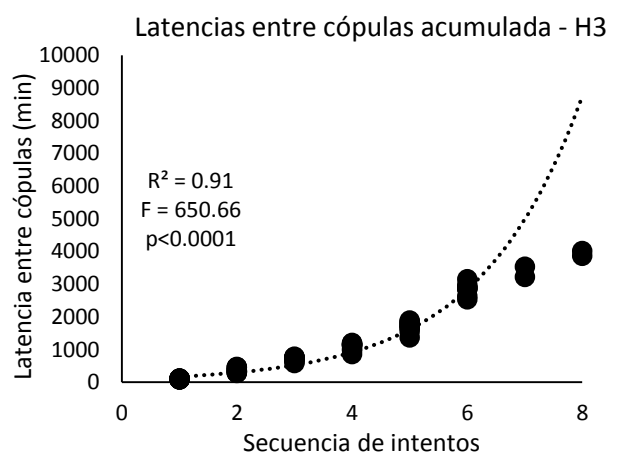
**Figura 3.** Latencia a la monta (acumulada) en función de la secuencia de intentos de monta del macho focal en presencia de dos hembras (H2), a lo largo del experimento (N=10).



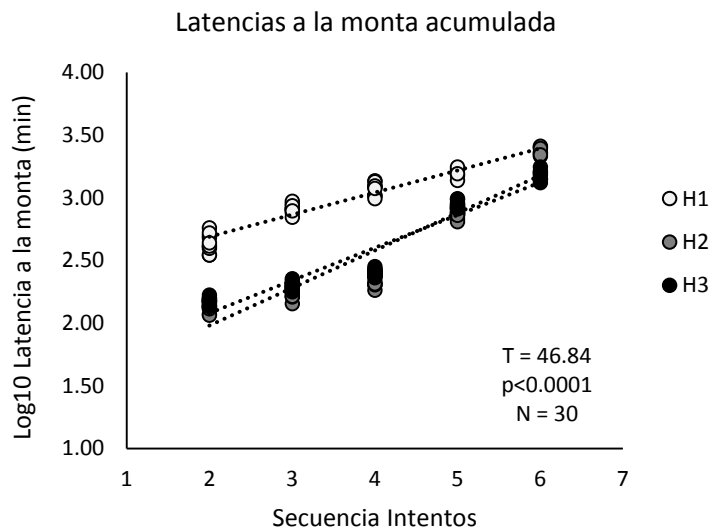
**Figura 4.** Latencia entre cópulas (acumulada) en función de la secuencia de intentos de cópula del macho focal en presencia de dos hembras (H2), a lo largo del experimento (N=10).



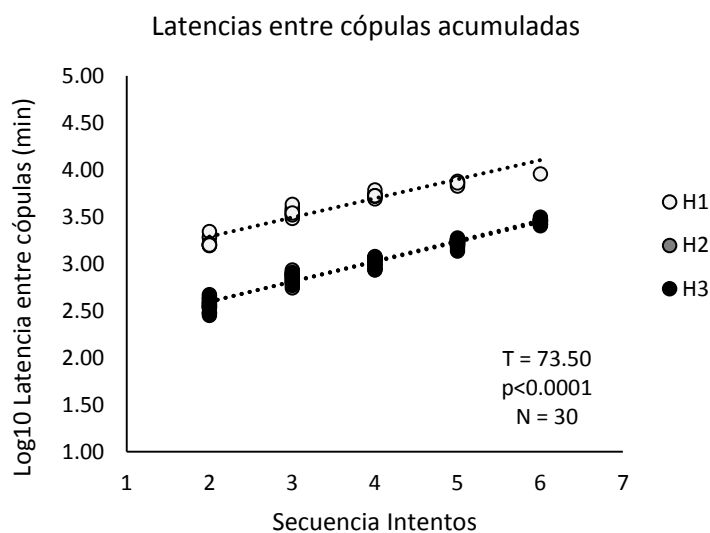
**Figura 5.** Latencia a la monta (acumulada) en función de la secuencia de intentos de monta del macho focal en presencia de tres hembras (H3), a lo largo del experimento (N=10).



**Figura 6.** Latencia entre cópulas (acumulada) en función de la secuencia de intentos de cópula del macho focal en presencia de tres hembras (H3), a lo largo del experimento (N=10).



**Figura 7.** Comparación entre las sucesivas latencias a la monta en función de la secuencia de intentos de los machos focales, de acuerdo al número de hembras disponibles, a lo largo del experimento. Leyendas: H1, una hembra; H2, dos hembras; H3, tres hembras (N=30).



**Figura 8.** Comparación entre las sucesivas latencias entre cópulas en función de la secuencia de intentos de los machos focales, de acuerdo al número de hembras disponibles, a lo largo del experimento. Leyendas: H1, una hembra; H2, dos hembras; H3, tres hembras (N=30).

De este modo, al contrastar las pendientes de los distintos modelos se encontraron diferencias significativas entre ellas, tanto para la latencia a la monta (GLMM Latencia a la monta:  $T=46.84$ ,  $p<0.0001$ ,  $N=30$ ) (Fig. 7), como para la latencia entre cópulas (GLMM Latencia entre cópulas:  $T=73.50$ ,  $p<0.0001$ ,  $N=30$ ) (Fig. 8), destacándose que la presencia de dos o más hembras disponibles (H2 y H3) redujo significativamente las latencias de los machos a la monta y a la recópula, y que recién en los últimos intentos de apareamiento los valores de latencias se aproximaron a los registrados para el caso de una única hembra (H1). Se destaca en Tabla 1 y 2, en mayor detalle, que en presencia de múltiples parejas sexuales el macho focal reduce sus tiempos de cortejo y apareamiento a lo largo de sus tres primeros intentos (donde existía al menos una hembra virgen en alguno de los tratamientos).

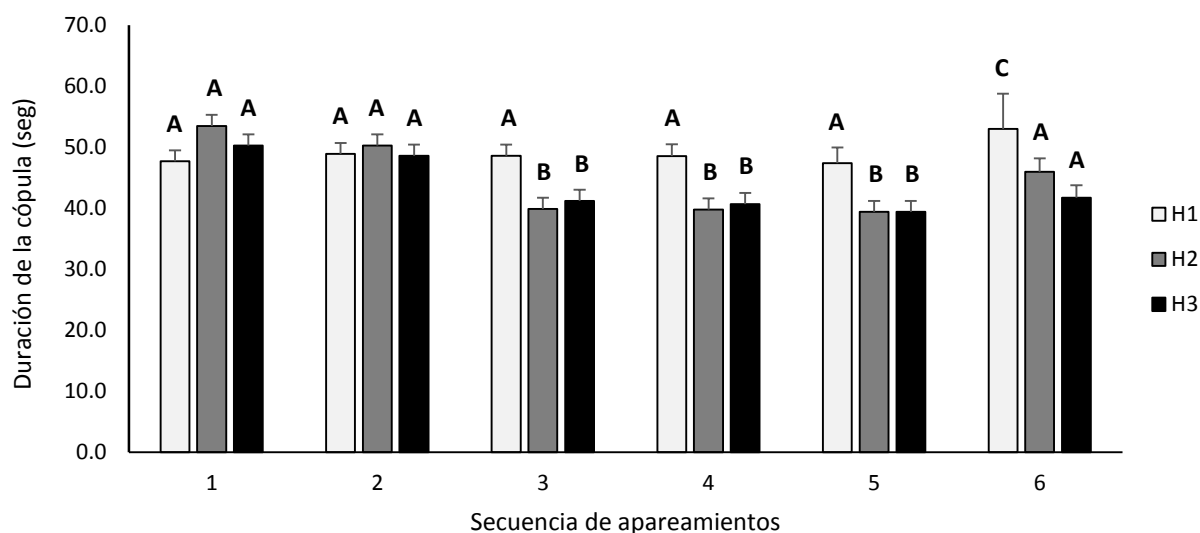
Considerando la inversión de los machos en la primera pareja sexual elegida a través de la duración de la cópula, no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales (ANOVA:  $F=2.36$ ,  $p=0.1134$ ,  $N=30$ ), destacándose que todos los primeros apareamientos tenían la misma duración. Sin embargo, en los sucesivos intentos de cópula se observó que la duración de las mismas se redujo a partir del segundo apareamiento cuando existían más hembras disponibles (H2 y H3) (ANOVA:  $F=8.16$ ,  $p=0.0004$ ,  $N=30$ ) (Tukey:  $p<0.05$ ,  $N=30$ ) (Fig. 9). Se destaca que tanto para las latencias, como para la duración de las cópulas no se registraron diferencias significativas entre los grupos H2 y H3, por lo cual la sola presencia de una hembra extra redujo al mínimo los tiempos de evaluación e inversión del macho focal.

| Grupo | Latencia monta | Media (min) | DS (min) |
|-------|----------------|-------------|----------|
| H1    | 1er Intento    | 98.20       | 6.25     |
|       | 2do Intento    | 443.70      | 74.82    |
|       | 3er Intento    | 821.60      | 68.38    |
| H2    | 1er Intento    | 99.00       | 4.71     |
|       | 2do Intento    | 135.80      | 13.21    |
|       | 3er Intento    | 174.60      | 16.40    |
| H3    | 1er Intento    | 103.60      | 5.87     |
|       | 2do Intento    | 151.40      | 8.33     |
|       | 3er Intento    | 202.10      | 13.73    |

**Tabla 1.** Comparación entre las tres primeras latencias a la monta de los machos focales de acuerdo al número de hembras disponibles. Leyendas: H1, una hembra; H2, dos hembras; H3, tres hembras (N=30).

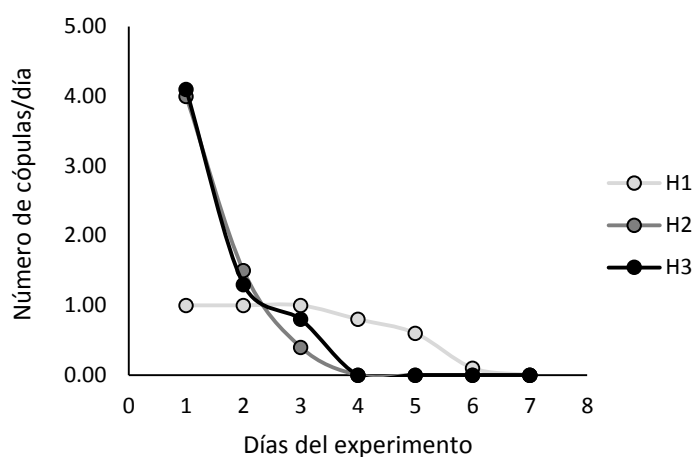
| Grupo | Latencia cópula | Media (min) | DS (min) |
|-------|-----------------|-------------|----------|
| H1    | 1era Cópula     | 106.40      | 10.59    |
|       | 2da Cópula      | 1723.70     | 220.50   |
|       | 3era Cópula     | 3588.90     | 360.44   |
| H2    | 1era Cópula     | 104.60      | 7.52     |
|       | 2da Cópula      | 372.20      | 39.39    |
|       | 3era Cópula     | 723.20      | 103.79   |
| H3    | 1era Cópula     | 101.40      | 9.51     |
|       | 2da Cópula      | 371.30      | 67.63    |
|       | 3era Cópula     | 716.50      | 60.14    |

**Tabla 2.** Comparación entre las tres primeras latencias a la cópula de los machos focales de acuerdo al número de hembras disponibles. Leyendas: H1, una hembra; H2, dos hembras; H3, tres hembras (N=30).



**Figura 9.** Duración de las cópulas de machos focales en función de la secuencia de apareamientos, de acuerdo al número de parejas sexuales. Leyenda: H1, una hembra disponible; H2, dos hembras disponibles; H3, tres hembras disponibles. Letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ( $p < 0.05$ ) (N=30).

Finalmente, al comparar el número de cópulas totales entre los grupos experimentales, no se encontraron diferencias significativas (ANOVA:  $F=0.85$ ,  $p=0.4394$ ,  $N=30$ ), observándose que los machos produjeron aproximadamente 6 espermatozoides independientemente del número de hembras disponibles. No obstante, cuando analizamos la distribución de tales cópulas a lo largo del experimento se encontró que ante la presencia de más hembras (H2 y H3), los machos concretaron en menor tiempo la totalidad de sus apareamientos posibles ( $\chi^2$ :  $H=44.34$ ,  $p < 0.0001$ ,  $N=30$ ). Esto se hizo evidente al observar que los machos aislados con una única hembra distribuyeron sus cópulas a lo largo de todo el experimento (alrededor de un apareamiento por día), mientras que aquellos en presencia de múltiples parejas sexuales, las agotaron en los primeros tres días (Fig. 10).



**Figura 10.** Número de cópulas diarias a lo largo del experimento de acuerdo al número de hembras disponibles. Leyendas: H1, una hembra; H2, dos hembras; H3, tres hembras (N=30).

## Discusión

En el presente Capítulo se estudió la posible influencia de la disponibilidad simultánea de múltiples hembras sobre el comportamiento de apareamiento del macho. En el experimento planteado, el *sex ratio* se encontró sesgado hacia las hembras, incrementándose el número de potenciales parejas disponibles para los machos.

Los resultados obtenidos mostraron que los machos de *R. prolixus* prefieren aparearse en todos los casos con hembras con las que no han copulado previamente y disminuyen sus latencias entre cópulas para acceder a las restantes parejas sexuales disponibles. Específicamente, se observó que no existieron diferencias entre los tres grupos experimentales (H1, H2 y H3) en las latencias de los machos al primer intento de apareamiento, siendo siempre reducidas y similares. Esto es de esperar, ya que en ese momento todas las hembras disponibles eran vírgenes y, por tanto, igualmente atractivas para los machos (Dewsbury, 1981; Jordan & Brooks, 2010). A partir del segundo intento de apareamiento se observó una diferencia significativa en los tiempos de latencia a la monta (así como latencia a la cópula) entre los grupos experimentales, siendo mayores cuando el macho tenía una única pareja sexual disponible (H1) y menores cuando aún existían otras hembras novedosas (H2 y H3).

Los resultados mostraron que los machos de *R. prolixus* expuestos a dos hembras fueron capaces, en promedio, de iniciar el cortejo de cópula (monta) a los 135.80 ( $\pm$  13.21 DS) minutos de terminado el primer apareamiento, mientras que los machos expuestos a una sola hembra iniciaron el cortejo de cópula en promedio a los 443.70 ( $\pm$  74.82 DS) minutos (i.e. tardaron casi 3 veces más en reiniciar el cortejo). Por otra parte, el tiempo promedio que demoraron los machos expuestos a dos hembras en volver a copular (luego del primero apareamiento) fue de 372.20 ( $\pm$  39.39 DS) minutos, mientras que en los machos expuestos a una sola hembra fue de 1723.70 ( $\pm$  220.50 DS) minutos (i.e. 4.65 veces más). Estas diferencias halladas son una clara demostración de la importancia que tiene la metodología planteada a la hora de evaluar, por ejemplo, la ventana temporal necesaria para producir otro espermatozoido y volver a copular, ya que los resultados dependerán de la presencia/ausencia de múltiples hembras para aparearse.

Los resultados obtenidos en el presente experimento concuerdan con lo predicho por el efecto *Coolidge*, que se define como un decremento en la propensión del macho a copular repetidamente con la misma hembra, combinada con un aumento del interés sexual ante hembras novedosas (Wilson et al. 1963; Dewsbury, 1981). Existe una gran variedad de paradigmas para estudiar dicho efecto, algunos de

los cuales aplican diseños en los que se incluyen nuevas parejas previo/posterior del momento de saciedad del macho, reemplazo de parejas en forma sucesiva, y elección simultánea entre distinta cantidad de parejas (Dewsbury, 1981). En relación a la presentación simultánea de múltiples hembras, sus efectos en mamíferos son muy marcados y conocidos, y es por ello que se utiliza a fines prácticos para optimizar la reproducción del ganado por ejemplo. Almquist & Hale (1956) muestran que toros puestos a prueba diariamente en presencia de una sola vaca incrementan la latencia a la cópula a lo largo del tiempo. La presentación de dos vacas en forma simultánea produce una rápida caída en la latencia a la cópula, que es revertida en *tests* subsiguientes utilizando una sola vaca nuevamente. Lo que se logra a través de estos diseños de presentación simultánea de múltiples hembras es reducir al mínimo la latencia ente apareamientos, ya que, a diferencia de otros diseños, no se espera a que el macho se haya saciado para agregar una nueva hembra. Como al momento se desconocía con precisión en *R. prolixus* cuál era el tiempo mínimo necesario para que un macho pueda volver a copular con una hembra, se eligió justamente este tipo de diseño que potencia al máximo la motivación del macho y, además, siendo las hembras presentadas de alta calidad (vírgenes).

La preferencia por hembras novedosas hallada en el presente Capítulo se encuentra en concordancia con la preferencia por hembras vírgenes observada en el Capítulo anterior. La pregunta que surge es si la variable que consideran los machos en su elección es la novedad de la hembra (que depende de si el macho ha copulado anteriormente con ella o no) o el estatus reproductivo de la hembra (si es virgen o no). Como en el presente experimento ambos se modificaron en el mismo sentido no fue posible discernir entre ambas posibilidades. Para resolver este interrogante debería mantenerse constante el estatus reproductivo de las hembras (e.g. utilizando hembras con experiencia reproductiva reciente) y manipularse el grado de novedad (hembra novedosa vs. hembra no novedosa). De esta manera, el experimento que podría hacerse a futuro es exponer al macho a la elección simultánea entre dos hembras ya apareadas (una con el macho focal vs. otra que lo haya hecho con otro macho), evaluando si es la preferencia por la hembra novedosa o simplemente su estatus reproductivo, el causante del efecto.

Otra variable considerada por los machos en escenarios con alta disponibilidad de parejas sexuales, posteriormente a la evaluación de las mismas, es la inversión reproductiva realizada con cada hembra que se aparea. En este sentido, dado que aparentemente no existen mecanismos fisiológicos postcopulatorios que regulen la transferencia o el almacenamiento de espermatozoides en *R. prolixus* de acuerdo a la calidad de los individuos y del contexto social presente (Capítulo 4 y 5), podemos especular que la inversión realizada por los machos con las hembras elegidas estaría relacionada con la duración del apareamiento y el cuidado posterior de la pareja (*mate guarding*). Esto se evidenció al observar que los machos redujeron la duración de sus cópulas cuando se aparearon con hembras conocidas en presencia de otras parejas sexuales disponibles (H2 y H3). En tales casos, invertir un mayor tiempo en una hembra ya copulada por ellos, no se va a traducir en un aumento de su éxito reproductivo (Jordan & Brooks, 2010). En cambio, en aquellos escenarios donde el macho tenía una única pareja disponible (H1), las duraciones

de las cópulas fueron constantes, indicando que el macho también fue sensible a la ausencia de otras oportunidades de apareamiento. Si bien se observó que su motivación a copular se redujo cuando no existían otras hembras novedosas (i.e. aumentan las latencias), resguardar su única pareja podría estar relacionado con asegurarse el éxito reproductivo (Alcock, 1994).

Un resultado interesante de destacar es que no se observaron diferencias significativas en la cantidad de espermatozoides transferidos por los machos a lo largo del experimento, entre los distintos grupos. Esto estaría indicando que los machos pueden desarrollar una determinada cantidad de espermatozoides, de acuerdo al estado nutricional en que se encuentren (Khalifa, 1950), siendo independiente de la disponibilidad de parejas sexuales. Sin embargo, resulta llamativo que la distribución de las cópulas a lo largo del experimento sí fue significativamente diferente de acuerdo a la presencia de más hembras, observándose que los machos expuestos a una única hembra (H1) tardaron alrededor de 5/6 días en agotar sus oportunidades de cópula, mientras que los machos expuestos a una mayor cantidad de hembras (H2 y H3) lo hicieron en un lapso de tres días. En el caso del macho aislado con una única hembra, este comportamiento de retrasar la recópula va en beneficio de optimizar su éxito reproductivo, ya que a mayor latencia, mayor es la chance en la naturaleza de que aparezca una mejor opción (i.e. otra hembra) para aparearse (Andersson, 1994). Se desconoce la razón por la que el macho continuó copulando con la misma hembra cuando ésta es capaz de almacenar su espermatozoides y utilizarlo en futuros ciclos ovulatorios. Posiblemente la razón tenga que ver con asegurar la paternidad saturando el reservorio de la hembra con su propio espermatozoides.

Como se ha mencionado anteriormente, los efectos de la disponibilidad de múltiples hembras sobre el comportamiento del macho ha sido poco investigada en insectos. En el coleóptero *Nicrophorus vespilloides* se encontró evidencia de la existencia del efecto *Coolidge* y se estudiaron los mecanismos subyacentes que permiten al macho discriminar entre parejas conocidas y novedosas, mostrando que los machos prefieren a las hembras con las que no copularon antes, independientemente de su estatus sexual (Steiger et al., 2008). A su vez, estos autores demostraron que los machos utilizan patrones de compuestos cuticulares para discriminar entre las hembras. Se conoce también que las hembras de *Gryllus sigillatus* marcan a los machos con compuestos químicos específicos evitando así recopular con parejas con las que previamente ya se han apareado (Ivy et al., 2005). Además, es conocida en insectos la utilización de compuestos químicos que actúan como antiafrodisiacos, es decir compuestos producidos por los machos y transferidos a la hembra durante el apareamiento que evitan la cópula de otros machos (e.g. Happ, 1969; Kukuk, 1985; Peschke, 1987; Carlson & Schlein, 1991; Andersson et al., 2003), y que posiblemente impidan también la recópula del macho original.

Consideramos finalmente, que la experiencia y resultados obtenidos en el presente Capítulo son un claro ejemplo de cómo el estudio de un conjunto controlado de individuos interactuando permite un mayor acercamiento hacia el entorno natural de la especie y una comprensión más profunda acerca de



las presiones de selección que han moldeado el comportamiento de los individuos (Martin & Bateson, 1993; Barnard, 2004; Ruhela & Sinha, 2010).

## REFERENCIAS

- Alcock J.** 1994. Postinsemination Associations Between Males and Females in Insects: The Mate-Guarding Hypothesis. *Annual Review of Entomology*. 39(1): 1-21.
- Almqvist J. O. & Hale E. B.** 1956. An approach to the measurement of sexual behavior and semen production of dairy bulls. *Proceedings of the III International Congress on Animal Reproduction*. 3: 50-59.
- Andersson M. B.** 1994. *Sexual selection*. New Jersey. UK: Princeton University Press.
- Andersson J., Borg-Karlson A. K. & Wiklund C.** 2003 Antiaphrodisiacs in pierid butterflies: a theme with variation! *Journal of Chemical Ecology*. 29: 1489-1499.
- Arnaud L. & Haubruge E.** 1999. Mating Behaviour And Male Mate Choice In *Tribolium castaneum* (Coleoptera, Tenebrionidae). *Behaviour*. 136(1): 67-77.
- Arnqvist G. & Rowe L.** 2005. *Sexual Conflict*. Biological Sciences Monographs in Behavior and Ecology. Princeton University Press. Princeton, New Jersey. 352 pp.
- Barnard C. J.** 2004. *Animal Behaviour: Mechanism, Development, Function and Evolution*. London: Pearson Prentice Hall. 726p.
- Barrows E. M., Bell W. J. & Michener C. D.** 1975. Individual odor differences and their social functions in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 72: 2824-2828.
- Beach F. A. & Jordan L.** 1956. Sexual exhaustion and recovery in the male rat. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology*. 8: 121-133.
- Berglund A.** 1993. The operational sex ratio influences choosiness in a pipefish. *Behavioral Ecology*. 5(3): 254-258.
- Carlson D. A. & Schlein Y.** 1991. Unusual polymethyl alkenes in tsetse-flies acting as abstinon in *Glossina morsitans*. *Journal of Chemical Ecology*. 17: 267-284.
- Clark S. J.** 1988. The effects of operational sex ratio and food deprivation on copulation duration in the water strider (*Gerris remigis* Say). *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 23: 317-322.

- Dewsbury D. A.** 1981. Effects of novelty on copulatory-behavior – the Coolidge effect and related phenomena. *Psychological Bulletin*. 89: 464-482.
- Dewsbury D. A.** 1982. Ejaculate cost and male choice. *The American Naturalist*. 119: 601-610.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C. W.** InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Donovan A. & Verrell P. A.** 1991 The effect of partner familiarity on courtship success in the salamander *Desmognathus ochrophaeus*. *Journal of Herpetology*. 25: 93-95.
- Emlen S. T.** 1976. Lek organization and mating strategies in the bullfrog. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 1: 283-313.
- Emlen S. T. & Oring L. W.** 1977. Ecology, sexual selection and the evolution of mating systems. *Science*. 197: 215-222.
- Happ G.** 1969. Multiple Sex Pheromones of the Mealworm Beetle, *Tenebrio molitor* L. *Nature*. 222: 180-181.
- Hettyey A., Vagi B., Hevizi G. & Torok J.** 2009. Changes in sperm stores, ejaculate size, fertilization success, and sexual motivation over repeated matings in the common toad, *Bufo bufo* (Anura: Bufonidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 96: 361-371.
- Ivy T. M., Weddle C. B. & Sakaluk S. K.** 2005. Females use self-referent cues to avoid mating with previous mates. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 272: 2475-2478.
- Jirotkul M.** 1999. Operational sex ratio influences female preference and male–male competition in guppies. *Animal Behaviour*. 58: 287-294.
- Jordan L. A. & Brooks R. C.** 2010. The lifetime costs of increased male reproductive effort: courtship, copulation and the Coolidge effect. *Journal of Evolutionary Biology*. 23: 2403-2409.
- Kelley J. L., Graves J. A. & Magurran A. E.** 1999. Familiarity breeds contempt in guppies. *Nature*. 401: 661-662.
- Khalifa A.** 1950. Spermatophore production and egg-laying behaviour in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Parasitology*. 40(3-4): 283-289.
- Koene J. M. & Ter Maat A.** 2007. Coolidge effect in pond snails: male motivation in a simultaneous hermaphrodite. *BMC Evolutionary Biology*. 7: 212.

- Kukuk P.** 1985. Evidence for an antiaphrodisiac in the sweat bee *Lasioglossum (Dialictus) zephyrum*. Science. 227: 656-657.
- Manrique G., Vitta A. C. R., Ferreira R. A., Zani C. L., Unelius C. R., Lazzari C. R., Diotaiuti L., Lorenzo M. G.** 2006. Chemical communication in Chagas disease vectors. Source, identity and potential function of volátiles released by the metasternal and Brindley's glands of *Triatoma infestans* adults. Journal of Chemical Ecology 32: 2035-2052.
- Martin P. & Bateson P.** 1993. Measuring of behavior: an introductory guide. Cambridge University Press. 222p.
- Mills S. C. & Reynolds J. D.** 2003. Operational sex ratio and alternative reproductive behaviours in the European bitterling, *Rhodeus sericeus*. Behavioral Ecology and Sociobiology. 54: 98-104.
- Ödeen A. & Moray C. M.** 2008. *Drosophila melanogaster* virgins are more likely to mate with strangers than familiar flies. Naturwissenschaften. 95: 253-256.
- Parker G. A.** 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Biological Reviews. 45: 525-567.
- Parker G. A. & Pizzari T.** 2010. Sperm competition and ejaculate economics. Biological Reviews. Cambridge Philosophical Society. 85(4): 897-934.
- Peschke K.** 1987 Male-aggression, female mimicry and female choice in the rove beetle, *Aleochara curtula* (Coleoptera, Staphylinidae). Ethology. 75: 265-284.
- Pizzari T., Cornwallis C. K., Lovlie H., Jakobsson S. & Birkhead T. R.** 2003. Sophisticated sperm allocation in male fowl. Nature. 426: 70-74.
- Pompilio L., González Franco M., Chisari L. B. & Manrique G.** 2016. Female choosiness and mating opportunities in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. Behaviour. 153(15): 1863-1878.
- Reznick D.** 1985. Costs of Reproduction: An Evaluation of the Empirical Evidence. Oikos. 44(2): 257-267.
- Rosa M. E., Barta Z., Fülöp A., Székely T. & Kosztolányi A.** 2017. The effects of adult sex ratio and density on parental care in *Lethrus apterus* (Coleoptera, Geotrupidae). Animal Behaviour. 132: 181-188.
- Ruhela A. & Sinha M.** 2010. Recent Trends in Animal Behaviour. Published by Oxford Book Company, Jaipur.
- Simmons L. W.** 2001. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Monographs in Behavior and Ecology. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ.

- Steiger S., Franz R., Eggert A. K. & Muller J. K.** 2008. The Coolidge effect, individual recognition and selection for distinctive cuticular signatures in a burying beetle. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 275: 1831-1838.
- Tokarz R. R.** 1992. Male mating preference for unfamiliar females in the lizard, *Anolis sagrei*. *Animal Behaviour*. 44: 843-849.
- Wcislo W. T.** 1992. Attraction and learning in mate-finding by solitary bees, *Lasioglossum (Dialictus) figueresi* Wcislo and *Nomia triangulifera* Vachal (Hymenoptera: Halictidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 31: 139-148.
- Weir L. K., Grant J. W. A. & Hutchings J. A.** 2011. The Influence of Operational Sex Ratio on the Intensity of Competition for Mates. *The American Naturalist*. 177(2): 167-176.
- Wilson J. R., Kuehn R. E. & Beach F. A.** 1963. Modification in sexual behavior of male rats produced by changing stimulus female. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 56: 636-644.

## Discusión General

*"When you find yourself teetering on the edge of oblivion  
mine will be the hands taking pleasure  
in giving you the final push."*

*—Liliana Vess*

## DISCUSIÓN GENERAL

El objetivo de esta Tesis fue estudiar los factores y reglas de decisión involucrados en la elección de pareja sexual en el insecto hematófago *Rhodnius prolixus* (Heteroptera: Reduviidae). A tal fin se integraron conocimientos y metodologías provenientes del campo de la Fisiología del Comportamiento, así como del área de la Ecología del Comportamiento. A nuestro entender, esta es la primera línea de trabajo que estudia cómo eligen su pareja sexual los triatominos. A lo largo de este recorrido confirmamos que la especie seleccionada es un excelente modelo para estudiar el comportamiento de elección de pareja tanto en machos como en hembras (quienes exhiben comportamientos estereotipados de rechazo a la cópula, posibles de ser evaluados a través de la simple observación).

Uno de los primeros aportes de esta Tesis es la descripción sistemática del comportamiento de apareamiento de *Rhodnius prolixus* en presencia y ausencia de contexto social (definido como la presencia de otros individuos, aun cuando se encuentren físicamente inaccesibles). Se demostró al respecto, que el comportamiento de apareamiento se modifica en función del contexto social. Específicamente, en situaciones en las que la pareja focal se encuentra en completo aislamiento las hembras no exhiben comportamientos de rechazo a la cópula, mientras que en presencia de contexto social los mismos ocurren. Estos resultados llevan a plantearse la importancia de la inclusión de un contexto similar al natural para el estudio y profunda comprensión del comportamiento de una especie.

A partir de esos primeros resultados, la pregunta que se plantea es de qué otros factores depende la expresión del comportamiento de rechazo de la hembra. Si la presencia de contexto social es el factor desencadenante, la función del comportamiento de rechazo podría estar asociada a la elección de machos en función de su calidad (la hembra rechazaría a un macho cuando es de baja calidad y/o si está presente otro macho de mejor calidad disponible). En el Capítulo 3 se pone a prueba esta hipótesis y se muestra que las hembras evalúan la calidad de los machos (determinada por su estado nutricional), rechazando una oportunidad de cópula solamente cuando de esa manera obtiene el beneficio potencial de copular con un macho de mejor calidad.

Otra variable que podría estar afectando la decisión de la hembra de aceptar o rechazar a un macho son sus ciclos ovulatorios. En el Capítulo 2 se muestra que las hembras vírgenes que se encuentran cursando su segundo ciclo ovárico y tienen un mayor riesgo de oviponer huevos infértiles disminuyen drásticamente el umbral de selectividad al elegir pareja sexual. Estos resultados muestran que las decisiones comportamentales son sensibles al estado interno (fisiológico) del individuo, resaltando la importancia de un enfoque interdisciplinario.

A lo largo de la Tesis se muestra también que los machos de *R. prolixus* no eligen azarosamente a las hembras que cortejan. Son capaces de discriminar entre hembras vírgenes y no vírgenes, exhibiendo una clara preferencia por las primeras (Capítulo 4). También se muestra en el Capítulo 6 que el interés sexual de los machos se renueva ante la presencia de una mayor cantidad de parejas disponibles.

Otra pregunta planteada es si (además de elección precopulatoria) existe en la especie elección a nivel postcopulatorio. A tal fin, se evaluó la producción, transferencia y almacenamiento de espermatozoides y su relación con la calidad de los individuos y la presencia de potenciales competidores/parejas. En el Capítulo 4 se muestra que los machos de mayor calidad transfieren igual cantidad de esperma que los de menor calidad, que las hembras retienen la misma cantidad de esperma de machos de alta y baja calidad, y que el contexto social no tiene ningún efecto sobre la inversión y almacenamiento diferencial de esperma. Sin embargo, sí existen diferencias en la cantidad de huevos fértiles ovipuestos por hembras que copularon con machos de alta vs. baja calidad, siendo las apareadas con machos de mejor calidad las que derivan en un mayor éxito reproductivo. Por otra parte, en el Capítulo 5 se encontró que los machos invierten la misma cantidad de esperma en hembras de distintas calidades, manipulada a través de cambios en su estatus reproductivo (virgen vs. recientemente apareada). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que *R. prolixus* no ha desarrollado mecanismos fisiológicos para la inversión y retención diferencial de esperma. Queda abierto el interrogante acerca de los mecanismos fisiológicos implicados en el control de la fecundación de huevos.

|   | Hembras   |   | Machos   |  |
|---|---|---|--|--|
|   | Variables relevantes  | Variables afectadas                                 | Variables relevantes   | Variables afectadas  |
| <b>Indicadores de calidad de la potencial pareja sexual</b> | Estado nutricional<br>- Calidad absoluta (cada macho <i>per se</i> )<br>- Calidad relativa (comparación entre individuos) | Cópula (rechazos)<br>Éxito reproductivo             | Historia reproductiva:<br>- Virgen<br>- Recientemente copulada             | Hembra elegida (acercamiento)<br>Latencia a la monta<br>Duración cópula                  |
| <b>Estado fisiológico interno</b>                           | Riesgo de oviposición de huevos como infértiles   | Cópula (rechazos)                                   | Estado nutricional   | Éxito reproductivo   |
|   | Estatus reproductivo:<br>- Virgen<br>- Recientemente copulada   | Cópula (rechazos)<br>Almacenamiento espermatozoides |  |  |
| <b>Contexto social</b>                                      | - Ausente<br>- Mayor proporción de machos<br>- Mayor proporción de hembras  | Cópula (rechazos)                                   | - Ausente<br>- Mayor proporción de machos<br>- Mayor proporción de hembras | Latencia a la monta y cópula<br>N° de cópulas<br>Duración cópula<br><i>Mate guarding</i> |

**Tabla 1.** Variables relevantes consideradas por machos y hembras de *R. prolixus* al momento de la elección de la pareja sexual. Se destacan las variables afectadas (comportamentales y/o fisiológicas) para cada nivel de estudio.

Los experimentos realizados a lo largo de la Tesis fueron diseñados con el fin de evaluar una a una las variables relevantes que consideran los individuos en su elección de pareja y, además, evaluar la posible interacción entre las distintas variables relevantes observadas. Ese es el motivo por el cual, al estudiar la influencia de un nuevo factor, se manipula también otra variable que ha mostrado ser relevante para los individuos en otro experimento (e.g. el contexto social) utilizando diseños factoriales.

Esta forma de abordaje permite hacer inferencias sobre el algoritmo de toma de decisión de los individuos cuando más de una variable relevante se modifica a la vez, como ocurre en la naturaleza. Integrando los resultados obtenidos, se construyó un listado con la descripción de variables relevantes que inciden en la elección de pareja y su consecuente observación operacional para cada uno de los sexos (Tabla 1).

### *Elección de pareja sexual desde el punto de vista de la hembra*

En base a los resultados obtenidos a partir de la evaluación conjunta de variables relevantes, se comenzó con la construcción del algoritmo de toma de decisión utilizado por la hembra de *R. prolixus* para aceptar/rechazar una oportunidad de cópula (Fig. 1). De ellos se desprende que, de todas las variables aquí analizadas, la que más afecta la elección de la hembra es su propio estatus reproductivo. Esta inferencia se basa en que las hembras con experiencia reproductiva reciente rechazan en todos los casos cualquier intento de cópula de nuevos machos. Recién finalizado su período refractario luego del apareamiento, las mismas recobrarían su motivación por nuevas parejas sexuales.

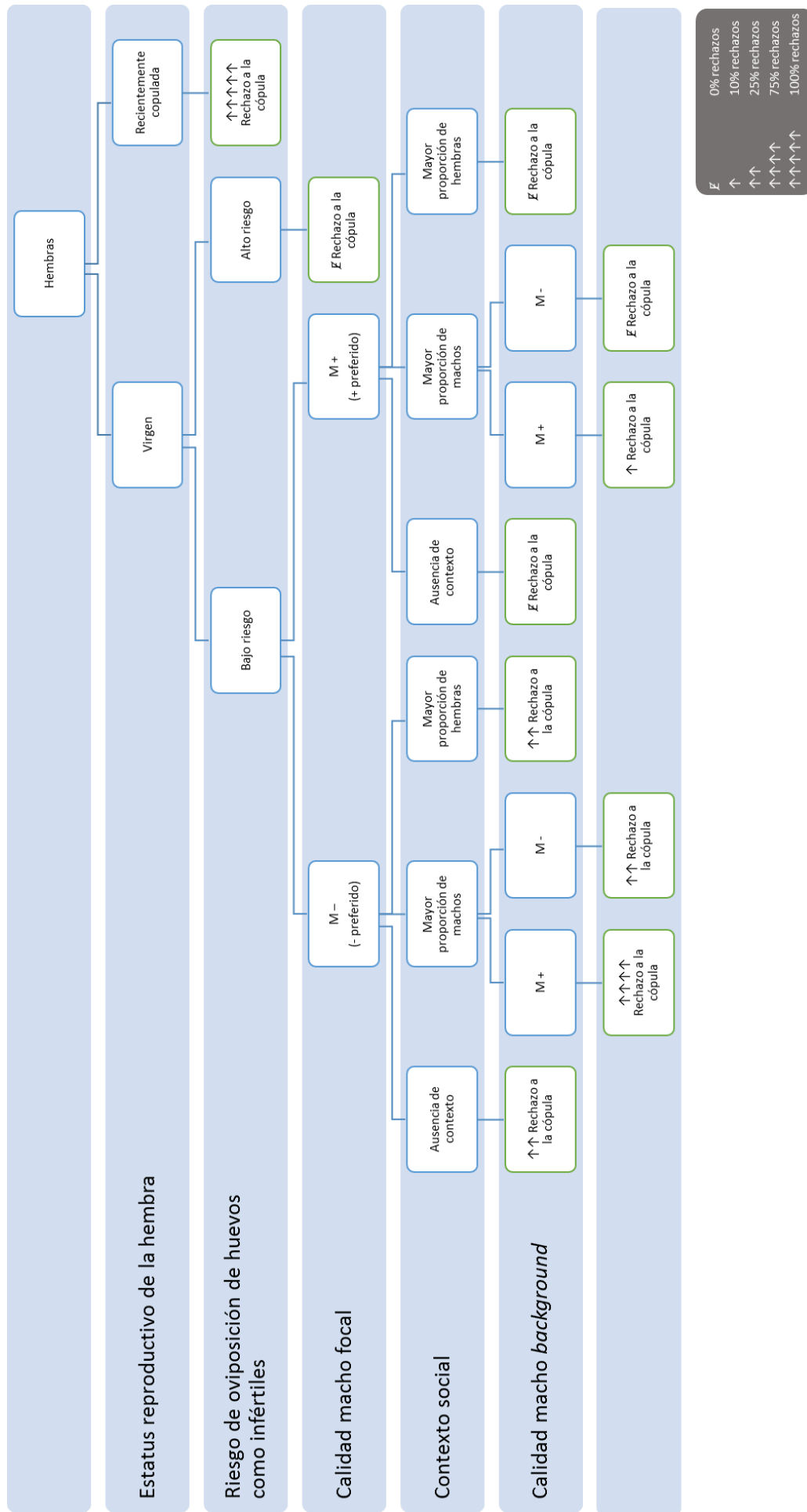
Pero no todas las hembras vírgenes aceptan a cualquier macho para copular. Existe otra variable relevante involucrada en la toma de decisiones que es el riesgo que tiene cada hembra de oviponer huevos infértiles. Esta inferencia se basa en la observación de que sólo aquellas con bajo riesgo de oviponer huevos infértiles son selectivas al elegir pareja sexual. Cuando, por el contrario, el riesgo de oviposición es alto, las hembras aceptan en todos los casos al macho ofrecido como pareja sexual.

Por otra parte, las hembras vírgenes y/o receptivas que además tengan bajo riesgo de oviponer huevos infértiles, consideran en su elección tanto la calidad de la pareja que la corteja como la de las potenciales que la rodean. Esta inferencia se basa en que la hembra es sensible al estado nutricional de los machos, prefiriendo a aquellos de mejor estado nutricional (i.e. alta calidad), rechazando los intentos de apareamiento de macho de baja calidad cuando existen machos de mejor condición disponibles.

Y finalmente, es fundamental el rol que cumple la presencia de un contexto social sobre la decisión de la hembra de aceptar o rechazar una oportunidad de cópula, ya que es necesaria su presencia para la expresión de los comportamientos de discriminación activa de las hembras. En este sentido, su decisión se ajustaría de acuerdo a la oferta y calidad de otras potenciales parejas, valorando el costo de rechazar una oportunidad de apareamiento en función del beneficio de aguardar por un macho de mejor calidad.

Integrando lo anteriormente expuesto, podemos concluir que lo primero que considera una hembra al momento elegir una pareja sexual es su propia "condición" (a través de su estatus reproductivo y del riesgo de oviponer huevos infértiles), lo que determinaría su motivación a aparearse y a afrontar los costos de ser selectiva. Si la hembra se encuentra en condiciones de ser selectiva, hay dos variables que entran en juego: la calidad de la pareja y la presencia de contexto social. Del análisis de todas las posibilidades surgirá en última instancia su decisión de aceptar o no a un macho como pareja sexual.





**Fig. 1.** Diagrama de flujo representando el algoritmo de toma de decisión utilizado por la hembra de *R. prolixus* para aceptar/rechazar una oportunidad de cópula, considerando las variables influyentes en la evaluación y selección de su pareja sexual.

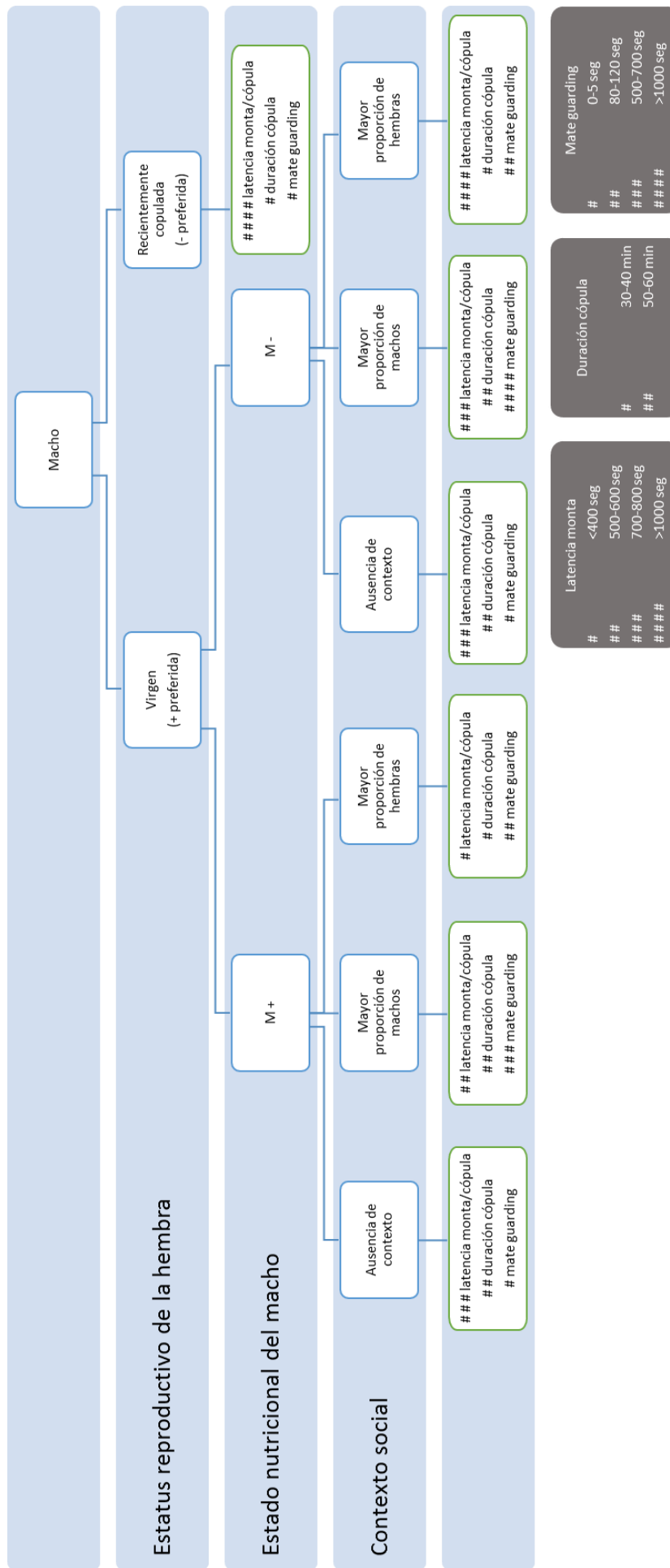
### *Elección de pareja sexual desde el punto de vista del macho*

Al igual que para las hembras, se avanzó en la construcción del algoritmo de toma de decisión utilizado por los machos de *R. prolixus* al momento de elegir pareja sexual (Fig. 2). Una variable crucial para explicar las preferencias de los machos es el estatus reproductivo de la hembra, ya que la mayoría de los machos elige montar a una hembra virgen en lugar de una con experiencia reproductiva previa. Ello se evidencia a través de latencias a la monta y a las cópulas más prolongadas, y en una menor duración de los apareamientos y del *mate guarding* cuando sólo se encuentran disponibles hembras recientemente apareadas. Tal preferencia se relacionaría, como se mencionó anteriormente, a que si un macho invierte tiempo cortejando a una hembra copulada o no receptiva, incursionaría en gastos energéticos que no se traducirían en un aumento de su éxito reproductivo.

La siguiente variable clave sería el propio estado nutricional de los machos. Los resultados muestran que machos de alta calidad son mejores competidores que machos de baja calidad, ya que éstos reducen sus latencias de aproximación a las potenciales parejas anticipándose a que otros machos copulen con ellas. A su vez, se observó que cuando existen múltiples hembras disponibles, sólo los machos de alta calidad acortan su latencia a los apareamientos, lo que se relacionaría con la estrategia de acceder a un mayor número de parejas sexuales y así maximizar el éxito reproductivo. Por su parte, los machos de baja calidad serían menos competitivos debido a su condición nutricional comprometida, lo que implicaría que de lograr aparearse con una hembra, inviertan un mayor tiempo en cuidarla de otros machos competidores.

Integrando lo anteriormente expuesto, podemos concluir que lo primero que valora un macho al momento de seleccionar una pareja sexual es la calidad de la hembra, es decir, su estatus reproductivo. A continuación, en función de si su estado nutricional es óptimo o se encuentra comprometido, evaluaría el contexto social presente determinando la existencia de otras potenciales parejas sexuales y/o competidores. Del análisis de todas las posibilidades, se establecerían las modificaciones del comportamiento de apareamiento necesarias para acceder a más hembras disponibles y/o cuidar una pareja de intentos de cópula de otros machos.

Resulta clave destacar que para la construcción del algoritmo de toma de decisión de *R. prolixus* no se consideraron los mecanismos fisiológicos de elección de pareja a nivel postcopulatorio. En base a la evidencia disponible, esto se debe a la posible ausencia de efectos significativos a este nivel, lo que implicaría que son los comportamientos pre y post copulatorios los que estarían involucrados en la elección de pareja sexual tanto en hembras como en machos de *R. prolixus*.



**Fig. 2.** Diagrama de flujo representando el algoritmo de toma de decisión utilizado por el macho de *R. prolixus* para cortejar/no cortejar una hembra, considerando las variables influyentes en la evaluación y selección de su pareja sexual.

### *Consideraciones finales*

A partir de los conocimientos obtenidos, consideramos que la presente Tesis resulta un primer acercamiento hacia la comprensión de los factores que influyen en el comportamiento de elección de pareja sexual de *R. prolixus* como especie particular, y en triatomíneos en general.

Por otra parte, consideramos que los distintos experimentos realizados implican un aporte teórico y metodológico al tema general de elección de pareja sexual.

Y, finalmente, esbozar la construcción de un algoritmo de toma de decisiones, nos permite avanzar en la predicción de las elecciones que tomará un individuo, cuando todos los factores relevantes estudiados varían conjuntamente como ocurre en la naturaleza.

## **REFERENCIAS GENERALES**

*"Beauty determines value, and we determine beauty..."*

## REFERENCIAS GENERALES

- Alcock J.** 1994. Postinsemination Associations Between Males and Females in Insects: The Mate-Guarding Hypothesis. *Annual Review of Entomology*. 39(1): 1-21.
- Almquist J. O. & Hale E. B.** 1956. An approach to the measurement of sexual behavior and semen production of dairy bulls. *Proceedings of the III International Congress on Animal Reproduction*. 3: 50-59.
- Aluja M., Rull J. Sivinski J. Trujillo G. & Pérez-Staples D.** 2009. Male and female condition influence mating performance and sexual receptivity in two tropical fruit flies (Diptera: Tephritidae) with contrasting life histories. *Journal of Insect Physiology*. 55(12): 1091-1098.
- Andersson M. B.** 1994. *Sexual selection*. New Jersey. UK: Princeton University Press.
- Andersson J., Borg-Karlson A. K. & Wiklund C.** 2003 Antiaphrodisiacs in pierid butterflies: a theme with variation! *Journal of Chemical Ecology*. 29: 1489-1499.
- Andrade M. C. B. & Kasumovic M. M.** 2005. Terminal Investment Strategies and Male Mate choice: Extreme Tests of Bateman. *Integrative and Comparative Biology*. 45(5): 838-847.
- Arnaud L. & Haubruge E.** 1999. Mating Behaviour And Male Mate Choice In *Tribolium castaneum* (Coleoptera, Tenebrionidae). *Behaviour*. 136(1): 67-77.
- Arnqvist G. & Rowe L.** 2005. *Sexual Conflict*. *Biological Sciences Monographs in Behavior and Ecology*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey. 352 pp.
- Atwell A. & Wagner W. E.** 2014. Female mate choice plasticity is affected by the interaction between male density and female age in a field cricket. *Animal Behaviour*. 98: 177-183.
- Barnard C.J.** 2004. *Animal Behaviour: Mechanism, Development, Function and Evolution*. London: Pearson Prentice Hall. 726p.
- Barrows E. M., Bell W. J. & Michener C. D.** 1975. Individual odor differences and their social functions in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 72: 2824-2828.
- Baruffaldi L. & Costa F. G.** 2010. Changes in male sexual responses from silk cues of females at different reproductive states in the wolf spider *Schizocosa malitiosa*. *Journal of Ethology*. 28: 75.
- Bastock M. & Manning A.** 1955. The courtship of *Drosophila melanogaster*. *Behaviour*. 8: 85-111.
- Beach F. A. & Jordan L.** 1956. Sexual exhaustion and recovery in the male rat. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology*. 8: 121-133.

- Berglund A.** 1993. The operational sex ratio influences choosiness in a pipefish. *Behavioral Ecology*. 5(3): 254-258.
- Berglund A.** 1995. Many mates make male pipefish choosy. *Behaviour*. 131(3): 213-218.
- Berglund A., Widemo M. S. & Rosenqvist G.** 2005. Sex-role reversal revisited: choosy females and ornamented, competitive males in a pipefish. *Behavioral Ecology*. 16(3): 649-655.
- Birkhead T.** 2007. Promiscuidad: Una historia evolucionista de la competencia entre espermatozoides. Colección Las Dos Culturas. Vol. N°8. Ed. Laetoli - España & Ed. Oceano - México. 316p.
- Bleu J., Bessa-Gomes C. & Laloia D.** 2012. Evolution of female choosiness and mating frequency: effects of mating cost, density and sex ratio. *Animal Behaviour*. 83: 131-136.
- Blumstein D. T., Daniel J. C. & Evans C. S.** 2000. JWatcher© v1.0. Dan Blumstein's Lab University of California, Los Angeles & The Animal Behaviour Lab, Macquarie University, Sydney. URL <http://www.jwatcher.ucla.edu/>
- Bodin A., Barrozo R. B., Couton L. & Lazzari C. R.** 2008. Temporal modulation and adaptive control of the behavioural response to odours in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology*. 54: 1343-1348.
- Boggs C. L.** 1992. Resource allocation: exploring connections between foraging and life history. *Functional Ecology* 6: 508.
- Boggs C. L.** 2009. Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. *Functional Ecology*. 23: 27-37.
- Bonduriansky, R.** 2001. The evolution of male mate choice in insects: a synthesis of ideas and evidence. *Biological Reviews*, 76: 305-339.
- Borg A. A., Forsgren E. & Amundsen T.** 2006. Seasonal change in female choice for male size in the two-spotted goby. *Animal Behaviour*. 72: 763-771.
- Borges da Silva E.; Branco M.; Mendel Z. & Franco J.C.** 2013. Mating behavior and performance in the two cosmopolitan mealybug species *Planococcus citri* and *Pseudococcus calceolariae* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Journal of Insect Behavior*. 26: 304-320.
- Bunning H., Rapkin J., Belcher L., Archer C.R., Jensen K. & Hunt J.** 2015. Protein and carbohydrate intake influence sperm number and fertility in male cockroaches, but not sperm viability. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 282: 1802.
- Buxton P. A.** 1930. The biology of a blood-sucking *Rhodnius prolixus*. *Translations of the Entomological Society of London*. 78(2): 227-236.

- Carazo P., Sanchez E., Font E. & Desfilis E.** 2004. Chemosensory cues allow male *Tenebrio molitor* beetles to assess the reproductive status of potential mates. *Animal Behaviour*. 68(1): 123-129.
- Cardoso Giaquinto P., da Silva Berbert C. M. & Delicio H. C.** 2010. Female preferences based on male nutritional chemical traits. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 64(6): 1029-1035.
- Carlson D. A. & Schlein Y.** 1991. Unusual polymethyl alkenes in tsetse-flies acting as abstinon in *Glossina morsitans*. *Journal of Chemical Ecology*. 17: 267-284.
- Chen P. S.** 1984. The functional-morphology and biochemistry of insect male accessory-glands and their secretions. *Annual Review of Entomology*. 29: 233-255.
- Chiang R. G. & Chiang J. A.** 1995. Fecundity of the blood-feeding insect *Rhodnius prolixus* increases in successive periods of egg production. *Experientia*. 51(3): 289-292.
- Chiang R. G. & Chiang J. A.** 2017. Reproductive physiology in the blood feeding insect, *Rhodnius prolixus*, from copulation to the control of egg production. *Journal of Insect Physiology*. 97: 27-37.
- Clark S. J.** 1988. The effects of operational sex ratio and food deprivation on copulation duration in the water strider (*Gerris remigis* Say). *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 23: 317-322.
- Cocchiararo-Bastias L. M., Mijailovsky S. J., Calderon-Fernández G. M., Lorenzo Figueiras A. N. & Juárez M. P.** 2011. Epicuticle Lipids Mediate Mate Recognition in *Triatoma infestans*. *Journal of Chemical Ecology*. 37(3): 246-252.
- Cohen J.** 1975. Gamete redundancy-wastage or selection? Pages 99-112, in Mulcahy D. L., Gamete competition in plants and animals. North Holland, Amsterdam.
- Coleman S. W., Patricelli G. L. & Borgia G.** 2004. Variable female preferences drive complex male displays. *Nature*. 428: 742-745.
- Collins S. A.** 1995. The effect of recent experience on female choice in zebra finches. *Animal Behaviour*. 49: 479-486.
- Contreras-Garduño J., Peretti A. V. & Córdoba-Aguilar A.** 2006. Evidence that Mating Plug is Related to Null Female Mating Activity in the Scorpion *Vaejovis punctatus*. *Ethology*. 112(2): 152-163.
- Córdoba-Aguilar A., Uhía E. & Cordero Rivera A.** 2003. Sperm competition in Odonata (Insecta): the evolution of female sperm storage and rivals' sperm displacement. *Journal of Zoology*. 261(4): 381-398.
- Cotton S., Fowler K. & Pomiankowski A.** 2004. Do sexual ornaments demonstrate heightened condition-dependent expression as predicted by the handicap hypothesis? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 271: 771-783.



- Crespo J. G. & Manrique G.** 2007. Mating behavior of the haematophagous bug *Triatoma infestans*: Role of Brindley's and metasternal glands. *Journal of Insect Physiology*. 53: 708-714.
- Crowley P. H., Travers S. E., Linton M. C, Cohn S. L., Sih A. & Craig Sargent R.** 1991. Mate density, predation risk, and the seasonal sequence of mate choices: A dynamic game. *The American Naturalist* 137(4): 567-596.
- Davey K. G.** 1958. The Migration of Spermatozoa in the Female of *Rhodnius Prolixus* Stal. *Journal of Experimental Biology*. 35: 694-701.
- Davey K. G.** 1959. Spermatophore Production in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Cell Science*. 3(100): 221-230.
- Davey K. G.** 1965. Copulation and egg-production in *Rhodnius prolixus*: The role of the spermathecae. *Journal of Experimental Biology*. 42: 373-378.
- Davey K. G.** 1967. Some Consequences Of Copulation in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology*. 13: 1629-1636.
- Davey K. G.** 2007. The interaction of feeding and mating in the hormonal control of egg production in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology*. 53: 208-215.
- Dávila F. & Aron S.** 2017. Protein restriction affects sperm number but not sperm viability in male ants. *Journal of Insect Physiology*. 100: 71-76.
- Dewsbury D. A.** 1981. Effects of novelty on copulatory-behavior – the Coolidge effect and related phenomena. *Psychological Bulletin*. 89: 464-482.
- Dewsbury D. A.** 1982. Ejaculate cost and male choice. *The American Naturalist*. 119: 601-610.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W.** InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Donovan A. & Verrell P. A.** 1991 The effect of partner familiarity on courtship success in the salamander *Desmognathus ochrophaeus*. *Journal of Herpetology*. 25: 93-95.
- Eberhard W. G.** 1996. Female Control: Sexual Selection by Cryptic Female Choice. Monographs in Behavior and Ecology. Princeton University Press. Princeton & Oxford.
- Eberhard W. G. & Cordero C.** 1995. Sexual selection by cryptic female choice on male seminal products - a new bridge between sexual selection and reproductive physiology. *Trends in Ecology & Evolution*. 10(12): 493-496.

- Emlen S. T.** 1976. Lek organization and mating strategies in the bullfrog. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 1: 283-313.
- Emlen S. T. & Oring L. W.** 1977. Ecology, sexual selection and the evolution of mating systems. *Science*. 197: 215-222.
- Fedina T. Y. & Lewis S. M.** 2006. Proximal traits and mechanisms for biasing paternity in the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 60(6): 844-853.
- Fitzpatrick S., Feliciangeli M. D., Sánchez-Martín M., Monteiro F. A. & Miles M. A.** 2008. Molecular genetics reveal that silvatic *Rhodnius prolixus* do colonise rural houses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2(4): e210.
- Fowler K. & Partridge L.** 1989. A cost of mating in female fruitflies. *Nature*. 338: 760-761.
- Friberg U.** 2006. Male perception of female mating status: its effect on copulation duration, sperm defence and female fitness. *Animal Behaviour*. 72: 1259-1268.
- Fricke C., Bretman A. & Chapman T.** 2008. Adult male nutrition and reproductive success in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*. 62(12): 3170-3177.
- Friend W., Choy C. & Cartwright E.** 1965. The effect of nutrient intake on the development and the egg production of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Canadian Journal of Zoology*. 43: 891-904.
- Gage M. J. G. & Cook P. A.** 1994. Sperm Size or Numbers? Effects of Nutritional Stress Upon Eupyrene and Apyrene Sperm Production Strategies in the Moth *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidea). *Functional Ecology*. 8(5): 594-599.
- Gamboa C. J.** 1963. Comprobación de *Rhodnius prolixus* extra domiciliario en Venezuela. *Boletín De La Oficina Sanitaria Panamericana*. 54: 18-25.
- Garbaczewska M., Billeter J. C. & Levine J. D.** 2013. *Drosophila melanogaster* males increase the number of sperm in their ejaculate when perceiving rival males. *Journal of Insect Physiology*. 59: 306-310.
- Gilbert L. E.** 1976. Postmating female odor in *Heliconius butterflies*: a male-contributed antiaphrodisiac? *Science*. 193(4251): 419-420.
- Goodchild A. J. P.** 1955. Some observations on growth and egg production of the blood-sucking Reduviids, *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. *Physiological Entomology*. 30: 137-144.
- Gould J. G. & Gould C. G.** 1989. *Sexual Selection*. Scientific American Library. A division of HPHLP. New York.

- Gray D. A.** 1997. Female House crickets, *Acheta domesticus*, prefer the chirps of large males. *Animal Behaviour*. 54: 1553-1562.
- Gress B. E. & Pitnick S.** 2017. Size-dependent ejaculation strategies and reproductive success in the yellow dung fly, *Scathophaga stercoraria*. *Animal Behaviour*. 127: 281-287.
- Griggio M., Hoi H., Lukasch B. & Pilastro A.** 2016. Context-dependent female preference for multiple ornaments in the bearded reedling. *Ecology and Evolution*. 6: 493-501.
- Happ G.** 1969. Multiple Sex Pheromones of the Mealworm Beetle, *Tenebrio molitor* L. *Nature*. 222: 180-181.
- Hebets E. A.** 2003. Subadult experience influences adult mate choice in an arthropod: exposed female wolf spiders prefer males of a familiar phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100: 13390-13395.
- Hebets E. A. & Vink C.J.** 2007. Experience leads to preference: experienced females prefer brush-legged males in a population of syntopic wolf spiders. *Behavioral Ecology*. 18: 1010-1020.
- Hedrick A. & Dill L. M.** 1993. Mate choice by female crickets is influenced by predation risk. *Animal Behaviour*. 46: 193-196.
- Hettyey A., Vagi B., Hevizi G. & Torok J.** 2009. Changes in sperm stores, ejaculate size, fertilization success, and sexual motivation over repeated matings in the common toad, *Bufo bufo* (Anura: Bufonidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 96: 361-371.
- Hodin J.** 2009. She shapes events as they come: plasticity in female insect reproduction. Pages 423-521 in D. W. Whitman and T. N. Ananthakrishnan. *Phenotypic plasticity of insects mechanisms and consequences*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Hooper A. K., Wegener B. J. & Wong B. B. M.** 2016. When should male squid prudently invest sperm. *Animal Behaviour*. 112: 163-167.
- Ivy T. M., Weddle C. B. & Sakaluk S. K.** 2005. Females use self-referent cues to avoid mating with previous mates. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 272: 2475-2478.
- Jarrige A., Kassis A., Schmoll T. & Goubault M.** 2016. Recently mated males of a lek-mating insect intensify precopulatory mate guarding under male competition. *Animal Behaviour*. 117: 21-34.
- Jennions M. D. & Petrie M.** 1997. Variation in mate choice and mating preferences: a review of causes and consequences. *Biological Reviews*. 72(2): 283-327.
- Jirotkul M.** 1999. Operational sex ratio influences female preference and male–male competition in guppies. *Animal Behaviour*. 58: 287-294.

- Johansson B. G. & Jones T. M.** 2007. The role of chemical communication in mate choice. *Biological Reviews*. 82(2): 265-289.
- Jordan L. A. & Brooks R. C.** 2010. The lifetime costs of increased male reproductive effort: courtship, copulation and the Coolidge effect. *Journal of Evolutionary Biology*. 23: 2403-2409.
- Kahril A. F. & Cox R. M.** 2015. Diet affects ejaculate traits in a lizard with condition-dependent fertilization success. *Behavioral Ecology*. 26(6): 1502-1511.
- Kaldun B. & Otti O.** 2016. Condition-dependent ejaculate production affects male mating behavior in the common bedbug *Cimex lectularius*. *Ecology and Evolution*. 14;6(8): 2548-2558.
- Kelley J. L., Graves J. A. & Magurran A. E.** 1999. Familiarity breeds contempt in guppies. *Nature*. 401: 661-662.
- Kelso E. C. & Verrell P. A.** 2002. Do male veiled chameleons, *Chamaeleo calyptratus*, adjust their courtship displays in response to female reproductive status? *Ethology*. 108: 495-512.
- Khalifa A.** 1950. Spermatophore production and egg-laying behaviour in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Parasitology*. 40(3-4): 283-289.
- Knell R. J. & Webberley K. M.** 2004. Sexually transmitted diseases of insects: distribution, evolution, ecology and host behaviour. *Biological Reviews*. 79: 557-581.
- Kodric-Brown A.** 1989. Dietary carotenoids and male mating success in the guppy: an environmental component to female choice. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 25: 393-401.
- Kodric-Brown A. & Nicoletto P. F.** 1996. Consensus among females in their choice of males in the guppy *Poecilia reticulata*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 39: 395-400.
- Kodric-Brown A. & Nicoletto P. F.** 2001. Age and experience affect female choice in the guppy (*Poecilia reticulata*). *The American Naturalist*. 157(3): 316-23.
- Koene J. M. & Ter Maat A.** 2007. Coolidge effect in pond snails: male motivation in a simultaneous hermaphrodite. *BMC Evolutionary Biology*. 7: 212.
- Kudo H. & Karino K.** 2012. Short-term change in male sexually selected traits and female mate preference in the guppy *Poecilia reticulata*. *Ichthyological Research*. 59(1): 1-7.
- Kukuk P.** 1985. Evidence for an antiaphrodisiac in the sweat bee *Lasioglossum (Dialictus) zephyrum*. *Science*. 227: 656-657.
- Lazzari C. R.** 1992. Circadian organization of locomotion activity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *Journal of Insect Physiology*. 38: 895-903.

- Lea J., Halliday T. & Dyson M.** 2000. Reproductive stage and history affect the phonotactic preferences of male midwife toads, *Alytes muletensis*. *Animal Behaviour*. 60: 423-427.
- Lee K. P., Simpson S. J., Clissold F. J., Brooks R., Ballard J. W. O., Taylor P. W., Soran N. & Raubenheimer D.** 2008. Lifespan and reproduction in *Drosophila*: new insights from nutritional geometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 105: 2498-2503.
- Lent H. & Wygodzinsky P.** 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 163(3): 123-520.
- Leopold R. A.** 1976. The role of male accessory glands in insect reproduction. *Annual Review of Entomology*. 21: 199-221.
- Lima M. M., Jurberg P. & de Almeida J. R.** 1986. Behavior of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas' disease. I. Courtship and copulation of *Panstrongylus megistus* (Burm., 1835) in the laboratory. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 81(1): 1-5.
- Locatello L., Poli F. & Rasotto M. B.** 2015. Context-dependent evaluation of prospective mates in a fish. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 69(7): 1119-1126.
- López S.** 1999. Parasitized female guppies do not prefer showy males. *Animal Behaviour*. 57: 1129-1134.
- Manrique G. & Lazzari C. R.** 1994. Sexual behavior and stridulation during mating in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Memorias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 89(4): 629-633.
- Manrique G. & Lazzari C. R.** 1995. Existence of a sex pheromone in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae): I Behavioural evidences. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 90(5): 645-648.
- Manrique G. & Lorenzo M. G.** 2012. The Sexual Behaviour of Chagas Disease Vectors: Chemical Signals Mediating Communication between Male and Female Triatomine Bugs. *Psyche*. 1-8.
- Manrique G. & Schilman P. E.** 2000. Two different vibratory signals in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Tropica*. 77: 271-278.
- Manrique G., Vitta A. C. R., Ferreira R. A., Zani C. L., Unelius C. R., Lazzari C. R., Diotaiuti L., Lorenzo M. G.** 2006. Chemical communication in Chagas disease vectors. Source, identity and potential function of volátiles released by the metasternal and Brindley's glands of *Triatoma infestans* adults. *Journal of Chemical Ecology* 32: 2035-2052.
- Martin O. Y. & Hosken D. J.** 2002. Strategic ejaculation in the common dung fly *Sepsis cynipsea*. *Animal Behaviour*. 63(3): 541-546.

- Martin P. & Bateson P.** 1993. Measuring of behavior: an introductory guide. Cambridge University Press. 222p.
- May-Concha I., Rojas J. C., Cruz-López L., Millar J. G. & Ramsey J. M.** 2012. Volatile compounds emitted by *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease: chemical analysis and behavioural evaluation. *Medical and Veterinary Entomology*. 27(2): 165-174.
- McGraw L.A., Fiumera A.C., Ramakrishnan M., Madhavarapu S., Clark A. G. & Wolfner M. F.** 2007. Larval rearing environment affects several post-copulatory traits in *Drosophila melanogaster*. *Biology Letters*. 3: 607-610.
- Mérot C., Frérot B., Leppik E. & Joron M.** 2015. Beyond magic traits: Multimodal mating cues in Heliconius butterflies. *Evolution*. 69(11): 2891-904.
- Mills S. C. & Reynolds J. D.** 2003. Operational sex ratio and alternative reproductive behaviours in the European bitterling, *Rhodeus sericeus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 54: 98-104.
- Monteiro F. A., Barrett T. V., Fitzpatrick S., Cordon-Rosales C., Feliciangeli D. & Beard C. B.** 2003. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Molecular Ecology*. 12: 997-1006.
- Moore P. J. & Moore A. J.** 2001. Reproductive aging and mating: the ticking of the biological clock in female cockroaches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98: 9171-9176.
- Morehouse N. I., Nakazawa T., Booher C. M., Jeyasingh P. D. & Hall M. D.** 2010. Sex in a material world: why the study of sexual reproduction and sex-specific traits should become more nutritionally explicit. *Oikos*. 119: 766-778.
- Neelon D. P.** 2017. Social plasticity in choosiness in green tree frogs, *Hyla cinerea*. *Behavioral Ecology*. 28(6): 1540-1546.
- Ödeen A. & Moray C. M.** 2008. *Drosophila melanogaster* virgins are more likely to mate with strangers than familiar flies. *Naturwissenschaften*. 95: 253-256.
- Ono T., Siva-Jothy M. T. & Kato A.** 1989. Removal and subsequent ingestion of rivals' semen during copulation in a tree cricket. *Physiological Entomology*. 14(2): 195-202.
- Papkea M. D., Riechertbf S. E. & Schulz S.** 2001. An airborne female pheromone associated with male attraction and courtship in a desert spider. *Animal Behaviour*. 61(5): 877-886.
- Parker G. A.** 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews*. 45: 525-567.

- Parker G. A.** 2006. Sexual conflict over mating and fertilization: an overview. *Philosophical Transactions. The Royal Society B.* 361: 235-259.
- Parker G. A. & Pizzari T.** 2010. Sperm competition and ejaculate economics. *Biological Reviews. Cambridge Philosophical Society.* 85(4): 897-934.
- Parker G. A., Baker R.R. & Smith V.G.F.** 1972. The origin and evolution of gamete dimorphism and the male-female phenomenon. *Journal of Theoretical Biology.* 36(3): 529-553.
- Pereira-Lourenço A. S., Santos-Mallet J. R. & Freitas S. P. C.** 2013. Anatomy of the Spermatophore in Triatomines (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) and Its Applications to the Study of Chagas Disease Vector. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Biology.* 89(4): 775-780.
- Peretti A. V. & Aisenberg A.** 2011. Communication under sexual selection hypotheses: challenging prospects for future studies under extreme sexual conflict. *Acta Ethologica.* 14: 109-116.
- Perry J. C & Rowe L.** 2010. Condition-dependent ejaculate size and composition in a ladybird beetle. *Proceedings of the Royal Society. B: Biological Sciences.* 277: 3639-3647.
- Peschke K.** 1987 Male-aggression, female mimicry and female choice in the rove beetle, *Aleochara curtula* (Coleoptera, Staphylinidae). *Ethology.* 75: 265-284.
- Pfennig K. S. & Tinsley R. C.** 2002. Different mate preferences by parasitized and unparasitized females potentially reduces sexual selection. *Journal of Evolutionary Biology.* 15: 399-406.
- Pires H. H. R., Lorenzo M. G., Lazzari L. D. & Manrique G.** 2004. The Sexual Behaviour of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): an Experimental Study. *Memories Institute Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 99(3): 295-300.
- Pizzari T., Cornwallis C. K., Lovlie H., Jakobsson S. & Birkhead T. R.** 2003. Sophisticated sperm allocation in male fowl. *Nature.* 426: 70-74.
- Pompilio L., González Franco M., Chisari L. B. & Manrique G.** 2016. Female choosiness and mating opportunities in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Behaviour.* 153(15): 1863-1878.
- Pontes G. B. & Lorenzo M. G.** 2012. Female metasternal gland odours mediate male aggregation in *Rhodnius prolixus*, a triatomid bug. *Medical and Veterinary Entomology.* 26(1): 33-36.
- Pontes G. B., Bohman B., Unelius C. R. & Lorenzo M. G.** 2008. Metasternal Gland Volatiles and Sexual Communication in the Triatomine Bug, *Rhodnius prolixus*. *Journal of Chemical Ecology.* 34(4): 450-457.
- Poulin R.** 1994. Mate Choice Decisions by Parasitized Female Upland Bullies, *Gobiomorphus breviceps*. *Proceedings of The Royal Society. Series B, Biological Sciences.* 256: 183-187.

- Poulin R. & Vickery W. L.** 1996. Parasite-mediated sexual selection: just how choosy are parasitized females? *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 38:43-49.
- Pratt G. E. & Davey K. G.** 1972a. The corpus allatum and oogenesis in *Rhodnius prolixus* (Stal.) II. The effect of starvation. *Journal of Experimental Biology*. 56: 215-221.
- Pratt G. E. & Davey K. G.** 1972b. The corpus allatum and oogenesis in *Rhodnius prolixus* (Stal.) III. The effect of mating. *Journal of Experimental Biology*. 56: 223-237.
- Ramírez Pérez J.** 1969. Estudio sobre la anatomía de *Rhodnius prolixus*. *Revista Venezolana de Sanidad y Asistencia Social*. 34: 10-98.
- Real L.** 1990. Search theory and mate choice. I. Models of single-sex discrimination. *The American Naturalist*. 136(3): 376-405.
- Reaney T.** 2009. Female preference for male phenotypic traits in a fiddler crab: do females use absolute or comparative evaluation? *Animal Behaviour*. 7(1): 139-143.
- Reznick D.** 1985. Costs of Reproduction: An Evaluation of the Empirical Evidence. *Oikos*. 44(2): 257-267.
- Roberts J. A. & Uetz G. W.** 2005. Information content of female chemical signals in the wolf spider, *Schizocosa ocreata*: male discrimination of reproductive state and receptivity. *Animal Behaviour*. 70(1): 217-223.
- Roces F. & Manrique G.** 1996. Different stridulatory vibrations during sexual behaviour and disturbance in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Insect Physiology*. 42(3): 231-238.
- Rojas J. C., Malo E. A., Gutierrez-Martinez A. & Ondarza R. N.** 1990. Mating Behavior of *Triatoma mazzottii* Usinger (Hemiptera: Reduviidae) Under Laboratory Conditions. *Annals of the Entomological Society of America*. 83(3): 598-602.
- Rosa M. E., Barta Z., Fülöp A., Székely T. & Kosztolányi A.** 2017. The effects of adult sex ratio and density on parental care in *Lethrus apterus* (Coleoptera, Geotrupidae). *Animal Behaviour*. 132: 181-188.
- Rouse J. & Bretman A.** 2016. Exposure time to rivals and sensory cues affect how quickly males respond to changes in sperm competition threat. *Animal Behaviour*. 122: 1-8.
- Ruhela A. & Sinha M.** 2010. *Recent Trends in Animal Behaviour*. Published by Oxford Book Company, Jaipur.
- Schofield C. J.** 1994. *Triatominae, biología y control*. Eurocommunica Publications, United Kingdom.



- Schütz D., Tschirren L., Pachler G., Grubbauer P. & Taborsky M.** 2017. Sperm-limited males save ejaculates for future matings when competing with superior rivals. *Animal Behaviour*. 125: 3-12.
- Sedra L. & Lange A. B.** 2013. The female reproductive system of the kissing bug, *Rhodnius prolixus*: arrangements of muscles, distribution and myoactivity of two endogenous FMRFamide-like peptides. *Peptides*. 53: 140-147.
- Servedio M. R. & Lande R.** 2006. Population genetic models of male and mutual mate choice. *Evolution*. 60(4): 674-685.
- Shelly T. E. & Bailey W. J.** 1992. Experimental manipulation of mate choice by male katydids: the effect of female encounter rate. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 30(3): 277-282.
- Simmons L. W.** 2001. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Monographs in Behavior and Ecology*. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ.
- Simmons L. W. & Gwynne D. T.** 1991. The refractory period of female katydids (Orthoptera: Tettigoniidae): sexual conflict over the remating interval? *Behavioral Ecology*. 2(4): 276-282.
- Siva-Jothy M. T. & Stutt A. D.** 2003. A matter of taste: direct detection of female mating status in the bedbug. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 270: 649-652.
- Spieth, H. T.** 1966. Courtship behavior of Hawaiian Drosophilidae. University of Texas Publication. 6615: 245-313.
- Steiger S., Franz R., Eggert A. K. & Muller J. K.** 2008. The Coolidge effect, individual recognition and selection for distinctive cuticular signatures in a burying beetle. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 275: 1831-1838.
- Stoltz J. A., McNeil J. N. & Andrade M. C. B.** 2007. Males assess chemical signals to discriminate just-mated females from virgins in redback spiders. *Animal Behaviour*. 74: 1669-1674.
- Sugawara T.** 1979. Stretch reception in the bursa copulatrix of the butterfly, *Pieris rapae crucivora*, and its role in behavior. *Journal of Comparative Physiology*. 130: 191-199.
- Thomas M. & Simmons L.** 2007. Male crickets adjust the viability of their sperm in response to female mating status. *American Naturalist*. 170: 190-195.
- Thornhill R. & Alcock J.** 1983. The evolution of insect mating systems. Harvard University Press. Cambridge, Mass. 547 pp.
- Tokarz R. R.** 1992. Male mating preference for unfamiliar females in the lizard, *Anolis sagrei*. *Animal Behaviour*. 44: 843-849.

- Trabalon M., Bagnères A. G. & Roland C.** 1997. Contact Sex Signals in Two Sympatric Spider Species, *Tegenaria domestica* and *Tegenaria pagana*. *Journal of Chemical Ecology*. 23(3): 747-758.
- Trimberger G. W.** 1962. Artificial insemination. Pages 144-162 in E. S. E. Hafez. *Reproduction in farm animals*. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Uetz G. W. & Norton S.** 2007. Preference for male traits in female wolf spiders varies with the choice of available males, female age and reproductive state. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 6: 631-641.
- Vitta A. C. R. & Lorenzo M. G.** 2009. Copulation and mate guarding behavior in *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*. 46(4): 789-795.
- Vitta A. C. R., Bohman B., Unelius C. R. & Lorenzo M. G.** 2009. Behavioral and Electrophysiological Responses of *Triatoma brasiliensis* Males to Volatiles Produced in the Metasternal Glands of Females. *Journal of Chemical Ecology*. 35(10): 1212-1221.
- Wang Z. & Davey K. G.** 1993. The role of juvenile hormone in vitellogenin production in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology*. 39 (6): 471-476.
- Wcislo W. T.** 1992. Attraction and learning in mate-finding by solitary bees, *Lasioglossum (Dialictus) figueresi* Wcislo and *Nomia triangulifera* Vachal (Hymenoptera: Halictidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 31: 139-148.
- Wedell N., Gage M. J. G. & Parker G. A.** 2002. Sperm competition, male prudence and sperm-limited females. *Trends in Ecology & Evolution*. 17: 313-320.
- Weir L. K., Grant J. W. A. & Hutchings J. A.** 2011. The Influence of Operational Sex Ratio on the Intensity of Competition for Mates. *The American Naturalist*. 177(2): 167-176.
- Westerman E.L., Chirathivat N., Schyling E. & Monteiro A.** 2014. Mate preference for a phenotypically plastic trait is learned, and may facilitate preference-phenotype matching. *Evolution*. 68(6): 1661-1670.
- Willis P. M., Ryan M. J. & Rosenthal G. G.** 2011. Encounter rates with conspecific males influence female mate choice in a naturally hybridizing fish. *Behavioral Ecology*. 22(6): 1234-1240.
- Wilson J. R., Kuehn R. E. & Beach F. A.** 1963. Modification in sexual behavior of male rats produced by changing stimulus female. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 56: 636-644.
- Xie J., De Clercq P., Zhang Y., Wu H., Pan C. & Pangb H.** 2015. Nutrition-dependent phenotypes affect sexual selection in a ladybird. *Scientific Reports*. 7(2): 159-170.

**Zacharias C. A., Pontes G. B., Lorenzo M. G. & Manrique G.** 2010. Flight Initiation by Male *Rhodnius prolixus* is Promoted by Female Odors. *Journal of Chemical Ecology*. 36(4): 449-451.

**Zahavi A.** 1975. Mate selection-a selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology*. 53(1): 205-214.

**Zeledon R. & Rabinovich J. E.** 1981. Chagas disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Annual Review of Entomology*. 26: 101-133.