

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Evolución del gameto masculino de lagartos del género *Tupinambis* asociada al riesgo de competencia espermática**

por

**Biol. Cecilia Soledad Blengini**

**Directora: Dra. Chiaraviglio, Margarita**

**Co-directora: Dra. Giojalas, Laura C.**

**Laboratorio de Biología del Comportamiento  
Instituto de Diversidad y Ecología Animal (IDEA)  
CONICET – Universidad Nacional de Córdoba.**



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES.  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

Córdoba, Argentina  
2014

## COMISIÓN ASESORA

Dra. Margarita Chiaraviglio, Instituto de Diversidad y Ecología Animal (IDEA) CONICET-UNC, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.

Dr. Alfredo Peretti, Instituto de Diversidad y Ecología Animal (IDEA) CONICET-UNC, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.

Dr. Miguel Walter Fornés, Instituto de Histología y Embriología Mendoza. (IHEM) CONICET-UN Cuyo, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo.

## DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

### TRIBUNAL

Firma: ..... Aclaración: .....

Firma: ..... Aclaración: .....

Firma: ..... Aclaración: .....

*A mi familia*

## **Agradecimientos**

A mi directora de tesis, Marga, por haber confiado en mi y abrirme las puertas de su laboratorio. Por su apoyo en cada aventura que se me ocurría emprender, por ayudarme a crecer en la carrera científica y los grandes consejos de vida que me hacen ser mejor persona.

A mi co-directora de tesis, Laura, por permitirme seguir trabajando en su laboratorio y las discusiones durante estos años de trabajo.

A mis amigos del laboratorio de Biología del Comportamiento: Sergio, Maxi, Gaby, Vale, Pau, Ima y Guada por los momentos compartidos tanto dentro como fuera del labo.

A mis amigos del CEBICEM: Dieguis, Anyi, Ale, Marisa, Aye, Lauri, Vic, Andre por que cada vez que fui a invadirles el laboratorio me recibieron con un mate, una sonrisa y siempre dispuestos a ayudarme.

A mi comisión asesora: el Dr. Alfredo Peretti y el Dr. Miguel Fornés por su gran predisposición y ayuda durante estos cinco años aportando nuevas visiones para mejorar nuestro trabajo. Y al evaluador externo Dr. Juan Manuel Busso por su evaluación que aportó una mirada diferente a nuestras preguntas fortaleciendo la discusión del trabajo.

A la gente del campo, que sin su ayuda hubiera sido imposible realizar este trabajo y por el intercambio de vivencias que fueron muy importantes para mi crecimiento personal. En especial a Carlos Beck y su familia, a Quirko, a Galván y a la familia Lobos.

A todas las fuentes de financiamiento que hicieron posible tanto el desarrollo de esta tesis como de todos los proyectos del laboratorio: CONICET, FONCYT, SECYT, MINCYT entre otras.

Al Dr. Pitnick y todo su grupo de trabajo, por abrirme las puertas de su laboratorio y su generosidad y calidad humana durante mi estadía.

A mi familia, Ma, Pa y Fer, porque sin ustedes no hubiera podido hacer nada de mi vida. Por el apoyo incondicional a cada aventura, por estar siempre. Fueron años complicados para todos, pero este logro es un símbolo de que paso a paso se puede salir adelante. Los quiero con todo mi corazón.

A mi cómplice en la vida, Jojo, un inmenso gracias por el apoyo, los consejos, la paz que me das. Y sobre todo, por esperarme y entender que era una etapa muy importante en mi vida. Te amo. Y ahora si siempre juntos.

A la loca familia de Juampi, a todos y cada uno de ellos, por hacerme sentir parte de esa familia desde el primer día.

A mis amigos de la vida: Leti, Ju, Lu, Tefi, Chechu, Anita, los Cuices, Lau Monti, Beli, Andre, Oli, Mery, Mari, Ange, Rei, Vic, Lauri Bertoldi, Hernan, Nahuel, Pablito, Emi porque fueron y son un pilar fundamental en mi vida. Gracias por estar siempre.

# Listado de publicaciones derivadas de esta Tesis

## Artículos adjuntados al final del manuscrito

**Blengini, C.S.**, Naretto, S, Cardozo, G, Giojalas, L.C y Chiaraviglio, M. 2014. Variability in sperm form and function in the context of sperm competition risk in two *Tupinambis* lizards. *Ecology and Evolution*. 4(21):4080-4092.

Naretto, S; Cardozo, G.; **Blengini, C.S.** y M. Chiaraviglio. 2014. Sexual selection and dynamics of jaw muscle in *Tupinambis* lizards. *Evolutionary Biology*. 41(2):192-200.

Lüpold, S; Pitnick, S; Berben K.S; **Blengini, C.S.**; Belote, J.M y Manier M.K. 2013. Female mediation of competitive fertilization success in *Drosophila melanogaster*. PNAS 110(26): 106983-10698.

# Índice

Índice de tablas y figuras.....	1
Abreviaturas.....	6
Resumen.....	8
Abstract.....	10
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>11</b>
❖ Sistemas de apareamiento y selección sexual post-copulatoria.....	11
❖ Riesgo de competencia espermática.....	11
❖ Relación entre los caracteres espermáticos y la competencia espermática....	12
❖ Contextos sociales intra- e inter-específicos (alopatría-simpatría).....	15
❖ Squamata en el contexto de la competencia espermática.....	15
❖ Lagartos como modelo de estudio ( <i>Tupinambis merianae</i> y <i>T. rufescens</i> )....	16
❖ Hipótesis y Objetivo General.....	16
❖ Lineamientos de la Tesis.....	17
<b>METODOLOGÍA GENERAL.....</b>	<b>18</b>
❖ Especies en estudio.....	18
❖ Áreas de estudio.....	18
❖ Metodología de captura en vida silvestre.....	19
❖ Indicadores de riesgo de competencia espermática.....	20
❖ Obtención de muestras espermáticas.....	21
❖ Determinación de los caracteres espermáticos.....	21
❖ Ensayo de interacción espermática de machos potencialmente rivales <i>in vitro</i> .....	24
 Capítulo 1:	
<b>CARACTERES ESPERMATICOS COMO ESTRATEGIA DE RIESGO</b>	
<b>COMPETENCIA ESPERMATICA EN LAGARTOS <i>Tupinambis merianae</i> y <i>T. rufescens</i>.....</b>	<b>26</b>
➤ Introducción:.....	26
▪ Riesgo de competencia espermática.....	26

▪	Influencia de la competencia espermática sobre los caracteres de los espermatozoides en tres niveles de aproximación: entre especies y dentro de cada especie: entre machos y dentro de cada macho.....	26
▪	Relación forma y función espermática.....	28
▪	Interacción entre esperma-esperma de machos potencialmente rivales.....	28
▪	Objetivos específicos.....	29
➤	Metodología específica.....	31
➤	Resultados:.....	34
▪	Diferencias en el riesgo de competencia espermática entre especies.....	34
▪	Variación en los caracteres espermáticos.....	34
◆	Comparación inter-específica de los caracteres espermáticos (concentración, RAE, viabilidad, morfometría y caracteres dinámicos).....	34
◆	Variación intra-específica de los caracteres espermáticos entre machos y dentro de cada macho.....	35
◆	Temporalidad de la variabilidad dentro de cada macho de los caracteres morfométricos del espermatozoide.....	36
◆	Relación entre variabilidad dentro de cada macho de los caracteres espermáticos y la condición corporal.....	36
▪	Relación entre morfometría y velocidad espermática.....	42
▪	Ensayo de interacción espermática de machos potencialmente rivales <i>in vitro</i> .....	45
➤	Discusión.....	47

Capítulo 2:

<b>ULTRAESTRUCTURA DE ESPERMATOZOIDEOS DE <i>Tupinambis merianae</i> y <i>T. rufescens</i> EN EL CONTEXTO DE COMPETENCIA ESPERMÁTICA.....</b>	<b>53</b>
➤ Introducción:.....	53
▪ Ultraestructura en el contexto filogenético.....	53
▪ Importancia de los caracteres ultraestructurales en el contexto de la competencia espermática. Evidencias en Squamata.....	53
▪ Objetivos específicos.....	55
➤ Metodología específica.....	56



➤ Resultados:	57
▪ Descripción de la ultraestructura de los espermatozoides de <i>Tupinambis merianae</i> y <i>T. rufescens</i>	57
▪ Comparación inter-específica de caracteres ultraestructurales (nº de mitocondrias, área de vaina fibrosa y fibras 3-8)	61
➤ Discusión	63

Capítulo 3:

**RELACIÓN ENTRE EL CARÁCTER SEXUAL SECUNDARIO Y LOS CARACTERES ESPERMATICOS EN *Tupinambis merianae* y *T. rufescens***

.....	66
-------	----

➤ Introducción:	66
▪ Relación entre selección sexual pre- y post-copulatoria	66
▪ Hipótesis de fenotipo unido a fertilidad vs hipótesis de competencia espermática	66
▪ Carácter sexual secundario	67
▪ Caracteres espermáticos (concentración, morfometría y velocidad)	68
▪ Variación temporal de las estrategias reproductivas de los machos	69
▪ Objetivos específicos	69
➤ Metodología específica	70
➤ Resultados:	71
▪ Relación entre el músculo pterigoideo y los caracteres espermáticos	71
▪ Relación entre el músculo pterigoideo y la variabilidad dentro cada macho de los caracteres espermáticos	71
▪ Diferencias en los caracteres espermáticos entre distintos tipos de machos	74
▪ Variación temporal de los caracteres reproductivos a lo largo de la temporada reproductiva	74
➤ Discusión	79

Capítulo 4:

**CARACTERES ESPERMÁTICOS EN RELACIÓN A PRESIONES DE SELECCIÓN SEXUAL INTER- E INTRA- ESPECÍFICAS**

.....	82
-------	----

➤ Introducción:.....	82
▪ Selección post-copulatoria como fuerza diversificadora de especies.....	82
▪ Contextos de competencia inter- e intra-específicos.....	83
▪ Variaciones en los caracteres espermáticos.....	83
▪ Objetivos específicos.....	84
➤ Metodología específica.....	86
➤ Resultados:.....	88
▪ Indicadores de riesgo de competencia intra- e ínter-específicos.....	88
▪ Comparación intra-específica de los caracteres espermáticos.....	89
▪ Comparación de los caracteres reproductivos de los machos en distintos contextos sociales.....	90
▪ Comparación inter-específica de los caracteres espermáticos en la población simpátrica.....	92
➤ Discusión.....	93
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>96</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>98</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO: PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS.....</b>	<b>123</b>

# Índice de Tablas y Figuras

**Tabla 1.** Número de ejemplares maduros de *Tupinambis merianae* y *Tupinambis rufescens* estudiados en cada temporada.

**Tabla 2.** Comparación del peso testicular y peso del músculo pterigoideo entre especies de *Tupinambis*. Media del carácter  $\pm$  desvío estándar. ANCOVA con PC como covariable. Los análisis estadísticos se realizaron con las variables transformadas Log 10. Se presentan arriba los valores *F* y *P* para el efecto especie y abajo para el efecto de la covariable.

**Tabla 3.** Proporción de sexo operativa de *Tupinambis merianae* y *Tupinambis rufescens*.

**Tabla 4.** Comparación de caracteres morfométricos y dinámicos del espermatozoide entre especies de *Tupinambis*.

**Tabla 5.** Variación entre machos de los caracteres morfométricos y dinámicos del espermatozoide en *Tupinambis merianae* y *Tupinambis rufescens*.

**Tabla 6.** Partición de la varianza de los caracteres morfométricos y dinámicos del espermatozoide en: Varianza entre especies, entre machos y dentro de cada macho.

**Tabla 7.** Diferencias entre machos en la variación dentro de cada macho de los caracteres morfométricos y dinámicos del espermatozoide en *Tupinambis merianae* y *Tupinambis rufescens*.

**Tabla 8.** Variación temporal del CV dentro de cada macho en los caracteres morfométricos del espermatozoide de *Tupinambis*.

**Tabla 9.** Relación entre la variabilidad dentro de cada macho de los caracteres espermáticos y la condición corporal en *Tupinambis*.

**Tabla 10.** Relación entre VSL y caracteres morfométricos del espermatozoide en *Tupinambis*.

**Tabla 11.** Relación entre VCL y caracteres morfométricos del espermatozoide en *Tupinambis*.

**Tabla 12.** Relación entre VSL y VCL con la variabilidad dentro de cada macho (CV) de los caracteres morfométricos del espermatozoide en *Tupinambis*.

**Tabla 13.** Comparación de caracteres dinámicos de los espermatozoides de *T. merianae* en un ensayo de interacción espermática de machos potencialmente rivales *in vitro*.

**Tabla 14.** Relación entre el peso del músculo pterigoideo y los caracteres espermáticos en *Tupinambis merianae*.

**Tabla 15.** Relación entre el peso del músculo pterigoideo y los caracteres espermáticos en *Tupinambis rufescens*.

**Tabla 16.** Relación entre el peso del músculo pterigoideo y la variación dentro de cada macho de los caracteres espermáticos en *T. merianae* y *T. rufescens*.

**Tabla 17.** Comparación de los caracteres espermáticos entre machos con distinta inversión en el músculo pterigoideo en *Tupinambis*.

**Tabla 18.** Comparación de la variabilidad dentro de cada macho de los caracteres espermáticos entre machos con distinta inversión relativa en el músculo pterigoideo en *Tupinambis*.

**Tabla 19.** CP1 y CP2 resultantes del análisis de componentes principales realizados con caracteres reproductivos en machos de *Tupinambis merianae* y *T. rufescens*.

**Tabla 20.** Variación mensual de los valores de CP1 y CP2 de los machos de *Tupinambis merianae* y *T. rufescens* (MANOVA).

**Tabla 21.** Comparación del peso testicular y peso del músculo pterigoideo entre poblaciones con diferentes contextos sociales en *Tupinambis*. Media del carácter  $\pm$  desvío estándar. ANCOVA con PC como covariable. Los análisis estadísticos se realizaron con las variables transformadas Log 10. Se presentan arriba los valores *F* y *P* para el efecto especie y abajo para el efecto de la covariable.

**Tabla 22.** Proporción de sexo de individuos maduros de *Tupinambis merianae* y *Tupinambis rufescens* en poblaciones alopátricas y simpátricas.

**Tabla 23.** Comparación de los caracteres espermáticos entre poblaciones con distintos contextos sociales.

**Tabla 24.** CP1 y CP2 resultantes de análisis de componentes principales realizados con caracteres reproductivos en machos de *Tupinambis*.

**Tabla 25.** Comparación de los caracteres espermáticos entre especies en la población en simpatria.

**Figura 1.** La inversión diferencial en los componentes del eyaculado puede ser influenciada o influenciar a un amplio rango de factores. La flecha rosa, contiene la lista de componentes del eyaculado y representa la transferencia de un eyaculado de un macho a una hembra. Las flechas negras indican relaciones entre factores e individuos (Marco teórico resaltado en negrita, adaptado de Perry *et al.*, 2013).

**Figura 2.** Ejemplares de las dos especies en estudio. Macho de *Tupinambis merianae* (izquierda); macho de *Tupinambis rufescens* (derecha).

**Figura 3.** Áreas de estudio en la provincia de Córdoba. Población de *Tupinambis merianae* en alopatria (verde; 31°28'S, 63°38'O; 30°52'S, 62°05'O; 31°48'S, 63°39'O; 31°05'S, 62°03'O); población de *Tupinambis rufescens* en alopatria (rojo; 29°30'S, 64°15'O a 29°57'S, 63°55'O) y población simpátrica de ambas especies (celeste; 30°54'S, 63°30'O a 31°10'S, 63°07'O).

**Figura 4.** Obtención de la muestra espermática a partir de la porción final del conducto deferente (cuadrado naranja) y observación de espermatozoides bajo microscopio.

**Figura 5.** Espermatozoides de *Tupinambis* con el acrosoma intacto (flecha negra) y reaccionado (flecha roja).

**Figura 6.** Caracteres morfométricos en un espermatozoide de *Tupinambis*. **LC**, longitud de la cabeza; **LPM**, longitud de la pieza media; **LPP**, longitud de la pieza principal; **LTE**, longitud total del espermatozoide.

**Figura 7.** Diagrama de las coordenadas en X e Y de una trayectoria espermática y las dimensiones que son tenidas en cuenta para el cálculo de los caracteres dinámicos de los espermatozoides. **VCL**, velocidad curvilínea; **VSL**, velocidad lineal; **DCL**, distancia curvilínea recorrida por el espermatozoide; **DL**, distancia lineal entre el punto inicial y final de la trayectoria del espermatozoide; **t**, tiempo.

**Figura 8.** Ensayo de interacción espermática de machos potencialmente rivales *in vitro*.

**Figura 9.** Variación entre machos y dentro de cada macho en los caracteres morfométricos del espermatozoide en lagartos *Tupinambis*. *Tupinambis merianae*; *Tupinambis rufescens*. Cuadrados y círculos representan la media de cada individuo ( $\pm$  desviación estándar) ordenados de mayor a menor. **LC**, longitud de la cabeza; **LPM**, longitud de pieza media; **LPP** longitud pieza principal; **LTE**, longitud total espermática.

**Figura 10.** Variación entre machos y dentro de cada macho en los caracteres dinámicos del espermatozoide en lagartos *Tupinambis*. *Tupinambis merianae*; *Tupinambis rufescens*. Cuadrados y círculos representan la media de cada individuo ( $\pm$  desviación estándar) ordenados de mayor a menor. **VSL**, velocidad lineal; **VCL**, velocidad curvilínea; **LIN**, linealidad.

**Figura 11.** Relación entre la **VSL** y los caracteres morfométricos del espermatozoide en *Tupinambis*. *T. merianae*; *T. rufescens*. Las pendientes fueron similares entre especies (Variable Dummy **LPM**:  $F=0,48$ ;  $P= 0,6204$ ; proporción **LPP:LPM**:  $F=0,00062$ ,  $P= 0,9803$ ).

**Figure 12.** Relación entre la **VCL** y los caracteres morfométricos del espermatozoide en *Tupinambis*. *T. merianae*; *T. rufescens*. Las pendientes fueron similares entre especies (Variable Dummy **LPM**:  $F=0,50$ ;  $P= 0,4796$ ; proporción **LPP:LPM**:  $F=0,09$ ;  $P= 0,7616$ ).

**Figura 13.** Esquema representativo de la ultraestructura espermática de *Tupinambis spp.* En sección longitudinal con sus correspondientes secciones transversales. La escala ha sido modificada para mejor claridad.

**Figura 14.** Ultraestructura de la cabeza de espermatozoides de *Tupinambis merianae* (A-G) y *Tupinambis rufescens* (H-O). A,B, H-J. Sección longitudinal del complejo acrosomal, mostrando el acrosoma y el cono subacrosomal (las flechas rojas indican los hombros nucleares y las flechas negras la base del perforatorio). C-G, K-O Secciones transversales de la cabeza del espermatozoide. G, O Sección transversal de núcleo. C-F, K-N Sección transversal del complejo acrosomal. Abreviaciones: **a**: acrosoma; **csa**: cono subacrosomal; **co1**: corteza acrosomal externa; **co2**: corteza acrosomal interna; **m**: médula acrosomal; **n**: núcleo; **p**: perforatorio; **rn**: rostro nuclear; **zel**: zona epinuclear electro-lúcida.

**Figura 15.** Ultraestructura de la pieza media y flagelo de espermatozoides de *Tupinambis merianae* A. Sección longitudinal de la pieza media. B, C. Sección longitudinal del cuello mostrando el aparato centriolar. D. Sección transversal del cuello, mostrando el centriolo distal. E. Sección transversal de la pieza media (la flecha roja indica la fibra exterior densa en posición 3) F. Sección transversal de la pieza principal. Abreviaciones. **ax**: axonema; **cd**: cuerpos densos; **cdist**: centriolo distal; **cp**: centriolo proximal; **fn**: fosa nuclear; **fpe**: fibras periféricas densas; **m**: mitocondrias; **mpc**: material pericentriolar; **n**: núcleo; **vf**: vaina fibrosa.

**Figura 16.** Ultraestructura de la pieza media y flagelo de espermatozoides de *Tupinambis rufescens*. A. Sección longitudinal de la pieza media. B, C. Sección longitudinal del cuello mostrando el aparato centriolar. D. Sección transversal del límite del cuello. E. Sección transversal de la pieza media (la flecha roja indica la fibra exterior densa en posición 3) F. Sección transversal de la pieza principal. Abreviaciones. **ax**: axonema; **cd**: cuerpos densos; **cdist**: centriolo distal; **cp**: centriolo proximal; **fn**: fosa nuclear; **fpe**: fibras periféricas densas; **m**: mitocondrias; **mpc**: material pericentriolar; **n**: núcleo; **vf**: vaina fibrosa.

**Figura 17.** Relación entre el músculo pterigoideo y los caracteres espermáticos en *Tupinambis*. A) *T. merianae* y B) *T. rufescens*.

**Figura 18.** Variación temporal de los distintos tipos de machos según la inversión en el músculo pterigoideo. a) *Tupinambis merianae*; b) *Tupinambis rufescens*. Colores claros: machos que invierten menos en músculo de lo esperado, colores oscuros, machos que invierten más de lo esperado.

**Figura 19.** Análisis de componentes principales de caracteres reproductivos en machos de *Tupinambis*. A) *T. merianae*; B) *T. rufescens*. Los distintos meses están indicados con elipses

predictivas. Elipse azul: octubre; elipses amarillos: noviembre; elipses verdes: diciembre. PM: Peso del músculo pterigoideo; PC: Peso corporal; VSL: Velocidad lineal.

**Figura 20.** Diseño de estudio de las poblaciones con diferentes contexto sociales.

**Figura 21.** Análisis de componentes principales de caracteres reproductivos en machos de *Tupinambis*. Alopatría *T. merianae*; Simpatría *T. merianae*; Alopatría *T. rufescens*; Simpatría *T. rufescens*. PC: Peso corporal; PM: Peso del músculo pterigoideo.

## Abreviaturas

LHC: Largo hocico-cloaca

PC: Peso corporal

PT: Peso de ambos testículos

PM: Peso del músculo pterigoideo

R: Individuos reproductivos

NR: Individuos no reproductivos

PBS: Buffer fosfato salino

BWW: Medio de cultivo Biggers, Withen y Wittingham

RAE: Reacción acrosómica espontanea

LC: Longitud de la cabeza espermática

LPM: Longitud de la pieza media espermática

LPP: Longitud de la pieza principal espermática

LTE: Longitud total del espermatozoide

LPP:LC: Proporción entre la pieza principal y la cabeza del espermatozoide

LPP:LPM: Proporción entre la pieza principal y la pieza media del espermatozoide

LC:LPM: Proporción entre la cabeza y la pieza media del espermatozoide

VCL: Velocidad curvilínea

VSL: Velocidad lineal

LIN: Linealidad

DCL: Distancia curvilínea recorrida por el espermatozoide

DL: Distancia lineal entre el punto inicial y final de la trayectoria del espermatozoide

t: Tiempo

PSO: Proporción de sexo operativo

DS: Índice de dimorfismo sexual en el tamaño corporal

CV: Coeficiente de variación

REML: Máxima verosimilitud restringida

DE: Desvío estándar

AFDE: Área de las fibras densas externas

AVF: Área de la vaina fibrosa



a: acrosoma  
csa: cono subacrosomal  
co1: corteza acrosomal externa  
co2: corteza acrosomal interna  
m: médula acrosomal  
n: núcleo  
p: perforatorio  
rn: rostro nuclear  
zel: zona epinuclear electro-lúcida  
ax: axonema  
cd: cuerpos densos  
cdist: centriolo distal  
cp: centriolo proximal  
fn: fosa nuclear  
fpe: fibras periféricas densas  
m: mitocondrias  
mpc: material pericentriolar  
vf: vaina fibrosa  
g.l.: Grados de libertad  
CP: Componente principal

## Resumen

La competencia espermática es la competencia entre eyaculados de machos rivales por la fertilización de los mismos ovocitos, la cual ejerce una fuerte selección en los machos y conduce a la evolución de los caracteres espermáticos que maximizan el éxito de fertilización. Además de las presiones intra-específicas, los individuos podrían estar sujetos a selección sexual por interacciones inter-específicas cuando especies similares están en simpatría, por lo que, las zonas de contacto entre especies han sido reconocidas como laboratorios naturales de evolución. *Tupinambis merianae* y *T. rufescens* se presentan como un excelente modelo de estudio ya que son cercanas filogenéticamente, ecológicamente similares y se encuentran en contextos sociales de alopatría y simpatría. La tesis aborda de manera progresiva el estudio de la variación de los caracteres espermáticos, formulando preguntas sobre los mecanismos que llevan a la evolución del espermatozoide para mejorar el éxito reproductivo de los machos. *Tupinambis merianae* y *Tupinambis rufescens* están expuestas a diferentes contextos de riesgo de competencia espermática, los cuales modelan los caracteres espermáticos. A nivel intra-específico, ambas especies presentan gran variabilidad de los caracteres espermáticos tanto entre machos, como dentro de cada macho, sugiriendo que la variación espermática sería una estrategia de inversión diferencial de los individuos de *Tupinambis*. Sumado a esto, se presenta la relación entre la forma y la función espermática, los espermatozoides con pieza principal más larga en relación a la pieza media poseen mayor velocidad espermática. Se profundiza el estudio de la ultraestructura espermática de *T. merianae* y *T. rufescens*, mostrándose conservada dentro del género *Tupinambis*. Sin embargo, se observan diferencias en el número de sets de mitocondrias y cuerpos densos presentes en la pieza media, las cuales fueron discutidas en relación a la importancia de la mitocondria en la función espermática. Además se presenta por primera vez en lagartos, un balance entre el carácter sexual secundario y los caracteres espermáticos. Las estrategias reproductivas de los machos de *Tupinambis*, considerando caracteres pre- y post-copulatorios, no son fijas sino que varían a lo largo de la temporada reproductiva. Por último, las interacciones entre dos especies cercanamente relacionadas en simpatría, generan una mezcla de presiones intra- e inter-específicas que podrían afectar las estrategias reproductivas de distintas maneras. Se observan cambios en el contexto competitivo y social entre poblaciones de alopatría y simpatría de lagartos *Tupinambis* y con ellos modificaciones de los caracteres espermáticos. Además en simpatría, ambas especies presentan caracteres

espermáticos similares, lo que podría indicar que las barreras post-copulatorias al aislamiento reproductivo entre estas especies son ineficientes. El presente trabajo de Tesis brinda nuevos conocimientos sobre los mecanismos de selección sexual post-copulatoria en lagartos, resaltando la variabilidad en los caracteres espermáticos como estrategia para hacer frente a la competencia intra- e inter-específica.

# Abstract

Sperm competition is recognized as a significant force in the evolution of sperm traits that maximize male fertilization success. The species are subject not only to intraspecific selective pressure but also interspecific ones when two similar species are in sympatry. This contact zone are considered a natural laboratory of evolution. *Tupinambis merianae* and *T. rufescens* are an excellent model of study because they are sister species, ecologically similar and are in different social context of allopatry and sympatry. This Thesis has progressively approached the study of variation in sperm traits, questioning the mechanism that lead sperm evolution to improve male reproductive success. *Tupinambis merianae* and *Tupinambis rufescens* are exposed under different competition pressures that shift sperm traits. At intraspecific level sperm traits show substantial variation at all levels examined: between species, among males within species, and within-male suggesting that sperm variation could be a strategy to afford sperm competition. Moreover, we presented the relationship between sperm form and function, sperm with relatively longer principal piece swim faster. After that, we improved the study of sperm ultrastructure, being conserved within *Tupinambis* genera. However, we observed differences in the number of mitochondrias and dense body in the midpiece. These differences are discussed in relation to the importance of the mitochondria in sperm function. Furthermore, we provide the first evidence of a trade-off between secondary sexual characters and sperm traits in Squamata and show the variability of male reproductive strategies throughout the breeding season in lizards. Finally, we observed changes in sperm traits between populations with different social context of allopatry and sympatry. However, we did not find differences in sperm traits of both species in sympatry, suggesting that reproductive isolation barriers are inefficient. This Thesis gives new insight about mechanisms of post-copulatory sexual selection in lizard and highlight the sperm variability as a strategy to afford intra- and interspecific sperm competition.

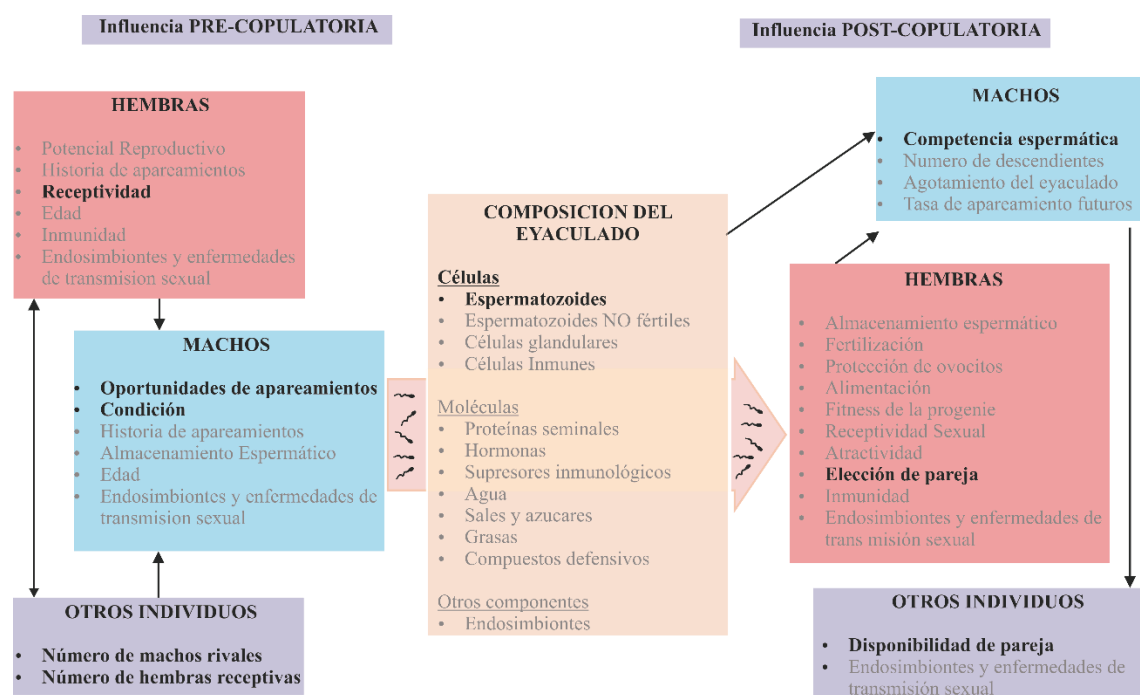
# INTRODUCCION

En especies poliándricas, donde las hembras se aparean con múltiples machos, el éxito reproductivo de un macho depende no sólo de su capacidad para acceder a la pareja, sino también de la competencia de sus espermatozoides por la fertilización de los ovocitos (Reuter *et al.*, 2007; Kvarnemo y Simmons, 2013). Dilucidar la relación entre la selección sexual pre- y post-copulatoria es una de las principales preguntas en la biología evolutiva de la reproducción (Mautz *et al.*, 2013; Lüpold *et al.*, 2014). La poliandria, promueve la superposición espacial y temporal de eyaculados de varios machos (Kvarnemo y Simmons, 2013), dando oportunidad para que la selección sexual actúe después del apareamiento tanto a través de la competencia espermática (Parker, 1970), como de la elección criptica de la hembra (Eberhard, 1996). La competencia espermática es la competencia entre eyaculados de machos rivales por la fertilización de los mismos ovocitos (Parker, 1970). Esta forma de selección sexual post-copulatoria ejerce una fuerte selección en los machos y conduce a la evolución de los caracteres espermáticos que maximizan el éxito de fertilización (Snook, 2005; Pizzari y Parker, 2009; Evans, 2010; Kvarnemo y Simmons, 2013). La inversión en el eyaculado de los machos y los apareamientos múltiples, con diferentes machos, por parte de las hembras, podrían co-evolucionar de manera tal que moldeen los sistemas de apareamientos en poblaciones y especies (Perry *et al.*, 2013)

El riesgo de competencia espermática ha sido definido como la probabilidad de que una hembra se aparee con dos o más machos dentro de un ciclo reproductivo (Snook y Pizzari, 2012). En especies con alto riesgo de competencia espermática, los machos necesitan invertir mayor cantidad de energía en sus eyaculados que en aquellas especies donde la competencia espermática se relaja (Parker, 1998). En diferentes taxa como mariposas (Gage, 1994), escorpiones (Vrech *et al.*, 2014), peces (Stockley *et al.*, 1997), aves (Birkhead, 1996), anfibios (Jennions y Passmore, 1993), mamíferos (Gomendio *et al.*, 1998) y reptiles (Tourmente, 2008) se ha evidenciado que la competencia espermática favorece la evolución de mayores pesos testiculares. En estudios experimentales se determinó que existe una relación causal entre el aumento del nivel de competencia espermática y el aumento en el peso testicular relativo (Hosken y Ward, 2001; Pitnick *et al.*, 2001), por lo que éste ha sido considerado un indicador confiable de competencia espermática (Snook y Pizzari, 2012;

Tourmente *et al.*, 2009; 2013). Además, la proporción de sexo operativo (PSO), la cual describe el número relativo de machos y hembras que están aptos para reproducirse en un momento determinado, también es considerada como un predictor de la intensidad de competencia por los apareamientos (Emlen y Oring, 1977; Kvarnemo y Simmons, 2013). La percepción de un macho de la presencia y la cantidad de rivales en el momento de la cópula pueden ser indicadores del riesgo (Wigby y Chapman, 2004; Engqvist y Reinhold, 2005; Reuter *et al.*, 2007). Es decir, cuando la PSO está desviada hacia los machos se produce un aumento de la intensidad de competencia (Clutton-Brock y Vincent, 1991; Kvarnemo y Merilaita, 2006; Kvarnemo y Simmons, 2013; Parker y Birkhead, 2013) y por lo tanto mayor riesgo de competencia espermática (Parker y Birkhead, 2013). Sumado a estos indicadores, el dimorfismo sexual, ya sea en el tamaño corporal o en otros caracteres, desviado hacia los machos es conocido como un indicador de competencia pre-copulatoria entre machos (Corl *et al.*, 2010). Lüpold *et al.*, (2014) postulan que si la selección sexual pre-copulatoria es intensa, en especies donde los machos no pueden monopolizar a la hembra, el dimorfismo sexual podría ser también indicador del riesgo de competencia espermática. Cambios en el contexto social, en relación al número y calidad de competidores pueden causar variaciones en las oportunidades de apareamiento y en el nivel de competencia espermática (Immler *et al.*, 2010).

La competencia espermática puede influir en diferentes componentes del eyaculado, conduciendo a rápidos cambios evolutivos (Perry *et al.*, 2013). La variación del eyaculado a diferentes niveles (entre machos, entre poblaciones y especies) podría jugar un papel clave en moldear el comportamiento y la fisiología reproductiva. Los costos y beneficios asociados a la composición del eyaculado podrían variar con el contexto social y ecológico. Para la producción del eyaculado los machos podrían ser sensibles a su propio estado así como al estado de su pareja y el de otros individuos en el ambiente socio-sexual (Perry *et al.*, 2013) (Fig. 1).



**Figura 1.** La inversión diferencial en los componentes del eyaculado puede ser influenciada o influenciar a un amplio rango de factores. La flecha rosa, contiene la lista de componentes del eyaculado y representa la transferencia de un eyaculado de un macho a una hembra. Las flechas negras indican relaciones entre factores e individuos (Marco teórico resaltado en negrita, adaptado de Perry *et al.*, 2013).

El número de espermatozoides ha sido considerado como un determinante del éxito de la fertilización, ya que se necesita gran cantidad para evitar el efecto dilución dentro del tracto de la hembra (Short, 1981). La teoría predice que la competencia espermática favorecería el aumento de la producción de espermatozoides (Parker, 1970; Malo *et al.*, 2005a; Gomendio *et al.*, 2006; Simmons y Emlen, 2006). El tamaño testicular relativo determinaría la tasa de producción espermática (Møller, 1989; Gomendio *et al.*, 1998). De hecho, existen evidencias en aves y mamíferos, donde se encontró que la concentración espermática aumenta con el tamaño testicular (Møller, 1988; Soulsbury y Lossa, 2010). Del Barco Trillo *et al.*, (2013) sostienen que altos niveles de competencia espermática podrían promover mayor producción de espermatozoides no sólo aumentando el volumen testicular sino también afectando caracteres morfológicos y cinéticos del testículo que influyen la tasa de producción espermática. En trabajos previos realizados en aves (Møller, 1988), mamíferos (Møller, 1989) e insectos, (Hunter y Birkhead, 2002) se ha observado que especies donde la hembra es promiscua, tienden a poseer eyaculados con mayor proporción de espermatozoides viables. Mientras que, Montoto *et al.*, (2011) no encontraron relación

entre la viabilidad espermática y la competencia en roedores. Además los espermatozoides deben realizar la reacción acrosómica para liberar enzimas que son necesarias para penetrar las coberturas del ovocito y poder fusionarse con la membrana plasmática en un momento y lugar determinado (Yanagimachi, 1994). Es por esto que la competencia espermática podría favorecer que los espermatozoides mantengan intacto el acrosoma hasta el encuentro con el ovocito, para que ocurra la fertilización (Montoto *et al.*, 2011).

Además de los caracteres de calidad espermática mencionados, la competencia espermática podría influenciar otros caracteres del espermatozoide. La morfología espermática está bajo selección sexual y ha evolucionado de manera rápida, llevando a una gran variedad de tamaños y formas de los espermatozoides tanto entre especies como dentro de una misma especie (Pitnick *et al.*, 2009a). Estudios comparativos revelan que la competencia espermática favorece un aumento en el tamaño espermático (Gomendio y Roldan, 2008; Fitzpatrick *et al.*, 2009; Lüpold *et al.*, 2009a; Tourmente *et al.*, 2011a; Zeng *et al.*, 2014). La fuerza de selección podría actuar de manera diferente en cada componente del espermatozoide en distintos taxas, ya que la estructura y función de los componentes puede variar entre especies (Tourmente *et al.*, 2009). En relación a esto, en mamíferos, altos niveles de competencia espermática están asociados con un aumento en la longitud de la pieza principal y terminal del flagelo (Gomendio y Roldan, 2008; Tourmente *et al.*, 2011a), lo cual produciría mayor fuerza para el movimiento espermático y por ende mayor velocidad. En serpientes (Tourmente *et al.*, 2009), aves (Johnson y Briskie, 1999) y primates (Anderson *et al.*, 2005) un aumento de la competencia espermática ha sido relacionada con un aumento en la longitud de la pieza media, lo que conduciría a un aumento de la energía disponible para el espermatozoide (Froman *et al.*, 2002). Además, algunos caracteres ultraestructurales han sido reportados como importantes para la motilidad y/o longevidad del espermatozoide, por lo que la competencia espermática podría favorecer la evolución de los mismos. Es esperado que la selección sexual post-copulatoria actúe sobre la forma y la función espermática, sin embargo existen evidencias contrapuestas (Simmons y Fitzpatrick, 2012; Simpson *et al.*, 2013). Algunos estudios encuentran una relación positiva entre la morfometría y la velocidad espermática en ciertos taxas (Mossman *et al.*, 2009; Helfenstein *et al.*, 2010), mientras que en otros, se muestran relaciones negativas (Malo *et al.*, 2006) o incluso no encuentran relación entre estos caracteres (Fitzpatrick *et al.*, 2007; 2009; Lüpold *et al.*, 2009b).



La velocidad espermática es reconocida como un importante determinante de la fertilidad de un macho ya sea en contextos no competitivos (Malo *et al.*, 2005b; Gomendio *et al.*, 2007; Gomendio y Roldan, 2008) como en competitivos (Birkhead *et al.*, 1999; Donoghue *et al.*, 1999; Gage *et al.*, 2004; Pizzari y Parker, 2009; Gasparini *et al.*, 2010; Beausoleil *et al.*, 2012), ya que podría determinar la habilidad para sobrepasar las barreras físicas en el tracto de la hembra, y/o para entrar a los sitios de almacenamiento y determinar qué espermatozoide llegará primero a los sitios de fertilización (Malo *et al.*, 2005b). Existen evidencias de que la velocidad espermática ha evolucionado en respuesta a la competencia espermática en distintos taxas tales como roedores (Tourmente *et al.*, 2011a), aves (Lüpold *et al.*, 2009a; Kleven *et al.*, 2009), y peces (Fitzpatrick *et al.*, 2009), manifestándose una relación positiva entre el tamaño y la velocidad espermática en diversos grupos animales (Gomendio y Roldan, 2008; Fitzpatrick *et al.*, 2009; Tourmente *et al.*, 2011a).

En este contexto, una pregunta central de la biología evolutiva es entender cómo la selección sexual post-copulatoria actúa sobre los caracteres espermáticos en poblaciones naturales (Beausoleil *et al.*, 2012). Sumado a esto, cuando dos especies ecológicamente similares coinciden en tiempo y espacio, es decir se encuentran en simpatría, pueden generar presiones selectivas en los miembros de una o ambas especies (Langkilde y Shine, 2007; Grether *et al.*, 2009). Por tal motivo, las zonas de contacto entre especies han sido reconocidas como laboratorios naturales de evolución (Bridle *et al.*, 2001). Las interacciones inter e intra-específicas podrían representar una mezcla de fuerzas selectivas que provean un escenario ideal para el estudio de los mecanismos reproductivos en poblaciones alopátricas y simpátricas.

En ofidios y lagartos (Squamata), en general las especies son poliginándricas (Duvall *et al.*, 1992; Vitt y Caldwell, 2009), es decir exhiben un sistema de apareamiento en el cual machos y hembras son polígamos. En particular en lagartos, se ha evidenciado apareamientos múltiples dentro de un mismo periodo reproductivo (Olsson y Madsen, 1998; Zamudio y Sinervo, 2000; Olsson y Madsen, 2001; Laloi *et al.*, 2004) y paternidad múltiple (Olsson *et al.*, 1996; Olsson y Madsen, 1998; Calsbeek *et al.*, 2007; Keogh *et al.*, 2013). Además, las hembras poseen estructuras de almacenamiento espermático (Sever y Hamlett, 2002) lo que posibilitaría la superposición de eyaculados de diferentes machos antes de la ovulación (Birkhead y Møller, 1993), pudiendo almacenar espermatozoides desde días hasta

semanas previas a la ovulación (Olsson *et al.*, 2007; Keogh *et al.*, 2013). Existen evidencias de que el volumen del eyaculado transferido por los machos aumenta con la duración de la cópula bajo riesgo de competencia espermática, sugiriendo que los machos aumentan la duración de la copula para transferir mayor cantidad de espermatozoides y así ser más competitivos (Olsson, 2001). Por lo anteriormente descrito, los lagartos son un excelente modelo para estudiar cómo la selección sexual post-copulatoria moldea los caracteres espermáticos.

En esta tesis abordamos el estudio de dos especies de lagartos cercanas filogenéticamente, el lagarto overo (*Tupinambis meriana*) y el lagarto colorado (*T. rufescens*) (Cabaña *et al.*, 2014), las cuales son fenotípicamente similares, comparten caracteres bio-ecológicos (Cardozo *et al.*, 2012) y poseen una zona de solapamiento de sus distribuciones (Lanfri *et al.*, 2014). Exhiben dimorfismo sexual en el tamaño corporal, siendo los machos de mayor tamaño que las hembras. Además, los machos presentan dimorfismo sexual en el músculo pterigoideo de la cabeza, el cual es considerado un carácter sexual secundario, relacionado con el tamaño testicular y la presencia de espermatozoides (Naretto *et al.*, 2014). Cabe destacar que, existen evidencias de que las hembras de *T. meriana*, en cautiverio, pueden copular con 2 ó 3 machos distintos en un día (Lopes y Abe 1999), dando oportunidad a que la selección sexual continúe después de la copula.

Por lo expuesto anteriormente, la hipótesis del presente trabajo sostiene que la variación de los caracteres espermáticos, los cuales determinarían el éxito reproductivo de los machos de lagartos *Tupinambis*, está influenciada por los diferentes contextos de riesgo de competencia espermática. La predicción que se desprende de esta hipótesis es que la especie que esté sometida a mayor riesgo de competencia espermática, presentará mejor calidad espermática, determinada a partir del estudio de los distintos caracteres espermáticos propuestos.

## **Objetivo general**

Dilucidar la evolución del espermatozoide a nivel inter- e intra-específico, en relación al riesgo de competencia espermática, mediante la caracterización estructural y funcional de los espermatozoides en dos especies de lagartos cercanas filogenéticamente, del género *Tupinambis*.

## Lineamientos de la Tesis:

La tesis se desarrolla en cuatro capítulos, en los cuales se aborda de manera progresiva el estudio de la variación de los caracteres espermáticos, formulando preguntas sobre los mecanismos que llevan a la evolución del espermatozoide para mejorar el éxito reproductivo de los machos. En el primer capítulo, se presenta el contexto de riesgo de competencia espermática entre *T. merianae* y *T. rufescens*, y se indaga sobre la variación de los caracteres espermáticos en tres niveles de aproximación: entre especies, y dentro de cada especie: entre machos y dentro de cada macho. Además se presenta la relación entre forma y función espermática en cada especie y se evalúa cómo la interacción esperma-esperma de machos rivales influencia la velocidad espermática. En el segundo capítulo, se profundiza el estudio de la ultraestructura del espermatozoide en relación al riesgo de competencia espermática, en el cual se comparan caracteres ultraestructurales, discutidos como importantes para el funcionamiento espermático. En el capítulo 3, se estudia la relación entre el carácter sexual secundario y los caracteres del espermatozoide a fin de identificar factores que influyan en la variabilidad de los caracteres espermáticos entre machos. Se establece la relación entre el desarrollo del carácter sexual secundario y los caracteres espermáticos en cada especie y su variación durante la temporada reproductiva. Por último, en el capítulo 4 se presenta el cambio en los caracteres espermáticos en relación con las presiones intra- e inter-específicas en poblaciones con diferentes contextos sociales de alopatría y simpatría.

# METODOLOGIA GENERAL

## Especies en estudio

*Tupinambis merianae* y *T. rufescens* (Fig. 2) son dos especies de lagartos que poseen la distribución más austral del género (Lanfri *et al.*, 2013). Se reproducen estacionalmente, y el cortejo y la cópula se desarrollan entre los meses de octubre a diciembre (Fitzgerald *et al.*, 1993). *T. rufescens* está asociado a ambientes chaqueños áridos mientras que *T. merianae* ocupa mayor variedad de ambientes, incluyendo parte de la región Chaqueña, Espinal y Pampa (Lanfri *et al.*, 2013). Cabe destacar que en la provincia de Córdoba, estas especies presentan una zona entre la región Chaqueña y el Espinal en donde sus distribuciones se solapan (Lanfri *et al.*, 2013), por lo que podemos encontrar poblaciones alopátricas de cada especie y simpátricas. Estas especies de *Tupinambis* están incluidas en el apéndice II de CITES (2008) y en Argentina se encuentran sujetos a un régimen de captura con fines comerciales (Porini, 2006).



**Figura 2.** Ejemplares de las dos especies en estudio. Macho de *Tupinambis merianae* (izquierda); Macho de *Tupinambis rufescens* (derecha).

## Área de estudio

Los ejemplares utilizados en esta tesis, provienen de tres poblaciones de la provincia de Córdoba. Se determinó una población de lagarto overo (*Tupinambis merianae*), una de lagarto colorado (*Tupinambis rufescens*) y una población donde están presentes ambas especies (Fig. 3). Las poblaciones provenientes de las distribuciones alopátricas y simpátricas, se determinaron a partir del criterio utilizado en Cardozo *et al.*, (2012).



**Figura 3.** Áreas de estudio en la provincia de Córdoba. Población de *Tupinambis merianae* en alopatria (verde; 31°28'S, 63°38'O; 30°52'S, 62°05'O; 31°48'S, 63°39'O; 31°05'S, 62°03'O); población de *Tupinambis rufescens* en alopatria (rojo; 29°30'S, 64°15'O a 29°57'S, 63°55'O) y población simpátrica de ambas especies (celeste; 30°54'S, 63°30'O a 31°10'S, 63°07'O).

### Metodología de captura en vida silvestre

La captura de los ejemplares para este estudio, se realizó con ayuda de los pobladores rurales mediante visitas semanales durante la temporada de actividad reproductiva de los lagartos, desde inicio de octubre a fines de diciembre. Se contactaron cazadores en diferentes localidades cercanas a las poblaciones de lagartos en estudio. Se acompañó a los cazadores a fin de minimizar el sesgo de captura entre sexos y tamaños por la metodología. Para todos los estudios se contaron con los permisos correspondientes de captura científica otorgados por la Secretaria de Ambiente de la Provincia de Córdoba. Los especímenes fueron cazados por los pobladores rurales para la comercialización legal de sus cueros, y fueron sacrificados en concordancia con la guía de eutanasia animal (AVMA, 2007). Los viajes de campaña se realizaron durante las temporadas 2009, 2010, 2011 y 2013.

De cada ejemplar capturado se registró la especie, sexo, fecha y lugar de captura. Se tomaron medidas del largo hocico-cloaca (LHC), el peso corporal (PC), el peso de ambos testículos (PT) y el peso del músculo pterigoideo de la cabeza (PM) siguiendo el protocolo de Naretto *et al.*, (2014) utilizando una balanza digital (precisión: 0,01g). De cada ejemplar, se determinó la madurez sexual por medio de la observación de las estructuras reproductivas. En las hembras, se consideró reproductiva a aquella que poseía folículos vitelogénicos, huevos en el oviducto y/o cuerpos lúteos en los ovarios (Naretto, 2014). En los machos se registró la presencia de espermatozoides en el conducto deferente. El largo hocico-cloaca (LHC) del menor individuo que presentó evidencias reproductivas fue utilizado para estimar el tamaño mínimo de madurez sexual (Cardozo y Chiaraviglio, 2011). Se estudiaron 344 ejemplares de *Tupinambis merianae* y 72 de *Tupinambis rufescens* (Tabla 1).

**Tabla 1.** Número de ejemplares maduros de *Tupinambis merianae* y *Tupinambis rufescens* estudiados en cada temporada

Temporadas	<i>T. merianae</i>				<i>T. rufescens</i>			
	Hembras Maduras		Machos Maduros		Hembras Maduras		Machos Maduros	
	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR
Oct -Dic 2009	24	28	38	21		2	1	1
Oct -Dic 2010	10	27	38	35	2		10	1
Oct -Dic 2011	22	16	31	34	5	6	37	7
Oct -Dic 2013			14	6				
TOTAL	56	71	121	96	7	8	48	9

R: Individuos Reproductivos; NR: Individuos No Reproductivos.

### Indicadores de riesgo de competencia espermática

Para estimar el riesgo de competencia espermática se consideraron cuatro indicadores que lo reflejarían: el peso testicular, la proporción de sexo operativo (PSO), el dimorfismo sexual en el tamaño corporal y el peso del músculo pterigoideo. La comparación de los indicadores de riesgo de competencia espermática entre especies o poblaciones será detallada en cada capítulo según corresponda.

## Obtención de la muestra espermática

En el laboratorio, la muestra espermática fue obtenida a partir de la disección de los órganos reproductivos de los machos. Los espermatozoides fueron obtenidos de la porción final del conducto deferente (Fig. 4), (Depeiges y Dacheux, 1985). Todas las muestras fueron colectadas en un tubo plástico de 1,5 ml que contenía 90  $\mu$ l de una solución salina (PBS).



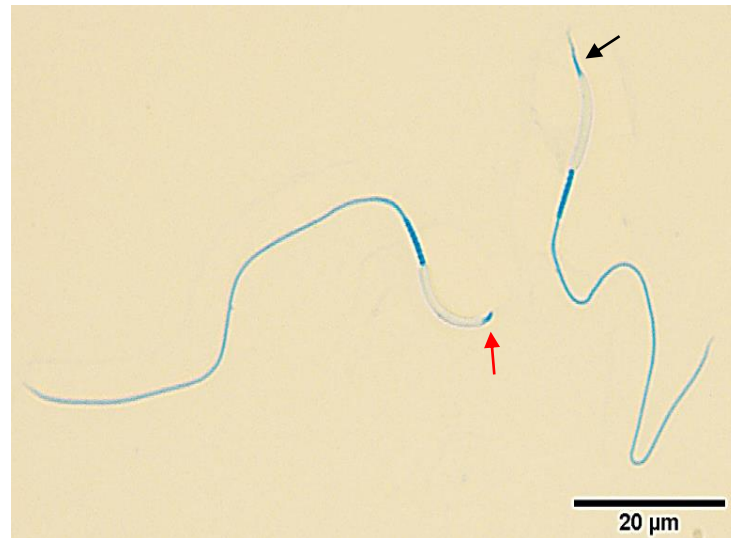
**Figura 4.** Obtención de la muestra espermática a partir de la porción final del conducto deferente (cuadrado naranja) y observación de espermatozoides bajo microscopio de campo claro (foto) o contraste de fase según corresponda.

## Determinación de los caracteres espermáticos

**Concentración.** Éste carácter fue estimado utilizando una cámara de Neubauer, luego las muestras fueron diluidas en medio de cultivo Biggers, Whitten, y Wittingham (BWW) (Biggers *et al.*, 1971) suplementado con 4% de albumina bovina (Tourmente *et al.*, 2011b).

**Viabilidad.** El estado vital de los espermatozoides se determinó utilizando el test de tinción con Eosina 0,5% (WHO, 1999). Este colorante penetra en la membrana de la cabeza de las células muertas, las cuales se tiñen de rojo, mientras que las células vivas no se colorean. Se contaron 100 espermatozoides de cada individuo.

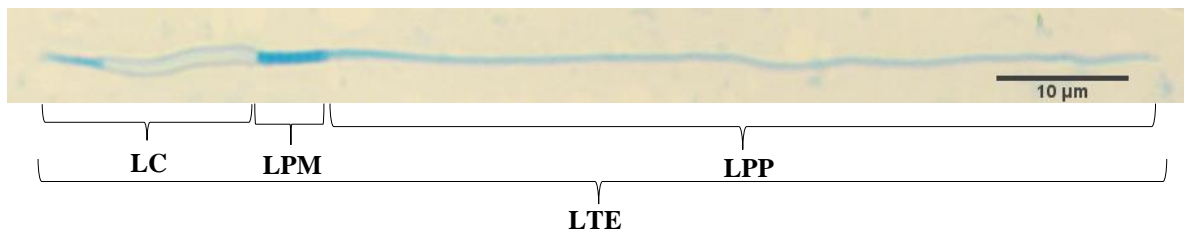
**Reacción acrosómica espontánea (RAE).** Una alícuota de 45  $\mu$ l de la solución espermática se fijó con 45  $\mu$ l de formol al 2% por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la muestra se lavó dos veces con acetato de amonio 100 nM por 7 minutos a 700 g. El precipitado se re-suspendió en 45  $\mu$ l de PBS y se esparció sobre un portaobjetos. Una vez seca la muestra, se procedió a la tinción de Azul Brillante Coomassie (Firman y Simmons, 2010), observándose la preparación bajo microscopio de campo claro. El estado acrosomal se determinó como intacto (todo el acrosoma azul; Fig. 5, flecha negra), o reaccionado (solo zona post-acrosomal azul; Fig. 5, flecha roja), determinándose el porcentaje de células RAE en 200 células por ejemplar.



**Figura 5.** Espermatozoides de *Tupinambis* con el acrosoma intacto (flecha negra) y reaccionado (flecha roja).

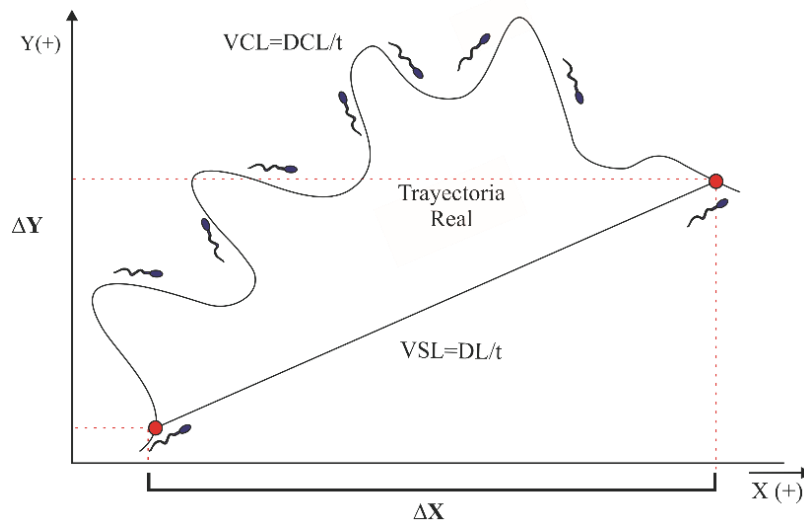
**Morfometría.** Estos caracteres se determinaron en las células previamente teñidas con Azul Brillante Coomassie, según lo descripto arriba, examinando las muestras bajo iluminación de campo claro en un microscopio Nikon eclipse Ti (Nikon Instruments Inc, Tokyo, Japan) a un aumento de 400x. Las muestras se fotografiaron utilizando una cámara digital (Nikon DS-Qi1Mc) con un controlador-U2 (Nikon Instruments Inc, Tokyo, Japan). La longitud de la cabeza (LC), la pieza media (LPM), la pieza principal (LPP) y la longitud total (LTE) ( $\mu\text{m}$ ) (Fig. 6) se midieron en 50 espermatozoides por muestra mediante el análisis de las imágenes digitales con el programa ImageJ v. 1.48g (NIH, Bethesda, MD). Luego a partir de las medidas anteriores, se estimó la proporción entre pieza principal:cabeza (LPP:LC); pieza principal:pieza media (LPP:LPM) y cabeza:pieza media (LC:LPM). La escala de las imágenes se calibró utilizando una fotografía de la grilla de una cámara de Neubauer tomada bajo las mismas condiciones. En cada individuo se calculó la media de cada carácter y, a partir de dichos valores, se calcularon las medias para cada especie. La obtención de los datos de la ultraestructura espermática será detallada en el capítulo 2.





**Figura 6.** Caracteres morfométricos en un espermatozoide de *Tupinambis*. **LC**, longitud de la cabeza; **LPM**, longitud de la pieza media; **LPP**, longitud de la pieza principal; **LTE**, longitud total del espermatozoide

**Caracteres dinámicos.** Alícuotas de 500  $\mu\text{l}$  de la solución espermática a una concentración de  $1 \cdot 10^6$  espermatozoides/ml fueron incubadas en un baño termostático a  $25^\circ\text{C}$  por 30 minutos (Tourmente *et al.*, 2011b). Luego, 20  $\mu\text{L}$  de la suspensión espermática se colocaron en un portaobjeto para su observación. Los caracteres dinámicos fueron medidos a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ) usando un sistema de video-microscopía compuesto por un microscopio de contraste de fase (CX41; Olympus, Tokyo, Japan) equipado con una video cámara digital (ICAM 1500; Labomed, Fremont, CA, USA). La captura de los videos se realizó con el software Virtualdub v.1.6.16 (Avery Lee). Las muestras espermáticas fueron grabadas a una magnificación de 100x, por 4 minutos, cambiando el campo aleatoriamente cada 5 segundos. Luego un total de 45 espermatozoides por ejemplar fueron seguidos individualmente por el lapso de 3 segundos. Las trayectorias fueron transformadas a una matriz de coordenadas usando el programa ImageJ v. 1.48g (NIH, Bethesda, MD) y su aplicación MtrackJ v. 1.1.0 (Eric Meijering). Con esta matriz de datos se calcularon los siguientes caracteres dinámicos utilizando el programa Spermtrack v. 4.2 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina): velocidad lineal (VSL), velocidad curvilínea (VCL) y linealidad (LIN;  $\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL}$ ) (Blengini *et al.*, 2011) (Fig. 7). En cada individuo se calculó la media de cada carácter y, a partir de dichos valores, se calcularon las medias para cada especie.



**Figura 7.** Diagrama de las coordenadas en X e Y de una trayectoria espermática y las dimensiones que son tenidas en cuenta para el cálculo de los caracteres dinámicos de los espermatozoides. VCL, velocidad curvilínea; VSL, velocidad lineal; DCL, distancia curvilínea recorrida por el espermatozoide; DL, distancia lineal entre el punto inicial y final de la trayectoria del espermatozoide; t, tiempo.

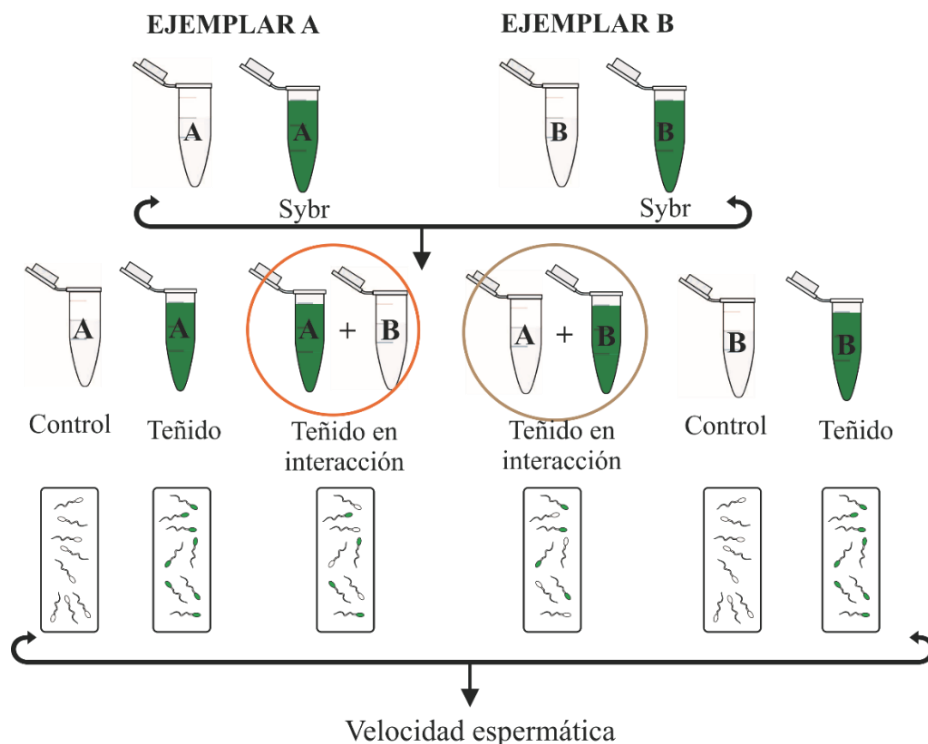
El periodo de tiempo entre la muerte del animal y el análisis de la muestra espermática fue en el rango de 2 a 3 horas. Durante este periodo, la muestra espermática no se vio afectada debido a que el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo fue del  $93,30 \pm 4,81\%$  en *T. merianae* y del  $96,03 \pm 3,72\%$  en *T. rufescens*. Además la viabilidad de la muestras fue superior al 80% para ambas especies.

### **Ensayo de interacción espermática de machos potencialmente rivales *in vitro***

El ensayo *in vitro* de interacción espermática consistió en mezclar espermatozoides de dos machos potencialmente rivales. A fin de identificar los espermatozoides de cada macho y evaluar los caracteres dinámicos, se realizó una tinción vital fluorescente SYBR 14 (Life Technologies) la cual es una molécula permeable a la membrana plasmática y se une al ADN. Dado que se contaba con un marcador fluorescente de un solo color, se pudo teñir simultáneamente a los espermatozoides de un solo macho, por lo que el diseño estuvo limitado a mezclar espermatozoides coloreados de un macho y NO coloreados de otro macho. De esta forma se podía observar los caracteres dinámicos de los espermatozoides del macho coloreado en interacción con espermatozoides del otro macho no coloreados.

Brevemente, una vez obtenida la muestra espermática de cada macho, se realizaron dos alícuotas de  $3 \cdot 10^6$  células/ml en medio de cultivo BWW. Una de ellas sería el tratamiento Control, y la otra tratamiento Teñido, a esta última se incubó con Sybr 14 por 15 minutos a  $25^\circ\text{C}$  a una concentración final del colorante 100nM, siendo insignificante la concentración del solvente DMSO en el cual esta disuelto el Sybr14 para disminuir los efectos deletéreos sobre los espermatozoides. Una vez cumplido el tiempo de incubación, en ambas alícuotas se realizó un lavado y centrifugación a 500g por 5 minutos y se re suspendió el precipitado en 500  $\mu\text{l}$  de BWW. Luego, se mezclaron 200 $\mu\text{l}$  de la alícuota Teñida del macho A con 200  $\mu\text{l}$  de la alícuota Control del macho B y viceversa. Se incubaron a  $25^\circ\text{C}$  por 30 minutos. De esta manera se obtuvieron tres tratamientos, control, teñido y teñido en interacción con espermatozoides de un macho potencialmente rival (Fig. 8).

A fin de determinar los caracteres dinámicos, se tomaron alícuotas de 20  $\mu\text{l}$  de cada uno de los tratamientos y se realizaron videos con un microscopio de fluorescencia Nikon DS-Qi1Mc, adosado a una video cámara digital con un controlador DS-U2 (Nikon Instruments Inc, Tokyo, Japan). Para la captura de los videos se utilizó el programa NIS-Elements-3.2. Las filmaciones fueron analizadas con el programa Image J 1.48g y su aplicación MtrakJ. En cada individuo se evaluaron los caracteres dinámicos antes mencionados de 35 espermatozoides.



**Figura 8.** Ensayo de interacción espermática de machos potencialmente rivales *in vitro*.

## Capítulo 1

# CARACTERES ESPERMATICOS COMO ESTRATEGIA DE COMPETENCIA ESPERMATICA EN LAGARTOS *Tupinambis merianae* y *T. rufescens*

### Introducción

La competencia espermática es reconocida como una poderosa fuerza de evolución sobre los caracteres reproductivos (Birkhead y Møller, 1998). El riesgo de competencia espermática es la probabilidad de que una hembra se aparee con más de un macho dentro de un mismo ciclo reproductivo (Snook y Pizzari, 2012). El peso testicular relativo es considerado un indicador confiable de riesgo de competencia espermática ya que ha sido demostrado cómo la competencia favorece el desarrollo de mayores testículos en especies promiscuas (Snook y Pizzari, 2012; Tourmente *et al.*, 2009; 2013). Cambios en la estructura social, en relación al número y calidad de competidores pueden causar variaciones en las oportunidades de apareamiento y en el nivel de competencia espermática (Immler *et al.*, 2010).

La competencia espermática puede influir en diferentes componentes del eyaculado, conduciendo a rápidos cambios evolutivos (Perry *et al.*, 2013). La teoría predice que la competencia espermática favorecería la inversión en los caracteres de calidad espermática como: el aumento de la producción de espermatozoides (Parker, 1970; Malo *et al.*, 2005a; Gomendio *et al.*, 2006; Simmons y Emlen, 2006), mayor viabilidad espermática (Møller, 1988; Møller, 1989; Hunter y Birkhead, 2002) y la disminución en el porcentaje de RAE para que los espermatozoides mantengan intacto el acrosoma hasta el encuentro con el ovocito, y así poder fertilizarlo (Montoto *et al.*, 2011).

Además, estudios comparativos muestran que la morfología y la velocidad espermática ha sido objeto de fuerte selección sexual post-copulatoria en especies donde las hembras son promiscuas (Gomendio *et al.*, 2007; Fitzpatrick *et al.*, 2009; Lüpold *et al.*,

2009a; Tourmente *et al.*, 2011a; Simmons y Fitzpatrick, 2012; Simpson *et al.*, 2013; Zeng *et al.*, 2014) y han mostrado una relación positiva entre la longitud total del espermatozoide y la velocidad espermática (Gomendio y Roldan, 2008; Fitzpatrick *et al.*, 2009; Tourmente *et al.*, 2011a). Sin embargo a nivel intra-específico, los resultados no han sido concluyentes, sugiriendo que las fuerzas selectivas podrían operar de manera diferente a niveles micro- y macro-evolutivos (Gomendio y Roldan, 2008). Los estudios comparativos son útiles para establecer tendencias evolutivas generales; sin embargo, para entender las bases de esas tendencias se requieren análisis intra-específicos detallados (Lüpold *et al.*, 2009b).

A nivel intra-específico, la competencia espermática podría jugar un rol importante en regular la variabilidad del tamaño espermático tanto entre machos como dentro de un eyaculado (Calhim *et al.*, 2007; Kleven *et al.*, 2007; Immler *et al.*, 2008; Helfenstein *et al.*, 2010). Se han propuesto hipótesis contrapuestas para explicar cómo ésta presión de selección afecta la variación de la morfometría espermática. Por un lado, se propone que un aumento en la presión de competencia espermática podría reducir la variabilidad en el tamaño espermático (Birkhead *et al.*, 2005; Calhim *et al.*, 2007; Kleven *et al.*, 2007; Immler *et al.*, 2008) llevando a un diseño espermático óptimo (Calhim *et al.*, 2007). Por otro lado, estudios recientes sugieren que la variación en la morfometría espermática persiste y podría ser un importante determinante del éxito reproductivo diferencial de los machos (Crean y Marshall, 2008; Morrow *et al.*, 2008; Immler *et al.*, 2010). Calhim *et al.*, (2011) mostraron en *Malurus cyaneus* que parte de la variación en el tamaño espermático se mantiene a pesar de la extrema promiscuidad que muestra esta especie. En relación a esto, Helfenstein *et al.*, (2010) propone que un macho podría producir una diversidad de espermatozoides para maximizar el éxito de fertilización bajo competencia espermática.

Dentro de una especie, cada macho debe ajustar la inversión espermática en relación a la disponibilidad y calidad de hembras (Cornwallis y Birkhead, 2007; Lüpold *et al.*, 2011; Kvarnemo y Simmons, 2013; Perry *et al.*, 2013), al rol social del macho (Rudolfson *et al.*, 2006; Locatello *et al.*, 2007) y a la percepción del riesgo de competencia espermática (Simmons y Fitzpatrick, 2012; Kvarnemo y Simmons, 2013; Perry *et al.*, 2013). Nuevos estudios, se han focalizado en la variación de los caracteres espermáticos entre eyaculados de un mismo macho, sugiriendo que la morfometría (Immler *et al.*, 2010; Calhim *et al.*, 2011) y la velocidad espermática (Lüpold *et al.*, 2012a) son caracteres plásticos que se podrían ajustar a cambios en el contexto social. Sin embargo, la variación de los caracteres

espermáticos dentro de un eyaculado ha sido escasamente estudiada y podría ser clave para entender la diversificación espermática (Immler *et al.*, 2010; Simpson *et al.*, 2013). Si bien algunos trabajos muestran variación en el tamaño espermático dentro de un eyaculado (Malo *et al.*, 2006; Schulte-Hostedde y Montgomerie, 2006; Helfenstein *et al.*, 2010; Immler *et al.*, 2010; Calhim *et al.*, 2011; Lüpold *et al.*, 2012a), muchas veces ha sido asociada a un mal desarrollo de los espermatozoides dentro del testículo (Parker y Begon, 1993; Hellriegel y Blanckenhorn, 2002) o a una mala condición física del individuo (Schulte-Hostedde y Montgomerie, 2006). Cierta grado de variación fenotípica dentro de un eyaculado podría ser adaptativo; los machos podrían producir diversos espermatozoides especializados, cada uno con un óptimo diferente (Pizzari y Parker, 2009).

La velocidad espermática es el resultado del diseño combinado de los diferentes componentes del espermatozoide, por lo que la selección podría actuar no sólo sobre los componentes espermáticos individuales sino en la proporción entre ellos, para así mejorar la velocidad (Gomendio y Roldan, 2008; Humphries *et al.*, 2008; Lüpold *et al.*, 2009a). Si bien a nivel intra-específico varios estudios no han encontrado relación entre el diseño espermático y la velocidad (Gage *et al.*, 2002; Burness *et al.*, 2004; Fitzpatrick *et al.*, 2007; 2009; Locatello *et al.*, 2007; Lüpold *et al.*, 2009b), trabajos recientes han provisto diversas evidencias. En dos especies de aves, *Taenopygia guttata* (Mossman *et al.*, 2009) y *Passer domesticus* (Helfenstein *et al.*, 2010), se encontró una fuerte relación entre la longitud de la pieza principal y la velocidad espermática; y entre la proporción pieza principal:cabeza y la velocidad. En una especie de roedor, espermatozoides con pieza media más largas tienen mayores velocidades (Firman y Simmons, 2010). Sin embargo, Malo *et al.*, (2006) reportó una asociación negativa entre la velocidad espermática y la longitud de la pieza media. Simpson *et al.*, (2013) recalca la importancia de tener en cuenta la variación de los caracteres espermáticos dentro de un eyaculado para determinar la relación entre forma y función espermática.

El resultado de la competencia espermática puede deberse a efectos atribuidos a ambos sexos, incluyendo diferencias relativas en la habilidad competitiva de los machos rivales, desvíos en la tasa de fertilización mediados por las hembras, e interacciones complejas que involucren el genotipo de machos competidores y la hembra (Evans, 2010). Para entender con mayor profundidad los procesos micro-evolutivos de la diversificación

espermática, es necesario conocer cómo los machos y las hembras interactúan funcionalmente para contribuir a la variación en el éxito de fertilización durante la competencia (Lüpold *et al.*, 2012b; Evans *et al.*, 2013). Dilucidar estos procesos, sin embargo, ha sido dificultoso debido a impedimentos experimentales como, la dificultad de observar a los espermatozoides directamente en el tracto reproductivo de la hembra; y discriminar espermatozoides provenientes de diferentes machos (Manier *et al.*, 2010; Lüpold *et al.*, 2012b). Recientemente, en estudios donde se han discriminado los espermatozoides de machos rivales, se encontró en el salmón (*Oncorhynchus tshawytscha*) que la variación en el éxito reproductivo de los machos estaba dada por la diferencia intrínseca en la habilidad competitiva de los espermatozoides de machos rivales (Evans *et al.*, 2013). Por el contrario, en *Drosophila melanogaster*, Lüpold *et al.*, (2012b) mostraron que espermatozoides rivales influyen significativamente la velocidad espermática, es decir habría una interacción esperma-esperma de machos rivales. La influencia entre espermatozoides de machos potencialmente rivales enfatiza la importancia de entender el comportamiento espermático en un contexto competitivo (Lüpold *et al.*, 2012b). El desarrollo de técnicas que permiten identificar a los espermatozoides de distintos machos, abre un panorama a nuevas preguntas para profundizar los mecanismos de selección sexual post-copulatoria.

En este capítulo se propone dilucidar la variabilidad de los caracteres espermáticos en relación al riesgo de competencia espermática en *Tupinambis merianae* y *T. rufescens*. Además indagar en la relación entre la forma y la función espermática en ambas especies. Por último, se pretende, en una primera aproximación, dilucidar si la interacción esperma-esperma de machos potencialmente rivales modifica la velocidad espermática en *Tupinambis merianae*. Para lo cual se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Determinar diferencias en el riesgo de competencia espermática entre especies de *Tupinambis*.
- Determinar diferencias en caracteres espermáticos entre especies de *Tupinambis* (concentración, % RAE, viabilidad, caracteres morfométricos y dinámicos del espermatozoide).
- Analizar la variación de los caracteres morfométricos y dinámicos del espermatozoide en tres niveles de aproximación: entre especies y dentro de cada especie: entre machos y dentro de cada macho.

- Analizar la temporalidad de la variabilidad dentro de cada macho de los caracteres morfométricos del espermatozoide en *T. merianae* y *T. rufescens*.
- Dilucidar la relación entre la variabilidad de los caracteres morfométricos y dinámicos del espermatozoide dentro de cada macho y la condición corporal de los individuos en *T. merianae* y *T. rufescens*.
- Dilucidar la relación entre los caracteres morfométricos y la velocidad espermática en *T. merianae* y *T. rufescens*.
- Analizar la variación de la velocidad espermática debido a la interacción esperma-esperma de machos potencialmente rivales en un ensayo *in vitro* en *Tupinambis merianae*.



## Metodología específica

### Ejemplares utilizados

Para el desarrollo de este capítulo, se utilizaron todos los ejemplares colectados durante las cuatro temporadas de actividad de estos lagartos. Para el ensayo de interacción espermática *in vitro* se utilizaron los datos de *T. meriana* obtenidos durante la temporada 2013, los cuales fueron excluidos del resto de los análisis.

### Análisis de los datos

Para determinar diferencias en el riesgo de competencia espermática entre especies, se consideraron cuatro indicadores: el peso testicular relativo, la PSO, el dimorfismo sexual (DS) en el tamaño corporal y el peso relativo del músculo pterigoideo. Las diferencias entre especies en el peso testicular relativo y en el peso relativo del músculo pterigoideo fueron determinadas por un análisis de covarianza (ANCOVA), utilizando el peso del cuerpo como co-variable. Las siguientes variables: peso testicular, peso del músculo pterigoideo y peso del cuerpo fueron transformadas a  $\text{Log}_{10}$  debido a que no cumplían los supuestos de normalidad ni homogeneidad de varianzas. Para el análisis del peso testicular relativo, fueron considerados los datos de animales colectados durante el pico máximo de desarrollo gonadal para cada especie, debido a que el peso testicular varía a lo largo de la temporada reproductiva (*T. meriana* N=92; F=10,85; P<0,0001; *T. rufescens* N=45; F=2,90, P=0,0260), reduciéndose el número de ejemplares utilizados para este análisis a 78 machos de *T. meriana* y 41 individuos de *T. rufescens*. La proporción de sexo fue estimada a partir de los ejemplares reproductivos; y las diferencias entre sexos fueron calculadas mediante un Test de Chi-cuadrado. El índice de dimorfismo sexual en el tamaño corporal (DS) (Lovich y Gibbons, 1992) fue calculado a partir del LHC de los individuos maduros. Un valor negativo de DS indica que los machos fueron de mayor tamaño que las hembras, un valor positivo del índice indica lo opuesto. Las diferencias en el LHC entre sexos en cada especie fueron determinadas por un análisis de la varianza (ANOVA).

Las diferencias entre especies en la concentración, la viabilidad y el %RAE se estimaron a partir de análisis de covarianza (ANCOVA), utilizando el LHC como co-variable. Para cuantificar la variación entre machos y dentro de cada macho fueron calculados los coeficientes de variación (CV) para los caracteres morfométricos y dinámicos

del espermatozoide para cada macho y luego el CV medio de cada carácter de todos los machos estudiados por especie (Calhim *et al.*, 2007). Las diferencias entre especies en la media y en el CV dentro de cada macho de los caracteres morfométricos y dinámicos del espermatozoide fueron determinadas a partir de un ANOVA anidado y un test no paramétrico de Kruskal-Wallis, respectivamente. Las diferencias entre machos en los caracteres espermáticos en cada especie fueron calculadas mediante un test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Además para determinar si la variabilidad dentro de cada macho estaba relacionada al desarrollo testicular, se compararon las diferencias en el CV dentro de cada macho entre meses del periodo de actividad reproductiva (octubre–diciembre) basándonos en las diferencias entre meses del peso testicular relativo, mediante un test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Se utilizaron modelos aleatorios con máxima verosimilitud restringida (REML) para particionar la variación total, en varianza entre especies, entre machos de cada especie y dentro de cada macho. Cabe resaltar que para evaluar la confiabilidad de la medición se realizaron los análisis de repetibilidad pertinentes, usando 15 machos de cada especie, en los cuáles se midieron 5 espermatozoides cuatro veces cada uno. Para evaluar si la variabilidad dentro de cada macho difería entre machos en cada especie se realizaron dos modelos, uno que asume inicialmente homogeneidad de varianzas entre individuos dentro de cada especie y otro que permite que la varianza sea distinta entre individuos. Luego se compararon los dos modelos mediante un test de radio verosimilitud para determinar si la varianza difería significativamente entre individuos, siguiendo el criterio AIC.

La relación entre el CV de los caracteres espermáticos dentro de cada macho y la condición corporal (residuales de la relación entre el  $\text{Log}_{10}$  del peso corporal (PC) y el  $\text{Log}_{10}$  del LHC) fue evaluada mediante un análisis de regresión simple. Para testear si la morfometría espermática estaba asociada con la velocidad, se realizó un análisis de regresión múltiple, utilizando LC, LPM, LPP como variables predictoras para cada especie y se determinó la similitud en las pendientes por medio de variables Dummy. Debido a este análisis se graficaron los residuos parciales de la velocidad como variable dependiente. Previamente se testeó la colinearidad de las variables predictoras. Por otro lado, se evaluó si la variabilidad (CV) dentro de cada macho de los caracteres morfométricos estaba relacionada a la velocidad espermática, mediante un análisis de regresión múltiple usando el CV LC; CV LPM; CV LPP como variables predictoras. Además se realizaron análisis de

regresiones simples entre la velocidad espermática como variable dependiente y la proporción LPP:LC; LPP:LPM y LC:LPM como predictores.

En el análisis del ensayo de interacción espermática de machos potencialmente rivales *in vitro*, para comparar el efecto de la interacción esperma-esperma sobre los caracteres dinámicos, se realizó un ANOVA entre el tratamiento teñido y teñido en interacción de un mismo macho. Previamente, al comparar el tratamiento Control y el Teñido, se encontró diferencia en la VCL y una tendencia en la VSL (ANOVA Anidado, VCL:  $F_{1,15} = 5,94$ ;  $P = 0,0278$ ; VSL:  $F_{1,15} = 4,01$ ;  $P = 0,0636$ ), aunque no se observaron diferencias en la viabilidad espermática (ANOVA  $F_{1,16} = 0,14$ ;  $P = 0,7163$ ), por lo que se procedió a relativizar los valores de los tratamientos teñido y teñido en interacción con respecto al valor medio de los controles, para independizar el efecto que la técnica de tinción podría tener sobre la velocidad espermática. Para esto se dividió el valor de cada tratamiento Teñido y Teñido en interacción con el valor promedio del tratamiento control.

Los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa InfoStat (versión 2012; Universidad de Córdoba, Argentina) y el programa R (versión 2.13.0; The R Foundation for Statistical Computing 2011).

## Resultados

### Indicadores de riesgo de competencia espermática

Al comparar los cuatro indicadores de riesgo de competencia espermática entre especies de *Tupinambis*, se observaron diferencias en tres de ellos. *Tupinambis rufescens* presentó mayor peso testicular relativo que *T. merianae* (Tabla 2). La PSO también difirió entre especies, siendo 6,87:1 en *T. rufescens* y 1,91: 1 en *T. merianae* (Tabla 3). Por su parte el DS en el tamaño corporal estuvo desviado hacia los machos en ambas especies, siendo para *T. rufescens* de -0,139 (ANOVA SVL,  $F_{1,66}=17,89$ ;  $P < 0,0001$ ) y para *T. merianae* de -0,046 (ANOVA SVL,  $F_{1,314}= 19,57$ ;  $P < 0,0001$ ). Por último, al comparar el peso relativo del músculo pterigoideo no se encontraron diferencias significativas entre especies (Tabla 2).

**Tabla 2.** Comparación del peso testicular y peso del músculo pterigoideo entre especies de *Tupinambis*. Media del carácter  $\pm$  desvío estándar; ANCOVA con PC como covariable. Los análisis estadísticos se realizaron con las variables transformadas Log 10. Se presentan arriba los valores *F* y *P* para el efecto especie y abajo para el efecto de la covariable.

Carácter	<i>T. merianae</i>	<i>T. rufescens</i>	g.l.	F	P
Peso Testicular (g)	6,02 $\pm$ 2,59	9,03 $\pm$ 4,19	1,117	<b>5,17</b>	<b>0,0248</b>
	N=78	N=41		<b>92,83</b>	<b>&lt;0,0001</b>
Peso Músculo Pterigoideo (g)	52,94 $\pm$ 37,36	75,26 $\pm$ 43,76	1,144	2,29	0,1322
	N=102	N=45		<b>943,04</b>	<b>&lt;0,0001</b>

**Tabla 3.** Proporción de sexo operativa de *Tupinambis merianae* y *Tupinambis rufescens*

	Hembras	Machos	$\chi^2$	P	PSO
<i>T. merianae</i>	56	107	<b>15,96</b>	<b>&lt;0.0001</b>	1,91:1
<i>T. rufescens</i>	7	48	<b>30,56</b>	<b>&lt;0.0001</b>	6,87:1

### Comparación inter-específica de los caracteres espermáticos

En primer lugar, se exploró la variación de los caracteres espermáticos entre especies de *Tupinambis*. Se observó que *T. merianae* presentó mayor concentración espermática que *T. rufescens* (ANCOVA  $F_{1,125}=5,94$ ;  $P=0,0162$ ). Sin embargo no se encontraron diferencias entre especies en el %RAE (ANCOVA  $F_{1,116}=0,53$ ;  $P= 0,4673$ ), ni en la viabilidad espermática (ANCOVA  $F_{1,53}=0,0002$ ,  $P=0,9888$ ). Por otro lado, se observaron diferencias significativas en todos los caracteres morfométricos: LC (ANOVA anidado  $F_{1,115}=4,20$ ;  $p=$

0,0428); LPM (ANOVA anidado  $F_{1,115}=17,24$ ;  $p= 0,0001$ ); LPP (ANOVA anidado  $F_{1,115}=94,11$ ;  $p<0,0001$ ) y LTE (ANOVA anidado  $F_{1,115}=109,70$ ;  $p<0,0001$ ) (Tabla 4). *T. merianae* presentó todos sus componentes espermáticos más largos que *T. rufescens*. Además, se observaron diferencias en la velocidad espermática (VCL: ANOVA anidado  $F_{1,120}= 5,83$ ;  $p=0,0172$ ; y VSL: ANOVA anidado  $F_{1,120}= 5,03$ ,  $p=0,0267$ ; Tabla 4), siendo *T. rufescens* la especie que presenta espermatozoides más veloces que *T. merianae*; sin embargo, no se encontraron diferencias en el patrón de movimiento espermático entre especies (ANOVA anidado  $F_{1,120}= 0,00061$ ;  $p= 0,9804$ ; Tabla 4).

**Tabla 4.** Comparación de caracteres morfométricos y dinámicos del espermatozoide entre especies de *Tupinambis*.

Especies	Caracteres espermáticos		Media $\pm$ ds.	Rango (min-máx)	CV entre machos	CV macho $\pm$ ds.
<i>T. merianae</i>	Caracteres Morfométricos N= 74	LC ( $\mu\text{m}$ )	13,64 $\pm$ 0,75 *	12,25 – 15,53	5,5	7,24 $\pm$ 2,24
		LPM ( $\mu\text{m}$ )	5,19 $\pm$ 0,29 *	4,59 – 5,83	5,6	9,71 $\pm$ 2,01*
		LPP ( $\mu\text{m}$ )	59,97 $\pm$ 1,23 *	57,41 – 62,4	2,05	5,34 $\pm$ 1,91
		LTE ( $\mu\text{m}$ )	79,19 $\pm$ 1,22 *	76,73 – 81,79	1,55	4,23 $\pm$ 1,44
	Caracteres Dinámicos N=82	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	31,52 $\pm$ 6,61 *	19,6 – 52,30	20,97	20,87 $\pm$ 3,98
		VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	24,79 $\pm$ 5,63 *	15,47 – 43,89	22,71	31,46 $\pm$ 6,60
		LIN	0,78 $\pm$ 0,05	0,68– 0,87	5,89	18,90 $\pm$ 5,22
<i>T. rufescens</i>	Caracteres Morfométricos N= 43	LC ( $\mu\text{m}$ )	13,28 $\pm$ 1,04	11,53 – 15,08	7,83	8,01 $\pm$ 2,62
		LPM ( $\mu\text{m}$ )	4,94 $\pm$ 0,38	4,38 – 5,89	7,66	11,57 $\pm$ 2,35
		LPP ( $\mu\text{m}$ )	57,69 $\pm$ 1,19	54,6 – 60,17	2,05	5,76 $\pm$ 2,54
		LTE ( $\mu\text{m}$ )	76,32 $\pm$ 1,69	73,27 – 79,04	2,21	4,7 $\pm$ 2,34
	Caracteres Dinámicos N=39	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	34,99 $\pm$ 7,5	21,66 – 60,84	22,93	20,90 $\pm$ 4,79
		VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	27,79 $\pm$ 6,65	17,97 – 51,61	24,03	30,81 $\pm$ 6,40
		LIN	0,78 $\pm$ 0,04	0,67– 0,85	5,18	16,83 $\pm$ 3,84

\* Diferencias significativas entre especies. LC: Longitud de la cabeza; LPM: Longitud de la pieza media; LPP: Longitud de la pieza principal; LTE: Longitud total espermática; VCL: Velocidad curvilínea; VSL: Velocidad lineal; LIN: Linealidad

### Variación intra-específica de los caracteres espermáticos

Al estudiar la variabilidad de los caracteres espermáticos entre machos, se observaron diferencias significativas en todos los componentes espermáticos y los caracteres dinámicos en cada especie (Tabla 5; Fig. 9, 10). Sin embargo, al descomponer la varianza total de cada carácter espermático, en los tres niveles de análisis: entre especies y dentro de cada especie:

entre machos y dentro de cada macho, se observó que la variabilidad dentro de cada macho, fue la fuente de mayor variación de los caracteres espermáticos (Tabla 6; Fig. 9, 10). La variación dentro de cada macho explicó del 56% (LC) al 76% (LPP) de la variación total de los caracteres morfométricos (Tabla 6; Fig. 9) y del 51% (VCL) al 94% (LIN) de la variación total de los caracteres dinámicos (Tabla 6; Fig. 10). Estos caracteres mostraron una repetibilidad de medición alta y significativa, en el rango de 0,84 a 0,99 en *T. merianae* y 0,75 a 0,99 en *T. rufescens* (caracteres morfométricos: *T. merianae* todos  $F_{74,300} > 24,47$ ;  $P < 0,0001$ . *T. rufescens* todos  $F_{74,300} > 13,32$ ,  $P < 0,0001$ . Caracteres dinámicos: *T. merianae* todos  $F_{74,300} > 119$ ,  $P < 0,0001$ ; *T. rufescens* todos  $F_{74,300} > 46,14$ ,  $P < 0,0001$ ) (Tabla 6).

**Tabla 5.** Variación entre machos de los caracteres morfométricos y dinámicos del espermatozoide en *T. merianae* y *T. rufescens*

Caracteres espermáticos	<i>T. merianae</i>		<i>T. rufescens</i>	
	H	P	H	P
LC (µm)	1544,95	0,0001	1161,6	0,0001
LPM (µm)	969,65	0,0001	622,68	0,0001
LPP (µm)	1068,37	0,0001	465,4	0,0001
LTE (µm)	985,74	0,0001	687,81	0,0001
VCL (µm/s)	1749,09	0,0001	787,23	0,0001
VSL (µm/s)	1128,71	0,0001	508,07	0,0001
LIN	363,69	0,0001	167,01	0,0001

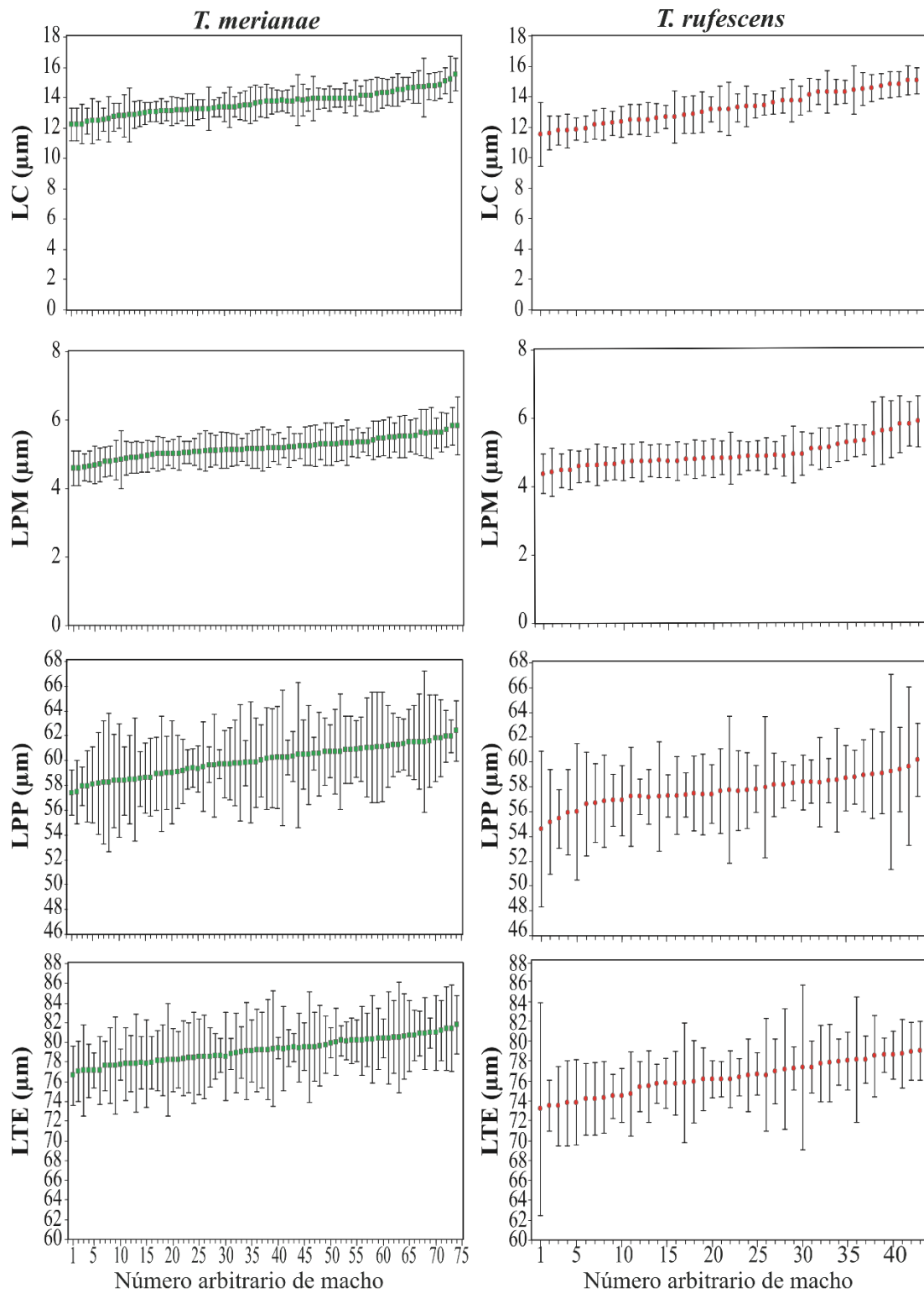
LC: Longitud de la cabeza; LPM: Longitud de la pieza media; LPP: Longitud de la pieza principal; LTE: Longitud total espermática; VCL: Velocidad curvilínea; VSL: Velocidad lineal; LIN: Linealidad

Con respecto a la variabilidad dentro de cada macho, se exploró las diferencias entre machos realizando un test de radio verosimilitud para cada especie por separado, siendo rechazada la hipótesis nula de que la variación dentro de cada macho es igual entre machos (Tabla 7; Fig. 9, 10). Por otro lado, se estudió si la variabilidad dentro de cada macho de los caracteres morfométricos cambiaba entre los meses del periodo reproductivo por la temporalidad del testículo. En *T. merianae* no se encontraron diferencias entre meses (Tabla 8). Sin embargo, en *T. rufescens* encontramos diferencias en la variación dentro de cada macho del LC y LTE entre meses, con mayor variación en la mitad del periodo reproductivo (noviembre) (Tabla 8). Por último, no se encontró asociación entre la variabilidad dentro de cada macho y la condición corporal de los machos en ninguna de las dos especies de *Tupinambis* (Tabla 9).

**Tabla 6.** Partición de la varianza de los caracteres morfométricos y dinámicos del espermatozoide en: Varianza entre especies, entre machos y dentro de cada macho.

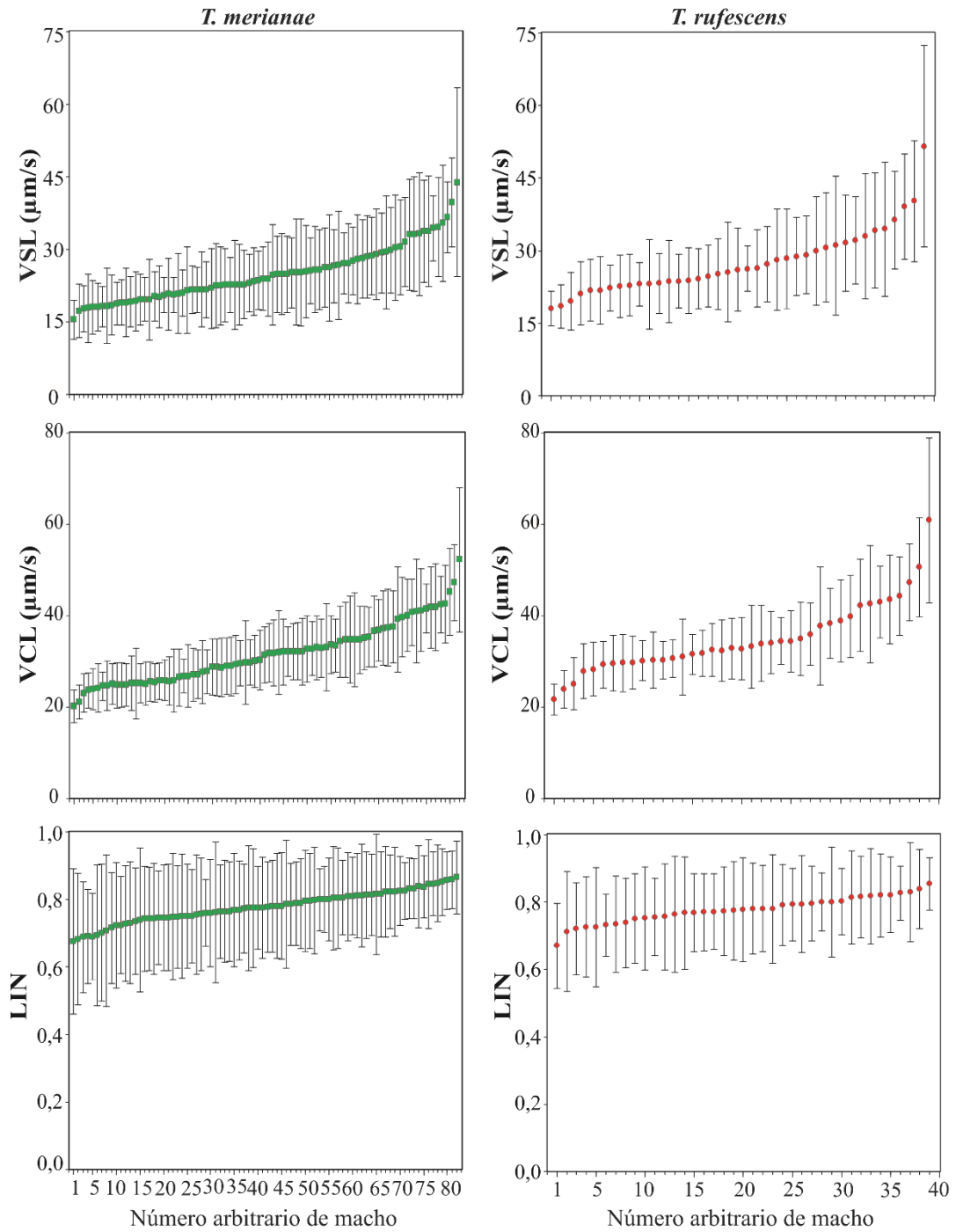
	Fuentes de variación				Repetibilidad <i>T. merianae</i>	Error de Medición <i>T. merianae</i>	Repetibilidad <i>T. rufescens</i>	Error de Medición <i>T. rufescens</i>
	Entre especies	Entre machos	Dentro de cada macho	Total				
<b>LC</b>					0,97	0,06	0,97	0,05
Varianza estimada ± ds	0,048 ± 0,221	0,735 ± 0,857	1,092 ± 1,045	1,875				
<b>LPM</b>					0,84	0,05	0,75	0,04
Varianza estimada ± ds	0,0269 ± 0,164	0,100 ± 0,316	0,297 ± 0,545	0,424				
<b>LPP</b>					0,96	0,2	0,98	0,13
Varianza estimada ± ds	2,582 ± 1,607	1,235 ± 1,111	12,163 ± 3,487	15,98				
<b>LTE</b>					0,97	0,23	0,99	0,14
Varianza estimada ± ds	4,123 ± 2,030	1,755 ± 1,325	13,782 ± 3,712	19,66				
<b>VCL</b>					0,97	1,6	0,96	1,64
Varianza estimada ± ds	4,309 ± 2,076	46,442 ± 6,815	53,01 ± 7,281	103,761				
<b>VSL</b>					0,99	0,61	0,99	0,68
Varianza estimada ± ds	2,726 ± 1,651	34,473 ± 5,871	74,078 ± 8,607	111,269				
<b>LIN</b>					0,97	0,00082	0,92	0,0011
Varianza estimada ± ds	0 ± 0	0,0014 ± 0,038	0,021 ± 0,1436	0,0224				

LC: Longitud de la cabeza; LPM: Longitud de la pieza media; LPP: Longitud de la pieza principal; LTE: Longitud total espermática; VCL: Velocidad curvilineal; VSL: Velocidad lineal; LIN: Linealidad



**Figura 9.** Variación entre machos y dentro de cada macho en los caracteres morfométricos del espermatozoide en lagartos *Tupinambis*. *Tupinambis merianae* ■; *Tupinambis rufescens* ●. Cuadrados y círculos representan la media de cada individuo ( $\pm$  desviación estándar) ordenados de mayor a menor. LC, longitud de la cabeza; LPM, longitud de pieza media; LPP longitud pieza principal; LTE, longitud total espermática.





**Figura 10.** Variación entre machos y dentro de cada macho en los caracteres dinámicos del espermatozoide en lagartos *Tupinambis*. *Tupinambis meriana* ■ ; *Tupinambis rufescens* ● . Cuadrados y círculos representan la media de cada individuo ( $\pm$  desviación estándar) ordenados de mayor a menor. VSL, velocidad lineal; VCL, velocidad curvilínea; LIN, linealidad.

**Tabla 7.** Diferencias entre machos en la variación dentro de cada macho de los caracteres morfométricos y dinámicos del espermatozoide en *Tupinambis merianae* y *Tupinambis rufescens*.

Caracteres espermáticos	<i>T. merianae</i>		<i>T. rufescens</i>	
	L. ratio	P	L. ratio	P
LC (µm)	616,348	0,0001	322,689	0,0001
LPM (µm)	338,157	0,0001	226,093	0,0001
LPP (µm)	937,725	0,0001	728,798	0,0001
LTE (µm)	869,115	0,0001	816,444	0,0001
VCL (µm/s)	666,146	0,0001	454,042	0,0001
VSL (µm/s)	721,528	0,0001	474,609	0,0001
LIN	398,053	0,0001	131,623	0,0001

LC: Longitud de la cabeza; LPM: Longitud de la pieza media; LPP: Longitud de la pieza principal; LTE: Longitud total espermática; VCL: Velocidad curvilínea; VSL: Velocidad lineal; LIN: Linealidad

**Tabla 8.** Variación temporal del CV dentro de cada macho en los caracteres morfométricos del espermatozoide de *Tupinambis*

Especies	Caracteres	Periodo Reproductivo				Estadística	P
		Octubre	Noviembre	Diciembre			
<i>T. merianae</i> N= 72	CV LC		7,30 ± 2,12	6,99 ± 2,28	0,76	0,3827	
	CV LPM		9,81 ± 1,69	9,61 ± 2,36	0,25	0,6162	
	CV LPP		5,59 ± 1,65	5,15 ± 2,17	1,11	0,2923	
	CV LTE		4,37 ± 1,22	4,11 ± 1,16	0,41	0,5209	
<i>T. rufescens</i> N= 41	<b>CV LC</b>	<b>8,35 ± 3,29</b>	<b>8,87 ± 2,62</b>	<b>6,38 ± 1,76</b>	<b>12,68</b>	<b>0,0018</b>	
	CV LPM	12,67 ± 2,47	11,58 ± 2,28	10,82 ± 2,08	3,77	0,1520	
	CV LPP	4,58 ± 1,96	6,29 ± 2,64	5,50 ± 2,84	3,31	0,1908	
	<b>CV LTE</b>	<b>3,58 ± 1,44</b>	<b>5,49 ± 2,77</b>	<b>3,82 ± 1,42</b>	<b>6,57</b>	<b>0,0374</b>	

Negrita: Diferencias significativas entre meses. CV LC: Coeficiente de variación de la longitud de la cabeza; CV LPM: Coeficiente de variación de la longitud de la pieza media; CV LPP: Coeficiente de variación de la longitud de la pieza principal; CV LTE: Coeficiente de variación de la longitud total espermática.

**Tabla 9.** Relación entre la variabilidad dentro de cada macho de los caracteres espermáticos y la condición corporal en *Tupinambis*.

Especies	Caracteres espermáticos	Variable dependiente	Predictor	R <sup>2</sup>	Pendiente	F	P
<i>T. meriana</i>	Caracteres morfométricos N=71	CV LC	Condición Corporal	0,01	4,15	0,65	0,4234
		CV LPM	Condición Corporal	0,01	-4,89	1,03	0,3147
		CV LPP	Condición Corporal	0,01	-3,14	0,47	0,4930
		CV LTE	Condición Corporal	0,01	-2,6	0,57	0,4516
	Caracteres dinámicos N=81	CV VCL	Condición Corporal	0,01	7,73	1,09	0,3001
		CV VSL	Condición Corporal	0,0008	3,26	0,07	0,7925
<i>T. rufescens</i>	Caracteres morfométricos N=39	CV LC	Condición Corporal	0,01	5,37	0,49	0,4868
		CV LPM	Condición Corporal	0,01	-4,16	0,48	0,4948
		CV LPP	Condición Corporal	0,0021	-1,9	0,08	0,783
		CV LTE	Condición Corporal	0,0013	-1,45	0,05	0,8275
	Caracteres dinámicos N=37	CV VCL	Condición Corporal	0,0045	5,44	0,16	0,6918
		CV VSL	Condición Corporal	0,0043	0,69	0,0015	0,9694

CV LC: Coeficiente de variación de la longitud de la cabeza; CV LPM: Coeficiente de variación de la longitud de la pieza media; CV LPP: Coeficiente de variación de la longitud de la pieza principal; CV LTE: Coeficiente de variación de la longitud total espermática. CV VCL: Coeficiente de variación de la velocidad curvilínea; CV VSL: Coeficiente de variación de la velocidad lineal.

Además, se compararon la variabilidad entre machos y dentro de cada macho entre especies. *T. rufescens* presentó mayor variación entre machos (CV entre machos) de LC y LPM (Tabla 4) y mayor variación dentro de cada macho (CV dentro de cada macho) de la LPM que *T. meriana* (H=15,93; P<0,0001, Tabla 4). Sin embargo, no se observaron diferencias entre especies en la variabilidad dentro de cada macho de los caracteres dinámicos (CV VCL H =0,04; P= 0,8320; CV VSL H=0,07, P= 0,7872; CV LIN H= 3,92, P= 0,0476, Tabla 4).

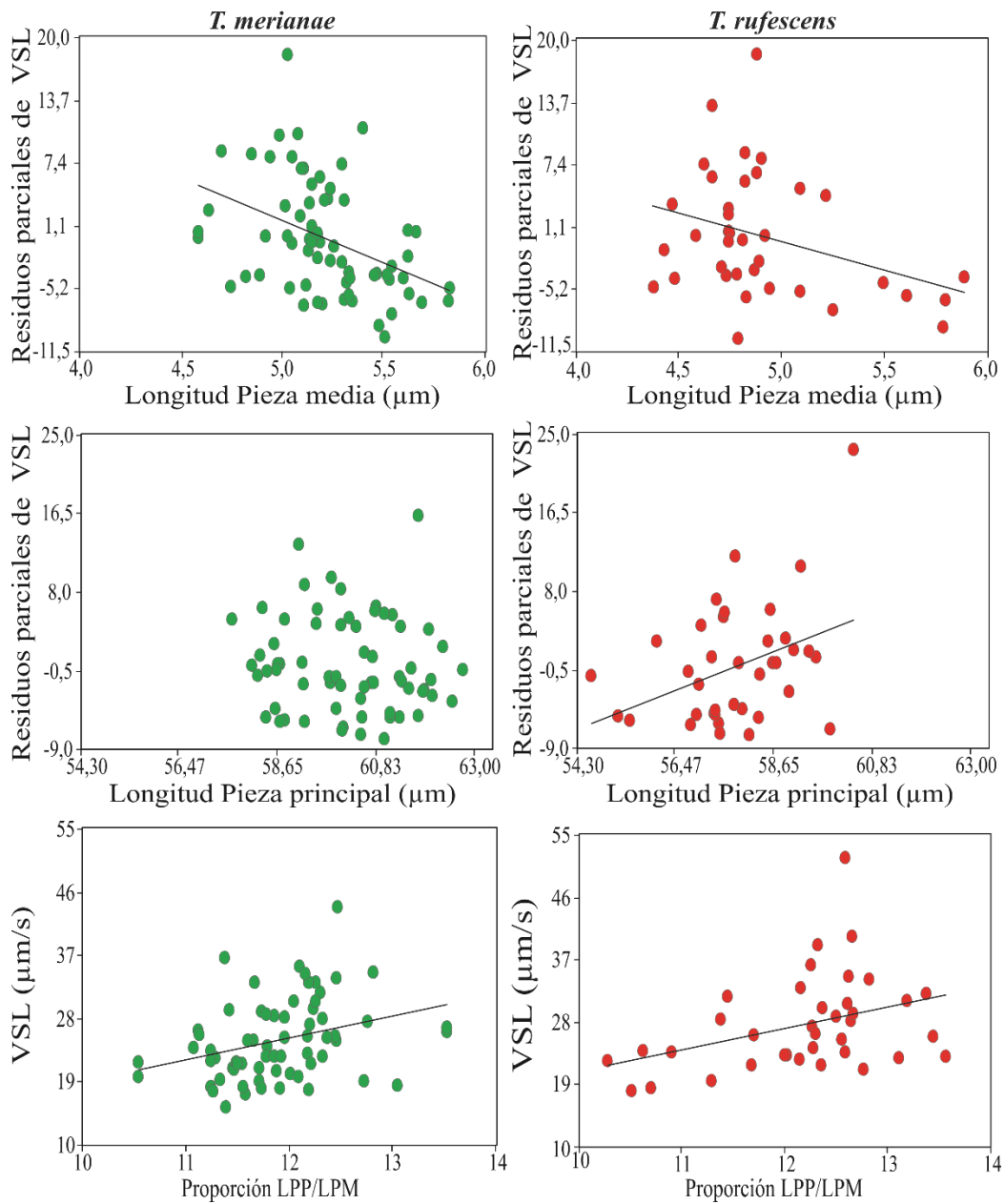
## Relación entre la morfometría y la velocidad espermática

La relación entre la longitud de cada componente espermático y la velocidad fue evaluada en cada especie por separado. Se encontró que la VSL está relacionada de manera negativa con la longitud de la pieza media y de manera positiva con la proporción LPP:LPM, con pendientes similares entre especies (Tabla 10; Fig. 11). Además, en *T. rufescens* se observó una relación positiva entre la VSL y la LPP; la cual, no fue observada en *T. merianae* (Tabla 10; Fig. 11). Por otra parte, se evaluó la relación de la variabilidad dentro de cada macho de los caracteres morfométricos y la velocidad espermática. En *T. merianae* se encontró una débil relación positiva entre el CV LC y la VSL. Por el contrario, en *T. rufescens*, se encontró una relación negativa entre el CV LPM y la VSL (Tabla 12). Debido a que la linealidad fue alta, mayor al 78% para ambas especies (Mortimer 1997), se encontraron resultados similares cuando se analizó la VCL como variable dependiente (Tabla 11, 12; Fig. 12).

**Tabla 10.** Relación entre VSL y caracteres morfométricos del espermatozoide en *Tupinambis*.

Especies	Variable		R <sup>2</sup>	Pendiente	F	P
	dependiente	Predictor				
<i>T. merianae</i> N=66	VSL (µm/s)	LC (µm)	0,17	-1,17	0,01	0,9196
		<b>LPM (µm)</b>		<b>-8,61</b>	<b>11,82</b>	<b>0,0011</b>
		LPP (µm)		-0,45	0,63	0,4300
		LPP: LC	0	-0,06	0,000052	0,9819
		<b>LPP:LPM</b>	<b>0,10</b>	<b>2,8</b>	<b>7,35</b>	<b>0,0086</b>
		LC:LPM	0,05	5,59	3,54	0,0545
<i>T. rufescens</i> N= 37	VSL (µm/s)	LC (µm)	0,23	-0,59	0,04	0,8388
		<b>LPM (µm)</b>		<b>-5,63</b>	<b>4,93</b>	<b>0,0334</b>
		<b>LPP (µm)</b>		<b>1,99</b>	<b>5,1</b>	<b>0,0307</b>
		LPP:LC	0	0,31	0,03	0,8752
		<b>LPP:LPM</b>	<b>0,14</b>	<b>2,76</b>	<b>5,75</b>	<b>0,022</b>
	LC:LPM	0,03	3,59	1,16	0,289	

Negrita: Relaciones significativas. LC: Longitud de la cabeza; LPM: Longitud de la pieza media; LPP: Longitud de la pieza principal; LPP:LPM: Proporción de la pieza principal y pieza media; LC:LPM Proporción de la cabeza y pieza media; VSL: Velocidad lineal.

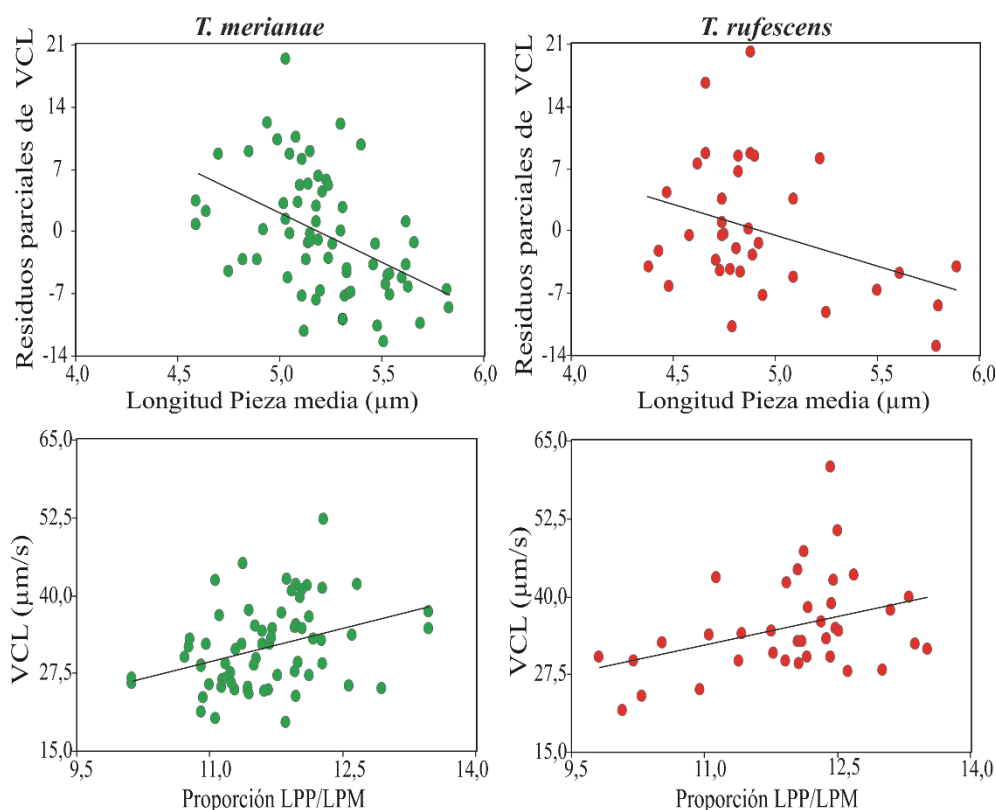


**Figura 11.** Relación entre la VSL y los caracteres morfométricos del espermatozoide en *Tupinambis*. *T. merianae* ● ; *T. rufescens* ●. Las pendientes fueron similares entre especies (Variable Dummy LPM:  $F=0,48$ ;  $P= 0,6204$ ; proporción LPP:LPM:  $F=0,00062$ ,  $P= 0,9803$ ).

**Tabla 11.** Relación entre VCL y caracteres morfométricos del espermatozoide en *Tupinambis*

Especies	Variable					
	dependiente	Predictor	R <sup>2</sup>	Pendiente	F	P
<i>T. merianae</i> N=66	VCL (µm/s)	LC (µm)	0,20	-1,86	0,02	0,8803
		<b>LPM (µm)</b>		<b>-10,99</b>	<b>14,58</b>	<b>0,0003</b>
		LPP (µm)		-0,62	0,94	0,3366
		LPP:LC	0	0,74	0,06	0,806
		<b>LPP:LPM</b>	<b>0,12</b>	<b>3,58</b>	<b>8,89</b>	<b>0,0041</b>
	LC:LPM	0,05	6,41	3,36	0,0714	
<i>T. rufescens</i> N= 37	VCL (µm/s)	LC (µm)	0,22	-0,92	0,0000003	0,9996
		<b>LPM (µm)</b>		<b>-6,86</b>	<b>5,52</b>	<b>0,0249</b>
		LPP (µm)		2,01	4,04	0,0526
		LPP:LC	0	0,28	0,02	0,8984
		<b>LPP:LPM</b>	<b>0,13</b>	<b>3,05</b>	<b>5,33</b>	<b>0,027</b>
	LC:LPM	0,03	3,64	0,91	0,3463	

Negrita: Relaciones significativas. LC: Longitud de la cabeza; LPM: Longitud de la pieza media; LPP: Longitud de la pieza principal; LPP:LPM: Proporción de la pieza principal y pieza media; LC:LPM Proporción de la cabeza y pieza media VCL: Velocidad curvilínea.



**Figure 12.** Relación entre la VCL y los caracteres morfométricos del espermatozoide en *Tupinambis*. *T. merianae* ● ; *T. rufescens* ● . Las pendientes fueron similares entre especies (Variable Dummy LPM: F=0,50; P= 0,4796; proporción LPP:LPM: F=0,09; P= 0,7616).

**Tabla 12.** Relación entre VSL y VCL con la variabilidad dentro de cada macho (CV) de los caracteres morfométricos del espermatozoide en *Tupinambis*.

Especies	Variable		R <sup>2</sup>	Pendiente	F	P
	dependiente	Predictor				
<i>T. meriana</i> N=66	VSL (µm/s)	<b>CV LC</b>	<b>0,09</b>	<b>0,81</b>	<b>4,91</b>	<b>0,0304</b>
		CV LPM		-0,38	1,07	0,3051
		CV LPP		0,11	0,09	0,7639
	VCL (µm/s)	CV LC	0,06	0,77	3,02	0,0873
		CV LPM		-0,41	0,93	0,3386
		CV LPP		0,08	0,03	0,8531
<i>T. rufescens</i> N=37	VSL (µm/s)	CV LC	0,19	0,28	0000,3	0,9957
		<b>CV LPM</b>		<b>-1,36</b>	<b>7,48</b>	<b>0,01</b>
		CV LPP		-0,22	0,29	0,5945
	VCL (µm/s)	CV LC	0,23	0,24	0,07	0,7976
		<b>CV LPM</b>		<b>-1,72</b>	<b>9,67</b>	<b>0,0039</b>
		CV LPP		-0,26	0,34	0,5628

Negrita: Relaciones significativas. CV LC: Coeficiente de variación de la longitud de la cabeza; CV LPM: Coeficiente de variación de la longitud de la pieza media; CV LPP: Coeficiente de variación de la longitud de la pieza principal; CV LTE: Coeficiente de variación de la longitud total espermática. VSL: Velocidad lineal; VCL: Velocidad curvilínea.

### **Ensayo de interacción espermática de machos potencialmente rivales *in vitro*.**

Al mezclar espermatozoides de dos machos potencialmente rivales, en el ensayo *in vitro* de interacción espermática, se compararon los caracteres dinámicos de los espermatozoides teñidos de un macho, antes y después de estar en presencia con espermatozoides de otro macho. Al comparar los tratamientos teñido y teñido en interacción con espermatozoides de otro macho, no se observaron diferencias significativas de la velocidad espermática, tanto en la media como en la variabilidad dentro de cada macho (Tabla 13).

**Tabla 13.** Comparación de caracteres dinámicos de los espermatozoides de *T. merianae* en un ensayo de interacción espermática de machos potencialmente rivales in vitro.

	Teñido	Teñido en interacción	g.l	F	P
VCL	24,28 ± 3,55	24,14 ± 4,06	1,13	0,07	0,8019
CV VCL	29,12 ± 7,82	26,13 ± 4,59	1,13	0,76	0,3995
VSL	20,00 ± 3,35	19,58 ± 4,13	1,13	0,14	0,7178
CV VSL	34,45 ± 7,14	31,81 ± 6,04	1,13	0,53	0,4789

VCL: Velocidad curvilínea; VSL: Velocidad lineal; CV VCL: Coeficiente de variación de la velocidad curvilínea; CV VSL: Coeficiente de variación de la velocidad lineal.



## Discusión

En este capítulo se presenta por primera vez, la relación entre los caracteres morfométricos y la velocidad espermática en el contexto de riesgo de competencia espermática en lagartos. Nuestros resultados indican que las dos especies de *Tupinambis* están expuestas a diferentes contextos de competencia, lo cual podría llevar a diferencias en el riesgo de competencia espermática entre especies. En relación a esto, encontramos diferencias entre especies en varios de los caracteres espermáticos, tales como concentración, morfometría y velocidad espermática. Por otro lado, a nivel intra-específico, se observó gran variabilidad de los caracteres morfométricos y dinámicos del espermatozoide entre machos, tanto en la media como en el CV dentro de cada macho. A pesar de esto, ambas especies presentaron una relación positiva entre la proporción LPP:LPM y la velocidad, es decir que espermatozoides con pieza principal más larga en relación a la pieza media son más veloces. Por último, en este capítulo, se intentó dar una primera aproximación de poner a punto una técnica experimental que permita diferenciar espermatozoides de machos potencialmente rivales y así poder dilucidar el rol de la interacción esperma-esperma en el resultado de la competencia espermática.

Medir la competencia post-copulatoria en poblaciones de animales en vida silvestre es bastante dificultoso, existen indicadores indirectos del riesgo de competencia espermática, que si bien han sido discutidos, el uso de múltiples medidas que se aproximen al riesgo está ampliamente justificado (Klug *et al.*, 2010). Es por esto, que en esta tesis, inferimos el riesgo de competencia espermática a partir de cuatro indicadores: el peso testicular relativo, la PSO, el dimorfismo sexual en el tamaño corporal y el desarrollo del carácter sexual secundario. A pesar de que *T. merianae* y *T. rufescens* son especies cercanas filogenéticamente, se observó que estarían bajo distinta presión de competencia. Los machos de *T. rufescens* presentaron mayor riesgo de competencia espermática ya que mostraron mayor peso testicular relativo, mayor dimorfismo sexual en el tamaño corporal desviado hacia los machos y mayor PSO desviada hacia los machos que *T. merianae*. Sin embargo, no se observaron diferencias en el peso relativo del músculo pterigoideo. Por lo tanto, si estas especies difieren en el contexto de competencia, se podría esperar diferencias en los caracteres espermáticos. En relación a esto, se encontró que *T. merianae* presentó mayor concentración y longitud de todos sus componentes espermáticos que *T. rufescens*. Sorprendentemente, *T. rufescens* presentó

mayor variabilidad entre machos y dentro de cada macho de la longitud de la pieza media y mayor velocidad espermática que la especie hermana.

El éxito reproductivo de un macho está determinado por la interacción entre la habilidad de acceder a la pareja y elegir hembras de alta calidad reproductiva, y la habilidad de su eyaculado para competir con eyaculados rivales (Cornwallis y Birkhead, 2007; Keogh *et al.*, 2013). Debido a que la producción espermática es costosa (Olsson *et al.*, 1997), cada macho debería ajustar la inversión en su eyaculado para maximizar su éxito reproductivo (Perry *et al.*, 2013) según su rol social (Rudolfson *et al.*, 2006; Cornwallis y Birkhead, 2007; Locatello *et al.*, 2007), el número y calidad de hembras disponibles (Lüpold *et al.*, 2011; 2012a) y la intensidad de riesgo de competencia espermática (Parker, 1998; Cornwallis y Birkhead, 2007; Pizzari y Parker, 2009; Kvarnemo y Simmons, 2013). En especies donde la competencia espermática es un fenómeno común, existen grandes diferencias en las características espermáticas entre machos (Snook, 2005), sugiriendo que cierto grado de variación entre individuos en los caracteres espermáticos es esperado en poblaciones naturales (Gomendio *et al.*, 2007). En relación a esto, los machos de *T. merianae* y *T. rufescens* producirían espermatozoides de tamaño y velocidad variable. Y más aún, la variabilidad dentro de cada macho también fue diferente entre machos. En concordancia con Pitnick *et al.*, (2009a), la variación entre machos en los caracteres morfométricos y dinámicos encontrada en *Tupinambis* sugiere que podría haber más de un solo óptimo de aptitud (*fitness*) para los caracteres espermáticos, y que cada individuo podría ajustar la proporción de espermatozoides diferentes en relación al contexto de competencia al cual este expuesto.

Los machos podrían producir una variedad de espermatozoides de distintos tamaños como una estrategia para maximizar el éxito de fertilización en un contexto de competencia espermática (Helfenstein *et al.*, 2010; Calhim *et al.*, 2011). Estudios que compararon dos o más eyaculados de un mismo macho mostraron que un individuo puede modificar el tamaño espermático (Immler *et al.*, 2010) y la velocidad (Lüpold *et al.*, 2012a) de acuerdo a cambios en el contexto social y el riesgo de competencia espermática, sugiriendo que los machos exhiben una plasticidad en la inversión de los recursos reproductivos (Kvarnemo y Simmons, 2013). En relación a esto, encontramos en estas dos especies de *Tupinambis*, una gran variabilidad dentro de cada macho en los caracteres morfométricos y dinámicos del

espermatozoides. Una explicación a la variabilidad dentro de cada macho de los caracteres morfométricos podría ser que como el peso testicular varía a lo largo del periodo reproductivo, varíe la morfometría de los espermatozoides producidos. Esta hipótesis predice que encontraríamos eyaculados más variables al comienzo y al final de periodo reproductivo, cuando los testículos no están en su máximo desarrollo (Cramer *et al.*, 2013). Sin embargo, en *T. rufescens* encontramos mayor variabilidad dentro de cada macho en la LC y LTE en la mitad del periodo reproductivo (noviembre), coincidiendo con el máximo desarrollo testicular (Naretto, 2014). Por otro lado, no encontramos relación entre la variabilidad dentro de cada macho y la condición corporal de los animales. Estos resultados sugieren que un macho podría producir una mezcla de diferentes espermatozoides dentro de un mismo eyaculado para enfrentar la competencia espermática. Esto cobra importancia ya que cada componente espermático podría contribuir con diferentes funciones y además, podría haber un balance entre las funciones (Pizzari y Parker, 2009; Helfenstein *et al.*, 2010). La heterogeneidad dentro del tracto reproductivo de la hembra y/o la heterogeneidad del microambiente testicular durante la espermatogénesis podrían influenciar el fenotipo espermático. Como consecuencia de esto, podría haber más de un solo óptimo de diseño espermático o el óptimo podría estar cambiando continuamente (Morrow *et al.*, 2008).

Diferentes hipótesis han sido propuestas para explicar la importancia de los diferentes componentes del espermatozoide para la función espermática. Algunos estudios han reportado una contribución positiva de la longitud de la pieza principal del flagelo a la velocidad espermática en varios taxos (Gomendio y Roldan, 2008; Fitzpatrick *et al.*, 2009; Lüpold *et al.*, 2009a; Tourmente *et al.*, 2011a), ya que aumentaría la fuerza necesaria para la propulsión del espermatozoide (Katz y Drobnis, 1990). Por su lado, un aumento de la longitud de la pieza media podría reflejar un incremento en la cantidad de energía disponible (Cardullo y Baltz, 1991) para la motilidad y longevidad espermática (Parker y Begon, 1993). Finalmente, una elongación de la longitud de la cabeza podría jugar un papel importante durante el almacenamiento espermático, contribuyendo a las interacciones esperma-tracto reproductivo de la hembra (Pitnick *et al.*, 2009b), y reducir la fuerza de roce experimentada por el espermatozoide y así aumentar su velocidad de natación (Malo *et al.*, 2006). Estudios recientes sugieren que la variación dentro de un eyaculado en los caracteres espermáticos podría enmascarar la relación entre la morfometría y la velocidad espermática, y proponen que al medir la morfometría y la velocidad en el mismo espermatozoide la relación entre la

forma y la función espermática sería más común de lo que se pensaba (Simpson *et al.*, 2013). Sin embargo, en este capítulo a pesar de que por razones experimentales no pudimos obtener ambas medidas de cada célula individual, al relacionar la media de los caracteres morfométricos de cada individuo con la media de la velocidad, mostramos que en ambas especies de *Tupinambis* existe una relación negativa entre la velocidad y la longitud de la pieza media y una relación positiva con la proporción pieza principal:pieza media, por lo que espermatozoides con pieza principal más larga en relación a su pieza media son más veloces. Además, en *T. rufescens* encontramos una relación positiva entre la velocidad lineal y la longitud de la pieza principal, la cual no fue evidenciada en *T. merianae*. Una posible explicación a esta discrepancia entre especies sería las diferencias en el contexto de competencia al cual están expuestas.

Conocer la relación entre los caracteres espermáticos y la eficiencia de fertilización es importante para entender la evolución del espermatozoide; sin embargo, dilucidar esta relación en poblaciones en vida silvestre de lagartos es difícil. Varios estudios en diferentes taxas han propuesto una relación positiva entre la velocidad espermática y el éxito de fertilización bajo competencia espermática (Birkhead *et al.*, 1999; Gage *et al.*, 2004; Gomendio y Roldan, 2008). Por lo tanto, si la variabilidad dentro de cada macho está relacionada con el éxito para la fertilización, hubiéramos esperado una relación positiva entre la variabilidad y la velocidad espermática. Cuando evaluamos esta relación, encontramos una débil relación positiva entre la VSL y la variabilidad dentro de cada macho en la LC en *T. merianae* y una relación negativa con la variabilidad dentro de cada macho de la LPM en *T. rufescens*. Estos resultados pueden explicarse por el hecho de que la morfometría espermática podría co-variarse no solo con la velocidad espermática sino también con la longevidad (Crean y Marshall, 2008; Helfenstein *et al.*, 2010). Sumado a esto, se ha postulado un balance entre la velocidad y la longevidad espermática. La teoría predice que la velocidad de natación aumentaría con el riesgo de competencia espermática a expensas de la duración de la motilidad (Ball y Parker, 1996). Helfenstein *et al.*, (2010) mostró que espermatozoides con la pieza principal más larga en relación a la cabeza nadan más rápido, mientras que los que poseen flagelo más corto viven por más tiempo. Por lo tanto, si la pieza media es el principal componente que provee la energía para el movimiento y la supervivencia espermática dentro del tracto de la hembra, y considerando nuestros resultados, sería interesante indagar si la pieza media está contribuyendo a la supervivencia espermática en estas especies. Esto cobra especial importancia en squamatas, ya que hay

evidencias de almacenamiento espermático por largos periodos (Birkhead y Møller, 1993; Olsson y Madsen, 1998; Holt y Loyd, 2010). En particular, en muchas especies de lagartos, las hembras poseen estructuras especiales para el almacenamiento espermático (Sever y Hamlett, 2002) y podrían guardar espermatozoides al menos algunas semanas entre la copula y la ovulación (Olsson y Madsen, 1998; Keogh *et al.*, 2013). El tiempo entre la inseminación y el encuentro con el ovocito podría influenciar el balance entre la velocidad y la longevidad espermática (Ball y Parker, 1996).

Por último, se realizó un ensayo de interacción espermática de machos potencialmente rivales *in vitro*, con el objetivo de comenzar a dilucidar los mecanismos por los cuales espermatozoides de un macho son más exitosos que los de otro macho en un escenario competitivo. Este tipo de ensayo permite determinar si la interacción entre los espermatozoides de dos machos potencialmente rivales modifica los caracteres dinámicos de las células. No se encontraron diferencias en las velocidades espermáticas entre los espermatozoides que estaban expuestos a la interacción con espermatozoides de otro macho y los espermatozoides que no lo estaban. Estos resultados podrían deberse a varias explicaciones alternativas. En primer lugar, se encontró que la técnica de tinción afecta los caracteres dinámicos de los espermatozoides, por lo que serían necesarias pruebas adicionales a fin de minimizar los efectos de la manipulación de las células sobre la velocidad espermática. Otra posible explicación, es que la interacción entre espermatozoides de machos potencialmente rivales este influenciada por la variación en la calidad de los eyaculados (Lüpold *et al.*, 2012b). En trabajos similares, se conoce de antemano la diferencia en los caracteres espermáticos de los individuos (Lüpold *et al.*, 2012b), esto hace difícil la generalización de la competitividad de los espermatozoides bajo otras condiciones (Engqvist, 2013). A diferencia de esto, en nuestro caso, se usaron machos aleatorios obtenidos en una población de animales en vida silvestre, por lo que podrían no diferir en los caracteres dinámicos entre competidores. Además otra explicación posible es que, en este caso, se evaluó sólo la interacción esperma-esperma como factor que inflencie el desempeño espermático, pero recientemente se han encontrado evidencias que proteínas seminales pueden influir en el resultado de la interacción espermática (Cornwallis y Birkhead, 2007; Perry *et al.*, 2013). Por último, otra explicación a estos resultados es el tiempo de incubación en el cual han estado interaccionando los espermatozoides de machos potencialmente rivales. En estos ensayos los espermatozoides estuvieron juntos por un lapso

de 30 minutos ya que se encontró que ese periodo de incubación era óptimo para evaluar los caracteres dinámicos del espermatozoide *in vitro* en *Tupinambis* (Observ. Pers.). Sin embargo, puede no haber sido suficiente para evidenciar el fenómeno de interacción espermática, ya que en el tracto de la hembra los espermatozoides podrían competir desde varias horas hasta días hasta llegar al sitio de almacenamiento o fertilización. Debido a todas estas explicaciones y a que no se tuvo en cuenta el efecto que podría producir la hembra a través de procesos de elección criptica, no podemos afirmar que la interacción esperma-esperma no afecte los caracteres dinámicos, sino por el contrario, es necesario ampliar los estudios a fin de poder entender con mayor precisión los mecanismos involucrados en la evolución de los caracteres espermáticos.

Como conclusión, mostramos por primera vez en lagartos la asociación entre la forma y un aspecto de la función espermática. Además, estos resultados sugieren que la variabilidad entre machos y dentro de cada macho podría ser una estrategia de inversión diferencial de los individuos de *Tupinambis* para enfrentar la competencia espermática, resaltando la importancia de estudiar la variabilidad dentro de cada macho para entender los mecanismos que subyacen a la evolución del espermatozoide. Y por último desarrollamos una técnica que permite discriminar espermatozoides de machos potencialmente rivales, la cual será en un futuro una potente herramienta para dilucidar los mecanismos que contribuyen al éxito diferencial de un macho en competencia.

## Capítulo 2

# ULTRAESTRUCTURA DE ESPERMATOZOIDES DE *Tupinambis merianae* y *T. rufescens* EN EL CONTEXTO DE COMPETENCIA ESPERMÁTICA

### Introducción

La ultraestructura espermática ha sido ampliamente descrita para muchas especies de Squamata (Texeira *et al.*, 1999; 2002; Giuliano *et al.*, 2002; Tavares-Bastos *et al.*, 2002; Tourmente *et al.*, 2006; Colli *et al.*, 2007; Tourmente *et al.*, 2008), y en particular para diversas especies de lagartos (Tavares-Bastos *et al.*, 2002; Texeira *et al.*, 2002; Ferreria y Dorder, 2003; Colli *et al.*, 2007), y es considerada como una fuente valiosa de caracteres filogenéticos (Giuliano *et al.*, 2002; Tavares-Bastos *et al.*, 2002).

La selección sexual post-copulatoria ha sido postulada como una fuerte presión sobre los caracteres morfométricos (Gomendio y Roldan, 1991; Gomendio y Roldan, 2008; Fitzpatrick *et al.*, 2009; Lüpold *et al.*, 2009a; Tourmente *et al.*, 2009; 2011a) y dinámicos del espermatozoide (Kleven *et al.*, 2009; Lüpold *et al.*, 2009a; Tourmente *et al.*, 2011a). Es por esto que, la competencia espermática, podría ser pensada también como una fuerza de selección sexual sobre los caracteres ultraestructurales del espermatozoide para maximizar el éxito de fertilización (Snook, 2005; Pizzari y Parker, 2009).

Además, algunos caracteres ultraestructurales han sido reportados como importantes para la motilidad y/o longevidad del espermatozoide. Entre ellos, las fibras externas que se encuentran alrededor del axonema y que, en particular las número 3 y 8, aparecen engrosadas desde la pieza media en Squamata, funcionan como soporte rígido del flagelo para el movimiento espermático (Gastman *et al.*, 1993; Turner *et al.*, 2006). Más aun, el número de set de mitocondrias y cuerpos densos, localizados en la pieza media, tendrían un papel fundamental en la provisión de energía espermática (Tavares-Bastos *et al.*, 2002; Turner *et*

*al.*, 2006; Tourmente *et al.*, 2009). Por último, la vaina fibrosa es una estructura del citoesqueleto que se extiende a lo largo de la mayor parte del flagelo espermático (Miki *et al.*, 2004) y que a diferencia de lo que ocurre en espermatozoides de mamíferos, en Squamata comienza en la pieza media inmediatamente posterior al centriolo distal (Texeira *et al.*, 1999; Tavares-Bastos *et al.*, 2002; Tourmente *et al.*, 2006; 2008). Esta estructura está involucrada en el movimiento espermático de varias maneras; influenciando el grado de flexibilidad del flagelo y así la forma del batido flagelar (Fawcett, 1975; Lindemann *et al.*, 1992; Eddy *et al.*, 2003); como fuente de energía para el movimiento del espermatozoide, ya que posee enzimas de la vía glicolítica permitiendo la producción de ATP a lo largo del flagelo (Narisawa *et al.*, 2002; Miki *et al.*, 2004; Turner *et al.*, 2006). Además, podría jugar un rol directo en la regulación de la motilidad porque posee proteínas involucradas en las vías de señalización y metabolismo, siendo esto crítico para el funcionamiento del flagelo (Miki *et al.*, 2002, Eddy *et al.*, 2003, Turner *et al.*, 2006). Tourmente *et al.*, (2009) fue pionero en relacionar la presión de selección sexual por competencia espermática y los caracteres ultraestructurales espermáticos, encontró que la competencia espermática aumenta el área de las fibras externas y de la vaina fibrosa pudiendo mejorar la calidad espermática en Ofidios.

Así, los lagartos *Tupinambis merianae* y *T. rufescens* son un excelente modelo para estudiar la relación entre el riesgo de competencia espermática y los caracteres ultraestructurales del espermatozoide. En primer lugar, en el capítulo 1 se mostró que ambas especies difieren en el riesgo de competencia, siendo mayor en *T. rufescens*, ya que presenta mayor tamaño testicular relativo, mayor dimorfismo sexual desviado hacia los machos y una proporción de sexo operativa desviada hacia los machos de casi 7:1. Además se encontraron diferencias tanto en el tamaño de los distintos componentes del espermatozoide como en los caracteres dinámicos entre estas dos especies. *T. merianae* presentó todos sus componentes espermáticos más largos que *T. rufescens*, mientras este último presentó espermatozoides más veloces que su especie hermana. Más aun, en un estudio, donde se utilizaron caracteres ultraestructurales de los espermatozoides para dilucidar las relaciones filogenéticas entre las especies de lagartos del género *Tupinambis*, se encontró que la cabeza y la pieza media son las regiones más variables entre especies del género, las principales diferencias se observaron en el número de set de mitocondrias y cuerpos densos presentes en la pieza media, en la forma de la mitocondrias y en características del acrosoma (Tavares-Bastos et



al., 2002). Cabe destacar que la ultraestructura de los espermatozoides de *T. rufescens* no ha sido descrita aun.

En este capítulo se propone estudiar la ultraestructura de los espermatozoides de *T. merianae* y *T. rufescens* en relación al contexto de riesgo de competencia espermática. Para lo cual se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Describir la ultraestructura del espermatozoide de *T. rufescens* y *T. merianae*
- Comparar la ultraestructura (N° de mitocondrias y cuerpos densos; área de las fibras densas externas (AFDE) y área de la vaina fibrosa (AVF)) entre especies.

## **Metodología específica**

### **Procesamiento de muestras espermáticas para microscopía electrónica.**

Para análisis de la ultraestructura espermática se obtuvieron muestras espermáticas de tres ejemplares de cada especie. La suspensión de espermatozoides fue diluida en PBS 1X hasta una concentración de  $5 \times 10^6$  spz/ml. Las muestras fueron centrifugadas por 7 minutos a 700g y lavadas con PBS 1X dos veces. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado resultante fue fijado a temperatura ambiente en una solución de glutaraldehído (2%) y formaldehído (4%) y preparado para su visualización mediante microscopía electrónica de transmisión según protocolo establecido por el centro de Microscopía Electrónica de la Universidad Nacional de Córdoba. Brevemente, cada muestra fue embebida en una solución de cacodilato 0,1 M durante 2 horas, posteriormente fijada con tetraóxido de osmio al 1%. Las muestras fueron lavadas con agua destilada y deshidratadas en una serie de concentraciones ascendentes de acetona (50, 70, 90 y 100%). Luego, fueron transferidas a una solución al 50% de acetona y resina epoxy Araldite y seguidamente dos veces a resina 100%. Finalmente, las células fueron incluidas en resina epoxy Araldite a 60°C durante 24h. Con ultramicrotomo JEOL JUM-7 se obtuvieron secciones finas que fueron montadas en grillas de níquel y teñidas con una solución de uranilo en etanol y citrato de plomo.

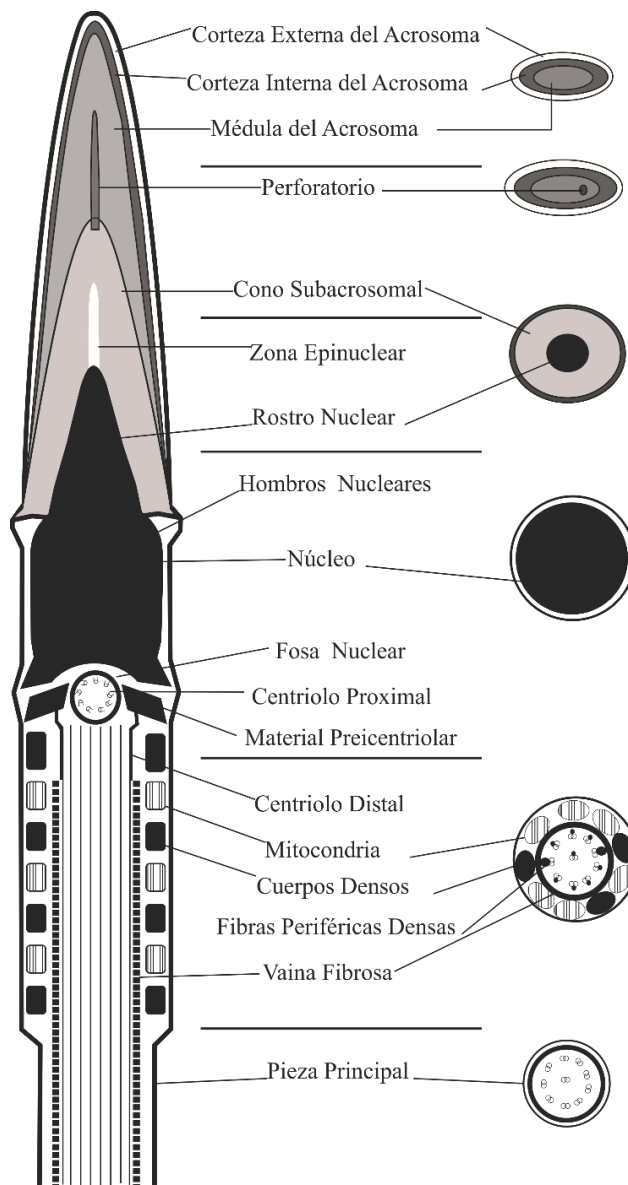
### **Descripción y medidas ultraestructurales**

Las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión (Zeiss LEO 906E). La descripción ultraestructural se llevó a cabo mediante la observación de micrografías a diferentes aumentos. Se midió el área ( $\mu\text{m}^2$ ) de la vaina fibrosa (AVF) y de las fibras densas exteriores en posición 3 y 8 (AFDE) utilizando el programa ImageJ v. 1.48g (NIH, USA). Estas estructuras resultan de especial interés debido a que poseen funciones en la motilidad espermática en otros grupos (Turner, 2006). Se comparó entre especies el AVF y las AFDE mediante un análisis no paramétrico de Kuskal-Wallis y análisis de la varianza (ANOVA), respectivamente. Los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa InfoStat (versión 2012; Universidad de Córdoba, Argentina).

# Resultados

## Descripción de la ultraestructura espermática

Debido a la gran similitud en la ultraestructura del espermatozoide de ambas especies analizadas, se hará la descripción de la misma en forma conjunta, señalando las diferencias cuando sea conveniente. En la figura 13 se muestra un esquema representativo de la ultraestructura espermática observada en *Tupinambis merianae* y *Tupinambis rufescens* describiendo las características de sus componentes a continuación.



**Figura 13.** Esquema representativo de la ultraestructura espermática de *Tupinambis* spp. En sección longitudinal con sus correspondientes secciones transversales. La escala ha sido modificada para mejor claridad.

*Complejo acrosomal.* El acrosoma está localizado en la región anterior de la cabeza del espermatozoide, está compuesto por una vesícula acrosómica externa y elongada; una capa interna, el cono subacrosomal, y el perforatorio (Fig. 14 A, B, H-J). En sección transversal es deprimido, siendo más circular en su base (Fig. 14 C-G, K-O). La vesícula acrosómica en la porción anterior está dividida en dos partes: una corteza estrecha y una región medular amplia. La corteza consiste en dos capas de diferentes electro-densidades: una capa fina de mayor electro-densidad que rodea a una capa electro-lúcida que tiene organización tubular (Fig. 14 C, D, K, L). La medula aparece como una estructura fuertemente electro-densa que completa el interior de la vesícula acrosómica (Fig. 14 C, D, K, L). El perforatorio es una varilla delgada que se extiende desde la punta del cono subacrosomal hasta el interior de la vesícula acrosómica (Fig. 14 B, H). La placa basal del perforatorio es cilíndrica en ambas especies (Fig. 14 B, H).

El cono subacrosomal se extiende en forma posterior al acrosoma y posee una estructura paracristalina electro-densa (Fig. 14 B, I, J). Ambas especies poseen una zona epinuclear electro-lúcida bien desarrollada siendo de mayor tamaño en *T. rufescens* alcanzando los 1,1  $\mu\text{m}$ , mientras que en *T. merianae* es de 0,121  $\mu\text{m}$  de longitud (Fig. 14 J, I). La porción basal del cono subacrosomal cubre el rostro nuclear finalizando en un borde postero-lateral a nivel de los hombros nucleares (Fig. 14 B, I).

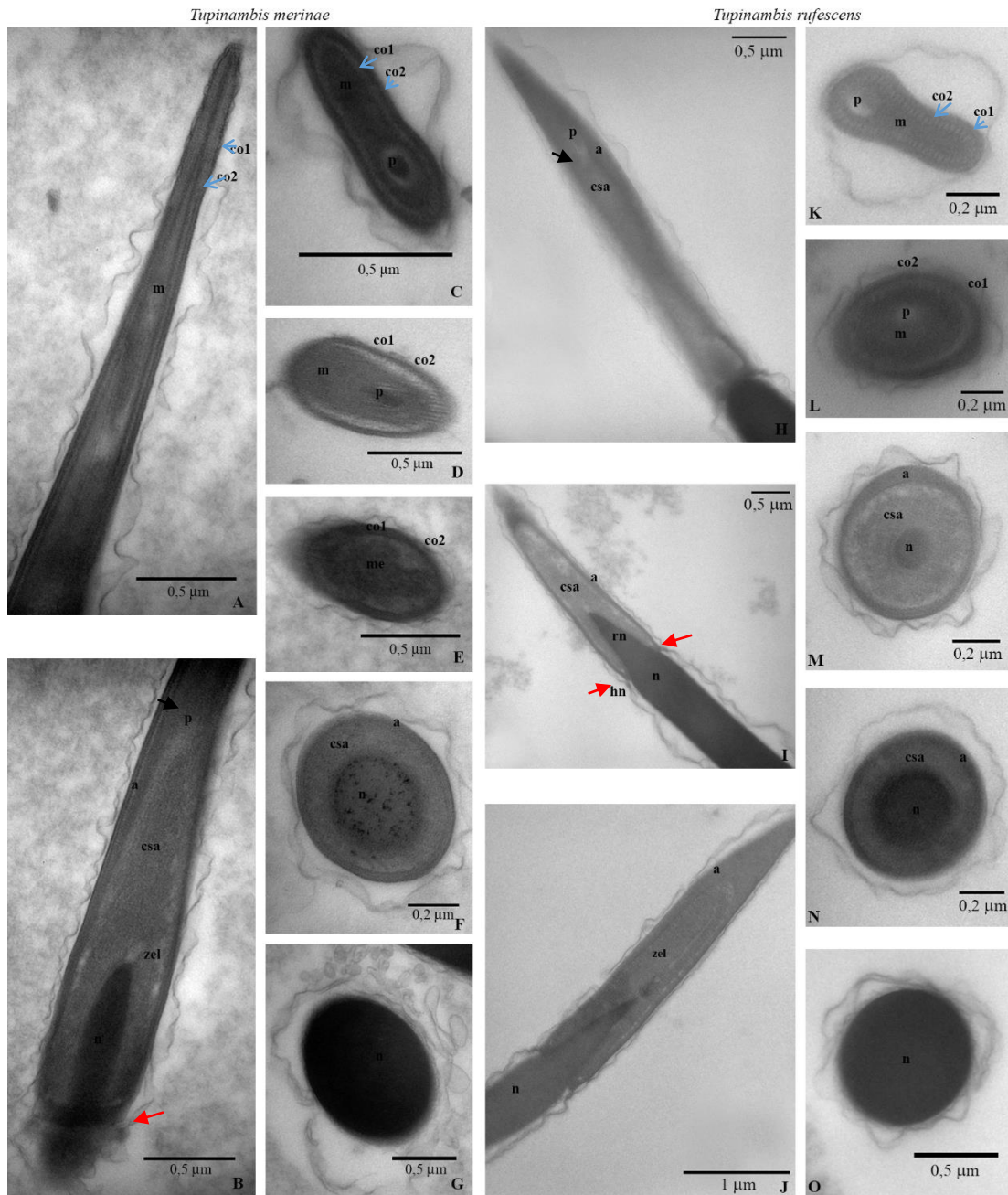
*Núcleo.* El núcleo es una estructura con alta electro-densidad de forma cilíndrica y curva, con la región apical dentro del cono subacrosomal (Fig. 14. B, I, J). La cromatina se encuentra compacta y homogénea. En sección transversal es circular (Fig. 14 G, O). El polo anterior del núcleo, conocido como el rostro nuclear, posee forma ahusada y penetra en el cono subacrosomal (Fig. 14 B, I, J). La transición entre el rostro nuclear y la porción cilíndrica del núcleo está delimitada por los hombros nucleares pequeños y redondeados (Fig. 14 B, I). La base del núcleo está marcada por una depresión cóncava, llamada fosa nuclear, que contiene el aparato centriolar (Fig. 15 B, 16 B, C).

*Cuello.* Esta región constituye la unión entre la pieza media y la cabeza del espermatozoide, contiene a los centriolos proximal y distal, el primer anillo de cuerpos densos y mitocondrias. El centriolo proximal está rodeado de material pericentriolar que se extiende hacia posterior entre los dos centriolos (Fig. 15 B, C; 16 C). No se observó en ninguna de las especies, una estructura electro-densa central dentro del centriolo proximal (Fig. 15 C, 16 C). El centriolo distal forma el cuerpo basal del axonema, consiste en 9 tripletes de microtúbulos y 9 fibras

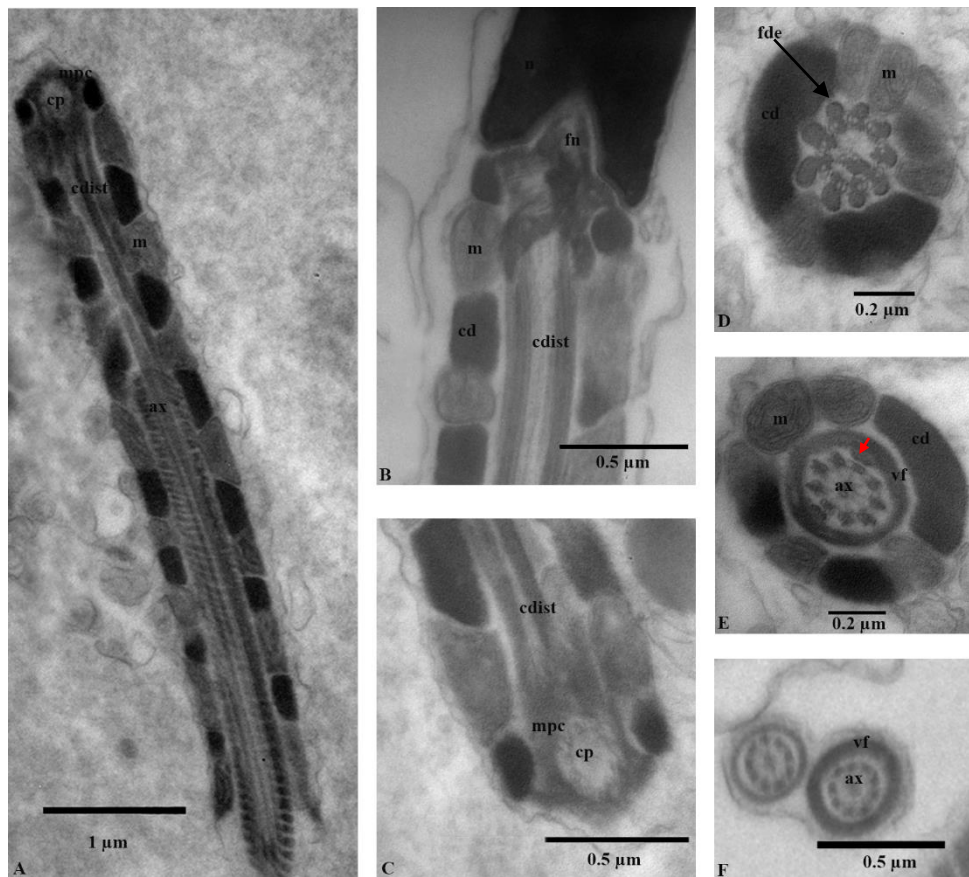
que cubren parcialmente los tripletes, ocupa un pequeño segmento de la pieza media sin penetrar en la vaina fibrosa (Fig 15 A, 16 A). En *T. merianae* posee un collar semicircular de cuerpos densos que lo rodean (Fig. 15 D).

*Pieza media.* La pieza media contiene las mitocondrias, el axonema y la vaina fibrosa, la cual rodea al axonema y comienza al final del centriolo distal (Fig. 15 A, 16A). El axonema está formado por un par central de microtúbulos rodeados por 9 dobletes y 9 fibras densas exteriores (periféricas) (Fig. 15 E, 16 E). Las FDE asociadas a los dobletes 3 y 8 están más engrosadas y separadas de los dobletes correspondientes (Fig. 15 E, 16 E). En sección longitudinal las mitocondrias poseen forma columnar en ambas especies (Fig. 15 A, B, 16 A, B), mientras que en sección transversal poseen una estructura irregular con crestas lineales (Fig. 15 E, 16 E). Existen diferencias en el número de mitocondrias entre las dos especies, *T. merianae* presenta 8 set de mitocondrias (Fig. 15 A) mientras que *T. rufescens* (Fig. 16 A) presenta 7. En ambas especies los cuerpos densos están bien desarrollados y ordenados en intervalos regulares (Fig. 15 A, 16 A). Hacia posterior, la pieza media termina en el anillo (Fig. 15 A, 16 A).

*Pieza principal.* La pieza principal o flagelo, forma la cola del espermatozoide. Está compuesta por el axonema, la vaina fibrosa y la membrana plasmática. Las fibras adyacentes a los dobletes de microtúbulos 3 y 8 esta ausentes desde la región anterior de la pieza principal (Fig. 15 F, 16 F).



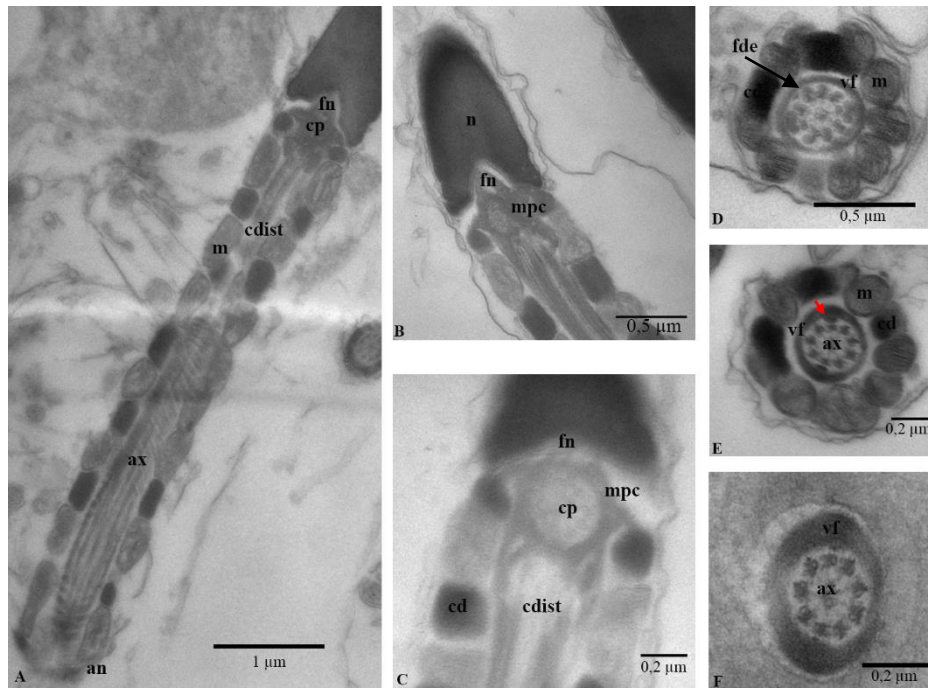
**Figura 14.** Ultraestructura de la cabeza de espermatozoides de *Tupinambis meriniae* (A-G) y *Tupinambis rufescens* (H-O). A, B, H-J. Sección longitudinal del complejo acrosomal, mostrando el acrosoma y el cono subacrosomal (las flechas rojas indican los hombros nucleares y las flechas negras la base del perforatorio). C-G, K-O Secciones transversales de la cabeza del espermatozoide. G, O Sección transversal de núcleo. C-F, K-N Sección transversal del complejo acrosomal. Abreviaciones: **a**: acrosoma; **csa**: cono subacrosomal; **co1**: corteza acrosomal externa; **co2**: corteza acrosomal interna; **m**: médula acrosomal; **n**: núcleo; **p**: perforatorio; **rn**: rostro nuclear; **zel**: zona epinuclear electro-lúcida.



**Figura 15.** Ultraestructura de la pieza media y flagelo de espermatozoides de *Tupinambis merianae* A. Sección longitudinal de la pieza media. B, C. Sección longitudinal del cuello mostrando el aparato centriolar. D. Sección transversal del cuello, mostrando el centriolo distal. E. Sección transversal de la pieza media (la flecha roja indica la fibra exterior densa en posición 3) F. Sección transversal de la pieza principal. Abreviaciones. **ax**: axonema; **cd**: cuerpos densos; **cdist**: centriolo distal; **cp**: centriolo proximal; **fn**: fosa nuclear; **fpe**: fibras periféricas densas; **m**: mitocondrias; **mpc**: material pericentriolar; **n**: núcleo; **vf**: vaina fibrosa.

### Comparación de la ultraestructura espermática entre especies

Al comparar caracteres ultraestructurales entre las dos especies, se observó que el número de set de mitocondrias y cuerpos densos difiere, *Tupinambis merianae* posee 8 sets, mientras que *T. rufescens* posee 7 sets. Sin embargo, el AFDE y el AVF no difirieron entre especies (AFDE: ANOVA  $F_{1,4} = 0,02$   $P = 0,8993$ ; AVF: Kruskal-Wallis  $H_{1,4} = 0,43$ ;  $P = 0,7000$ ).



**Figura 16.** Ultraestructura de la pieza media y flagelo de espermatozoides de *Tupinambis rufescens*. A. Sección longitudinal de la pieza media. B, C. Sección longitudinal del cuello mostrando el aparato centriolar. D. Sección transversal del límite del cuello. E. Sección transversal de la pieza media (la flecha roja indica la fibra exterior densa en posición 3) F. Sección transversal de la pieza principal. Abreviaciones. **ax**: axonema; **cd**: cuerpos densos; **cdist**: centriolo distal; **cp**: centriolo proximal; **fn**: fosa nuclear; **fpe**: fibras periféricas densas; **m**: mitocondrias; **mpc**: material pericentriolar; **n**: núcleo; **vf**: vaina fibrosa.



## Discusión

El estudio de la ultraestructura del espermatozoide brinda información sobre los mecanismos subcelulares que participan en la reproducción y provee caracteres útiles para dilucidar las relaciones filogenéticas entre las especies (Giuliano *et al.*, 2002; Tavares-Bastos *et al.*, 2002). En este capítulo se describe por primera vez la ultraestructura de los espermatozoides de *T. rufescens*, destacando las diferencias con *T. merianae*.

La ultraestructura espermática de estas dos especies de *Tupinambis*, muestra un patrón similar a otras especies de lagartos ya descritas (Teixeira *et al.*, 1999; 2002; Ferreria y Dorder, 2003; Colli *et al.*, 2007) y en particular con otras especies del género (Tavares-Bastos *et al.*, 2002). Comparten caracteres que han sido descritos en Squamata (Oliver *et al.*, 1996) como la presencia de un perforatorio prenuclear y único, el cono subacrosomal muy desarrollado, una zona epinuclear electro-lúcida, la vaina fibrosa que rodea al axonema presente desde la pieza media y las fibras exteriores densas en las posiciones 3 y 8 engrosadas. Además, al igual que en otras especies de lagartos poseen cuerpos densos entre las mitocondrias de la pieza media, con formas bien definidas y ubicadas en series a intervalos regulares (Teixeira *et al.*, 1999; Giugliano *et al.*, 2002; Tavares-Bastos *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2002; Ferreira y Dolder, 2003; Vieira *et al.*, 2004; Colli *et al.*, 2007). Se ha postulado que los cuerpos densos serían derivados mitocondriales debido a la posición en la que se encuentran y a que se han observado estructuras de transición (Oliver *et al.*, 1996). Al igual que lo descrito por Tavares-Bastos *et al.*, (2002) para otras especies del género *Tupinambis*, el complejo acrosomal y la pieza media fueron los compartimientos que presentaron variabilidad entre estas especies analizadas. Encontramos que *T. rufescens* posee una zona electro-lúcida de mayor longitud que *T. merianae*, mientras que este último posee 8 sets de mitocondrias y cuerpos densos en la pieza media en comparación con *T. rufescens* que posee 7 sets.

En el capítulo 1 se mostró que existen diferencias en el riesgo de competencia espermática entre las dos especies y se observaron diferencias en la longitud de los compartimientos espermáticos y en la velocidad espermática entre especies (Blengini *et al.*, *en revisión*), por lo que se esperaba encontrar diferencias en los caracteres ultraestructurales del espermatozoide. Al comparar la ultraestructura espermática, no se observaron diferencias en los componentes subcelulares analizados. El área de las fibras densas externas 3 y 8 y el

área de la vaina fibrosa a la altura de la pieza media fueron similares para ambas especies. Estos resultados podrían indicar que los caracteres ultraestructurales del espermatozoide en el género *Tupinambis* serían caracteres conservados con gran influencia filogenética. En un estudio realizado para dos especies de serpientes relacionadas filogenéticamente, las cuales diferían en su morfometría espermática, tampoco se evidenciaron diferencias en la ultraestructura de los espermatozoides (Tourmente *et al.*, 2008). Por el contrario, en un estudio comparativo en 25 especies de Ofidios, se compararon 5 especies que diferían considerablemente en el tamaño testicular relativo (índice de riesgo de competencia espermática) y en la longitud de los espermatozoides, se encontraron diferencias significativas en el área de la vaina fibrosa y en el área de las fibras externas (Tourmente *et al.*, 2009). Sin embargo, en nuestro estudio, observamos diferencias en el número de sets de mitocondrias y cuerpos densos entre las dos especies de *Tupinambis*. Cabe destacar que estas diferencias podrían deberse a errores del método de análisis ya que solo se han podido observar 1 ó 2 piezas medias enteras en las imágenes de ultraestructura para cada especie. No obstante, el rango de variación en el número de set de mitocondrias reportado por Tavares-Bastos *et al.*, 2002 para otras especies del género fue de 6 a 8 sets. Por otro parte, esta diferencia en el número de set de mitocondrias podría influir en la cantidad de energía disponible ya sea para el movimiento o longevidad del espermatozoide. *T. rufescens* presentó menor número de mitocondrias en la pieza media y mayor velocidad espermática en comparación con *T. merianae* y la relación entre velocidad espermática y longitud de la pieza media es negativa. Estos resultados podrían indicar que habría otra fuente adicional de energía además de las mitocondrias. Cabe destacar que, no sólo el número de mitocondrias sino cambios en la funcionalidad de las mismas sería importante en la cantidad de energía que se produce (Ruiz-Pesini *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 2007; Amaral *et al.*, 2013). Dos vías metabólicas han sido postuladas como las encargadas de la producción de la energía espermática: la fosforilación oxidativa que se lleva a cabo en las mitocondrias y la glicolisis que tiene lugar en la vaina fibrosa, lo que le permitiría transmitir la energía producida a lo largo del flagelo (Ruiz-Pesini *et al.*, 2007; Storey, 2008; Paoli *et al.*, 2011) y ambas vías podrían complementarse. El espermatozoide es capaz de utilizar diferentes sustratos y activar distintas vías de producción energética en relación a la etapa de la fertilización en la que se encuentre y al microambiente al cual este sometido (Ruiz-Pesini *et al.*, 2007; Storey, 2008), reflejando una gran versatilidad metabólica (Cummins, 2009; Ferramosca *et al.*, 2014). Es decir, puede responder a las demandas de energía ajustando la glicolisis y/o la fosforilación oxidativa en relación a su estado metabólico (Ferramosca *et al.*, 2014). En

mamíferos, se observaron diferencias en la disponibilidad de los sustratos de cada una de las vías metabólicas a lo largo del tracto reproductivo de la hembra, pudiendo influenciar, en determinado momento, la importancia de una u otra vía (Ruiz-Pesini *et al.*, 2007). Además se ha propuesto que la preferencia de un metabolismo frente al otro podría ser altamente especie-específico (Storey, 2008; Ferramosca *et al.*, 2014). Sin embargo, hasta el momento, no hay información disponible sobre estos metabolismos espermáticos en lagartos, por lo que sería interesante estudiar si la diferencia en el número de sets de mitocondrias y cuerpos densos refleja diferencias en la cantidad de energía disponible para la célula.

Por último, en el capítulo 1, se mostró que existe una gran variabilidad dentro de cada macho y entre individuos en la longitud de los compartimientos espermáticos, siendo difícil de abordar técnicamente en un estudio ultraestructural ya que no se puede estar seguro de que se están midiendo células independientes dentro de una misma muestra espermática.

## Capítulo 3

# RELACIÓN ENTRE EL CARÁCTER SEXUAL SECUNDARIO Y LOS CARACTERES ESPERMÁTICOS EN *Tupinambis merianae* y *T. rufescens*.

### Introducción

Desentrañar los factores que regulan la interacción entre los caracteres que confieren una ventaja antes y después de la copula es importante para entender como las estrategias sexuales evolucionan (Cornwallis y Birkhead, 2007; Evans, 2010; Fitzpatrick *et al.*, 2012; Engqvist, 2011; Kvanerno y Simmons, 2013). Debido que los machos tendrían una cantidad fija de energía para ser destinada a la reproducción, el éxito reproductivo de un macho estaría determinado por la habilidad de acceder y elegir hembras de alta calidad reproductiva ya sea peleando por el acceso directo a la pareja, o a través de ornamentos utilizados para atracción y cortejo; y, después de la copula, la habilidad de competir con eyaculados de machos rivales a través de distintos componentes del eyaculado (Cornwallis y Birkhead, 2007; Parker *et al.*, 2012; Kvanerno y Simmons, 2013; Lüpold *et al.*, 2014). Predecir la direccionalidad de la relación entre la calidad espermática y el desarrollo de caracteres sexuales secundarios es una tarea difícil. En la actualidad se han propuesto dos hipótesis de las cuales se desprenden predicciones opuestas (Lüpold *et al.*, 2014). En primer lugar la hipótesis del fenotipo unido a la fertilidad (Sheldon, 1994), sugiere que existiría una relación positiva entre la calidad espermática y la ornamentación en los machos. El patrón coincidente entre selección sexual pre- y post-copulatoria ha sido descrito en especies donde el éxito de fertilización favorece altamente a los machos atractivos (Evans *et al.*, 2003; Hosken *et al.*, 2008). De acuerdo a esta hipótesis, los caracteres sexuales secundarios podrían ser una señal honesta de la calidad del eyaculado (Malo *et al.*, 2005a). Por otro lado, la hipótesis de competencia espermática propuesta por Parker, (1998) predice que la selección sexual pre- y post-copulatoria podrían actuar en direcciones opuestas, reflejando un balance entre la inversión en calidad espermática y caracteres sexuales secundarios relacionados en la adquisición del apareamiento (Parker *et al.*, 2012).

La ventaja reproductiva que resulta de inseminar con mayor número y/o mejor calidad de espermatozoides, combinado con que los espermatozoides son un recurso limitado, llevaría a la evolución de diferentes estrategias de inversión en el eyaculado (Parker, 1998; Wedell *et al.*, 2002). En varias especies donde los machos exhiben estrategias alternativas, se ha evidenciado un balance (*trade-off*) entre la inversión en caracteres sexuales secundarios para enfrentar la competencia pre-copulatoria y la inversión en la calidad del eyaculado para hacer frente a la competencia espermática (Beausoleil *et al.*, 2012). Los machos dominantes, los cuales enfrentarían menor riesgo de competencia espermática, producen eyaculados con menor calidad en relación a los machos subordinados, los cuales estarían expuestos continuamente a la competencia espermática (Vladic' y Järvi, 2001; Neff *et al.*, 2003; Cornwallis y Birkhead, 2007; Locatello *et al.*, 2007; Pitcher *et al.*, 2009; Beausoleil *et al.*, 2012). Sin embargo, se han reportado estudios donde no encuentran relación entre caracteres pre- y post-copulatorios (Birkhead y Fletcher, 1995; Birkhead *et al.*, 1997; Hetty y Roberts, 2007; Lifjeld *et al.*, 2012; Mautz *et al.*, 2013).

En lagartos, pocos estudios se han focalizado en la relación entre mecanismos de selección sexual pre- y post-copulatoria que determinan el resultado del éxito reproductivo (Uller y Olsson, 2008). Se ha reportado la preponderancia de comportamientos de dominancia pre-copulatorios por parte de los machos para limitar el acceso a las hembras de otros machos (Halloy, 1996; Whiting *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2004; Halloy, 2012). Sin embargo, después de la copula las hembras podrían facilitar la competencia espermática y/o la elección criptica por el almacenamiento espermático antes de la ovulación (Olsson *et al.*, 1996; Olsson y Madsen, 1998). Es por esto que resulta particularmente interesante estudiar esta relación entre los mecanismos de selección sexual en estos taxos.

La teoría evolutiva propone que los caracteres sexuales secundarios han evolucionado a través del proceso de selección sexual, tanto a través de la elección de pareja por parte de la hembra como de la competencia entre machos, o una combinación de ambas (Berglund *et al.*, 1996; Malo *et al.*, 2005a; Karten *et al.*, 2009). Existen diversas hipótesis sobre la función de estos caracteres, entre ellas se destacan: indicar el estado de salud del macho y su condición fisiológica, (Pigliucci y Preston, 2004; Mc Culloug y Emlen, 2013), determinar el resultado de interacciones agresivas mejorando el acceso a la pareja (Huyghe *et al.*, 2005; Lailvaux y Irschik, 2006), indicar la condición o potencial reproductivo

(Lailvaux y Irschick, 2006; Naretto *et al.*, 2014). Por último, otra hipótesis propone que los caracteres sexuales secundarios serían señales de la competitividad de los espermatozoides y por ende, señales de la fertilidad del macho (Malo *et al.*, 2005a). En *Tupinambis merianae* y *T. rufescens* el músculo pterigoideo de la cabeza es un carácter sexual secundario, que ha sido considerado como armamento y ornamento. El dimorfismo sexual encontrado en el músculo pterigoideo en *Tupinambis*, es debido a un aumento de la masa muscular durante el periodo de actividad reproductivo. Si bien, el tamaño muscular relativo está asociado con el tamaño testicular y la presencia de espermatozoides, actuando como una señal honesta de la condición reproductiva de los machos (Naretto *et al.*, 2014), la relación entre el peso muscular y la calidad espermática no ha sido dilucidada.

Por otro lado, el número de espermatozoides es determinante de la fertilización porque se necesitan un gran número de espermatozoides para evitar el efecto dilución dentro del tracto de la hembra (Short, 1981). El tamaño de los distintos componentes del espermatozoide han sido reconocidos como importantes en la calidad espermática por contribuir diferencialmente a distintas funciones espermáticas y se ha mostrado que evoluciona en relación a la competencia espermática (Gomendio y Roldan, 2008; Fitzpatrick *et al.*, 2009; Lüpold *et al.*, 2009a; Tourmente *et al.*, 2011a). Además del número y tamaño espermático, la velocidad de los espermatozoides se ha considerado como un factor determinante del éxito de fertilización (Birkhead *et al.*, 1999; Gomendio y Roldan, 2008; Parker, 2009; Gasparini *et al.*, 2010; Beauseloeil *et al.*, 2012). Como la velocidad espermática varía ya sea entre machos, como dentro de cada macho (Capítulo 1), las células más veloces dentro de un eyaculado tendrían mayor probabilidad de llegar más rápido a los sitios de almacenamiento y a la vecindad del ovocito, por lo que estudiar la velocidad máxima de un eyaculado podría proveer información adicional a la velocidad promedio (Haugland *et al.*, 2009). En el capítulo 1, se mostró que en ambas especies de *Tupinambis* estudiadas, existe una varianza significativa tanto entre machos como dentro de cada macho en la longitud de los componentes espermáticos y en la velocidad de los espermatozoides. Sumado a esto, se observó una relación positiva entre la proporción LPP: LPM y la velocidad espermática en ambas especies. Estos resultados sugieren que los machos de *T. merianae* y *T. rufescens* varían en la habilidad competitiva de sus espermatozoides. Por lo que sería interesante estudiar si esta variación está relacionada con los caracteres sexuales secundarios.

Los caracteres reproductivos de los machos a menudo muestran una variación a lo largo de la temporada reproductiva (Lüpold *et al.*, 2012a). Existen evidencias en *Tupinambis* que el carácter sexual secundario (músculo pterigoideo) varía de manera dinámica a lo largo de la temporada reproductiva (Naretto *et al.*, 2014). Además, en varias especies se ha evidenciado cambios en los caracteres espermáticos durante la temporada reproductiva (Lüpold *et al.*, 2012a; Cramer *et al.*, 2013). Por lo que se podría esperar que la relación entre la selección sexual pre- y post-copulatoria varíe a lo largo de la temporada reproductiva.

En este capítulo se pretende dilucidar la relación entre el carácter sexual secundario y los caracteres espermáticos y su variación temporal a fin de dar luz a las hipótesis sobre la interacción de los mecanismos de selección sexual pre- y post-copulatorios en *T. merianae* y *T. rufescens*. Para lo cual se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Relacionar la inversión en el músculo pterigoideo y los caracteres espermáticos.
- Relacionar la inversión en el músculo pterigoideo y la variabilidad dentro de cada macho de los caracteres espermáticos.
- Evaluar las diferencias en los caracteres espermáticos en relación a la inversión en el músculo pterigoideo.
- Evaluar variaciones temporales en la relación entre el músculo pterigoideo y los caracteres espermáticos.

## Metodología específica

### Ejemplares utilizados

En este capítulo, se analizaron ejemplares reproductivos de *T. merianae* (N = 106) y de *T. rufescens* (N = 48), provenientes de tres temporadas de actividad reproductiva 2009, 2010, 2011.

### Análisis de datos

Para establecer la relación entre el carácter sexual secundario y los caracteres espermáticos se realizó un análisis de regresión múltiple utilizando suma de cuadrados tipo 1, con el peso del músculo pterigoideo como variable dependiente y el peso corporal, el peso de los testículos, la concentración espermática, la longitud de los componentes espermáticos y la VSL como predictores. Luego se realizaron otros dos análisis de regresión múltiple utilizando suma de cuadrados tipo 1, con el peso del músculo pterigoideo como variable dependiente y el peso corporal y la proporción LPP:LPM o la  $VSL_{Máx}$  como predictores. Las siguientes variables: peso del músculo pterigoideo, peso del testículo, peso corporal, VSL y  $VSL_{Máx}$  fueron transformadas a  $\text{Log}_{10}$  debido a que no cumplían los supuestos de normalidad ni homogeneidad de varianzas.

Para determinar la inversión en el músculo pterigoideo se calcularon los residuales de la regresión lineal entre el peso del músculo pterigoideo (PM) y el peso corporal (PC) (regresión lineal entre  $\text{Log}_{10}$  PM vs  $\text{Log}_{10}$  PC) en cada especie (*T. merianae*:  $F= 572,42$ ;  $P<0,0001$ . *T. rufescens*:  $F= 362,39$ ;  $P<0,0001$ ) y se determinaron 2 categorías de inversión, machos con mayor y menor peso muscular de lo esperado para cada especie.

Para establecer diferencias en la media y en la variabilidad dentro de cada macho de los caracteres espermáticos entre categorías de machos se realizó un ANOVA anidado y un Test no paramétrico Kruskal-Wallis, respectivamente. Para analizar las variaciones temporales dentro del período reproductivo (octubre-diciembre), se consideraron tres periodos mensuales. A fin de determinar si existen diferencias en la proporción de los distintos tipos de machos entre los meses de la temporada reproductiva, se realizó un test de Chi-cuadrado para cada especie. Por último, se realizó un MANOVA entre meses, comparando los componentes principales que surgieron de un análisis de componentes principales para cada especie utilizando el peso del músculo pterigoideo, el peso corporal, la longitud de la pieza media y de la pieza principal y la velocidad espermática. Los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa InfoStat (versión 2012; Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).



## Resultados

En *T. merianae* se observó una relación negativa entre el peso relativo del músculo pterigoideo y la VSL media y también con la VSL<sub>Máx</sub>. Mientras que en *T. rufescens* existe una relación negativa entre el peso relativo del músculo pterigoideo y la longitud de la pieza principal, y con la proporción de LPP:LPM. Además en *T. rufescens* hay una tendencia a una relación positiva con la longitud de la pieza media (Tabla 14, 15; Fig. 17). Al evaluar la relación entre el peso del músculo pterigoideo y la variabilidad dentro de cada macho de los caracteres espermáticos, no se encontró relación significativa con ningún caracter en ambas especies (Tabla 16).

**Tabla 14.** Relación entre el peso del músculo pterigoideo y los caracteres espermáticos en *Tupinambis merianae*

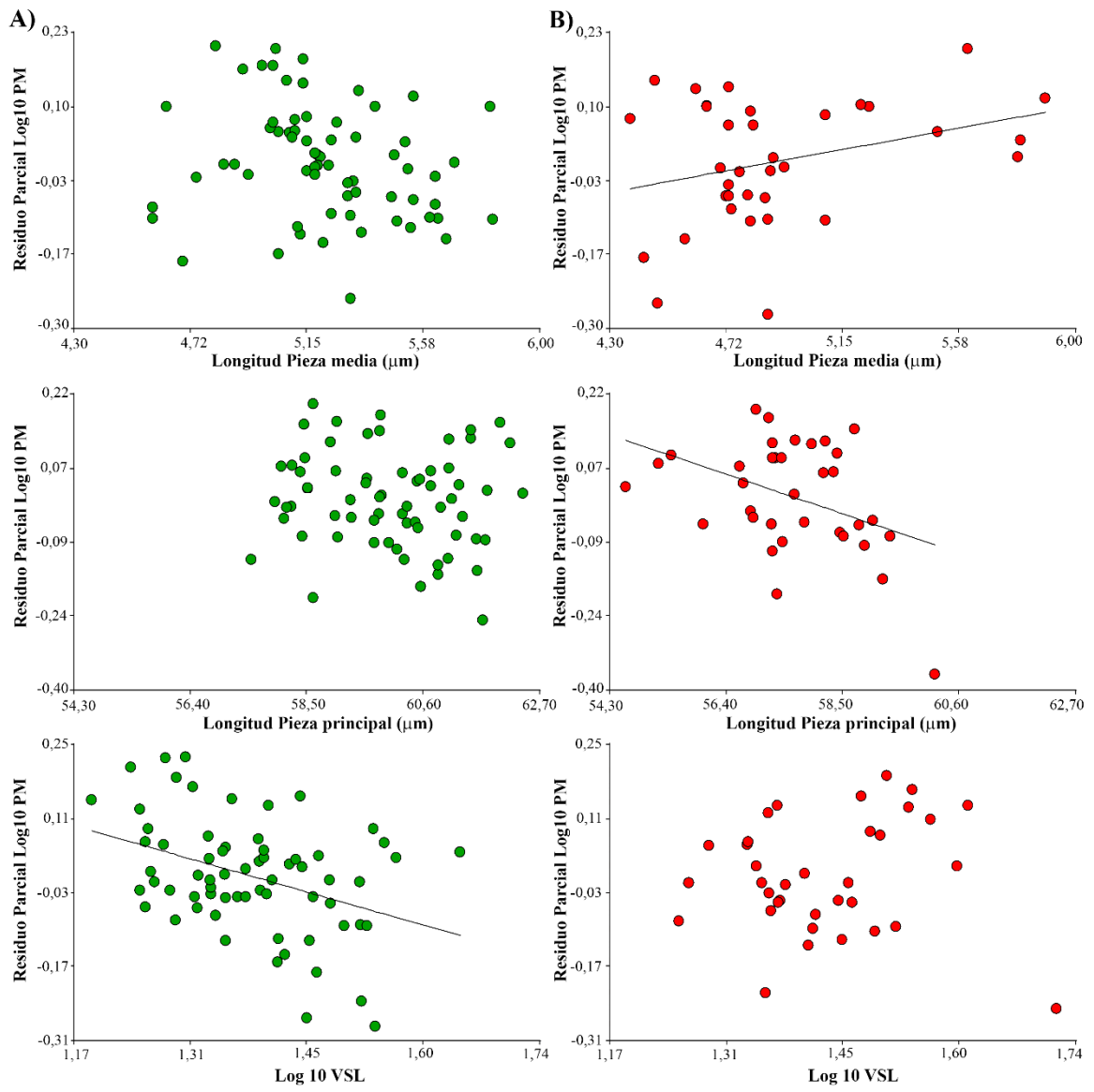
Especie	Variable		Pendiente	R <sup>2</sup>	F	P
	Dependiente	Predictor				
Modelo Completo				0,9		
<i>T. merianae</i> N=54	Log <sub>10</sub> PM	Log <sub>10</sub> PC	1,99		417,35	<0,0001
		Log <sub>10</sub> PT	0,1		2,8	0,1011
		Concentración	1,80E-05		1,34	0,2523
		LPM	-0,09		1,82	0,1842
		LPP	3,90E-03		0,03	0,8527
		<b>Log 10 VSL</b>	<b>-0,39</b>		<b>7,46</b>	<b>0,0089</b>
Modelo Simplificado				0,86		
<i>T. merianae</i> N=66	Log <sub>10</sub> PM	Log <sub>10</sub> PC	2,09		376,94	<0,0001
		LPM	-0,08		0,24	0,6249
		LPP	-0,01		0,1	0,7475
		<b>Log<sub>10</sub> VSL</b>	<b>-0,44</b>		<b>8,7</b>	<b>0,0045</b>
<i>T. merianae</i> N=71	Log <sub>10</sub> PM	<b>Log<sub>10</sub> PC</b>	<b>2,03</b>	<b>0,85</b>	<b>399,99</b>	<b>&lt;0,0001</b>
		Proporción	0,01		0,08	0,7756
		LPP:LPM				
<i>T. merianae</i> N=79	Log <sub>10</sub> PM	<b>Log<sub>10</sub> PC</b>	<b>1,77</b>	<b>0,85</b>	<b>424,46</b>	<b>&lt;0,0001</b>
		<b>Log<sub>10</sub> VSL<sub>máx</sub></b>	<b>-0,3</b>		<b>6,46</b>	<b>0,013</b>

Negrita: relaciones significativas. PM: Peso del músculo pterigoideo; PC: Peso corporal; PT: peso testicular; LPM: Longitud de la pieza media; LPP: Longitud de la pieza principal; LPP:LPM: Proporción de la pieza principal y pieza media; VSL: Velocidad lineal; VSL<sub>máx</sub>: Velocidad lineal máxima.

**Tabla 15.** Relación entre el peso del músculo pterigoideo y los caracteres espermáticos en *Tupinambis rufescens*

Especie	Variable		Pendiente	R <sup>2</sup>	F	P
	Dependiente	Predictor				
Modelo Completo				0,84		
<i>T. rufescens</i> N= 28	Log <sub>10</sub> PM	Log <sub>10</sub> PC	1,8		100,26	<0,0001
		Log <sub>10</sub> PT	0,03		0,92	0,3485
		Concentración	0,000009		0,59	0,4502
		LPM	0,07		1,96	0,1766
		LPP	-0,03		3,25	0,0858
		Log <sub>10</sub> VSL	-0,16		0,26	0,6136
Modelo Simplificado				0,85		
<i>T. rufescens</i> N=35	Log <sub>10</sub> PM	Log <sub>10</sub> PC	1,97		161,6	<0,0001
		LPM	0,09		3,4	0,0751
		<b>LPP</b>	<b>-0,04</b>		<b>4,86</b>	<b>0,0353</b>
		Log <sub>10</sub> VSL	0,08		0,1	0,7545
<i>T. rufescens</i> N=39	Log <sub>10</sub> PM	<b>Log<sub>10</sub> PC</b>	<b>1,9</b>	<b>0,85</b>	<b>192,85</b>	<b>&lt;0,0001</b>
		<b>Proporción LPP:LPM</b>	<b>-0,05</b>		<b>5,59</b>	<b>0,0236</b>
<i>T. rufescens</i> N=36	Log <sub>10</sub> PM	<b>Log<sub>10</sub> PC</b>	<b>1,84</b>	<b>0,83</b>	<b>159,81</b>	<b>&lt;0,0001</b>
		Log <sub>10</sub> VSL <sub>máx</sub>	-0,24		2,26	0,1425

Negrita: relaciones significativas. PM: Peso del músculo pterigoideo; PC: Peso corporal; PT: peso testicular; LPM: Longitud de la pieza media; LPP: Longitud de la pieza principal; LPP:LPM: Proporción de la pieza principal y pieza media; VSL: Velocidad lineal; VSL<sub>máx</sub>: Velocidad lineal máxima.



**Figura 17.** Relación entre el músculo pterigoideo y los caracteres espermáticos en *Tupinambis*. A) *T. meriana* ● y B) *T. rufescens* ●.

**Tabla 16.** Relación entre el peso del músculo pterigoideo y la variación dentro de cada macho de los caracteres espermáticos en *T. merianae* y *T. rufescens*.

Especie	Variable					
	Dependiente	Predictor	Pendiente	R <sup>2</sup>	F	P
<i>T. merianae</i>						
N=66	Log <sub>10</sub> PM	<b>Log<sub>10</sub> PC</b>	<b>2</b>	<b>0,85</b>	<b>334,72</b>	<b>&lt;0,0001</b>
		CV LPM	0,0012		0,01	0,9046
		CV LPP	0,0028		0,21	0,6483
		CV VSL	-0,0021		0,97	0,3275
<i>T. rufescens</i>						
N=35	Log <sub>10</sub> PM	<b>Log<sub>10</sub> PC</b>	<b>1,83</b>	<b>0,82</b>	<b>131,56</b>	<b>&lt;0,0001</b>
		CV LPM	-0,0029		0,05	0,8228
		CV LPP	-0,0045		0,36	0,5545
		CV VSL	-0,0033		0,82	0,3722

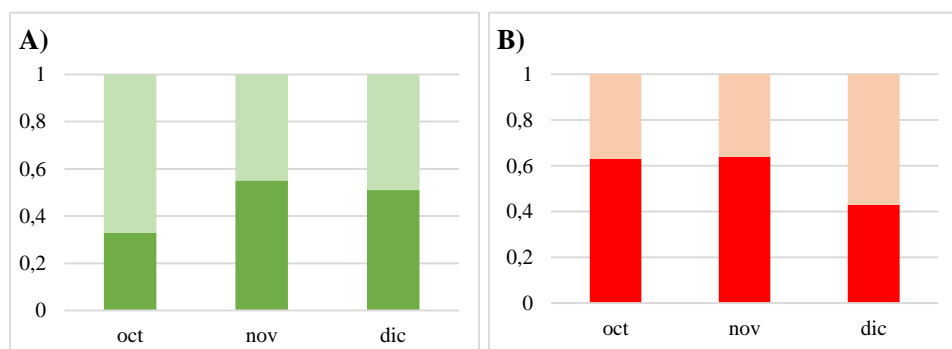
Negrita: relaciones significativas. PM: Peso del músculo pterigoideo; PC: Peso corporal; CV LPM: coeficiente de variación de la longitud de la pieza media; CV LPP: coeficiente de variación de la longitud de la pieza principal; CV VSL: coeficiente de variación de la velocidad lineal.

Al comparar los caracteres espermáticos entre categorías de machos, se encontraron diferencias en la longitud de la pieza principal en *T. rufescens*. Sin embargo no se encontraron diferencias en los caracteres espermáticos entre categorías de machos en *T. merianae* (Tabla 17, 18). No se observaron variaciones temporales de la cantidad de cada uno de los tipos de machos a lo largo de la temporada reproductiva, en cada momento se encuentra igual proporción 50:50 machos con más músculo de lo esperado en relación a machos con menos músculo de lo esperado (*T. merianae*  $\chi^2$ :1,07, g.l. 2; P=0,5858; *T. rufescens*  $\chi^2$ :1,63, g.l. 2; P=0,4417; Fig. 18).

**Tabla 17.** Comparación de los caracteres espermáticos entre machos con distinta inversión en el músculo pterigoideo en *Tupinambis*

Especies	Caracteres espermáticos	Inversión en Músculo		Estadísticas		
		Mas Músculo	Menos Músculo	g.l.	F	P
<i>T. merianae</i>	LPM	5,18 ± 0,25 N=34	5,22 ± 0,34 N= 33	1,67	0,19	0,669
	LPP	59,82 ± 1,26 N=34	59,93 ± 1,25 N= 33	1,67	0,08	0,777
	Prop. LPP:LPM	11,68 ± 0,54 N=34	11,65 ± 0,78 N= 33	1,67	0,02	0,894
	VSL	24,48 ± 6,29 N=44	25,15 ± 4,91 N=33	1,79	0,34	0,562
	VSL <sub>Máx</sub>	41,97 ± 11,88 N= 44	45,98 ± 9,25 N=33	1,74	3,66	0,06
<i>T. rufescens</i>	LPM	5,02 ± 0,47 N= 20	4,8 ± 0,22 N=17	1,37	2,07	0,159
	<b>LPP</b>	<b>57,25 ± 1,12 N= 20</b>	<b>58,01 ± 1,15 N=17</b>	<b>1,37</b>	<b>4,8</b>	<b>0,035</b>
	<b>Prop. LPP:LPM</b>	<b>11,64 ± 1,08 N=20</b>	<b>12,24 ± 0,64 N=17</b>	<b>1,37</b>	<b>3,42</b>	<b>0,073</b>
	VSL	26,75 ± 6,4 N=22	29,67 ± 7,69 N=14	1,34	1,62	0,212
	VSL <sub>Máx</sub>	47,19 ± 13,4 N=21	52,75 ± 17,43 N=14	1,34	1,02	0,321

Negrita: Diferencias significativas. LPM: Longitud de la pieza media; LPP: Longitud de la pieza principal; LPP:LPM: Proporción de la pieza principal y pieza media; VSL: Velocidad lineal; VSL<sub>máx</sub>: Velocidad lineal máxima.



**Figura 18.** Variación temporal de los distintos tipos de machos según la inversión en el músculo pterigoideo. a) *Tupinambis merianae*; b) *Tupinambis rufescens*. Colores claros: machos que invierten menos en músculo de lo esperado, colores oscuros, machos que invierten más de lo esperado.

**Tabla 18.** Comparación de la variabilidad dentro de cada macho de los caracteres espermáticos entre machos con distinta inversión relativa en el músculo pterigoideo en *Tupinambis*.

Especies	Caracteres espermáticos	Inversión en Músculo		Estadística	
		Mas Músculo	Menos Músculo	H	P
<i>T. merianae</i>	CV LPM	9,64 ± 1,49 N=34	9,84 ± 2,39 N= 33	-17,09	0,999
	CV LPP	5,54 ± 1,97 N=34	5,21 ± 1,84 N= 33	-16,5	0,999
	CV VSL	30,45 ± 6,95 N=44	32,56 ± 5,92 N=33	-14,97	0,999
<i>T. rufescens</i>	CV LPM	11,51 ± 1,98 N= 20	11,32 ± 2,55 N=17	-20,52	0,999
	CV LPP	5,38 ± 2,45 N= 20	5,74 ± 2,65 N=17	-23,06	0,999
	CV VSL	30,85 ± 5,88 N=22	31,83 ± 6,76 N=14	-11,21	0,999

CV LPM: coeficiente de variación de la longitud de la pieza media; CV LPP: coeficiente de variación de la longitud de la pieza principal; CV VSL: coeficiente de variación de la velocidad lineal.

El análisis de componentes principales realizado con los caracteres reproductivos arrojó dos variables que en *T. merianae* explican el 70% de la variabilidad y en *T. rufescens* explican el 73% de la variación (Tabla 19). De acuerdo con este análisis los machos presentan gran variabilidad (Fig. 19), en *T. merianae* el peso de los músculos pterigoideos y el peso corporal contribuyen principalmente al CP1; mientras que los caracteres espermáticos contribuyen al CP2, siendo la contribución de la pieza media y la VSL similar pero en direcciones opuestas. Por su parte, en *T. rufescens* el peso de los músculos pterigoideos y el peso corporal contribuyen al CP1, y los caracteres espermáticos contribuyen al CP2, en este caso la pieza principal y la VSL contribuyen en la misma dirección.

**Tabla 19.** CP1 y CP2 resultantes del análisis de componentes principales realizados con caracteres reproductivos en machos de *Tupinambis merianae* y *T. rufescens*.

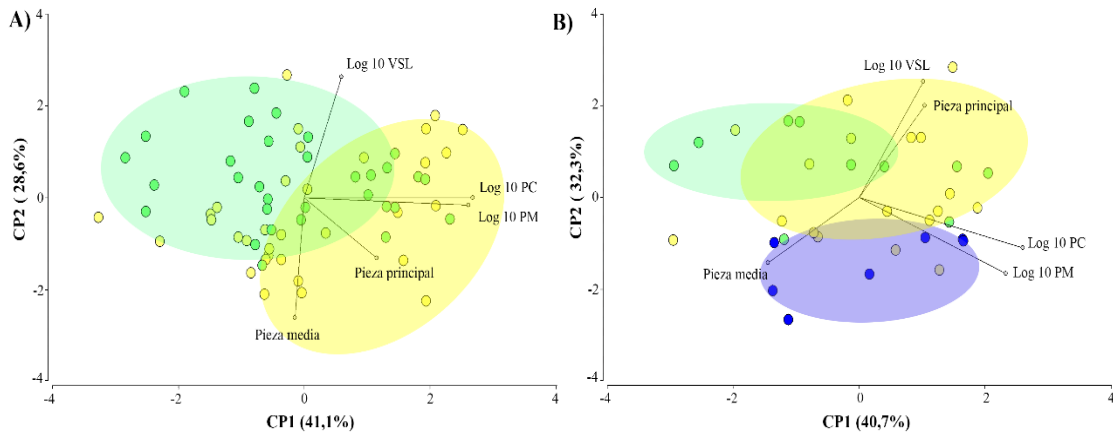
	<i>T. merianae</i>		<i>T. rufescens</i>	
	CP1	CP2	CP1	CP2
Autovalores	2,06	1,43	2,03	1,62
Variación explicada	0,41	0,29	0,41	0,32
Log <sub>10</sub> PM	0,66	-0,04	0,58	-0,41
Log <sub>10</sub> PC	0,68	-0,0003,4	0,64	-0,27
Log <sub>10</sub> VSL	0,15	0,67	0,25	0,62
LPM	-0,04	-0,66	-0,36	-0,35
LPP	0,29	-0,33	0,26	0,5

PM: Peso del músculo pterigoideo; PC: Peso corporal; LPM: Longitud de la pieza media; LPP: Longitud de la pieza principal; LPP:LPM: Proporción de la pieza principal y pieza media; VSL: Velocidad lineal.

Durante la estación reproductiva se observaron diferencias entre meses en los valores de los componentes principales, obtenidos con los caracteres reproductivos de los machos, en ambas especies (Tabla 20; Fig. 19). En *T. merianae* se observan machos con mayor peso muscular y mayor longitud de pieza media y pieza principal espermática (de acuerdo al CP1), mientras que en diciembre se observaron machos con menor peso muscular (de acuerdo a CP1) y mayor velocidad espermática (de acuerdo a CP2). En *T. rufescens* ocurre un patrón similar, en octubre se observan machos con más músculo pterigoideo en relación a los caracteres espermáticos (de acuerdo a CP1), mientras que, en noviembre y diciembre se observaron machos con menor peso muscular (de acuerdo al CP1) y mayor longitud de la pieza principal y mayor velocidad espermática (de acuerdo al CP2).

**Tabla 20.** Variación mensual de los valores de CP1 y CP2 de los machos de *Tupinambis merianae* y *T. rufescens* (MANOVA)

Especie	Componente	Mes	N	Media	DS	Mediana	F	P
<i>T. merianae</i>	CP1	Nov	33	0,06	1,41	-0,27	<b>3,65</b>	<b>0,0317</b>
		Dic	32	-0,15	1,4	-0,48		
	CP2	Nov	33	-0,31	1,26	-0,49		
		Dic	32	0,4	0,94	0,42		
<i>T. rufescens</i>	CP1	Oct	7	0,1	1,38	0,17	<b>4,07</b>	<b>0,0054</b>
		Nov	18	0,15	1,32	0,51		
		Dic	10	-0,34	1,71	-0,53		
	CP2	Oct	7	-1,45	0,7	-1		
		Nov	18	0,22	1,24	-0,27		
		Dic	10	0,63	0,83	0,68		



**Figura 19.** Análisis de componentes principales de caracteres reproductivos en machos de *Tupinambis*. A) *T. merianae*; B) *T. rufescens*. Los distintos meses están indicados con elipses predictivas. Elipse azul: octubre; elipses amarillos: noviembre; elipses verdes: diciembre. PM: Peso del músculo pterigoideo; PC: Peso corporal; VSL: Velocidad lineal.



## Discusión

Profundizar la relación entre la selección sexual pre- y post-copulatoria es una pregunta de gran interés para los biólogos evolutivos y que está siendo actualmente debatida (Mautz *et al.*, 2013; Lüpold *et al.*, 2014). Aquí presentamos por primera vez en Squamata, en particular en lagartos, evidencias de la existencia de un balance (*trade-off*) entre caracteres sexuales secundarios y los caracteres espermáticos, realizando un aporte a la hipótesis de competencia espermática. Además mostramos que las estrategias reproductivas en los machos de *Tupinambis* no son fijas y que varían a lo largo de la temporada reproductiva.

Maximizar la inversión en caracteres que son beneficiosos antes y después de la cópula puede ser difícil ya que ambos son costosos energéticamente (Olsson *et al.*, 1997; Emlen, 2001; Allen y Levinton, 2007). Comprender la relación entre los caracteres sexuales secundarios y la calidad espermática ha despertado gran interés encontrándose resultados muy diversos. Existen evidencias que apoyan tanto la hipótesis de fenotipo unido a fertilidad (Evans *et al.*, 2003; Malo *et al.*, 2005a) como la hipótesis de competencia espermática (Parker *et al.*, 2012). Sin embargo también existen evidencias que refutan ambas hipótesis. Lüpold *et al.*, (2014), sostienen, en un estudio macro-evolutivo, que el grado de monopolización de la hembra por parte de un macho, sería clave para explicar la variación de los patrones observados entre especies. En especies donde los machos son capaces de monopolizar a las hembras, existiría un balance entre los caracteres pre- y post-copulatorios; mientras que en especies donde los machos no pueden monopolizar a las hembras habría una relación positiva entre ellos (Lüpold *et al.*, 2014). En lagartos, existen pocos estudios que vinculen los caracteres pre- y post-copulatorios (Keogh *et al.*, 2013). Los resultados presentados en este capítulo muestran una relación negativa entre el peso relativo del músculo pterigoideo y algunos caracteres espermáticos. En *T. merianae* el peso muscular relativo estuvo inversamente relacionado con el promedio de la velocidad espermática y con la velocidad máxima. Mientras que en *T. rufescens* el peso relativo del músculo mostró una relación negativa con la longitud de la pieza principal del espermatozoide y con la proporción LPP:LPM; y si bien se puede observar una tendencia a una relación positiva con la longitud de la pieza media, ésta relación no fue significativa. En ninguna de las especies se encontró relación entre el carácter sexual secundario y la variabilidad dentro de cada macho en los caracteres espermáticos. A pesar de que observamos que la influencia de los caracteres pre-copulatorios sobre los caracteres espermáticos difirió entre estas dos especies, en *T.*

*merianae* influye sobre la velocidad y en *T. rufescens* sobre la estructura. Los resultados presentados en el capítulo 1, muestran que en *T. rufescens*, la velocidad espermática está relacionada positivamente con la longitud de la pieza principal y con la proporción LPP: LPM. Por lo que, se podría esperar, que el músculo pterigoideo también esté influyendo en última instancia en la velocidad espermática en esta especie al igual a lo que ocurre en *T. merianae*. Estos resultados sugieren que a pesar de que el músculo pterigoideo de la cabeza de *Tupinambis* fue propuesto como un carácter sexual secundario y una señal honesta de la condición reproductiva de los machos, ya que se asocia al tamaño testicular y a la presencia de espermatozoides (Naretto *et al.*, 2014), no sería un buen indicador de la calidad espermática.

El balance entre caracteres reproductivos para conseguir el apareamiento y la calidad del eyaculado, puede promover la evolución de las estrategias alternativas para el apareamiento, en el que machos compensan la incapacidad para monopolizar a las hembras invirtiendo más fuertemente en eyaculados competitivos (Oliveira *et al.*, 2008). En lagartos, es común que los machos ejerzan dominancia pre-copulatoria para limitar a otros machos el acceso a la hembra (Olsson y Madsen, 1998; Whiting *et al.*, 2003; Tokarz, 2008). En relación a esto, al comparar machos con distinta inversión relativa en el músculo pterigoideo, en *T. merianae* no se encontraron diferencias en los caracteres espermáticos, pero se observó una tendencia a que los machos con mayor inversión en músculo de lo esperado posean menores velocidades máximas. Mientras que en *T. rufescens*, los machos que poseen menor inversión en músculo de lo esperado poseen espermatozoides con pieza principal más larga. Las diferencias en los resultados entre estas especies podría deberse a las diferencias en el riesgo de competencia, *T. rufescens* estaría expuesto a mayor riesgo de competencia (Ver capítulo 1; Naretto *et al.*, 2014) lo que podría presionar al desarrollo de estrategias alternativas en esta especie.

La intensidad de selección sexual sobre los caracteres reproductivos depende del contexto social (Shine *et al.*, 2006; Procter *et al.*, 2012). Variaciones en las estrategias reproductivas persiste en muchos casos porque el fenotipo que maximiza la aptitud (*fitness*) de un individuo dependería de la condición del individuo, del fenotipo expresado por otros individuos y de las interacciones sociales (Calsbeek *et al.*, 2002; Adams y Collyer, 2007; Oliveira *et al.*, 2008; Bergmuller y Taborsky, 2010). Los caracteres reproductivos podrían variar a lo largo de la temporada reproductiva según la presión de competencia, la disponibilidad y calidad del recurso pareja y el fenotipo de los competidores (Gasparini *et*

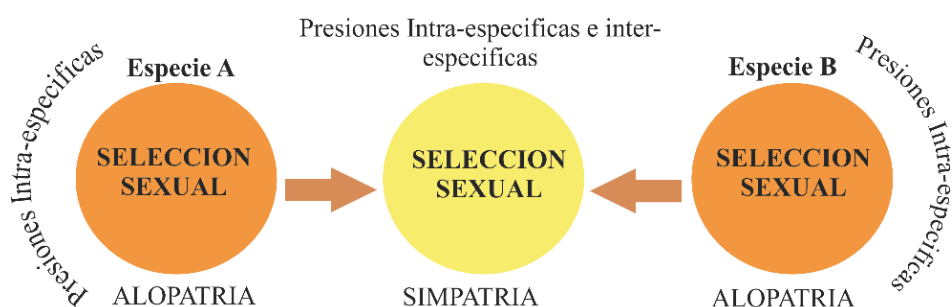
al., 2013), por lo que se podría esperar que la relación entre los caracteres involucrados en mecanismos pre- y post-copulatorios también sea flexible. En *Tupinambis*, se observó que la proporción de individuos categorizados según la inversión relativa en el músculo pterigoideo, no cambia a lo largo de la temporada, siendo 50:50 en cada mes para ambas especies. Sin embargo en un análisis multivariado, en el cual se incluyó el músculo y los caracteres espermáticos en conjunto, se encontró una variación temporal de las estrategias de los machos en ambas especies. En *T. merianae* se observó al comienzo de la temporada machos con mayor peso relativo del músculo pterigoideo y mayor longitud de pieza media y pieza principal del espermatozoide; mientras que al final de la temporada se encontraron machos con menor tamaño muscular relativo y mayor velocidad espermática. Coincidentemente, en *T. rufescens*, al comienzo de la temporada (octubre) se observaron machos con mayor peso muscular relativo y mayor longitud de la pieza media espermática; y luego en noviembre y diciembre se encontraron principalmente machos con menor tamaño muscular y mayor longitud de la pieza principal y velocidad espermática. Es decir, al principio de la temporada la estrategia de los machos sería tener más músculo pterigoideo, el cual les permitiría acceder a las hembras y una pieza media espermática más larga, la cual podría ser beneficiosa para que los espermatozoides permanezcan más tiempo en el tracto reproductivo de la hembra; por el contrario al final de la temporada, donde la cópula ocurriría más cercana al momento de la ovulación (Naretto, 2014), la estrategia de los machos sería mejorar la velocidad espermática para llegar más rápido al sitio de fertilización. Este patrón observado en las estrategias reproductivas de los machos también podría ser explicado debido a variaciones temporales en el fenotipo de las hembras y por ende calidad de las mismas, ya que existen evidencias en *Tupinambis merianae* de cambios en el fenotipo de las hembras a lo largo de la temporada reproductiva (Cardozo *et al.*, *en revisión*). Naretto, 2014 mostró, en *T. merianae*, que al comienzo de la temporada están presentes hembras de mayor calidad reproductiva y hacia el final aumenta la cantidad de competidores. Es por esto que machos con mayor desarrollo muscular tendrían ventajas en las peleas por el acceso a hembras de alta calidad reproductiva; mientras que al final de la temporada podría aumentar el riesgo de competencia espermática por lo que los machos invierten en los caracteres espermáticos. Es decir, este patrón podría estar asociado a variaciones del contexto social que impliquen cambios en la disponibilidad y calidad tanto del recurso pareja como de los competidores a lo largo de la temporada reproductiva.

## Capítulo 4

# CARACTERES ESPERMÁTICOS EN RELACIÓN A LA SELECCIÓN SEXUAL INTER- E INTRA-ESPECÍFICAS EN *Tupinambis merianae* Y *T. rufescens*

## Introducción

La presión de selección sexual post-copulatoria sobre los caracteres espermáticos ha llevado a la diferenciación entre especies cercanamente relacionadas, y en diferentes poblaciones de la misma especie (Cordero-Rivera *et al.*, 2004), jugando un rol importante en la formación de barreras para el aislamiento reproductivo y la mantención de los límites entre especies (Parker y Partridge, 1998; Eady, 2001; Coyne y Orr, 2004; Howard *et al.*, 2009; Butlin *et al.*, 2012; Manier *et al.*, 2013). La potencial fuerza de selección sexual puede variar entre poblaciones ya que podrían experimentar diferentes niveles de competencia que influyen el grado y tipo de selección sexual que ocurre localmente (Wade, 1995; Baird *et al.*, 1997; Tsuboi *et al.*, 2012; Rojas y Endler, 2013). Además de las presiones intra-específicas, los individuos podrían estar sujetos a selección por interacciones inter-específicas cuando especies similares están en simpatría (Carretero *et al.*, 2006, Kaliontzopoulou *et al.*, 2007, Fig. 20).



**Figura 20.** Diseño de estudio de las poblaciones con diferentes contexto sociales.

Existen diversos indicadores del riesgo de competencia espermática, el peso testicular relativo ha sido considerado por excelencia como un indicador confiable del nivel

de competencia espermática en distintos taxas (Snook y Pizzari, 2012; Tourmente *et al.*, 2009; 2013). El dimorfismo sexual desviado hacia los machos, y el desarrollo de caracteres sexuales secundarios como el músculo pterigoideo de la cabeza (Naretto *et al.*, 2014), son considerados indicadores de la intensidad de competencia entre los machos por acceder al recurso pareja (Corl *et al.*, 2010; Lüpold *et al.*, 2014). Y finalmente, la intensidad de selección sexual que actúa sobre los caracteres reproductivos depende de la disponibilidad de pareja y de competidores, es decir, de la proporción de sexo operativa (Kvanerno y Simmons, 2013; Wacker *et al.*, 2013) ya que da indicios de la presión competitiva. La competencia entre machos por las oportunidades de apareamiento ha sido reconocida como una potente presión selectiva que moldea la evolución de las estrategias reproductivas (Simmons y Emlen, 2006; Wacker *et al.*, 2013). La disponibilidad de pareja y competidores puede estar también influenciada por la presencia de especies relacionadas. Cuando dos especies ecológicamente similares coinciden en tiempo y espacio pueden generar presiones selectivas en los miembros de ambas especies (Langkilde y Shine, 2007; Grether *et al.*, 2009). La presencia de individuos híbridos da indicios de la interacción reproductiva inter-específica (Grether *et al.*, 2009). El proceso de hibridación podría contribuir a entender los mecanismos de selección sexual (Abbott *et al.*, 2013; Svensson, 2013). El concebir las parejas hetero-específicas como recurso reproductivo, podría deberse a los beneficios de dejar descendencia, en relación a los costos de que la camada sea híbrida (Rosenthal, 2013; Svensson, 2013). El peso testicular relativo, el peso relativo del músculo pterigoideo, el dimorfismo sexual en el tamaño corporal, la proporción de sexo y la presencia de una especie relacionada podrían indicar distintos contextos competitivos y sociales de presiones selectivas. Las zonas de contacto entre especies han sido reconocidas como laboratorios naturales de evolución (Bridle *et al.*, 2001). Las interacciones inter- e intra-específicas podrían representar una mezcla de fuerzas selectivas que provean un escenario ideal para el estudio de los procesos reproductivos.

La competencia espermática, ha conducido a la evolución de los caracteres espermáticos para maximizar el éxito de fertilización de los machos (Snook, 2005; Pizzari y Parker, 2009). Entre ellos se destacan, el aumento en la inversión de energía para la producción espermática (Gomendio *et al.*, 2006; Simmons y Emlen, 2006). Existen evidencias de cambios en la producción de espermatozoides en dos especies de lagartos, donde los machos en simpatría producen mayor cantidad de espermatozoides que los machos

en alopatría (Carretero *et al.*, 2006). A su vez, la morfometría (Pitnick *et al.*, 2009a) y la velocidad espermática han evolucionado también como respuesta a la presión de competencia espermática (Kleven *et al.*, 2009; Lüpold *et al.*, 2009a; Tourmente *et al.*, 2011a). Debido a que la producción espermática es costosa (Olsson *et al.*, 1997), se espera que los machos ajusten la inversión en su eyaculado durante un apareamiento, dependiendo de la disponibilidad de hembras (Cornwallis y Birkhead, 2007; Lüpold *et al.*, 2011; Kvarnemo y Simmons, 2013) y la percepción del macho del nivel de competencia (Parker y Pizzari, 2010; Simmons y Fitzpatrick, 2012; Kvarnemo y Simmons, 2013). Por lo que, la competencia espermática podría llevar a estrategias condicionales de los machos dependiendo de su fenotipo y el contexto social (Pizzari y Parker, 2009). Distintos contextos sociales-competitivos podrían llevar a la variación en los caracteres espermáticos modelados por la selección sexual post-copulatoria

De acuerdo a lo anterior, *Tupinambis merianae* y *T. rufescens* proveen un buen modelo para estudiar la evolución de caracteres reproductivos ya que son dos especies cercanas filogenéticamente (Cabaña *et al.*, 2014) y comparten características bio-ecológicas. (Cardozo *et al.*, 2012). Sus períodos reproductivos se solapan de tal manera que, tanto las gónadas como los caracteres sexuales secundarios están completamente desarrollados en el mismo período (Naretto *et al.*, 2014; Naretto, 2014). En ambas especies las áreas de distribución son alopátricas, sin embargo comparten una zona de simpatría (Cardozo *et al.*, 2012; Lanfri *et al.*, 2013). En este área ocurre el proceso de hibridación recíproca entre estas especies (Cabaña *et al.*, 2014) y se han observado interacciones agonísticas entre machos de ambas especies (Observación personal). En el capítulo 1, se mostró que los caracteres espermáticos difirieron entre las dos especies de *Tupinambis* estudiadas. *T. merianae* presentó espermatozoides con todos sus componentes más largos, mientras que *T. rufescens* presentó espermatozoides más rápidos. Sin embargo, ambas especies mostraron la misma relación entre la forma y la velocidad espermática (ver capítulo 1). Además, en el capítulo 3, se observó para ambas especies una relación negativa entre el carácter sexual secundario y los caracteres espermáticos, y que las estrategias reproductivas de los machos de *Tupinambis* no son fijas por lo que sería interesante estudiar cómo se expresan en distintos contextos sociales.

En este capítulo se pretende evaluar la variación de los caracteres espermáticos en relación al riesgo de competencia espermática desde una perspectiva intra- e inter-específica,

a través del estudio de poblaciones en alopatría y simpatría. Para lo cual se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar diferencias en el riesgo de competencia espermática entre poblaciones en distinto contextos sociales de alopatría y simpatría en *T. merianae* y *T. rufescens*.
- Evaluar las diferencias en los caracteres espermáticos en diferentes contextos sociales de alopatría y simpatría en *T. merianae* y *T. rufescens*.
- Evaluar cambios en las estrategias reproductivas entre poblaciones con distintos contexto social de alopatría y simpatría.
- Evaluar las diferencias en los caracteres espermáticos entre especies en la población simpátrica.

## Metodología Específica

### Ejemplares utilizados

Los individuos utilizados en este capítulo provienen de tres poblaciones con diferentes contextos sociales: dos zonas de alopatría (una para cada especie) y una zona de simpatría. Los sitios de estudio están separados por una distancia máxima de 100km, expuestos a condiciones climáticas similares, de manera tal de minimizar los efectos ambientales. Se analizaron un total de 86 individuos maduros de *Tupinambis merianae* y 33 individuos maduros de *T. rufescens* provenientes de las poblaciones alopátricas. De la zona de simpatría se analizaron un total de 23 individuos maduros de *T. merianae* y 24 individuos maduros de *T. rufescens*. Las especies fueron identificadas fenotípicamente. Se utilizaron datos de una misma temporada de actividad reproductiva (octubre a diciembre de 2011) para las tres poblaciones estudiadas.

### Análisis de datos

Para determinar el riesgo de competencia espermática entre poblaciones con distintos contextos sociales, comparamos los cuatro indicadores entre poblaciones alopátricas y simpátricas en cada especie. Calculamos la proporción de sexo de individuos maduros durante el periodo reproductivo en cada población estudiada, y testeamos las diferencias en la proporción de sexos usando un test de Chi-cuadrado. Además, en la zona de simpatría, calculamos una única proporción de sexo madura considerando machos y hembras de ambas especies, debido a que la existencia de individuos híbridos entre estas especies indica que las hembras de ambas especies podrían ser un potencial recurso reproductivo. Se analizó la proporción de sexo de individuos maduros debido a que manifiesta la misma tendencia para estas especies que la proporción de individuos reproductivos (Naretto, 2014). Se determinó el dimorfismo sexual en el tamaño corporal, de los individuos maduros, a través del índice de Gibbons y Lovich para cada población y las diferencias en el LHC entre sexos fueron analizadas mediante un ANOVA. Se comparó el peso testicular relativo y el peso relativo del músculo pterigoideo de individuos reproductivos entre poblaciones con diferente contexto social dentro de cada especie mediante un test de ANCOVA, utilizando el peso corporal como co-variable. Cuando realizamos análisis de ANCOVA, se testeó la interacción entre el factor y la covariable. Cuando esta interacción no fue significativa, fue descartada del modelo.



Para determinar diferencias en la concentración espermática y los caracteres morfométricos y dinámicos de los espermatozoides, entre poblaciones con distintos contextos sociales se realizaron análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis y ANOVA anidado, respectivamente. Ninguno de los caracteres espermáticos mostró asociación con el tamaño corporal (todas  $p > 0,1$ ).

Se realizó un análisis de componentes principales, utilizando el  $\log_{10}$  del PC,  $\log_{10}$  PM,  $\log_{10}$  VSL, longitud de la pieza principal y longitud de la pieza media para las 3 poblaciones juntas y luego para determinar variaciones en los valores de los componentes principales entre poblaciones con distintos contextos sociales, se realizó un MANOVA a dos factores, especie, contexto social y la interacción entre los mismos. Para determinar diferencias los caracteres espermáticos entre especies en la población simpátrica se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis y un ANOVA anidado según corresponda. Los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa InfoStat (versión 2012; Universidad de Córdoba, Argentina)

## Resultados

Para determinar diferencias en el riesgo de competencia espermática entre poblaciones con distintos contextos sociales en cada especie, se compararon los cuatro indicadores mencionados. En *T. merianae*, la población simpátrica presentó similar peso testicular relativo y peso relativo del músculo pterigoideo en relación a la población alopátrica (Tabla 21). El índice de dimorfismo sexual en el tamaño corporal estuvo desviado hacia los machos en ambas poblaciones, pero en diferente magnitud, siendo de -0,041 en alopátrica (ANOVA LHC,  $F_{1,84}=5,85$ ;  $P=0,0177$ ) y de -0,075 en simpátrica (ANOVA LHC,  $F_{1,21}=7,67$ ;  $P=0,0115$ ). La proporción de sexo de individuos maduros fue similar entre poblaciones, siendo 1,53:1 en alopátrica y de 1,55:1 en simpátrica (Tabla 22). Por su parte, en *T. rufescens* la población simpátrica presentó mayor peso testicular relativo que la población alopátrica (Tabla 21), mientras que el peso relativo del músculo pterigoideo fue similar entre poblaciones (Tabla 21). El índice de dimorfismo sexual en el tamaño corporal estuvo desviado hacia los machos en la población alopátrica, siendo -0,203 (ANOVA LHC,  $F_{1,31}=19,60$ ;  $P<0,0001$ ), mientras que en la población simpátrica fue de -0,088 (ANOVA LHC,  $F_{1,22}=3,54$ ;  $P=0,0733$ ). La proporción de sexo de individuos maduros estuvo desviada hacia los machos en ambas poblaciones pero con diferente magnitud, siendo 5,6:1 en alopátrica y de 2,43:1 en simpátrica (Tabla 22). Por último, la proporción de sexo de individuos maduros en la población simpátrica, estuvo desviada hacia los machos siendo 1,94:1 ( $\chi^2 = 4,79$ , g.l=1;  $P=0,0287$ ).

**Tabla 21.** Comparación del peso testicular y peso del músculo pterigoideo entre poblaciones con diferentes contextos sociales en *Tupinambis*. Media del carácter  $\pm$  desvío estándar. ANCOVA con PC como covariable. Los análisis estadísticos se realizaron con las variables transformadas Log 10. Se presentan arriba los valores *F* y *P* para el efecto especie y abajo para el efecto de la covariable.

Carácter	Machos alopatría	Machos simpatría	g.l	F	P
<i>Tupinambis merianae</i>					
Peso Testicular (g)	5,19 $\pm$ 2,73 N=21	7,14 $\pm$ 4 N=10	1,25	0,0039 <b>4,68</b>	0,9509 <b>0,0403</b>
Peso Músculo Pterigoideo (g)	49,67 $\pm$ 31,71 N=18	83,87 $\pm$ 45,10 N=10	1,25	1,94 <b>117,17</b>	0,1761 <b>&lt;0,0001</b>
<i>Tupinambis rufescens</i>					
Peso Testicular (g)	6,72 $\pm$ 3,82 N=19	10,48 $\pm$ 4,75 N=10	1,26	<b>7,92</b> <b>33,28</b>	<b>0,0092</b> <b>&lt;0,0001</b>
Peso Músculo Pterigoideo (g)	81,08 $\pm$ 45,9 N=20	76,00 $\pm$ 48,16 N=10	1,27	0,99 <b>207,49</b>	0,3282 <b>&lt;0,0001</b>

**Tabla 22.** Proporción de sexo de individuos maduros de *Tupinambis merianae* y *Tupinambis rufescens* en poblaciones alopátricas y simpátricas.

	<i>T. merianae</i>					<i>T. rufescens</i>				
	Hembras	Machos	$\chi^2$	P	PSO	Hembras	Machos	$\chi^2$	P	PSO
Alopatría	34	52	3,77	0,0523	1,53:1	5	28	16,03	<b>&lt;0,0001</b>	5,60:1
Simpatría	9	14	1,09	0,2952	1,55:1	7	17	4,17	<b>0,0412</b>	2,43:1

Al comparar los caracteres espermáticos entre poblaciones con distintos contextos sociales en cada especie se observó, en *T. merianae* que los individuos de la población simpátrica poseen espermatozoides con pieza media más larga que los individuos de alopatría. Por lo que, también se encontraron diferencias significativas en la proporción LPP:LPM entre poblaciones (Tabla 23). Por el contrario, en *T. rufescens* no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los caracteres espermáticos evaluados entre poblaciones con distinto contexto social (Tabla 23).

**Tabla 23.** Comparación de los caracteres espermáticos entre poblaciones con distintos contextos sociales

	Caracteres espermáticos	Alopatría	Simpatría	Estadístico	P
<i>T. merianae</i>	Concentración (10 <sup>6</sup> spz/ml)	2204,2 ± 942,50 N=13	2750,63 ± 292,73 N=8	H= 1,18	0,2773
	LC (µm)	14,07 ± 1,53 N=14	13 ± 1,13 N=9	F=3,28	0,0846
	<b>LPM (µm)</b>	<b>5,08 ± 0,21</b> N=14	<b>5,29 ± 0,21</b> N=9	<b>F=5,49</b>	<b>0,0291</b>
	LPP (µm)	59,88 ± 0,77 N=14	59,16 ± 1,76 N=9	F=1,84	0,1894
	LTE (µm)	79,7 ± 1,64 N=14	78,07 ± 2,63 N=9	F=3,36	0,0808
	<b>LPP:PLM</b>	<b>11,9 ± 0,44</b> N=14	<b>11,29 ± 0,49</b> N=9	<b>F=9,60</b>	<b>0,0054</b>
	VSL (µm/s)	28,79 ± 6,23 N=14	29,37 ± 6,36 N=8	F=0,05	0,8317
	<i>T. rufescens</i>	Concentración (10 <sup>6</sup> spz/ml)	2289,69 ± 934,18 N=16	2621,67 ± 1103,62 N=9	H= 0,39
LC (µm)		13,09 ± 1,47 N=18	13,11 ± 1,50 N=9	F= 0,0011	0,974
LPM (µm)		4,96 ± 0,16 N=18	4,92 ± 0,19 N=9	F=0,24	0,6277
LPP (µm)		57,42 ± 1,09 N=18	57,3 ± 1,09 N=9	F= 0,07	0,7911
LTE (µm)		76,21 ± 1,90 N=18	75,94 ± 2,51 N=9	F= 0,12	0,7326
LPP:PLM		11,74 ± 0,41 N=18	11,81 ± 0,48 N=9	F= 0,16	0,6915
VSL (µm/s)		30,09 ± 7,91 N=18	27,83 ± 4,08 N=9	F= 0,68	0,4175

LC: Longitud de la cabeza; LPM: Longitud de la pieza media; LPP: Longitud de la pieza principal; LTE: Longitud total espermática; LPP:LPM: Proporción de la pieza principal y pieza media; VSL: Velocidad lineal.

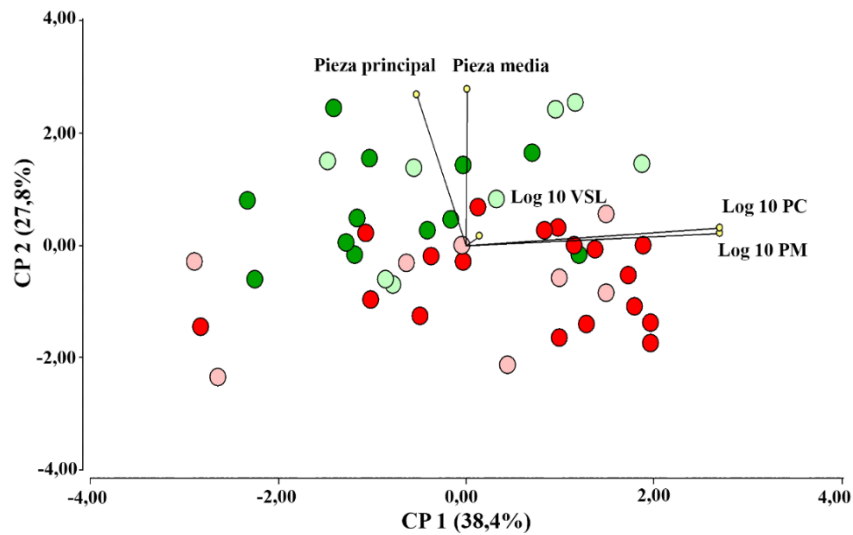
El análisis de componentes principales realizado con los caracteres reproductivos para ambas especies juntas, arrojó dos variables que explican el 66% de la variabilidad y (Tabla 24). El primer componente (CP1) está explicado principalmente por el músculo pterigoideo, mientras que el segundo componente (CP2) se refiere a la inversión en los caracteres espermáticos. Al comparar las estrategias reproductivas entre especies y poblaciones, se observaron diferencias entre especies (MANOVA  $F_{2,41} = 16,56$ ;  $P < 0,0001$ ), *T. merianae* presentó mayor desarrollo de los caracteres espermáticos en relación al músculo

pterigoideo, mientras que *T. rufescens* presento un patrón inverso (Fig. 21). Sin embargo, no se evidenciaron diferencias entre poblaciones con distintos contextos sociales en cada especie (MANOVA  $F_{2,41}= 0,10$ ;  $p=0,903$ ).

**Tabla 24.** CP1 y CP2 resultantes de análisis de componentes principales realizados con caracteres reproductivos en machos de *Tupinambis*.

	CP1	CP2
Autovalores	1,92	1,39
Variación explicada	0,38	0,28
Log 10 PM	0,70	0,08
Log 10 PC	0,70	0,05
Log 10 VSL	0,04	0,04
LPM	0,0044	0,71
LPP	-0,14	0,69

PM: Peso del músculo pterigoideo; PC: Peso corporal; LPM: Longitud de la pieza media; LPP: Longitud de la pieza principal; VSL: Velocidad lineal.



**Figura 21.** Análisis de componentes principales de caracteres reproductivos en machos de *Tupinambis*. Alopatria *T. meriana* ● ; Simpatría *T. meriana* ○ ; Alopatria *T. rufescens* ● ; Simpatría *T. rufescens* ○ . PC: Peso corporal; PM: Peso del músculo pterigoideo.

Por último, en la población simpátrica se compararon los caracteres espermáticos entre las dos especies, y se encontró que *T. merianae* posee espermatozoides con pieza media y pieza principal más largas que *T. rufescens* (Tabla 25).

**Tabla 25.** Comparación de los caracteres espermáticos entre especies en la población en simpatria

	Caracteres espermáticos	<i>T. merianae</i>	<i>T. rufescens</i>	Estadístico	P
Simpatria	Concentración (10 <sup>6</sup> sptz/ml)	2750,63 ± 292,73 N=8	2621,67 ± 1103,62 N=9	H= 0,15	0,743
	LC (µm)	13 ± 1,13 N=9	13,11 ± 1,50 N=9	F= 0,03	0,8602
	LPM (µm)	<b>5,29 ± 0,21</b> N=9	<b>4,92 ± 0,19</b> N=9	<b>F=15,05</b>	<b>0,0013</b>
	LPP (µm)	<b>59,16 ± 1,76</b> N=9	<b>57,3 ± 1,09</b> N=9	<b>F=7,26</b>	<b>0,016</b>
	LTE (µm)	78,07 ± 2,63 N=9	75,94 ± 2,51 N=9	F= 3,10	0,0974
	LPP:LPM	<b>11,29 ± 0,49</b> N=9	<b>11,81 ± 0,48</b> N=9	<b>F= 5,09</b>	<b>0,0385</b>
	VSL (µm/s)	29,37 ± 6,36 N=9	27,83 ± 4,08 N=9	F= 0,40	0,5354

LC: Longitud de la cabeza; LPM: Longitud de la pieza media; LPP: Longitud de la pieza principal; LTE: Longitud total espermática; LPP:LPM: Proporción de la pieza principal y pieza media; VSL: Velocidad lineal.

## Discusión

Las interacciones entre dos especies cercanamente relacionadas podrían afectar las estrategias reproductivas de distintas maneras. En este capítulo presentamos evidencias del cambio en el contexto competitivo y social entre poblaciones de alopatría y simpatría de lagartos *Tupinambis* y cómo estos cambios moldean los caracteres espermáticos.

En relación a la competencia intra-específica en poblaciones con distinto contexto social, se compararon los indicadores de riesgo de competencia espermática y se observaron cambios en el contexto competitivo en ambas especies. *T. merianae* presentó un aumento del dimorfismo sexual en el tamaño del cuerpo en la población simpátrica, mientras que el peso testicular relativo, el peso del músculo pterigoideo y la proporción de sexo intra-específica no variaron entre poblaciones. Por su parte, en la población simpátrica de *T. rufescens* se observó un aumento del tamaño testicular relativo y una disminución de la proporción de sexo intra-específica. En simpatría, la competencia intra-específica está combinada con las interacciones inter-específicas. Si se considera una proporción de sexo por zona, observamos un gradiente de mayor a menor competencia entre machos con el siguiente orden: alopatría de *T. rufescens*; área de simpatría para ambas especies; y alopatría de *T. merianae*. De hecho, si se considera que las interacciones sexuales inter-específicas permiten dejar descendencia (Svensson, 2013), los machos de *T. merianae* en la población simpátrica podrían estar sujetos a mayor competencia que los de la población alopátrica, mientras que los machos de *T. rufescens* podrían exhibir un patrón opuesto. Estos resultados plantean escenarios con distintos niveles de competencia reproductiva, influenciando la intensidad de presión de selección sexual post-copulatoria

En *T. merianae* el riesgo de competencia intra-específica no difirió entre poblaciones, con excepción del aumento del dimorfismo sexual en el tamaño corporal en la población simpátrica. Sumado a esto, la presencia de machos de *T. rufescens* en la población simpátrica aumenta en número relativo de competidores. En relación a esto, se observaron diferencias en la longitud de la pieza media del espermatozoide siendo más larga en la población simpátrica. Una elongación de la pieza media podría resultar en una mayor fuerza de propulsión y en un aumento de la energía necesaria tanto para el movimiento como la supervivencia del espermatozoide (Tourmente *et al.*, 2009). Como se mostró en el capítulo

1 de esta tesis, la pieza media está relacionada negativamente a la velocidad espermática, por lo que este aumento en las reservas energéticas podría ser necesario para mejorar la longevidad espermática (Parker y Begon, 1993). Por consiguiente, la pieza media podría ser el componente principal del espermatozoide que provea la energía necesaria para la supervivencia espermática dentro del tracto de la hembra. El aumento en la longitud de la pieza media de *T. merianae* sugiere una inversión adicional en la calidad espermática en la población simpátrica.

Por su parte, en *T. rufescens*, se observó un aumento del peso testicular relativo en la población simpátrica y una disminución del resto de los indicadores. En relación a esto, no se encontraron cambios en los caracteres espermáticos entre poblaciones con distintos contextos sociales. El peso del testículo ha sido considerado ampliamente como un indicador de riesgo de competencia espermática (Gomendio *et al.*, 2006; Snook y Pizzari, 2012) y relacionado con el aumento la producción de espermatozoides (Møller, 1988; Soulsbury y Lossa, 2010). Sin embargo, Naretto *et al.*, (*en revisión*) propone que *T. rufescens* en la población simpátrica está expuesto a menor competencia intra- e inter-específica y tendría mayor disponibilidad de hembras tanto conespecíficas como hetero-específicas. Por lo tanto, el aumento en el peso testicular podría estar siendo seleccionado para una mayor producción espermática (Preston *et al.*, 2001), por lo que los machos podrían copular con un mayor número de hembras (Preston *et al.*, 2003). Si bien, no se observaron cambios en la concentración espermática entre poblaciones de *T. rufescens*, la fuerza de selección sobre el peso testicular podría favorecer la competitividad de eyaculados futuros más que la competitividad del eyaculado actual (Lüpold *et al.*, 2014).

En el capítulo tres de esta tesis, se observa que las estrategias reproductivas de los lagartos *Tupinambis* no son fijas, sino que varían a lo largo de la temporada reproductiva. Sin embargo, cada especie sometida a diferentes contextos sociales mantiene su estrategia reproductiva. *T. merianae* invierte principalmente en los caracteres espermáticos, mientras que *T. rufescens* invierte principalmente en el desarrollo del músculo pterigoideo.

Una pregunta fundamental en la biología evolutiva está referida a las barreras de aislamiento reproductivo entre las especies (Noriyuki *et al.*, 2012; Friberg *et al.*, 2013;



Bargielowski y Lounibus, 2013). La importancia relativa de las barreras reproductivas puede ser estudiada en taxas relacionadas en los que ocurre hibridación naturalmente (Chang, 2004). El reforzamiento es el proceso de selección en contra de la hibridación o de los apareamientos con especies cercanamente relacionadas (Dobzhansky, 1951; Howard, 1993; Servedio y Noor, 2003). El cambio de la longitud de la pieza media entre contextos sociales de *T. merianae*, y siendo diferente de *T. rufescens* en simpatría, sugiere una tendencia al proceso de reforzamiento en un carácter reproductivo post-copulatorio. Sin embargo, en la zona de simpatría, se observaron similitudes en varios caracteres espermáticos como la concentración, la longitud total del espermatozoide y la velocidad espermática entre especies. Esta semejanza en varios caracteres espermáticos entre las dos especies de *Tupinambis* sugiere que las barreras post-copulatorias al aislamiento reproductivo serían ineficientes entre estas especies de lagartos. Estos resultados podrían explicar la hibridación recíproca entre *T. merianae* and *T. rufescens* encontrada en la zona de simpatría (Cabaña *et al.*, 2014). Si bien, otra posible explicación es que la hibridación haya llevado a la convergencia de los caracteres observados (Grether *et al.*, 2009), es importante resaltar en este trabajo, la variación de los caracteres espermáticos en lagartos *Tupinambis* en distintos contextos sociales. Tanto divergencia como convergencia de distintos caracteres en la población en simpatría son posibles resultados, dependiendo de la intensidad de la competencia inter-específica (Cody, 1973; Lorenz, 1966; Grether *et al.*, 2009) y los caracteres involucrados.

# CONCLUSIONES

El presente trabajo de Tesis brinda nuevos conocimientos sobre los mecanismos de selección sexual post-copulatoria en lagartos, resaltando la variabilidad en los caracteres espermáticos como estrategia para hacer frente a la competencia intra- e inter-específica.

*Tupinambis merianae* y *Tupinambis rufescens* a pesar de ser dos especies cercanas filogenéticamente están expuestas a diferentes contextos de riesgo de competencia espermática, los cuales modelan los caracteres espermáticos. *T. rufescens* presentó mayor riesgo de competencia espermática, acompañado por mayor velocidad de los espermatozoides y mayor variabilidad en la morfometría espermática dentro cada macho en relación a *T. merianae*.

A nivel intra- específico, ambas especies presentaron gran variabilidad de los caracteres espermáticos tanto entre machos, como dentro de cada macho, sugiriendo que la variación espermática podría ser una estrategia de inversión diferencial de los individuos de *Tupinambis* para enfrentar la competencia espermática. Sumado a esto, indagamos cómo la forma del espermatozoide influye sobre algún aspecto de su funcionalidad, como es la velocidad. En este caso, los espermatozoides con pieza principal más larga en relación a la longitud de la pieza media poseen mayor velocidad espermática. Destacamos la importancia de tener en cuenta la variabilidad de los espermatozoides dentro de cada macho para entender la evolución espermática.

La ultraestructura espermática de *T. merianae* y *T. rufescens*, parece ser conservada dentro del género *Tupinambis*, con gran influencia filogenética. Se observaron diferencias en el número de sets de mitocondrias y cuerpos densos presentes en la pieza media, las cuales fueron discutidas en relación a la importancia de la mitocondria en la función espermática.

A fin de identificar factores que estén influyendo en la variabilidad de los caracteres espermáticos entre machos, presentamos por primera vez en lagartos, evidencias de un balance entre el carácter sexual secundario y los caracteres espermáticos, contribuyendo a la hipótesis de competencia espermática. Además, este balance en los caracteres reproductivos de los machos podría conducir al desarrollo de estrategias alternativas al menos en *T.*

*rufescens*. Por otro lado, las estrategias reproductivas, considerando caracteres pre- y post-copulatorios, en los machos de *Tupinambis* no son fijas y varían a lo largo de la temporada reproductiva.

Las interacciones entre dos especies cercanamente relacionadas en simpatría, generan una mezcla de presiones intra- e inter-específicas que podrían afectar las estrategias reproductivas de distintas maneras. Observamos cambios en el contexto competitivo y social entre poblaciones de alopatría y simpatría de lagartos *Tupinambis* y con ellos modificaciones de caracteres espermáticos. Además en simpatría, observamos que ambas especies presentan caracteres espermáticos similares, lo que podría indicar que las barreras post-copulatorias al aislamiento reproductivo entre estas especies son ineficientes, lo cual podría favorecer la hibridación recíproca entre las mismas.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

En función de los resultados derivados de esta tesis surgen nuevos desafíos para profundizar el estudio sobre los mecanismos de selección sexual post-copulatoria. En primer lugar, indagar sobre la fuente de origen de la variabilidad espermática estructural y funcional dentro de cada macho, ya sea dentro del testículo, durante la espermatogénesis y/o durante el paso por el conducto deferente. Profundizar la relación entre la estructura y la función espermática, teniendo en cuenta otros caracteres funcionales como ser la longevidad espermática. Por otra parte, dilucidar los mecanismos de interacción eyaculado-eyaculado de machos potencialmente rivales y eyaculado-fluido oviductal de la hembra, a fin de entender el rol de cada sexo en el éxito de fertilización bajo selección sexual post-copulatoria.

# BIBLIOGRAFIA

## A

Abbott, R., Albach, D., Ansell, S., Arntzen, J.W., Baird, S.J.E., Bierne, N., Boughman, J., Brelsford, A., Buerkle, C.A., Buggs, R., Butlin, R.K., Dieckmann, U., Eroukhmanoff, F., Grill, A., Cahan, S.H., Hermansen, J.S., Hewitt, G., Hudson, A.G., Jiggins, C., Jones, J., Keller, B., Marczewski, T., Mallet, J., Martinez-Rodriguez, P., Möst, M., Mullen, S., Nichols, R., Nolte, A.W., Parisod, C., Pfenning, K., Rice, A.M., Ritchie, M.G., Seifert, B., Smadja, C.M., Stelkens, R., Szymura, J.M., Väinölä, S.A., Wolf, J.B.W., Zinner, D. **2013**. Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, **26**:229-246.

Adams, D.C., Collyer, M.L. **2007**. Analysis of character divergence along environmental gradients and other covariates. *Evolution*, **61**:510-515.

Allen, B. J., Levinton J. S. **2007**. Costs of bearing a sexually selected ornamental weapon in a fiddler crab. *Functional Ecology*, **21**:154–161.

Amaral, A., Lourenço, B., Marques, M., Ramalho-Santos, J. **2013**. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*, **146**(5):163-174.

Anderson, M.J., Nyholt J., Dixon A. F. **2005**. Sperm competition and the evolution of sperm midpiece volume in mammals. *Journal of Zoology*, **270**:682-686.

Anderson, M.J., Chapman, S.J., Videan, E.N., Evans, E., Fritz, J., Stoinski, T.S., Dixon, A.F., Ganeux, P. **2007**. Functional evidence of differences in sperm competition in humans and chimpanzees. *American Journal of Physical Anthropology*, **134**:274-280.

AVMA, Guidelines on Euthanasia. **2007**. In American Veterinary Medical Association eds. Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia.

## B

Ball, M.A., Parker G.A. **1996**. Sperm competition games: external fertilization and ‘adaptive’ infertility. *Journal of Theoretical Biology*, **180**:141–150.

- Baird, T.A., Fox, S.F., McCoy, K. **1997**. Population differences in the roles of size and coloration in intra- and intersexual selection in the collared lizard, *Crotaphytus collaris*: influence of habitat and social organization. *Behavioral Ecology*, **8**(5): 506-517.
- Bargielowski, I., Lounibus, L.P. **2013**. Rapid evolution of reduced receptivity to interspecific mating in the dengue vector *Aedes aegypti* in response to satyrization by invasive *Aedes albopictus*. *Evolutionary Ecology*, doi:10.1007/s10682-013-9669-4.
- Beausoleil, J. M. J., Doucet S. M., Heath D. D., Pitcher T. E. **2012**. Spawning coloration, female choice and sperm competition in the redbreast dace, *Clinostomus elongates*. *Animal Behavior*, **83**:969-977.
- Berglund, A., Bisazza, A., Pilastro, A. **1996**. Armaments and ornaments: an evolutionary explanation of traits of dual utility. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**(4):385-399.
- Bergmüller, R., Taborsky, M. **2010**. Animal personality due to social niche specialization. *Trends in Ecology and Evolution*, **25**:504-511.
- Biggers, J.D., Whitten W.K., Whittingham D.G. **1971**. The culture of mouse embryos in vitro. Pp. 86–116. *en* J. C. Daniel, ed. *Methods in mammalian embryology*. Freeman, San Francisco, California, USA.
- Birkhead, T.R., Møller A.P. **1993**. Sexual selection and the temporal separation of reproductive events: sperm storage data from reptiles, birds and mammals. *Biological Journal of the Linnean Society*, **50**:295-311.
- Birkhead, T.R., Fletcher, F. **1995**. Male phenotype and ejaculate quality in the zebra finch *Taeniopygia guttata*. *Proceedings of the Royal Society Series B*, **262**, 329–334.
- Birkhead, T.R. **1996**. Sperm competition: evolution and mechanisms. *Current Topics in Developmental Biology*, **33**:103-158.
- Birkhead, T.R., Buchanan, K.L., Devoogd, T.J., Pellat, E.J., Szekely, T., Catchpole, C.K. **1997**. Song, sperm quality and testes asymmetry in the sedge warbler. *Animal Behavior*, **53**: 965-971.

Birkhead, T. R., Møller A. P, eds. **1998**. Sperm Competition and Sexual Selection. Academic Press, San Diego, California.

Birkhead, T.R., Martinez J. R., Burke T., Froman D. P. **1999**. Sperm mobility determines the outcome of sperm competition in the domestic fowl. *Proceedings of the Royal Society Series of London Series B*, **266**:1759-1764.

Birkhead, T.R., Pellat E.J, Brekke P., Yeates R., Castillo-Juarez H. **2005**. Genetic effects on sperm design in the zebra finch. *Nature*, **434**:383-387.

Blengini, C.S., Teves M.E., Uñates D.R., Guidobaldi H.A., Gatica L.V., Giojalas L.C. **2011**. Human **sperm** pattern of movement during chemotactic re-orientation towards a progesterone source. *Asian Journal of Andrology*, **13**(5):769-73.

Bridle, J.R., Baird, S., Butlin, R.K. **2001**. Spatial structure and habitat variation in a grasshopper hybrid zone. *Evolution*, **55**:1832-1843.

Burness, G., Casselman S. J., Schulte-Hostedde A. I., Moyes C. D., Montgomerie R. **2004**. Sperm swimming speed and energetics vary with sperm competition risk in bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Behavioral, Ecology and Sociobiology*, **56**:65–70.

Butlin, R., Debelle, A., Kerth, C., Snook, R.R., Beukeboom, L.W., Catillo Cajas, R.F., Diao, W., Maan, M.E., Paolucci, S., Weissing, F.J. **2012**. What do we need to know about speciation? *Trends in Ecology and Evolution*, **27**:27-39.

## C

Cabaña, I., Gardenal, C.N., Chiaraviglio, M., Rivera, P.C. **2014**. Natural hybridization in lizards of the genus *Tupinambis* (Teiidae) in the southernmost contact zone of their distribution range. *Annales Zoologici Fennici*, **51**.

Calhim, S., Immler, S., Birkhead, T.R. **2007**. Postcopulatory sexual selection is associated with reduced variation in sperm morphology. *PLoS ONE*, **2**:e413.

Calhim, S., Double, M.C., Margraf, N., Birkhead, T.R., Cockburn, A. **2011**. Maintenance of sperm variation in a highly promiscuous wild bird. *PLoS ONE*. **6**:e28809.

Calsbeek, R., Alonzo, S.H., Zamudio, K., Sinervo, B. **2002**. Sexual selection and alternative mating behaviors generate demographic stochasticity in small populations. *Proceedings of the Royal Society Series of London Series B*, **269**:157-164.

Calsbeek, R., Bonneaud, C., Prabhu, S., Manoukis, N., Smith, T.B. **2007**. Multiple paternity and sperm storage lead to increased genetic diversity in *Anolis* lizards. *Evolutionary Ecology Research*, **9**:495-503.

Cardozo, G., Chiaraviglio, M. **2011**. Phenotypic plasticity of life history traits in relation to reproductive strategies in *Boa constrictor occidentalis*. *Evolutionary Ecology*, **25**: 1163-1177.

Cardozo, G., Naretto, S., Chiaraviglio, M. **2012**. The role of landscape in contact zones of lizard sister species. Pp. 161-176, en INTECH (eds.), Perspectives on Nature Conservation – Patterns, Pressures and Prospects Croacia.

Cardozo, G.; Naretto, S; Blengini, C.S. y M. Chiaraviglio. Phenotypic diversification in female body shape is related to reproductive potential in *Tupinambis merianae* lizards. *Annales Zoologici Fennici*, (En revisión).

Cardullo, R.A., Baltz, J.M. **1991**. Metabolic regulation in mammalian sperm: mitochondrial volume determines sperm length and flagellar beat frequency. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **19**: 180-188.

Carretero, M., Ribeiro, R., Barbosa, D., Sa-Sousa, P., Harris, D.J. **2006**. Spermatogenesis in two Iberian Podarcis lizards: relationships with male traits. *Animal Biology*, **56**:1-12.

Chang, A.S. **2004**. Conespecific sperm precedence in sister species of *Drosophila* with overlapping ranges. *Evolution*, **58**:781-789.

CITES, CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES. Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. Appendix I. Available at <http://www.cites.org/eng/app/appendices.shtml>. 2008.

Clutton-Brock, T.H., Vincent, A.C.J. **1991**. Sexual selection and the potential reproductive rates of males and females. *Nature*, **351**, 58–60.



Cody, M.L. **1973**. Character convergence. *Annual Review Ecology and Systematics*, **4**:189-211.

Colli G.R., Teixeira R.D., Scheltinga D.M., Mesquita D.O., Wiederhecker H.C., B'ao S.N. **2007**. Comparative study of sperm ultrastructure of five species of teiid lizards (Teiidae, Squamata), and *Cercosaura ocellata* (Gymnophthalmidae, Squamata). *Tissue and Cell*, **39**: 59–78.

Cordero-Rivera, A., Andres, J.A., Cordoba-Aguilar, A., Utzeri, U. **2004**. Allopatric evolution of sperm competition mechanisms and genital morphology in Calopterygid Damselflies (Insecta: Odonata). *Evolution*, **58**(2):349-359.

Corl, A., Davis A. R., Kuchta S. R., Comendant T., Sinervo B. **2010**. Alternative mating strategies and the evolution of sexual size dimorphism in the side-blotched lizard, *Uta stansburiana*: a population level comparative analysis. *Evolution*, **64**: 79–96.

Cornwallis, C.K., Birkhead, T.R. **2007**. Changes in sperm quality and numbers in response to experimental manipulation of male social status and female attractiveness. *American Naturalist*, **170**(5):758-770.

Coyne, J.A., Orr, H.A. **2004** Speciation. Sinauer Associates Inc., Sunderland

Cramer, E.R.A., Laskemoen, T., Kleven, O., Lifjeld, J.T. **2013**. Sperm length variation in House Wrens *Troglodytes aedon*. *Journal of Ornithology*, **154**: 129-138.

Crean, J.A., Marshall, D.J. **2008**. Gamete plasticity in a broadcast spawning marine invertebrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**(36):13508-13513.

Cummins, J. **2009**. Sperm motility and energetic. Pp. 185-206 en T.R. Birkhead, D.J. Hosken & S. Pitnick (eds.), *Sperm Biology: An Evolutionary Perspective* Academic Press, Burlington.

## D

Del Barco-Trillo, J., Tourmente, M., Roldan, E.R.S. **2013**. Metabolic Rate Limits the Effect of Sperm Competition on Mammalian Spermatogenesis. *PLoS ONE*, **8**(9): e76510.

Depeiges, A., Dacheux J. L. **1985**. Acquisition of sperm motility and its maintenance during storage in the lizard, *Lacerta vivipara*. *Journal of Reproduction and Fertility*, **74**:23-27.

Dobzhansky, T. **1951**. Genetics and the origin of species. Columbia Univ. Press, New York

Donoghue, A.M., Sonstegard T.S., King L.M., Smith E.J., Burt D.W. **1999**. Turkey sperm mobility influences paternity in the context of competitive fertilization. *Biology of Reproduction*, **61**:422-427.

Duvall, D., Arnold S. J., Schuett G.W. **1992**. Pitviper mating systems: Ecological potential, sexual selection and microevolution. Pp. 321-336 *en* J. A. Campbell, E. D. Brodie Jr., eds. Biology of the Pitvipers. Selva Press Tyler, Texas.

## E

Eady, P. **2001**. Postcopulatory, prezygotic reproductive isolation. *Journal of Zoology London*, **253**:47-52.

Eberhard, W.G. **1996**. Female control: sexual selection by cryptic female choice. Princeton, NJ: Princeton University Press.

Eddy, E.M., Toshimori, K., O'Brien, D.A. **2003**. Fibrous sheath in mammalian spermatozoa. *Microscopy Research and Technique*, **61**:103-115.

Emlen, S.T., Oring L.W. **1977**. Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science*, **197**: 215-223.

Evans, J. P., Zane, L., Francescato, S., Pilastro, A. **2003**. Directional postcopulatory sexual selection revealed by artificial insemination. *Nature*, **421**, 360-363.

Emlen, D. J. **2001**. Costs and the diversification of exaggerated animal structures. *Science*, **291**:1534-1536.

Evans J.P. **2010**. Quantitative genetic evidence that males trade attractiveness for ejaculate quality in guppies. *Proceedings of the Royal Society Series of London Series B*, **277**: 3195-3201.

Evans, J.P., Rosengrave, P., Gasparini, C., Gemmill, N.J. **2013**. Delineating the roles of males and females in sperm competition. *Proceedings of the Royal Society Series of London Series B*, **280**: 2013-2047.

Engqvist, L., Reinhold, K. **2005**. Pitfalls in experiments testing predictions from sperm competition theory. *Journal of Evolutionary Biology*, **18**:116–123.

Engqvist, L. **2011**. Male attractiveness is negatively genetically associated with investment in copulations. *Behavioral Ecology*, **22**, 345-349.

Engqvist, L. **2013**. A general description of additive and non-additive elements of sperm competitiveness and their relation to male fertilization success. *Evolution*, **67**(5): 1396-1405.

## F

Fawcett, D.W. **1975**. The mammalian spermatozoon. *Developmental Biology*, **44**:394-436.

Ferramosca, A., Zara, V. **2014**. Bioenergetics of Mammalian Sperm Capacitation. *Bio Med Research International*, 902953.

Ferreira, A., Dolder, H. **2003**. Sperm ultrastructure and spermatogenesis in the lizard, *Tropidurus itambere*. *Biocell*, **27**(3): 353-362.

Firman, R.C., Simmons, L.W. **2010**. Sperm midpiece length predicts sperm swimming velocity in house mice. *Biology Letters*, doi:10.1098/rsbl.2009.1027.

Fitzgerald, L.A., Cruz, F.B., Perotti G. **1993**. The reproductive cycles and the size at maturity of *Tupinambis rufescens* (Sauria: Teiidae) in the Dry Chaco of Argentina. *Journal of Herpetology*, **27**:70-78.

Fitzpatrick, J.L., Desjardins, J.K., Milligan, N., Montgomerie, R., Balshine, S. **2007**. Reproductive-tactic-specific variation in sperm swimming speeds in a shell-brooding cichlid. *Biology of Reproduction*, **77**:280–284.

Fitzpatrick, J. L., Montgomerie, R., Desjardins, J. K., Stiver, K. A., Kolm, N., Balshine, S. **2009**. Female promiscuity promotes the evolution of faster sperm in cichlid fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 1128-1132.

Fitzpatrick, J. L., Alambro, M., Gonzalez-Voyer, A., Kolm, N. and Simmons, L. W. **2012**. Male contest competition and the coevolution of weaponry and testes in pinnipeds. *Evolution*, **66**: 3595–3604.

Friberg, M., Leimar, O., Wiklund, C. **2013**. Heterospecific courtship, minority effects and niche separation between cryptic butterfly species. *Journal of Evolutionary Biology*, **26**:971-979.

Froman, D.P., Pizzari, T., Feltmann, A.J., Castillo, H., Birkhead, T.R. **2002**. Sperm mobility: mechanisms of fertilizing efficiency, genetic variation and phenotypic relationship with male status in the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **269**: 607-612.

## G

Gage, M.J.G. **1994**. Associations between body size, mating pattern, testis size and sperm lengths across butterflies. *Proceedings of the Royal Society Series of London Series B*, **258**: 247-254.

Gage, M.J.G., Macfarlane C., Yeates S., Shackleton R., Parker G. A. **2002**. Relationships between sperm morphometry and sperm motility in the Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, **61**:1528–1539.

Gage, M.J.G., Macfarlane, C.P., Yeates, S., Ward, R.G., Searle, J.B., Parker, G.A. **2004**. Spermatozoal Traits and Sperm Competition in Atlantic salmon: Relative Sperm Velocity Is the Primary Determinant of Fertilization Success. *Current Biology*, **14**: 44-47.

Gasparini, C., Simmons, L.W., Maxine Beveridge, M., Evans, J.P. **2010**. Sperm Swimming Velocity Predicts Competitive Fertilization Success in the Green Swordtail *Xiphophorus helleri*, *PLoS ONE*, **5**(8): e12146.

Gasparini, C., Serena, G., Pilastro, A. **2013**. Do unattractive friends make you look better? Context-dependent male mating preferences in the guppy. *Proceedings of the Royal Society Series of London Series B*, **280**:1756.

Gastmann, O., Burfeind, P., Günther, E., Hameister, H., Szpirer, C., Hoyer-Fender, S. **1993**. Sequence, expression, and chromosomal assignment of a human sperm outer dense fiber gene. *Molecular Reproduction and Development*, **36**(4):407-418.

Giugliano, L.G., Teixeira, R.D., Colli, G.R., Bão, S.N. **2002**. Ultrastructure of spermatozoa of the lizard *Ameiva ameiva*, with considerations on polymorphism within the family Teiidae (Squamata). *Journal of Morphology*, **253**(3):264-71.

Gomendio, M., Roldan E.R.S. **1991**. Sperm competition influences sperm size in mammals. *Proceedings of the Royal Society Series of London Series B*, **243**: 181-185.

Gomendio, M., Harcourt, A.H., Roldan, E.R.S. **1998**. Sperm competition in mammals. Pp. 667-756, *en*: Birkhead, T. R. y Mølller, A. P. (Eds.), *Sperm Competition and Sexual Selection*. Academic Press, San Diego, US.

Gomendio, M., Martin-Coello, J., Crespo, C., Magaña, C., Roldan, E.R.S. **2006**. Sperm competition enhances functional capacity of mammalian spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **103**: 15113-15117.

Gomendio, M., Malo, A.F., Garde, J., Roldan, E.R.S. **2007**. Sperm traits and male fertility in natural populations. *Reproduction*, **134**: 19-29.

Gomendio, M., Roldan, E.R.S. **2008**. Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. *International Journal of Developmental Biology*, **52**: 439-447.

Grether, G.F., Losin, N., Anderson, C.N., Okamoto, K. **2009**. The role of interspecific interference competition in character displacement and the evolution of competitor recognition. *Biological Review*, **84**:617-635.

## H

- Halloy, M. **1996**. Behavioral patterns in *Liolaemus quilmes* (Tropiduridae), a South American lizard. *Bulletin of the Maryland Herpetological Society*, **32**: 43-57.
- Halloy, M. **2012**. Visual display variation in neotropical lizards, *Leolaemus Quilmes* (Iguania: Leolaemidae): Relation to sex and season. *Herpetological Journal*, **22**(4):267-270.
- Haugland, T., Rudolfsen, G., Figenschou, L., Folstad, I. **2009**. Sperm velocity and its relation to social status in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Animal Reproduction Science*, **115**:231-237.
- Helfenstein, F., Podelvin, M., Richner, H. **2010**. Sperm morphology, swimming velocity, and longevity in the house sparrow *Passer domesticus*. *Behavioral, Ecology and Sociobiology*, **64**:557-565.
- Hellriegel, B., Blanckenhorn, W.U. **2002**. Environmental influences on the gametic investment of yellow dung fly males. *Evolutionary Ecology*, **16**:505-522.
- Hettey, A., Roberts J.D. **2006**. Sperm traits of the quacking frog, *Crinia Georgiana*: intra- and interpopulation variation in a species with a high risk of sperm competition. *Behavioral, Ecology and Sociobiology*, **59**:389-396.
- Holt, W.V., Loyd R.E. **2010**. Sperm storage in the vertebrate female reproductive tract: How does it work so well?. *Theriogenology*, **73**:713-722.
- Hosken, D.J., Ward, P.I. **2001**. Experimental evidence for testis size evolution via sperm competition. *Ecology Letter*, **4**:10-13.
- Hosken, D.J., Taylor, M.L., Hoyle, K., Higgins, S., Wedell, N. **2008**. Attractive males have greater success in sperm competition. *Current Biology*, **18**:553-554.
- Howard, D.J. **1993**. Reinforcement: origin, dynamics, and fate of an evolutionary hypothesis. Pp. 46-69, *en*: Harrison RG (ed.) Hybrid zones and the evolutionary process, Oxford Univ. Press, New York,
- Howard, D.J., Palumbi, R.S., Birge, L.M., Manier, M.K. **2009**. Sperm and speciation. Pp. 367-403, *en*: Birkhead TR, Hosken DJ, Pitnick S (eds.) Sperm biology: an evolutionary perspective, Academic Press, San Diego.

Huyghe, K., Vanhooydonck, B., Scheers, H., Molina-Borja, M., Van Damme, R. **2005**. Morphology, performance and fighting capacity in male lizards, *Gallotia galloti*. *Functional Ecology*, **19**(5):800-807.

Humphries, S., Evans, J.P., Simmons, L.W. **2008**. Sperm competition: linking form to function. *BMC Evolutionary Biology*, **8**:319.

Hunter, F.M., Birkhead, T.R. **2002**. Sperm Viability and Sperm Competition in Insects. *Current Biology*, **12**: 121-123.

## I

Immler, S., Calhim, S., Birkhead, T.R. **2008**. Increased postcopulatory sexual selection reduces the intra-male variation in sperm design. *Evolution*, **62**:1538-1543.

Immler, S., Pryke, S.R., Birkhead, T.R., Griffith, S.C. **2010**. Pronounced within-individual plasticity in sperm morphometry across social environments. *Evolution*, **64**:1634-1643.

## J

Jennions, M.D., Passmore, N.I. **1993**. Sperm competition in frogs: testis size and a 'sterile male' experiment on *Chiromantis xerampelina* (Rhacophoridae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **50**: 211-220.

Johnson, D.D.P., Briskie, J.V. **1999**. Sperm competition and sperm length in shorebirds. *Condor*, **101**:848-854.

## K

Kaliontzopoulou, A., Carretero, M.A., Llorente, G.A. **2007**. Multivariate and geometric morphometrics in the analysis of sexual dimorphism variation in *Podarcis* lizards. *Journal of Morphology*, **268**:152-165.

Karsten, K.B., Andriamandimbiariso, L.N., Fox, S.F., Raxworthy, C.J. **2009**. Sexual selection on body size and secondary sexual characters in 2 closely related, sympatric chameleons in Madagascar. *Behavioral Ecology*, **20**(5):1079-1088.

Katz, D.F., Drobnis, E.Z. **1990**. Analysis and interpretation of the forces twterated by spermatozoa. Pp. 125-137 *en* B. D. Bavister, J. Cummins and E. R. S. Roldan eds. Fertilization in Mammals. Serono Symposia, Norwell, MA.

Keogh, J.S., Umbers, K.D.L., Wilson, E., Stapley, J., Whiting, M.J. **2013**. Influence of alternate reproductive tactics and pre- and postcopulatory sexual selection on paternity and offspring performance in a lizard. *Behavioral, Ecology and Sociobiology*, **67** (4):629-638.

Kleven, O., Laskemoen, T., Fossoy, F., Robertson, R.J., Lifjeld, J.T. **2007**. Intra-specific variation in sperm length is negatively related to sperm competition in passerine birds. *Evolution*, **62**:494-499.

Kleven, O., Fossoy, F., Laskemoen, T., Robertson, R.J., Rudolfsen, G., Lifjeld, J.T. **2009**. Comparative evidence for the evolution of sperm swimming speed by sperm competition and female sperm storage duration in passerine birds. *Evolution*, **63**:2466–2473.

Klug, H., Lindström, K., Kokko, H. **2010**. What to include in measures of sexual selection is no trivialmatter. *Ecology Letter*, **13**:1094–1102.

Kvarnemo, C., Merilaita, S. **2006**. Mating distribution and its temporal dynamics affect operational sex ratio: a simulation study. *Biological Journal of the Linnean Society*, **89**: 551–559.

Kvarnemo, C., Simmons, L.W. **2013**. Polyandry as a mediator of sexual selection before and after mating. *Philosophical Transactions of the Royal Society, Series B*, **368**:20120042.

## L

Langkilde, T., Shine, R. **2007**. Interspecific conflict in lizards: Social dominance depends upon an individual's species not its body size. *Austral Ecology*, **32**:869-877.

Lailvaux, S., Irschick, D.J. **2006**. A functional perspective on sexual selection: insights and future prospects. *Animal Behaviour*, **72**(2), 263-273.



- Laloi, D., Richard, M., Lecomte, J., Massot, M., Clobert, J. **2004**. Multiple paternity in clutches of common lizard *Lacerta vivipara*: data from microsatellite markers. *Molecular Ecology*, **13**:719–723.
- Lanfri, S., Di Cola, V., Naretto, S., Chiaraviglio, M., Cardozo, G. **2013**. Understanding the ecological niche to elucidate spatial strategies of the southernmost *Tupinambis* lizards. *Amphibia-Reptilia*, **34**(4): 551-565.
- Lifjeld, J.T., Laskemoen, T., Kleven, O., Tiril, A., Pedersen, M., Lampe, H.M., Rudolfson, G., Schmoll, T., Slagsvold, T. **2012**. No Evidence for Pre-Copulatory Sexual Selection on Sperm Length in a Passerine Bird. *PLoS ONE*, **7**(2): e32611.
- Lindemann, C.B., Orlando, A., Kano, K.S. **1992**. The flagellar beat of rat sperm is organized by the interaction of two functionally distinct populations of dynein bridges with a stable central axonemal partition. *Journal of Cell Science*, **102**:249-260.
- Locatello, L., Pilsatro, A., Deana, R., Zarpellon, A., Rasotto, M.B. **2007**. Variation pattern of sperm quality traits in two gobies with alternative mating tactics. *Functional Ecology*, **21**: 975-981.
- Lopes, H.R., Abe, A.S. **1999**. Biología reproductiva e comportamiento do teiú, *Tupinambis merianae*, em cativeiro (Reptilia, Teiidae). Pp. 259–272. En: Fang, T.G., Montenegro, O.L., Bodmer, R.E. (Eds.) *Manejo y Conservación de Fauna Silvestre en América Latina*, Editorial Instituto e Ecología,) La Paz, Bolivia
- Lovich, J.E., Gibbons, J.W. **1992**. A review of techniques for quantifying sexual size dimorphism. *Growth, Dev. Aging*, **56** (4): 269-281.
- Lüpold, S., Linz, G.M., Birkhead, T.R. **2009a**. Sperm morphology and sperm velocity in passerine birds. *Proceedings of the Royal Society*, **276**(1659):1175-1181.
- Lüpold, S., Linz, G.M., Birkhead, T.R. **2009b**. Sperm design and variation in the New World blackbirds (Icteridae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **63**(6):899-909. Lüpold, S., Manier, M.K., Ala-Honkola, O., Belote, J.M., Pitnick, S. **2011**. Male *Drosophila*

*melanogaster* adjust ejaculate size based on female mating status, fecundity, and age. *Behavioral Ecology*, **22**: 184-191.

Lüpold, S., Brikhead, T.R., Westneat, D.F. **2012a**. Seasonal variation in ejaculate traits of male red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **66**(12):1607-1617.

Lüpold, S., Manier, M.K., Berben, K.S., Smith, K.J., Bryan, J., Daley, D., Buckley, S.H., Belote, J.M., Pitnick, S. **2012b**. How Multivariate Ejaculate Traits Determine Competitive Fertilization Success in *Drosophila melanogaster*. *Current Biology*, **22**(18):1667-72.

Lüpold, S., Tomkins, J.L., Simmons, L.W., Fitzpatrick, J.L. **2014**. Female monopolization mediates the relationship between pre- and postcopulatory sexual traits. *Nature Communications* **5**:3184.

## M

Malo, A.F., Roldan, E.R.S., Garde, J., Soler, A.J., Gomendio, M. **2005a**. Antlers honestly advertise sperm production and quality, *Proceedings of the Royal Society Series of London Series B*, **272**:149-157.

Malo, A.F., Garde, J., Soler, A.J., García, A.J., Gomendio, M., Roldan, E.R.S. **2005b**. Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biology of Reproduction*, **72**: 822-829.

Malo, A.F., Gomendio, M., Garde, J., Lang-Lenton, B., Soler, A.J., Roldan, E.R.S. **2006**. Sperm design and sperm function. *Biology Letter*, **2**:246-249.

Manier, M.K., Belote, J.M., Berben, K.S., Novikov, D., Stuart, W.T., Pitnick, S. **2010**. Resolving Mechanisms of Competitive Fertilization Success in *Drosophila Melanogaster*. *Science*, **5976**(328):354-35.

Manier, M.K., Belote, J.M., Berben, K.S., Lüpold, S., Ala-Honkola, O., Collins, W.F., Pitnick, S. **2013**. Rapid diversification of sperm precedence traits and processes among three sibling *Drosophila* species. *Evolution*, **67**:2348-2362.

Martins, E.P., Labra, A., Halloy, M., Tolman Thompson J. **2004**. Large-scale patterns of signal evolution: an interspecific study of *Liolaemus* lizard headbob displays. *Animal Behaviour*, **68**: 453-463.

Mautz, B.S., Møller, A.P., Jennions, M.D. **2013**. Do male secondary sexual characters signal ejaculate quality? A meta-analysis. *Biological Review*, **88**:669-682.

McCullough, E.L., Emlen, D.J. **2013**. Evaluating the costs of a sexually selected weapon: big horns at a small price. *Animal Behavior*, **86**(5):977-985.

Miki, K, Qu, W., Goulding, E.H., Willis, W.D., Bunch, D.O., Strader, L.F., Perreault, S.D., Eddy, E.M., O'Brien, D.A. **2004**. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **101**(47):16501-6.

Møller, A.P. **1988**. Testes size, ejaculate quality and sperm competition in birds. *Biological Journal of the Linnean Society*, **33**:273-283.

Møller, A.P. **1989**. Ejaculate quality, testes size and sperm production in mammals. *Functional Ecology*, **3**: 91-96.

Montoto, L.G., Magaña1, C., Tourmente, M., Martin-Coello, J., Crespo, C., Luque-Larena, J.J., Gomendio, M., Roldan, E.R.S. **2011**. Sperm Competition, Sperm Numbers and Sperm Quality in Muroid Rodents. *PLoS ONE*, **6**(3):e18173.

Morrow, E.H., Leijon, A., Meerupati, A. **2008**. Hemiclonal analysis reveals significant genetic, environmental and genotype x environment effects on sperm size in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology*, **21**(6):1692-702.

Mossman, J., Slate, J., Humphries, S., Birkhead, T.R. **2009**. Sperm morphology and velocity are genetically codetermined in the zebra finch. *Evolution*, **63**(10): 2730-2737.

## N

Naretto, S., Cardozo, G., Blengini, C.S., Chiaraviglio, M. **2014**. Sexual selection and dynamics of jaw muscle in *Tupinambis* lizards. *Evolutionary Biology*, **41**(2):192-200.

Naretto, S. **2014**. Estrategias reproductivas de lagartos (*Tupinambis merianae* y *Tupinambis rufescens*): Perspectiva ecológica y evolutiva de los sistemas de apareamiento. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Naretto, S., Blengini, C.S., Cardozo, G., Chiaraviglio, M. Pre- and post-copulatory traits of *Tupinambis* male lizards in allopatry and sympatry. *Journal of Zoology*.

Narisawa, S., Hecht, N.B., Goldberg, E., Boatright, K.M., Reed, J.C., Millán, J.L. **2002**. Testis-Specific Cytochrome *c*-Null Mice Produce Functional Sperm but Undergo Early Testicular Atrophy. *Molecular Cell Biology*, **22**(15): 5554-5562.

Neff, D.F., Fu, P., Gross, M.R. **2003**. Sperm investment and alternative mating tactics in bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Behavioral Ecology*, **14**(5): 634-641.

Noriyuki, S., Osawa, N., Nishida, T. **2012**. Asymmetric reproductive interference between specialist and generalist predatory ladybirds. *Journal of Animal Ecology*, **81**:1077-1085.

## O

Oliveira, R., Taborsky, M., Brockmann, H.J. **2008**. Alternative Reproductive Tactics: An Integrative Approach. Cambridge University Press

Oliver, S.C., Jamieson, B.G.M., Scheltinga, D.A. **1996**. The ultrastructure of spermatozoa of Squamata. II Agamidae, Varanidae, Colubridae, Elapidae, and Boidae (Reptilia). *Herpetologica*, **52**(2):216-241.

Olsson, M., Shine, R., Madsen, T., Gullberg, A., Tegelström, H. **1996**. Sperm selection by females. *Nature*, **383**, 58.

Olsson, M., Madsen, T., Shine, R. **1997**. Is sperm really cheap? Costs of reproduction in male adders, *Vipera berus*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Science*, **264**(1380): 455-459.

Olsson, M., Madsen, T. **1998**. Sexual selection and sperm competition in reptiles. Pp. 503-578, en T. R. Birkhead & A.P. Møller (eds.), *Sperm competition and sexual selection*. Academic Press, San Diego, California.

Olsson, M., Madsen, T. **2001**. Promiscuity in Sand Lizard (*Lacerta agilis*) and Adder Snakes (*Vipera berus*): Causes and Consequences. *Journal of Heredity*, **92** (2).

Olsson, M. **2001**. “Voyeurism” prolongs copulation in the dragon lizard *Ctenophorus fordi*. *Behavioral, Ecology and Sociobiology*, **50**:378-381.

Olsson, M., Schwartz, T., Uller, T., Healey, M. **2007**. Sons are made from old stores: sperm storage effects on sex ratio in a lizard. *Biology Letter*, **22**; 3(5):491-3.

## **P**

Paoli, D., Gallo, M., Rizzo, F., Baldi, E., Francavilla, S., Lenzi, A., Lombardo, F., Gandini, L. **2011**. Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. *Fertility and Sterility*, **95**(7):2315-2319.

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

Parker, G.A., Begon, M.E. **1993**. Sperm competition games: sperm size and sperm number under gametic control. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Science*, **253**:255-262.

Parker, G.A. **1998**. Sperm competition and evolution of ejaculates: towards a theory base. Pp. 3-54 *en* T. R. Birkhead and A. P. Møller, eds. Sperm Competition and Sexual Selection. Academic Press, San Diego, California.

Parker, G.A., Partridge, L. **1998**. Sexual conflict and speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society, Series B*, **353**:261-274.

Parker, G.A., Pizzari, T. **2010**. Sperm competition and ejaculate economics. *Biological Review of the Cambridge Philosophical Society*, **85**(4):897-934.

Parker, G.A., Lessells, C.M., Simmons, L.W. **2012**. Sperm competition games: a general model for precopulatory male–male competition. *Evolution*, **67**: 95-109.

Parker, G.A., Birkhead, T.R. **2013**. Polyandry: the history of a revolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society, Series B*, **368**:20120335.

- Perry, J.C., Sirot, L., Wigby, S. **2013**. The seminal symphony: how to compose an ejaculate *Trends in Ecology and Evolution*, **28**(7): 414-422.
- Pigliucci, M., Preston, K. **2004**. Phenotypic Integration Studying the Ecology and Evolution of Complex Phenotypes. Oxford University Press.
- Pitcher, T.E., Doucet, S.M., Beausoleil, J.M., Hanley, D. **2009**. Secondary sexual characters and sperm traits in salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Journal Fish Biology*, **74**(7):1450-61.
- Pitnick, S., Miller, G.T., Reagan, J., Holland, B. **2001**. Males' evolutionary responses to experimental removal of sexual selection. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Science*, **268**:1071-1080.
- Pitnick, S., Hosken, D.J., Birkhead, T.R. **2009a**. Sperm morphological diversity. Pp. 69-149, *en* T.R. Birkhead, D.J. Hosken & S. Pitnick (eds.), *Sperm Biology: An Evolutionary Perspective* Academic Press, Burlington.
- Pitnick, S., Wolfner, M.F., Suarez, S.S. **2009b**. Ejaculate-female and sperm-female interactions. Pp. 247-304, *en* T.R. Birkhead, D.J. Hosken & S. Pitnick (eds.), *Sperm Biology: An Evolutionary Perspective*. Academic Press, Burlington.
- Pizzari, T., Parker, G.A. **2009**. Sperm competition and sperm phenotype. Pp. 207-245 *en* T.R. Birkhead, D.J. Hosken & S. Pitnick (eds.), *Sperm Biology: An Evolutionary Perspective* Academic Press, Burlington.
- Porini, G.M. **2006**. Proyecto *Tupinambis*: Una propuesta para el manejo de *Tupinambis rufescens* y *T. merianae* en la Argentina. In M.L. Bolkovic & D. Ramadori (eds.), *Manejo de Fauna Silvestre en la Argentina. Programas de uso sustentable*. Dirección de Fauna Silvestre, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires.
- Preston, B.T., Stevenson, I.R., Pemberton, J.M., Wilson, K. **2001**. Dominant rams lose out by sperm depletion. *Nature*, **409**:681-682.
- Preston, B.T., Stevenson, I.R., Pemberton, J.M., Coltman, D.W., Wilson, K. **2003**. Overt and covert competition in a promiscuous mammal: the importance of weaponry and testes size to male reproductive success. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Science*, **270**:633-640.

Procter, D.S., Moore, A.J., Miller, C.W. **2012**. The form of sexual selection arising from male–male competition depends on the presence of females in the social environment. *Journal of Evolutionary Biology*, **25**:803-812.

## R

Reuter, M., Linklater, J.R., Lehmann, L., Fowler, K., Chapman, T., Hurst, G.D. **2007**. Adaptation to experimental alterations of the operational sex ratio in populations of *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, **62**(2): 401-412.

Rojas, B., Endler, J.A. **2013**. Sexual dimorphism and intra-population colour pattern variation in the aposematic frog *Dendrobates tinctorius*. *Evolutionary Ecology*, **27**:739-753.

Rosenthal, G.G. **2013**. Individual mating decisions and hybridization. *Journal of Evolutionary Biology*, **26**:252-255.

Rudolfson, G., Figenschou, L., Folstad, I., Tveiten, H., Figenschou, M. **2006**. Rapid adjustments of sperm characteristics in relation to social status. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Science*, **273**(1584): 325-332.

Ruiz-Pesini, E., Diez, C., Lapena, A.C., Perez-Martos, A., Montoya, J., Alvarez, E.,

Arenas, J., Lopez-Perez, M.J. **1998**. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clinical Chemistry*, **44**, 1616-1620.

Ruiz-Pesini, E., Diez-Sanchez, C., Lopez-Perez, M.J., Enriquez, J.A. **2007**. The role of the mitochondria in sperm function: Is there a place of oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process? *Current Topics in Developmental Biology*, **7**: 3-19.

## S

Schulte-Hostedde, A.I., Montgomerie, R. **2006**. Intraspecific variation in ejaculate traits of the northern watersnake (*Nerodia sipedon*). *Journal of Zoology*, **270**:147-152.

Sever, D.M., Hamlett, W.C. **2002**. Female sperm storage in reptiles. *Journal of Experimental Zoology*, **292** (2): 287-299.

- Servedio, M.R., Noor, M.A.F. **2003**. The role of reinforcement in speciation: Theory and data. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **34**:339-364.
- Sheldon, B.C. **1994**. Male phenotype, fertility and the pursuit of extra-pair copulations by female birds. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Science*, **257**:25e30.
- Shine, R., Webb, J.K., Lane, A., Mason, R.T. **2006**. Flexible mate choice: a male snake's preference for larger females is modified by the sizes of females encountered. *Animal Behavior*, **71**, 203–209.
- Short, R. V. **1981** Sexual selection in man and the great apes. Pp. 319–341, en C. E. Graham ed., Reproductive biology of the great apes New York: Academic Press.
- Simmons, L.W., Emlen, D.J. **2006**. Evolutionary trade-off between weapons and testes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **103**(44):16346-16351.
- Simmons, L.W., Fitzpatrick, J.L. **2012**. Sperm wars and the evolution of male fertility. *Reproduction*, **144**(5):519-534.
- Simpson, J.L., Humphries, S., Evans, J.P., Simmons, L.W., Fitzpatrick, J.L. **2013**. Relationships between sperm length and speed differ among three internally and three externally fertilizing species. *Evolution*.
- Snook, R.R. **2005**. Sperm in competition: not playing by the numbers. *Trends in Ecology and Evolution*, **20**(1): 46-53.
- Snook, R.R., Pizzari, T. **2012**. Post- copulatory Reproductive Strategies. In: *eLS*. John Wiley and Sons, Ltd: Chichester.
- Soulsbury, C., Iossa, G. **2010**. The impact of ovulation mode on sperm quantity and quality in mammals. *Evolutionary Ecology*, **24**:879-889.
- Stockley, P., Gage, M.J.G., Parker, G.A., Møller, A.P. **1997**. Sperm Competition in Fishes: The Evolution of Testis Size and Ejaculate Characteristics. *The American Naturalist*, **149**: 933-954.



Storey, B.T. **2008**. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *International Journal of Developmental Biology*, **52**:427-437.

Svensson, E.I. **2013**. Beyond hybridization: diversity of interactions with heterospecifics, direct fitness consequences and the effects on mate preferences. *Journal of Evolutionary Biology*, **26**:270-273.

## T

Tavares-Bastos, L., Texeira, R.D., Colli, G.R., B ao, S.N. **2002**. Polimorphism in the sperm ultrastructure among four species of lizards in the genus *Tupinambis* (Squamata: Teiidae). *Acta Zool gica* (Stockholm), **83**:297-307.

Teixeira, R.D, Vieira, G.H.C., Colli, G.R., B ao, S.N. **1999**. Ultrastructural study of spermatozoa of the Neotropical lizards, *Tropidurus semitaeniatus* and *Tropidurus torquatus* (Squamata, Tropiduridae). *Tissue & Cell*, **31**(3):308-317.

Teixeira, R.D, Scheltinga, D.M., Trauth, S.E., Colli, G.R., B ao, S.N. **2002**. A comparative ultrastructural study of spermatozoa of the teiid lizards *Cnemidophorus gularis*, *Cnemidophorus ocellifer*, and *Kentropyx altamazonica* (Reptilia, Squamata, Teiidae). *Tissue & Cell*, **34**(3):135-142.

Tokarz, R.R. **2008**. Males distinguish between former females residents of their territories and unfamiliar nonresident females as preferred mating partners in the lizards *Anolis sagrei*. *Journal of Herpetology*, **42**:260-264.

Tourmente, M., Giojalas, L.C., Chiaraviglio, M. **2008**. The ultrastructure of *Bothrops alternatus* and *Bothrops diporus* (Viperidae, Serpentes), and its possible relation to the reproductive features of the species. *Zoomorphology*.

Tourmente, M. **2008**. Los espermatozoides de Ofidios y su relación con el riesgo de competencia espermática. 120 pp. Tesis Doctoral. Doctorado en Ciencias Biológicas-Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales-Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina

Tourmente, M., Gomendio, M., Roldan, E.R.S., Giojalas, L.C., Chiaraviglio, M. **2009**. Sperm Competition and Reproductive Mode Influence Sperm Dimensions and Structure among Snakes. *Evolution*.

Tourmente, M., Gomendio, M., Roldan, E.R.S. **2011a**. Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. *BMC Evolutionary Biology*, **11**, 12.

Tourmente, M., Giojalas, L.C., Chiaraviglio, M. **2011b**. Sperm parameters associated with reproductive ecology in two snakes species. *Herpetologica*, **67**(1):58–70.

Tourmente, M., Rowe, M., González-Barroso, M.M., Rial, E., Gomendio, M., Roldan, E.R.S. **2013**. Postcopulatory Sexual Selection increases ATP content in rodent spermatozoa. *Evolution*, **67**(6): 1838-1846.

Tsuboi, M., Gonzalez-Voyer, A., Hoglund, J., Kolm, N. **2012**. Ecology and mating competition influence sexual dimorphism in Tanganyikan cichlids. *Evolutionary Ecology*, **26**:171-185.

Turner, R.M. **2006**. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, Fertility and Development*, **18**:25-38.

## U

Uller, T., Olsson, M. **2008**. Multiple paternity in reptiles: patterns and processes. *Molecular Ecology*, **17**:2566-2580.

## V

Vitt, L.J., Caldwell, J.P. **2009**. *Herpetology*, eds. California.

Vieira, G.H.C., Colli, G.R., B ao, S.N. **2004**. The ultrastructure of the spermatozoon of the lizard *Iguana iguana* (Reptilia, Squamata, Iguanidae) and the variability of sperm morphology among iguanian lizards. *Journal of Anatomy*, **204**:451-464.

Vladic, T.V., Afzelius, B.A., Bronnikov, G.E. **2001**. Sperm quality as reflected through morphology in Salmon alternative life histories. *Biology of Reproduction*, **66**: 98-105.

Vrech, D.E., Olivero, P.A., Mattoni, C.I., Peretti, A.V. **2014**. Testes mass, but not sperm length, increases with higher levels of polyandry in an ancient sex model. *PLoS One*. **9**(4):e94135.

## W

Wacker, S., Mobley, K., Forsgren, E., Myhre, L.C., de Jong, K., Amundsen, T. **2013**. Operational sex ratio but not density affect sexual selection in a fish. *Evolution*, **67**(7):1937-1949.

Wade, M. **1995**. The Ecology of sexual Selection: mean crowding of females and resource defense polygyny. *Evolutionary Ecology*, **9**(1):118-124.

Wedell, N., Gage, M.J.G., Parker, G.A. **2002**. Sperm competition, male prudence and sperm-limited females. *Trends in Ecology and Evolution*, **17**(7):313–320.

Whiting, M.J., Nagy, K.A., Bateman, P.W. **2003**. Evolution and maintenance of social status signaling badges: experimental manipulations in lizards. Pp. 47–82, *en*: Fox F, McCoy JK, Baird TA (eds) Lizard social behavior. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

WHO. **1987**. Laboratory Manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge: The Press Syndicate of the University of Cambridge.

Wigby, S., Chapman, T. **2004**. Female resistance to male harm evolves in response to manipulation of sexual conflict. *Evolution*, **58**:1028–1037.

## Y

Yangimachi, R. **1994**. in *The Physiology of Reproduction*, eds Knobil E, Neill JD (Raven, New York), 2nd Ed, pp 189–317.

## Z

Zamudio, K., Sinervo, B. **2000**. Polygyny, mate-guarding, and posthumous fertilization as alternative male mating strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**:14427-14432.

Zeng, Y., Lou, S.L., Liao, W.B., Jehle, R. **2014**. Evolution of sperm morphology in anurans: insights into the roles of mating system and spawning location. *BMC Evolutionary Biology*, **14**:104.

## **ANEXO: PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS**

## Variability in sperm form and function in the context of sperm competition risk in two *Tupinambis* lizards

Cecilia S. Blengini<sup>1</sup>, Naretto Sergio<sup>1</sup>, Cardozo Gabriela<sup>1</sup>, Laura C. Giojalas<sup>2</sup> & Chiaraviglio Margarita<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología del Comportamiento, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Instituto de Diversidad y Ecología Animal (IDEA) CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Av. Vélez Sársfield 299, X5000JJC Córdoba, Argentina

<sup>2</sup>Centro de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIByT) CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Av. Vélez Sarsfield 1611, X5016GCA Córdoba, Argentina

### Keywords

Postcopulatory sexual selection, sperm evolution, sperm morphometry, sperm velocity, Squamata.

### Correspondence

Cecilia S. Blengini, Instituto de Diversidad y Ecología Animal (IDEA) CONICET and Laboratorio de Biología del Comportamiento, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Av. Vélez Sársfield 299, Córdoba, CP: X5000JJC, Argentina.  
Tel: +54 9 351 3644819;  
E-mail: ceciliablengini@gmail.com

### Funding Information

The study was funded by Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT), MinCyT Córdoba -Préstamo BID-PID No. 013/2009, Secretaría de Ciencia y Tecnología (SeCyT), and Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Received: 4 July 2014; Revised: 6 September 2014; Accepted: 9 September 2014

doi: 10.1002/ece3.1262

## Introduction

Polyandry can promote the spatial and temporal overlap of ejaculates from multiple males within the female reproductive tract, promoting postcopulatory sexual selection and male adaptations that ensure success during sperm competition (Parker 1970; Snook 2005; Pizzari and Parker 2009). In taxa with high risk of sperm competition, females are more likely to mate with multiple males within a single reproductive cycle (Snook and Pizzari 2012), and males need to invest more energy in ejaculate

## Abstract

In polyandrous species, sperm morphometry and sperm velocity are under strong sexual selection. Although several hypotheses have been proposed to explain the role of sperm competition in sperm trait variation, this aspect is still poorly understood. It has been suggested that an increase in sperm competition pressure could reduce sperm size variation or produce a diversity of sperm to maximize male fertilization success. We aim at elucidating the variability of sperm morphometric traits and velocity in two *Tupinambis* lizards in the context of sperm competition risk. Sperm traits showed substantial variation at all levels examined: between species, among males within species, and within the ejaculate of individual males. Sperm velocity was found to be positively correlated with flagellum: midpiece ratio, with relatively longer flagella associated with faster sperm. Our results document high variability in sperm form and function in lizards.

traits (Parker 1998). Because sperm competition often favors the evolution of larger testes, relative testis mass is considered a reliable index of sperm competition risk (Tourmente et al. 2009, 2013; Snook and Pizzari 2012).

Sperm morphometry is under strong sexual selection and has been shown to evolve rapidly, with sperm having a variety of sizes and shapes both between and within species (Pitnick et al. 2009a). Sperm velocity is an important determinant of male fertility in noncompetitive (Malo et al. 2005; Gomendio et al. 2007; Gomendio and Roldan 2008) and competitive contexts (Birkhead et al.

1999; Gage et al. 2004; Gomendio and Roldan 2008; Pizzari and Parker 2009). Selection is expected to act on sperm form and function, but the evidence supporting this assumption remains controversial (Simmons and Fitzpatrick 2012; Gillies et al. 2013; Simpson et al. 2013).

Interspecific studies have found that sperm competition exerts directional selection for an increase in sperm size (Gomendio et al. 2007; Fitzpatrick et al. 2009; Lüpold et al. 2009a; Tourmente et al. 2011a) and sperm velocity (Lüpold et al. 2009a; Tourmente et al. 2011a). Because the structure and function of sperm components vary among taxa, sperm competition might have different effects on various components of sperm among taxa (Johnson and Briskie 1999; Gomendio and Roldan 2008; Tourmente et al. 2009, 2011a). Moreover, a positive relationship between total sperm size and swimming velocity was found in different taxa (Gomendio and Roldan 2008; Fitzpatrick et al. 2009; Tourmente et al. 2011a). This relationship is not clear at the intraspecific level, suggesting that the selective force may operate differently at the macro- and micro-evolutionary levels (Gomendio and Roldan 2008).

At the intraspecific level, postcopulatory sexual selection may play an important role in regulating among- and within-male sperm size variation (Calhim et al. 2007; Kleven et al. 2007; Immler et al. 2008; Helfenstein et al. 2010). On the one hand, an increase in sperm competition pressure might reduce among- and within-male variation in sperm size (Birkhead et al. 2005; Calhim et al. 2007; Kleven et al. 2007; Immler et al. 2008; Lifjeld et al. 2013; Van der Horst and Maree 2014) toward an optimal sperm design (Calhim et al. 2007). On the other hand, recent studies suggest that variation in sperm morphometry persists and may be an important determinant of relative reproductive fitness (Crean and Marshall 2008; Morrow et al. 2008; Immler et al. 2010; Bakker et al. 2014). Calhim et al. (2011) showed that variation can be maintained despite extreme promiscuity. Moreover, Helfenstein et al. (2010) proposed that an individual male may produce a diversity of sperm to maximize fertilization success in the context of sperm competition.

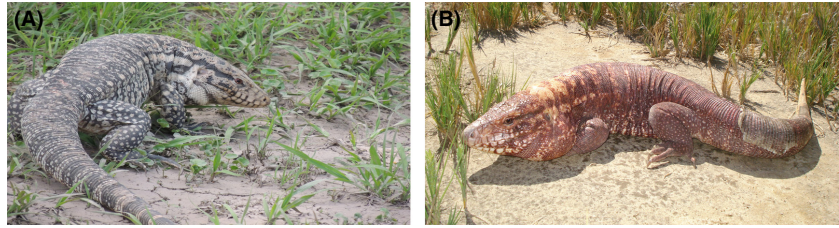
Recent studies focusing on within-male variation between ejaculates suggest that sperm morphometry (Immler et al. 2010; Calhim et al. 2011) and velocity (Lüpold et al. 2012) can be phenotypically plastic traits that can be adjusted to social environments. Moreover, there are evidences of within-ejaculate sperm size variation (Malo et al. 2006; Schulte-Hostedde and Montgomerie 2006; Helfenstein et al. 2010; Immler et al. 2010; Calhim et al. 2011; Lüpold et al. 2012; Lifjeld et al. 2013; Bakker et al. 2014; Van der Horst and Maree 2014). It has been argued that within-male variation in sperm size may represent developmental noise (Parker and Begon

1993; Hellriegel and Blanckenhorn 2002) or be influenced by male condition (Schulte-Hostedde and Montgomerie 2006). However, within-ejaculate sperm variation could be important to understand sperm diversification, which may be associated with variation in sperm function (Immler et al. 2010; Simpson et al. 2013). Phenotypic variation within individual ejaculates may be the result of sexual selection pressures; males may produce different specialized sperm, each one aiming at a different optimum (Pizzari and Parker 2009).

Because swimming speed is the result of the combination of different sperm components, ratios between the dimensions of different components seem better at explaining sperm swimming velocity than a single component (Gomendio and Roldan 2008; Humphries et al. 2008; Lüpold et al. 2009a; Fitzpatrick et al. 2010). Although several intraspecific studies have found no significant association between sperm size and velocity (Fitzpatrick et al. 2009; Lüpold et al. 2009b), other works have provided contrasting evidences (see Malo et al. 2006; Firman and Simmons 2010; Helfenstein et al. 2010). Recent studies showed the importance of taking into account the within-male variation in sperm traits to find the relationship between sperm morphometry and velocity (Fitzpatrick et al. 2010; Simpson et al. 2013).

Although a few studies have addressed sperm competition in Squamata (lizards and snakes) (Birkhead and Møller 1993; Olsson and Madsen 1998; Schulte-Hostedde and Montgomerie 2006; Tourmente et al. 2009), the mechanisms underlying success in sperm competition are not well understood. Most species of Squamata are polygynandrous (Duvall et al. 1992; Vitt and Caldwell 2009), that is, they exhibit a multi-male, multi-female polygamous mating system. Thus, there is ample opportunity for sperm competition arising from female matings with multiple partners within each ovarian cycle (Olsson and Madsen 1998; Zamudio and Sinervo 2000; Laloï et al. 2004). In some species, there is evidence of multiple paternity (Olsson and Madsen 1998; Calsbeek et al. 2007; Keogh et al. 2013), and females possess sperm storage structures (Sever and Hamlett 2002). However, the variability of sperm traits in relation to sperm competition risk has not been addressed in lizards.

Here we focused on two sister species, *Tupinambis merrianae* and *T. rufescens* (Cabaña et al. 2014) (Fig. 1), which are phenotypically similar, share ecological similarities (Cardozo et al. 2012), and exhibit sexual size dimorphism, with males larger than females. Moreover, males of these two species present sexual dimorphism in jaw muscle, a secondary sexual character that could be influenced by inter and intrasexual selection (Naretto et al. 2014). Furthermore, in both species, sex ratio is biased to males, especially in *T. rufescens*, suggesting that these



**Figure 1.** Males of *Tupinambis* lizards. (A) *Tupinambis merianae*; (B) *Tupinambis rufescens*.

species are exposed to different contexts of competition (Naretto et al. 2014). Hence, interpreting the variation in sperm traits in relation to sperm competition risk in two sister species may contribute to our understanding of selective pressures acting on sperm evolution.

We aim at elucidating the variability of sperm morphometric and dynamic traits in the context of sperm competition risk in *Tupinambis* lizards. We quantified the variation in sperm traits between species, and among and within males in each species. Furthermore, we show the relationship between sperm morphometry and velocity in lizards.

## Methods

### Study species

*Tupinambis merianae* and *T. rufescens* breed seasonally in spring (Fitzgerald et al. 1993). These lizard species are included in the Appendix II of the Convention on International Trade of Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES 2008); in Argentina, these lizards are under legal commercial harvesting (Porini 2006).

### Data collection

*Tupinambis* individuals were caught by local authorized hunters from wild populations in central Argentina (*T. rufescens*: 29°35'W, 64°10'S to 31°10'W, 63°15'S and *T. merianae*: 30°55'W, 63°40'S to 31°45'W, 62°15'S) throughout reproductive season, October to December (Naretto et al. 2014). Then, even individuals with low probability of capture are more likely to be trapped eventually (Biro 2013). We are authorized by the government environmental agencies for scientific capture, and we selected and accompanied local hunters to standardize the sampling protocol with the aim of avoiding size bias in capture rates. Specimens were killed for the legal skin trade, in accordance with AVMA Guidelines on Euthanasia (AVMA 2007). We weighed body mass and the mass of both testes of all individuals.

### Sperm sampling procedure

Specimens were dissected and spermatozoa were obtained from the terminal portion of the epididymis (Depeiges

and Dacheux 1985). Time elapsed between animal death and sperm analyses ranged from 2 to 3 h. During this period, sperm sample was not affected because the average percentage of progressive sperm was  $93.30 \pm 4.81\%$  in *T. merianae* and  $96.03 \pm 3.72\%$  in *T. rufescens*. Moreover, the viability of sperm sample was higher than 80% for both species.

All the samples obtained were collected in a 1.5 mL plastic tube containing approximately 90  $\mu\text{L}$  of phosphate buffered saline (PBS). Sperm concentration was estimated using a Neubauer chamber, and the samples were diluted to a concentration of  $1.10^6$  cells/mL in Biggers, Whitten, and Wittingham culture medium (Biggers et al. 1971) supplemented with 4% bovine serum albumin, prior to observation (Tourmente et al. 2011b).

### Sperm morphometry

We obtained sperm morphometric data from 74 males of *Tupinambis merianae* and 43 individuals of *T. rufescens* (Table 1). Aliquots of sperm samples were fixed for photography in 2% formaldehyde (Tourmente et al. 2009) and stained with Blue Brilliant Coomassie (Firman and Simmons 2010). The samples were examined at 400 $\times$  magnification under a phase contrast Nikon eclipse Ti microscope (Nikon Instruments Inc, Tokyo, Japan). Microphotographs of the samples were taken using Nikon DS-Qi1Mc digital camera with a controller DS-U2 (Nikon Instruments Inc). Absolute length ( $\mu\text{m}$ ) of head, midpiece and flagellum, and total sperm length of 50 spermatozoa per individual was measured using software Image J version 1.43u (NIH, Bethesda, MD). Then, the ratios of flagellum: head length, flagellum: midpiece length, and head: midpiece were estimated. All measurements were made by the same person to reduce potential interobserver variability. Mean trait values for each species were calculated from the means from each individual of that species.

### Sperm dynamic traits

We obtained sperm dynamics data from 82 males of *Tupinambis merianae* and 39 individuals of *T. rufescens* (Table 1). Aliquots (500  $\mu\text{L}$ ) of sperm sample were incubated at 25°C in thermally stable water baths for 30 min



**Table 1.** Comparison of sperm traits between *Tupinambis merianae* and *T. rufescens*.

Sperm traits	<i>T. merianae</i>	<i>T. rufescens</i>	Statistics	P-value
Head length ( $\mu\text{m}$ )	13.64 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup> 5.5 <sup>b</sup>	13.28 $\pm$ 1.04 7.83	$F = 4.20$	0.0428
Midpiece length ( $\mu\text{m}$ )	5.19 $\pm$ 0.29 5.6	4.94 $\pm$ 0.38 7.66	$F = 17.24$	<0.0001
Flagellum length ( $\mu\text{m}$ )	59.97 $\pm$ 1.23 2.05	57.69 $\pm$ 1.19 2.05	$F = 94.11$	<0.0001
Total sperm length ( $\mu\text{m}$ )	79.19 $\pm$ 1.22 1.55	76.32 $\pm$ 1.69 2.21	$F = 109.70$	<0.0001
Curvilinear velocity ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ )	31.52 $\pm$ 6.61 20.97	34.99 $\pm$ 7.5 22.93	$F = 5.83$	0.0172
Straight velocity ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ )	24.79 $\pm$ 5.63 22.71	27.79 $\pm$ 6.65 24.03	$F = 5.03$	0.0267
Linearity	0.78 $\pm$ 0.05 5.89	0.78 $\pm$ 0.04 5.18	$F = 0.00061$	0.9804
CV <sub>wm</sub> head length	7.24 $\pm$ 2.24	8.01 $\pm$ 2.62	$H = 3.40$	0.0651
CV <sub>wm</sub> midpiece length	9.71 $\pm$ 2.01	11.57 $\pm$ 2.35	$H = 15.93$	<0.0001
CV <sub>wm</sub> flagellum length	5.34 $\pm$ 1.91	5.76 $\pm$ 2.54	$H = 0.42$	0.5160
CV <sub>wm</sub> total sperm length	4.23 $\pm$ 1.44	4.7 $\pm$ 2.34	$H = 0.55$	0.4574
CV <sub>wm</sub> curvilinear velocity	20.87 $\pm$ 3.98	20.90 $\pm$ 4.79	$H = 0.04$	0.8320
CV <sub>wm</sub> straight velocity	31.46 $\pm$ 6.60	30.81 $\pm$ 6.40	$H = 0.07$	0.7872
CV <sub>wm</sub> linearity	18.90 $\pm$ 5.22	16.83 $\pm$ 3.84	$H = 3.92$	0.0476

a: Mean  $\pm$  SD; b: CV among males

(Tourmente et al. 2011b). The sperm suspension (20  $\mu\text{L}$ ) was placed in a plastic observation chamber and covered with a coverslip. Dynamic parameters were measured at room temperature (25°C) using a video microscopy system composed of a phase contrast microscope (CX41; Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a video camera (ICAM 1500; Labomed, Fremont, CA). The software used to capture the digital videos was Virtualdub v.1.6.16. The samples were recorded at 100 $\times$  magnification for 4 min with a random change of the microscope field every 5 sec. Subsequently, individual sperm tracks were followed for 3 sec in 45 cells/sample and transformed to a matrix of Cartesian coordinates using ImageJ version

1.43u (NIH) and its plug-in MtrackJ v. 1.1.0 (Eric Meijering). The following sperm dynamic parameters were calculated from this matrix using Spermtrack v. 4.2 (Universidad Nacional de Cordoba, Argentina): straight line velocity (VSL;  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ), curvilinear velocity (VCL;  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ), and linearity (LIN;  $\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL}$ ) (Blengini et al. 2011). Mean trait values for each species were calculated from the means of each individual of that species.

## Statistical analyses

The difference between species in relative testis mass (testis mass relative to body mass) was determined by an analysis of covariance (ANCOVA), using body mass as a covariable. As we observed that relative testis mass varied over the breeding season (*T. merianae*  $n = 92$ ;  $F = 10.85$ ,  $P < 0.0001$ ; *T. rufescens*  $n = 45$   $F = 2.90$ ,  $P = 0.0260$ ), then, we considered testis data only from lizards collected during the peak of the breeding season for each species. Testis mass and body mass were log<sub>10</sub> transformed.

To quantify among- and within-male variation in sperm traits, we calculated the coefficient of variation (CV) of sperm morphometric and dynamic traits for each male and calculated the mean for each trait from all males per species (Calhim et al. 2007). Statistical differences in the mean of sperm traits and within-male variation between species were determined by one-way nested ANOVA and Kruskal–Wallis, respectively. Moreover, in each species, differences in sperm traits among males were also determined by the nonparametric Kruskal–Wallis test. To test whether within-male variation of sperm traits was associated with testis development, we compared within-male variation of sperm traits among months during the breeding season (October–December) based on changes in testis mass over this period, using the nonparametric Kruskal–Wallis test. These statistical tests were conducted using InfoStat software (version 2012; Universidad de Cordoba, Argentina).

We used random models with restricted maximum likelihood parameter estimation function (REML) to partition total variance into variance between species and among and within males of a single species, and to estimate within-male and within-sperm (measurement) repeatability. To determine differences in within-male variation in sperm traits among males of each species, we ran two different models, one which initially assumed a common variance for individuals within each species, and the other in which variance was allowed to differ among individuals. The two models were compared using a likelihood ratio test to determine whether the intra-individual variance was significantly different for individuals of each species, following AIC criteria. These statistical tests

were conducted using the software R (version 2.13.0; The R Foundation for Statistical Computing 2011).

To test whether sperm length was associated with sperm velocity, we performed multiple regression analysis using head length, midpiece length, and flagellum length for each species as predictors. The colinearity of sperm morphometric traits was discarded previously. Furthermore, to test whether within-male variation of sperm morphometry was associated with sperm velocity, we also performed multiple regression analysis using CV in head length, CV in midpiece length and CV in flagellum length for each species as predictors. We also performed a single regression analysis with VCL, VSL as dependent variables, and flagellum: head length ratio, flagellum: midpiece length ratio and head: midpiece length ratio as predictors. These statistical tests were performed using InfoStat software (version 2012; Universidad de Córdoba, Argentina).

## Results

We found that *Tupinambis rufescens* had greater relative testis mass (ANCOVA  $F_{1,117} = 5.17$ ;  $P = 0.0248$ ) than *T. meriana*. Then, we explored interspecific sperm variation in the two species. *T. meriana*, had all sperm components longer than *T. rufescens*. However, *T. rufescens* presented higher sperm velocity than *T. meriana* (Table 1). Furthermore, no differences in the pattern of movement were observed between species (Table 1).

We also studied the variation in sperm traits among and within males of each species. Significant differences among males were found in all sperm morphometric and dynamic traits in both species (*T. meriana*, head length:  $H = 1544.95$ ,  $P < 0.0001$ ; midpiece length:  $H = 969.65$ ,  $P < 0.0001$ ; flagellum length:  $H = 1068.37$ ,  $P < 0.0001$ ; total sperm length:  $H = 985.74$ ,  $P < 0.0001$ ; VCL:  $H = 1749.09$ ,  $P < 0.0001$ ; VSL:  $H = 1128.71$ ,  $P < 0.0001$ ; and LIN:  $H = 363.69$ ,  $P < 0.0001$ . *T. rufescens*, head:  $H = 1161.6$ ,  $P < 0.0001$ ; midpiece:  $H = 622.68$ ,  $P < 0.0001$ ; flagellum:  $H = 465.4$ ,  $P < 0.0001$ ; total sperm length:  $H = 687.81$ ,  $P < 0.0001$ ; VCL:  $H = 787.23$ ,  $P < 0.0001$ ; VSL:  $H = 508.07$ ,  $P < 0.0001$ ; and LIN:  $H = 167.01$ ,  $P < 0.0001$ , Figs. 2, 3). However, within-male variation was always the highest source of variation of sperm traits in both species, ranging from 58% (head length) to 76% (flagellum length) of the total of the variance in sperm morphometric traits (Table 2, Fig. 2) and from 51% (VCL) to 94% (LIN) of the total of the variance in sperm dynamic traits (Table 2, Fig. 3). Furthermore, we found high repeatability of the measurements in all sperm traits measured, which ranged from 0.84 to 0.99 in *T. meriana* and from 0.75 to 0.99 in *T. rufescens* (Table 2).

To explore differences in within-male variation in sperm traits among males, the likelihood ratio test was performed in each species separately, and the null hypothesis that intra-individual variance in sperm traits is the same among individuals was rejected (Table 3, Figs. 2, 3). Moreover, we studied the temporal variation of within-male variability in sperm traits. In *T. meriana*, we did not find differences among months during the reproductive period (Table 4). However, in *T. rufescens*, we found differences in within-male variation of head length and total sperm length among months, with variation being higher in the middle of the season (November) (Table 4).

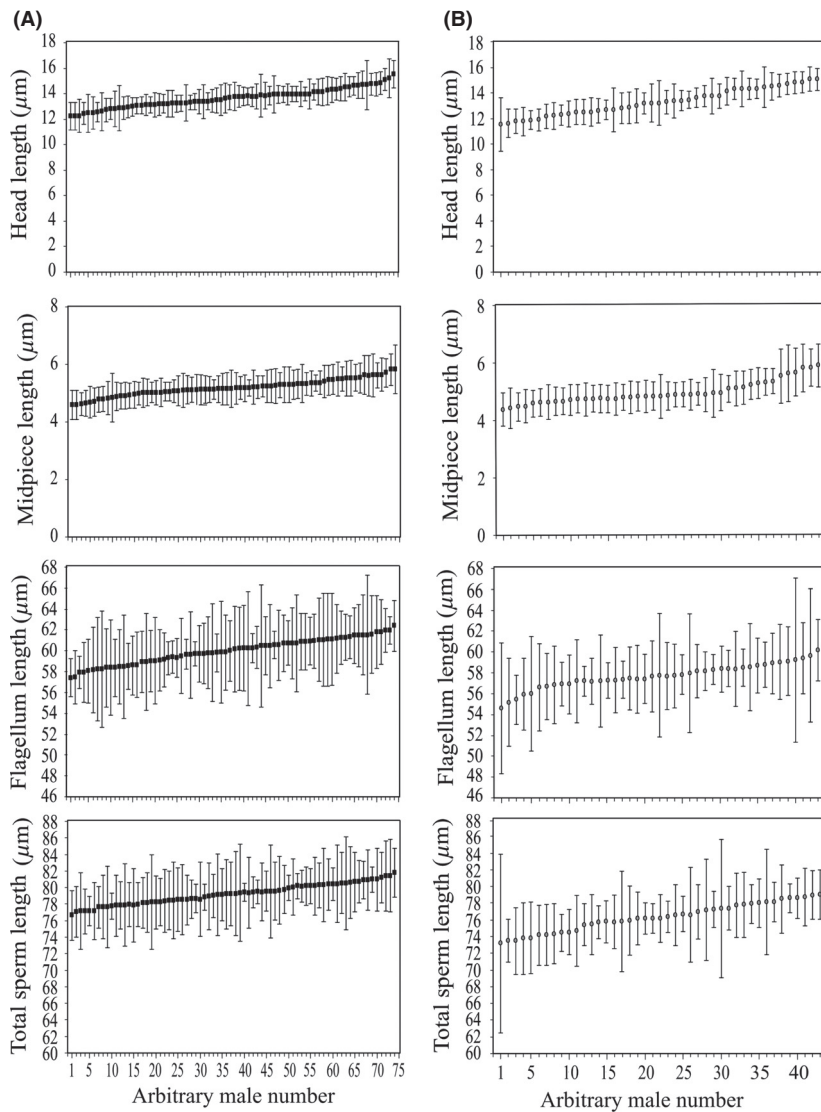
Finally, the comparison of CV of sperm morphometric traits showed that among males variation in head and midpiece length was higher in *T. rufescens*, whereas within males *T. rufescens* also had greater sperm variation of midpiece length than *T. meriana*. However, within-male variation in sperm dynamic traits was the same for both species (Table 1).

The relationship between sperm length and sperm velocity was evaluated in both species. We found that straight line velocity was negatively related to midpiece length and positively related to flagellum: midpiece ratio, with similar slopes between species (Table 5, Fig. 4). In addition, in *T. rufescens*, sperm velocity was positively related to flagellum length; this relationship was not found in *T. meriana* (Table 5). Moreover, we observed a positive relationship between within-male variation in head length and straight line velocity in *T. meriana* (slope: 0.81;  $F_{1,62} = 4.91$ ;  $P = 0.0304$ ). By contrast, in *T. rufescens*, we found a negative relationship between within-male variation in midpiece length and sperm velocity (slope:  $-1.36$ ;  $F_{1,33} = 7.48$ ;  $P = 0.01$ ). Because linearity was high, more than 78% for both species (Mortimer 1997), similar results were found when we used curvilinear velocity (Tables S1, S2, Fig. S1).

## Discussion

This study attempts to fill part of the striking lack of knowledge on the link between sperm morphometric and dynamic traits in the context of sperm competition risk in lizards. Sperm traits showed substantial variation at all levels examined: between species, among males within species, and within the ejaculate of individual males. Interestingly, in both *Tupinambis* species sperm velocity was found to be positively correlated with flagellum: midpiece ratio, with relatively longer flagella associated with faster sperm.

Because measuring postcopulatory sexual selection in wild animal populations is difficult, we inferred the risk of sperm competition based on reliable indicators of



**Figure 2.** Within- and among-male variation in sperm morphometric traits in *Tupinambis* lizards. (A) *Tupinambis merianae* (black squares); (B) *Tupinambis rufescens* (gray dots). Squares and dots represent individual mean lengths ( $\pm$ standard deviation) ranked in order of magnitude.

competition pressures. Here, we found differences in relative testis mass between *T. merianae* and *T. rufescens*. Moreover, Naretto et al. (2014) presented differences in the biased of sex ratio between these two species. The sexual proportion of individuals is often used as a predictor of the intensity of competition for mates, because it describes the relative number of males and females that are ready to mate (Kvarnemo and Simmons 2013). Then, these evidences suggest that, although they are sister species, they are under different competition pressures. Hence, if these species differed in competition context, we could expect differences in sperm traits. Here, we found that males of *T. merianae* present longer sperm than males of *T. rufescens*. Surprisingly, *T. rufescens* presented higher among-male sperm variation in head and midpiece

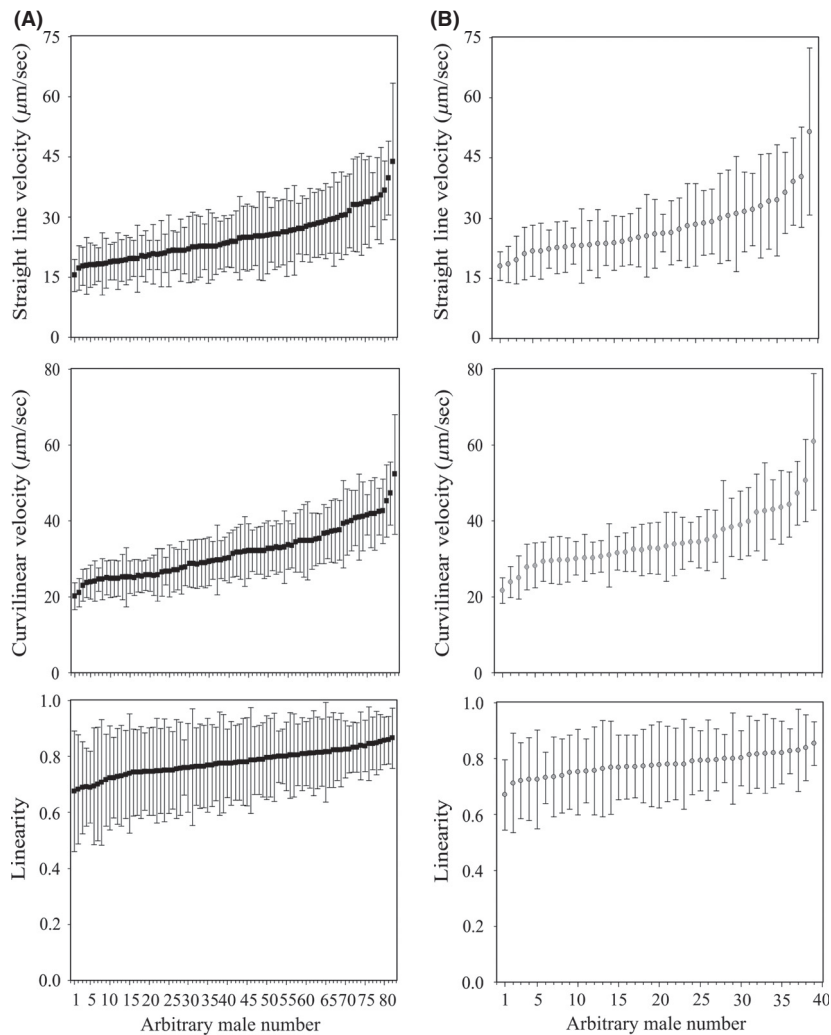
length, higher within-male variation in midpiece length, and higher sperm velocity than *T. merianae* males.

Male reproductive success is determined by the interaction between the ability to access and choose females of the highest reproductive quality and the ability to out-compete the ejaculates of rival males (Cornwallis and Birkhead 2007; Keogh et al. 2013). Because sperm production is costly (Olsson et al. 1997), individual males may adjust the investment to maximize net reproductive benefit according to their mating role (Rudolfson et al. 2006; Cornwallis and Birkhead 2007; Locatello et al. 2007), the number and quality of available females (Lüpold et al. 2011, 2012), and the risk and intensity of sperm competition (Parker 1998; Cornwallis and Birkhead 2007; Pizzari and Parker 2009; Kvarnemo and Simmons

**Table 2.** Partitioning of the variance in sperm morphometric and dynamic traits into: variance between species, among males of a single species, and within males.

	Source of variance							
	Between species	Among males	Within male	Total	Repeatability <i>T. merianae</i>	Measurement error <i>T. merianae</i>	Repeatability <i>T. rufescens</i>	Measurement error <i>T. rufescens</i>
Head length								
Variance estimate ± SD	0.048 ± 0.221	0.735 ± 0.857	1.092 ± 1.045	1.875	0.97	0.06	0.97	0.05
Midpiece length								
Variance estimate ± SD	0.0269 ± 0.164	0.100 ± 0.316	0.297 ± 0.545	0.424	0.84	0.05	0.75	0.04
Flagellum length								
Variance estimate ± SD	2.582 ± 1.607	1.235 ± 1.111	12.163 ± 3.487	15.98	0.96	0.2	0.98	0.13
Total length								
Variance estimate ± SD	4.123 ± 2.030	1.755 ± 1.325	13.782 ± 3.712	19.66	0.97	0.23	0.99	0.14
VCL								
Variance estimate ± SD	4.309 ± 2.076	46.442 ± 6.815	53.01 ± 7.281	103.761	0.97	1.6	0.96	1.64
VSL								
Variance estimate ± SD	2.726 ± 1.651	34.473 ± 5.871	74.078 ± 8.607	111.269	0.99	0.61	0.99	0.68
LIN								
Variance estimate ± SD	0 ± 0	0.0014 ± 0.038	0.021 ± 0.1436	0.0224	0.97	0.00082	0.92	0.0011

The variance due to measurement errors was obtained using 15 males of each species; five spermatozoa of each male were measured four times. All morphometric and dynamic traits showed high and significant measurement repeatability (Sperm morphometric traits: *T. merianae* all  $F_{74, 300} > 24.47, P < 0.0001$ ; *T. rufescens* all  $F_{74, 300} > 13.32, P < 0.0001$ ; sperm dynamic traits: *T. merianae* all  $F_{74, 300} > 119, P < 0.0001$ ; *T. rufescens* all  $F_{74, 300} > 46.14, P < 0.0001$ ).



**Figure 3.** Within- and among-male variation in sperm dynamic traits in *Tupinambis* lizards. (A) *Tupinambis merianae* (black squares); (B) *Tupinambis rufescens* (gray dots). Squares and dots represent individual mean lengths ( $\pm$ standard deviation) ranked in order of magnitude.

**Table 3.** Differences in within-male variation in sperm morphometric and dynamic traits among males in *Tupinambis merianae* and *T. rufescens*

Sperm traits	<i>T. merianae</i>		<i>T. rufescens</i>	
	L. ratio	<i>P</i>	L. ratio	<i>P</i>
Head length ( $\mu\text{m}$ )	616.348	0.0001	322.689	0.0001
Midpiece length ( $\mu\text{m}$ )	338.157	0.0001	226.093	0.0001
Flagellum length ( $\mu\text{m}$ )	937.725	0.0001	728.798	0.0001
Total sperm length ( $\mu\text{m}$ )	869.115	0.0001	816.444	0.0001
Curvilinear velocity ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ )	666.146	0.0001	454.042	0.0001
Straight velocity ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ )	721.528	0.0001	474.609	0.0001
Linearity	398.053	0.0001	131.623	0.0001

2013). Accordingly, males of *T. merianae* and *T. rufescens* may produce spermatozoa of variable sperm size and velocity. Furthermore, we found an important within-male variation for all sperm traits measured. Males may

produce a variety of sperm of different sizes as a strategy to maximize their fertilization success in a context of sperm competition (Helfenstern et al. 2010; Calhim et al. 2011). Moreover, because testis size changes throughout the breeding season, sperm morphology may vary within males during this period. This hypothesis would predict highly variable sperm at the beginning and the end of the season, when the testes are not in full breeding condition (Cramer et al. 2013). However, we found higher within-male variability in head length and total sperm length in the middle of the reproductive season (November), at the peak of maximum development of testis in *T. rufescens*, than at the beginning and the end of breeding season. These results suggest that a male may produce a mix of different sperm within a single ejaculate; this is important, because each component of spermatozoa may contribute with different functions and there might be trade-offs among functions (Pizzari and Parker 2009; Helfenstern

**Table 4.** Temporal variation in within-male variability in sperm traits of *Tupinambis*

Species	Sperm traits	Reproductive period			Statistic	P
		October	November	December		
<i>T. merianae</i> (n = 72)	CV Head length		7.30 ± 2.12	6.99 ± 2.28	0.76	0.3827
	CV Midpiece length		9.81 ± 1.69	9.61 ± 2.36	0.25	0.6162
	CV Flagellum length		5.59 ± 1.65	5.15 ± 2.17	1.11	0.2923
	CV Total sperm length		4.37 ± 1.22	4.11 ± 1.16	0.41	0.5209
<i>T. rufescens</i> (n = 41)	CV Head length	8.35 ± 3.29	8.87 ± 2.62	6.38 ± 1.76	12.68	0.0018
	CV Midpiece length	12.67 ± 2.47	11.58 ± 2.28	10.82 ± 2.08	3.77	0.1520
	CV Flagellum length	4.58 ± 1.96	6.29 ± 2.64	5.50 ± 2.84	3.31	0.1908
	CV Total sperm length	3.58 ± 1.44	5.49 ± 2.77	3.82 ± 1.42	6.57	0.0374

**Table 5.** Relationship between sperm straight line velocity and sperm morphometric traits in *Tupinambis*.

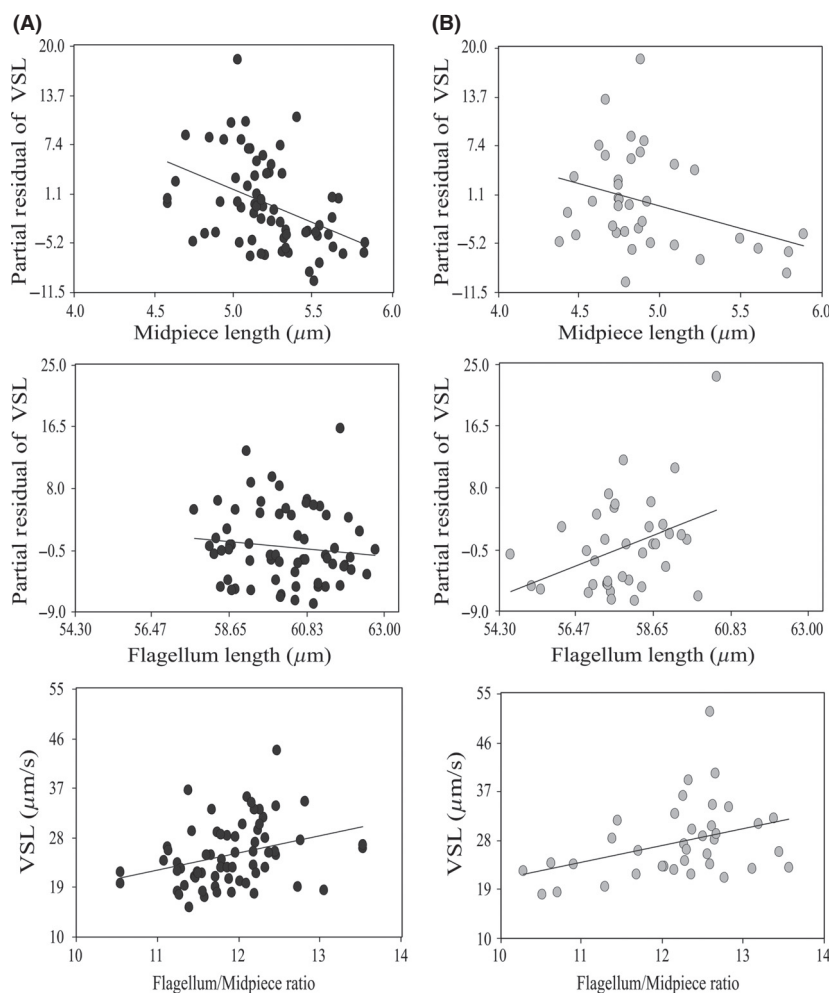
Species	Dependent variable	Predictor	Slope	F	P
<i>T. merianae</i> (n = 66)	VSL ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ )	Head length ( $\mu\text{m}$ )	-1.17	0.01	0.9196
		Midpiece length ( $\mu\text{m}$ )	-8.61	11.82	0.0011
		Flagellum length ( $\mu\text{m}$ )	-0.45	0.63	0.4300
		Flagellum: head ratio	-0.06	0.000052	0.9819
		Flagellum:midpiece ratio	2.8	7.35	0.0086
<i>T. rufescens</i> (n = 37)	VSL ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ )	Head length ( $\mu\text{m}$ )	-0.59	4.00E-02	0.8388
		Midpiece length ( $\mu\text{m}$ )	-5.63	4.93	0.0334
		Flagellum length ( $\mu\text{m}$ )	1.99	5.1	0.0307
		Flagellum: head ratio	0.31	0.03	0.8752
		Flagellum: midpiece ratio	2.76	5.75	0.022
		Head: midpiece ratio	3.59	1.16	0.289

et al. 2010; Bakker et al. 2014). Different sperm phenotypes may have advantages at different stages of the fertilization process (Bakker et al. 2014).

Different hypotheses have been proposed to explain the importance of different sperm components for sperm function; for example, a positive contribution of flagellum length to sperm velocity has been reported for several taxa (Gomendio and Roldan 2008; Fitzpatrick et al. 2009; Lüpold et al. 2009a; Tourmente et al. 2011a), increasing the thrust needed to propel sperm forward (Katz and Drobnis 1990). An increase of midpiece length may reflect sperm power output (Cardullo and Baltz 1991). An increase in the energetic reserves may increase longevity (Parker and Begon 1993). Finally, an elongation of head size may play an important role during sperm storage, contributing to sperm–female interactions (Pitnick et al. 2009b), and reducing the drag experienced by the sperm cell, which produces an increase in sperm swimming velocity (Malo et al. 2006). Recent studies suggest that intra-male variation in sperm traits could also mask length–speed relationships, because when average values for sperm length and speed are used, within-male variation is concealed (Simpson et al. 2013). By measuring multiple morphological traits for individual sperm cells

and accounting for intra-male variation, length–speed relationships are more common than currently thought (Simpson et al. 2013). However, here, in both *Tupinambis* species, we found a negative relationship between sperm midpiece length and straight line velocity as well as higher swimming velocity in spermatozoa with longer flagellum relative to their midpiece. Moreover, in *T. rufescens*, we found a positive relationship between flagellum length and straight line velocity, which was not found in *T. merianae*. One possible explanation for this difference between species may be differences in the competition context to which they are exposed.

We know the importance of the relationship between sperm traits and fertilization efficiency to understand sperm evolution; however, elucidating this relationship in wild lizard populations of these species is difficult. However, several studies in different taxa have proposed a positive relationship between sperm velocity and male reproductive success under sperm competition (Birkhead et al. 1999; Gage et al. 2004; Gomendio and Roldan 2008). If sperm performance was related to within-male variability in sperm morphometry, we would expect a positive relationship between sperm velocity and within-male variability. When we tested this relationship, we



**Figure 4.** Relationship between sperm straight line velocity and sperm morphometric traits in *Tupinambis*. (A) *Tupinambis merianae*; (B) *Tupinambis rufescens*. Similar slopes between species were found (Dummy variable midpiece  $F = 0.48$ ;  $P = 0.6204$ ; flagellum: midpiece ratio  $F = 0.00062$ ,  $P = 0.9803$ ).

found a positive weak relationship between VSL and within-male variability of head length in *T. merianae* and a negative relationship between VSL and within-male variability of midpiece length in *T. rufescens*. These results could be explained by the fact that sperm size may covary not only with velocity but also with other sperm performance parameters, such as longevity (Crean and Marshall 2008; Helfenstein *et al.* 2010). The theory predicts that sperm swimming speed will increase with increasing risk of sperm competition at the expense of the duration of motility (Ball and Parker 1996). Helfenstein *et al.* (2010) showed that sperm with long flagellum relative to their head swim faster than sperm with short flagellum, whereas the latter live longer than the former. As the midpiece is the main component providing sperm energy to move and survive in the female tract, considering our results it would be interesting to test whether midpiece contributes to sperm survival in these species. This is important in squamates, which have been shown to store sperm for long periods (Birkhead and Møller 1993;

Olsson and Madsen 1998; Holt and Loyd 2010). In particular, in many lizard species, females have special structures for storing sperm in their reproductive tracts (Sever and Hamlett 2002), and may store spermatozoa for at least some weeks between mating and ovulation (Olsson and Madsen 1998; Keogh *et al.* 2013). The time between insemination and egg encounter may influence a trade-off between velocity and longevity (Ball and Parker 1996).

In conclusion, our results show in lizards, the association between sperm length and function and suggest that the variability of sperm traits among and within males of a single species might be a strategy of sperm investment in lizards. The results also highlight the importance of studying within-male variability of sperm traits to understand the mechanism underlying sperm evolution.

## Acknowledgments

We are grateful to the local people for their invaluable assistance in the field. The study was funded by Consejo

Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT), MinCyT Córdoba -Préstamo BID-PID No. 013/2009, Secretaría de Ciencia y Tecnología (SeCyT), and Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. CSB and SN are students of the Biological Sciences Doctorate of the Universidad Nacional de Córdoba and fellowship holders of the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), GC is a scientist of the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), LCG is a scientist of the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), and MCH is Professor and senior scientist of the National University of Córdoba.

## Ethical Standards

The authors declare that this paper comply with the current laws of Argentina.

## Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- AVMA, Guidelines on Euthanasia. 2007. In American Veterinary Medical Association, eds. Formerly report of the AVMA panel on euthanasia. [http://www.avma.org/issues/animal\\_welfare/euthanasia.pdf](http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf).
- Bakker, T. C. M., M. Hollmann, M. Mehils, and M. Zbinden. 2014. Functional variation of sperm morphology in sticklebacks. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 68:617–627.
- Ball, M. A., and G. A. Parker. 1996. Sperm competition games: external fertilization and 'adaptive' infertility. *J. Theor. Biol.* 180:141–150.
- Biggers, J. D., W. K. Whitten, and D. G. Whittingham. 1971. The culture of mouse embryos in vitro. Pp. 86–116 in J. C. Daniel, ed. *Methods in mammalian embryology*. Freeman, San Francisco, CA.
- Birkhead, T. R., and A. P. Møller. 1993. Sexual selection and the temporal separation of reproductive events: sperm storage data from reptiles, birds and mammals. *Biol. J. Linn. Soc.* 50:295–311.
- Birkhead, T. R., J. R. Martinez, T. Burke, and D. P. Froman. 1999. Sperm mobility determines the outcome of sperm competition in the domestic fowl. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266:1759–1764.
- Birkhead, T. R., E. J. Pellat, P. Brekke, R. Yeates, and H. Castillo-Juarez. 2005. Genetic effects on sperm design in the zebra finch. *Nature* 434:383–387.
- Biro, P. A. 2013. Are most samples of animals systematically biased? Consistent individual trait differences bias samples despite random sampling. *Oecologia* 171:339–345.
- Blengini, C. S., M. E. Teves, D. R. Uñates, H. A. Guidobaldi, L. V. Gatica, and L. C. Giojalas. 2011. Human sperm pattern of movement during chemotactic re-orientation towards a progesterone source. *Asian J. Androl.* 13:769–773.
- Cabaña, I., C. N. Gardenal, M. Chiaraviglio, and P. C. Rivera. 2014. Natural hybridization in lizards of the genus *Tupinambis* (Teiidae) in the southernmost contact zone of their distribution range. *Ann. Zool. Fenn.*, 51(3): 340–348.
- Calhim, S., S. Immler, and T. R. Birkhead. 2007. Postcopulatory sexual selection is associated with reduced variation in sperm morphology. *PLoS One* 2:e413.
- Calhim, S., M. C. Double, N. Margraf, T. R. Birkhead, and A. Cockburn. 2011. Maintenance of sperm variation in a highly promiscuous wild bird. *PLoS One* 6:e28809.
- Calsbeek, R., C. Bonneaud, S. Prabhu, N. Manoukis, and T. B. Smith. 2007. Multiple paternity and sperm storage lead to increased genetic diversity in *Anolis* lizards. *Evol. Ecol. Res.* 9:495–503.
- Cardozo, G., S. Naretto, and M. Chiaraviglio. 2012. The role of landscape in contact zones of lizard sister species. Pp. 161–176 in INTECH, eds. *Perspectives on nature conservation – Patterns, pressures and prospects*. Intech, Croacia.
- Cardullo, R. A., and J. M. Baltz. 1991. Metabolic regulation in mammalian sperm: mitochondrial volume determines sperm length and flagellar beat frequency. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 19:180–188.
- CITES, CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES. Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. Appendix I. Available at <http://www.cites.org/eng/app/appendices.shtml>. 2008.
- Cornwallis, C. K., and T. R. Birkhead. 2007. Changes in sperm quality and numbers in response to experimental manipulation of male social status and female attractiveness. *Am. Nat.* 170:758–770.
- Cramer, E. R. A., T. Laskemoen, O. Kleven, and J. T. Lifjeld. 2013. Sperm length variation in House Wrens *Troglodytes aedon*. *J. Ornithol.* 154:129–138.
- Crean, J. A., and D. J. Marshall. 2008. Gamete plasticity in a broadcast spawning marine invertebrate. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105:13508–13513.
- Depeiges, A., and J. L. Dacheux. 1985. Acquisition of sperm motility and its maintenance during storage in the lizard, *Lacerta vivipara*. *J. Reprod. Fertil.* 74:23–27.
- Duvall, D., S. J. Arnold, and G. W. Schuett. 1992. Pitviper mating systems: ecological potential, sexual selection and microevolution. Pp. 321–336 in J. A. Campbell and E. D. Brodie Jr, eds. *Biology of the pitvipers*. Selva, Tyler, TX.
- Firman, R. C., and L. W. Simmons. 2010. Sperm midpiece length predicts sperm swimming velocity in house mice. *Biol. Lett.* 6:513–516.
- Fitzgerald, F. A., F. B. Cruz, and G. Perotti. 1993. The reproductive cycle and the size at maturity of *Tupinambis*



- rufescens* (Sauria: Teiidae) in the Dry Chaco of Argentina. *J. Herpetol.* 27:70–78.
- Fitzpatrick, J. L., R. Montgomerie, J. K. Desjardins, N. Kolm, and S. Balshine. 2009. Female promiscuity promotes the evolution of faster sperm in cichlid fishes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 106:1128–1132.
- Fitzpatrick, J. L., F. Garcia-Gonzalez, and J. P. Evans. 2010. Linking sperm length and velocity: the importance of intramale variation. *Biol. Lett.* 6:797–799.
- Gage, M. J. G., C. P. Macfarlane, S. Yeates, R. G. Ward, J. B. Searle, and G. A. Parker. 2004. Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic salmon: relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. *Curr. Biol.* 14:44–47.
- Gillies, E. A., V. Bondarenko, J. Cosson, and A. A. Pacey. 2013. Fins improve the swimming performance of fish sperm: a hydrodynamic analysis of the Siberian Sturgeon *Acipenser baerii*. *Cytoskeleton* 70:85–100.
- Gomendio, M., and E. R. S. Roldan. 2008. Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. *Int. J. Dev. Biol.* 52:439–447.
- Gomendio, M., A. F. Malo, J. J. Garde, and E. R. S. Roldan. 2007. Sperm traits and male fertility in natural populations. *Reproduction* 134:19–29.
- Helfenstein, F., M. Podelvin, and H. Richner. 2010. Sperm morphology, swimming velocity, and longevity in the house sparrow *Passer domesticus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 64:557–565.
- Hellriegel, B., and W. U. Blanckenhorn. 2002. Environmental influences on the gametic investment of yellow dung fly males. *Evol. Ecol.* 16:505–522.
- Holt, W. V., and R. E. Loyd. 2010. Sperm storage in the vertebrate female reproductive tract: how does it work so well? *Theriogenology* 73:713–722.
- Humphries, S., J. P. Evans, and L. W. Simmons. 2008. Sperm competition: linking form to function. *BMC Evol. Biol.* 8:319.
- Immler, S., S. Calhim, and T. R. Birkhead. 2008. Increased postcopulatory sexual selection reduces the intra-male variation in sperm design. *Evolution* 62:1538–1543.
- Immler, S., S. R. Pryke, T. R. Birkhead, and S. C. Griffith. 2010. Pronounced within-individual plasticity in sperm morphometry across social environments. *Evolution* 64:1634–1643.
- Johnson, D. D. P., and J. V. Briskie. 1999. Sperm competition and sperm length in shorebirds. *Condor* 101:848–854.
- Katz, D. F., and E. Z. Drobnis. 1990. Analysis and interpretation of the forces generated by spermatozoa. Pp. 125–137 in B. D. Bavister, J. Cummins and E. R. S. Roldan, eds. *Fertilization in mammals*. Serono Symposia, Norwell, MA.
- Keogh, J. S., K. D. L. Umbers, E. Wilson, J. Stapley, and M. J. Whiting. 2013. Influence of alternate reproductive tactics and pre- and postcopulatory sexual selection on paternity and offspring performance in a lizard. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 67:629–638.
- Kleven, O., T. Laskemoen, F. Fossoy, R. J. Robertson, and J. T. Lifjeld. 2007. Intra-specific variation in sperm length is negatively related to sperm competition in passerine birds. *Evolution* 62:494–499.
- Kvarnemo, C., and L. W. Simmons. 2013. Polyandry as a mediator of sexual selection before and after mating. *Philos. Trans. R. Soc. B* 368:20120042.
- Laloi, D., M. Richard, J. Lecomte, M. Massot, and J. Clobert. 2004. Multiple paternity in clutches of common lizard *Lacerta vivipara*: data from microsatellite markers. *Mol. Ecol.* 13:719–723.
- Lifjeld, J. T., A. Hoenen, L. E. Johannessen, T. Laskemoen, R. J. Lopes, P. Rodrigues, et al. 2013. The Azores bullfinch (*Pyrrhula murina*) has the same unusual and size-variable sperm morphology as the Eurasian bullfinch (*Pyrrhula pyrrhula*). *Biol. J. Linn. Soc.* 108:677–687.
- Locatello, L., A. Pilsatro, R. Deana, A. Zarpellon, and M. B. Rasotto. 2007. Variation pattern of sperm quality traits in two gobies with alternative mating tactics. *Funct. Ecol.* 21:975–981.
- Lüpold, S., G. M. Linz, and T. R. Birkhead. 2009a. Sperm morphology and sperm velocity in passerine birds. *Proc. R. Soc.* 276:1175–1181.
- Lüpold, S., G. M. Linz, and T. R. Birkhead. 2009b. Sperm design and variation in the New World blackbirds (Icteridae). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 63:899–909.
- Lüpold, S., M. K. Manier, O. Ala-Honkola, J. M. Belote, and S. Pitnick. 2011. Male *Drosophila melanogaster* adjust ejaculate size based on female mating status, fecundity, and age. *Behav. Ecol.* 22:184–191.
- Lüpold, S., T. R. Birkhead, and D. F. Westneat. 2012. Seasonal variation in ejaculate traits of male red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 66:1607–1617.
- Malo, A. F., J. J. Garde, A. J. Soler, A. J. Garcia, M. Gomendio, and E. R. S. Roldan. 2005. Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 72:822–829.
- Malo, A. F., M. Gomendio, J. Garde, B. Lang-Lenton, A. J. Soler, and E. R. S. Roldan. 2006. Sperm design and sperm function. *Biol. Lett.* 2:246–249.
- Morrow, E. H., A. Leijon, and A. Meerupati. 2008. Hemiclonal analysis reveals significant genetic, environmental and genotype x environment effects on sperm size in *Drosophila melanogaster*. *J. Evol. Biol.* 21:1692–1702.
- Mortimer, S. T. 1997. A Critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod.* 3:403–439.
- Naretto, S., G. Cardozo, C. S. Blengini, and M. Chiaraviglio. 2014. Sexual selection and dynamics of jaw muscle in *Tupinambis* lizards. *Evol. Biol.* 41:192–200.

- Olsson, M., and T. Madsen. 1998. Sexual selection and sperm competition in reptiles. Pp. 503–578 in T. R. Birkhead and A. P. Møller, eds. *Sperm competition and sexual selection*. Academic Press, San Diego, CA.
- Olsson, M., T. Madsen, and R. Shine. 1997. Is sperm really cheap? Costs of reproduction in male adders, *Vipera berus*. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 264:455–459.
- Parker, G. A. 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biol. Rev.* 45:525–567.
- Parker, G. A. 1998. Sperm competition and evolution of ejaculates: towards a theory base. Pp. 3–54 in T. R. Birkhead and A. P. Møller, eds. *Sperm competition and sexual selection*. Academic Press, San Diego, CA.
- Parker, G. A., and M. E. Begon. 1993. Sperm competition games: sperm size and sperm number under gametic control. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 253:255–262.
- Pitnick, S., D. J. Hosken, and T. R. Birkhead. 2009a. Sperm morphological diversity. Pp. 69–149 in T. R. Birkhead, D. J. Hosken and S. Pitnick, eds. *Sperm biology: an evolutionary perspective*. Academic Press, Burlington.
- Pitnick, S., M. F. Wolfner, and S. S. Suarez. 2009b. Ejaculate-female and sperm-female interactions. Pp. 247–304 in T. R. Birkhead, D. J. Hosken and S. Pitnick, eds. *Sperm biology: an evolutionary perspective*. Academic Press, Burlington.
- Pizzari, T., and G. A. Parker. 2009. Sperm competition and sperm phenotype. Pp. 207–245 in T. R. Birkhead, D. J. Hosken and S. Pitnick, eds. *Sperm biology: an evolutionary perspective*. Academic Press, Burlington.
- Porini, G. M. 2006. Proyecto *Tupinambis*: Una propuesta para el manejo de *Tupinambis rufescens* y *T. merianae* en la Argentina. Pp. 65–75 in M. L. Bolkovic, D. Ramadori, eds. *Manejo de Fauna Silvestre en la Argentina*. Programas de uso sustentable. Dirección de Fauna Silvestre, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires.
- Rudolfsen, G., L. Figenschou, I. Folstad, H. Tveiten, and M. Figenschou. 2006. Rapid adjustments of sperm characteristics in relation to social status. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 273:325–332.
- Schulte-Hostedde, A. I., and R. Montgomerie. 2006. Intraspecific variation in ejaculate traits of the northern watersnake (*Nerodia sipedon*). *J. Zool.* 270:147–152.
- Sever, D. M., and W. C. Hamlett. 2002. Female sperm storage in reptiles. *J. Exp. Zool.* 292:287–299.
- Simmons, L. W., and J. L. Fitzpatrick. 2012. Sperm wars and the evolution of male fertility. *Reproduction* 144:519–534.
- Simpson, J. L., S. Humphries, J. P. Evans, L. W. Simmons, and J. L. Fitzpatrick. 2013. Relationships between sperm length and speed differ among three internally and three externally fertilizing species. *Evolution* 68:92–104.
- Snook, R. R. 2005. Sperm in competition: not playing by the numbers. *Trends Ecol. Evol.* 20:46–53.
- Snook, R. R., and T. Pizzari. 2012. Post-copulatory Reproductive Strategies. In: eLS. John Wiley and Sons, Ltd: Chichester.
- Tourmente, M., M. Gomendio, E. R. S. Roldan, L. C. Giojalas, and M. Chiaraviglio. 2009. Sperm competition and reproductive mode influence sperm dimensions and structure among snakes. *Evolution*, 63:2513–2525.
- Tourmente, M., M. Gomendio, and E. R. S. Roldan. 2011a. Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. *BMC Evol. Biol.* 11:12.
- Tourmente, M., L. C. Giojalas, and M. Chiaraviglio. 2011b. Sperm parameters associated with reproductive ecology in two snakes species. *Herpetologica* 67:58–70.
- Tourmente, M., M. Rowe, M. M. González-Barroso, E. Rial, M. Gomendio, and E. R. S. Roldan. 2013. Postcopulatory Sexual Selection increases ATP content in rodent spermatozoa. *Evolution* 67:1838–1846.
- Van der Horst, G., and L. Maree. 2014. Sperm form and function in the absence of sperm competition. *Mol. Reprod. Dev.* 81:204–216.
- Vitt, L. J., and J. P. Caldwell. 2009. *Herpetology*, eds. California.
- Zamudio, K. R., and B. Sinervo. 2000. Polygyny, mate-guarding, and posthumous fertilization as alternative male mating strategies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97:14427–14432.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Table S1.** Relationship between sperm curvilinear velocity and sperm morphometric traits in *Tupinambis*.

**Table S2.** Relationship between sperm curvilinear velocity and within-male variability in sperm morphometric traits.

**Figure S1.** Relationship between curvilinear sperm velocity and sperm morphometric traits in *Tupinambis*.

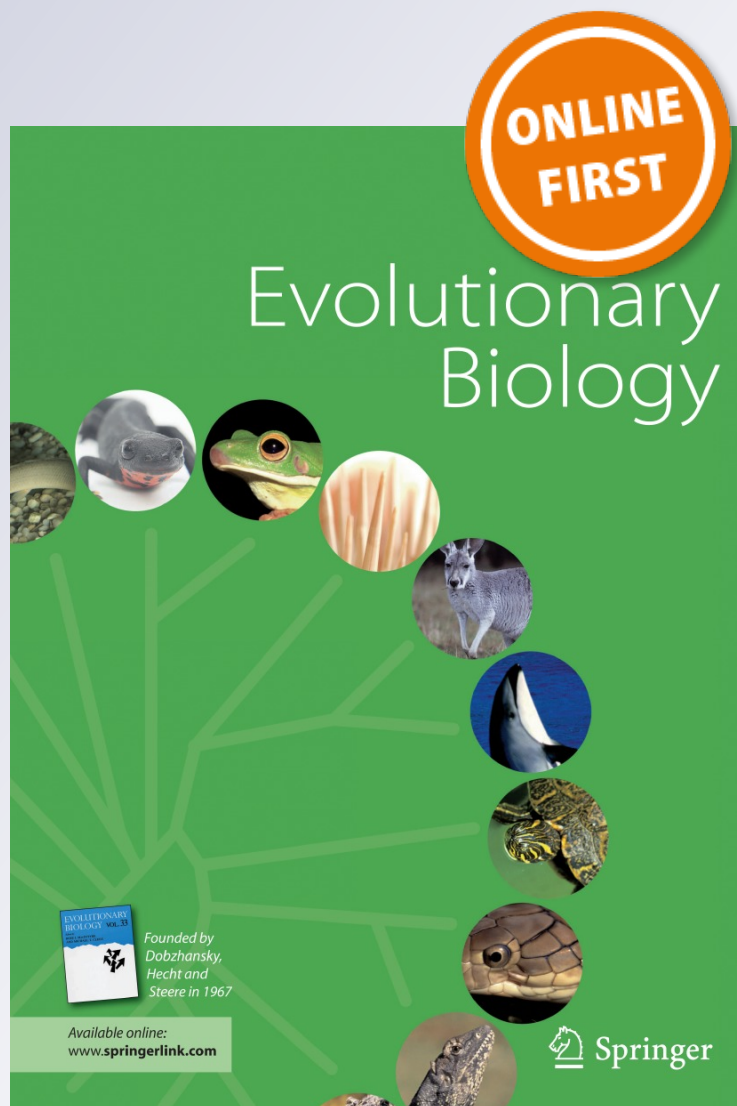
# *Sexual Selection and Dynamics of Jaw Muscle in Tupinambis Lizards*

**Sergio Naretto, Gabriela Cardozo,  
Cecilia S. Blengini & Margarita  
Chiaraviglio**

**Evolutionary Biology**  
Evolutionary Biology

ISSN 0071-3260

Evol Biol  
DOI 10.1007/s11692-013-9257-0



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media New York. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**

# Sexual Selection and Dynamics of Jaw Muscle in *Tupinambis* Lizards

Sergio Naretto · Gabriela Cardozo ·  
Cecilia S. Blengini · Margarita Chiaraviglio

Received: 15 May 2013 / Accepted: 4 September 2013  
© Springer Science+Business Media New York 2013

**Abstract** Sexual dimorphism patterns provide an opportunity to increase our understanding of trait evolution. Because selective forces may vary throughout the reproductive period, measuring dimorphism seasonally may be an interesting approach. An increased male head size may be important in intersexual and intrasexual interactions. In *Tupinambis* lizards, a big head is attributed in part to a large adductor muscle mass. Competition for mating can differ in species with different sex ratio and different degrees of sexual size dimorphism. We examined sexual differences in mass of the pterygoideus muscle, its temporal variation throughout the reproductive period and the relationship between muscle and reproductive condition in *Tupinambis merianae* and *T. rufescens*. We characterized sexual size dimorphism and sex ratio in both species. Mature males had larger jaw muscles than mature females in both species, mainly during the reproductive season. The dimorphism in jaw muscle was due to an increase in muscle mass in sexually active males. Seasonal increases in muscle mass and variation between immature and mature individuals suggest that the jaw muscle might be a secondary sexual character. We propose that the pterygoideus muscle may act as a signal of reproductive condition of males because it is associated with testis size and sperm presence. The patterns of sexual dimorphism in jaw muscle in both species were similar; however, the comparison shows how sexual characters remain dimorphic in different

competition contexts and in species with different degrees of body size dimorphism. Our results suggest that jaw muscle as sexual character could be influenced by inter- and intrasexual selective pressures.

**Keywords** Secondary sexual character · Sexual dimorphism · Seasonal variation · Pterygoideus muscle · *Tupinambis merianae* · *Tupinambis rufescens*

## Introduction

Differentiation between males and females in morphology, performance, behaviour and many other traits has long been a paradigm for evolutionary biologists (Darwin 1871; Andersson 1994). Patterns of sexual dimorphism provide an opportunity to increase our understanding of trait evolution because they result from selection forces that act differentially on individuals of each sex (Cox et al. 2003; Corl et al. 2009). Sexual size dimorphism is common in reptiles (Schoener 1977; Stamps 1983) and has been documented in lizards, with males typically being larger than females (Fitch 1981; Cox et al. 2007). Another important aspect to consider is sexual dimorphism of different body parts (Anderson and Vitt 1990; Herrel et al. 1996; Butler et al. 2000); indeed, the relative size of different body parts can be very informative of the selective pressures imposed on each sex (Cooper and Vitt 1989; Braña 1996; Hews 1996; Butler and Losos 2002; Kratochvil et al. 2003). Several hypotheses have been proposed to explain the evolution of morphological differences between sexes, including differential niche utilization, intersexual food competition, and sexual selection (Hendrick and Temeles 1989; Andersson 1994). In a reproductive context, sexual

S. Naretto (✉) · G. Cardozo · C. S. Blengini · M. Chiaraviglio  
Laboratorio de Biología del Comportamiento, Facultad de  
Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Instituto de Diversidad y  
Ecología Animal IDEA (CONICET-UNC), Universidad  
Nacional de Córdoba, Vélez Sársfield 299, CP X5000JJC  
Córdoba, Argentina  
e-mail: naretto-sergio@gmail.com

dimorphism of structures may be the result of intrasexual selection pressures when individuals compete for mates (Stamps 1983; Cox et al. 2003) and of intersexual selection pressures when signals for mate preference are identified (Cooper and Vitt 1993; Irschick et al. 2007). The traditional focus on the design of static signals such as ornaments has failed to fully explain sexual selection in a number of important systems (Mowles and Ord 2012). In addition, unravelling mechanisms underlying the evolution of sexual dimorphism can be complicated due to variation in the selective pressures acting during different periods of activity. In some species, such as *Anolis carolinensis*, the dewlap area changes seasonally, being larger in the spring reproductive season (Irschick et al. 2006). Because the strength of selective forces may vary at different moments during the reproductive period, measuring dimorphism over time and interpreting it as a dynamic trait may be an interesting approach to the understanding the evolution of sexual traits.

Secondary sexual traits evolve through the process of sexual selection, either via female choice, male–male competition or a combination of both (Berglund et al. 1996). An increased male head size may simultaneously be important in intersexual interactions (Herrel et al. 1996, 1999; Gvozdik and Van Damme 2003) and intrasexual interactions (Vitt and Cooper 1985; Bull and Pamula 1996; Gvozdik and Van Damme 2003). During copulation the male lizard typically bites the female on the back of the neck as he mounts her (Pough et al. 2001). Another important role of biting lies in determining the outcome of aggressive interactions (Lailvaux et al. 2004; Huyghe et al. 2005; Lappin and Husak 2005; Husak et al. 2006). Bite force is strongly correlated with body and head sizes in several lizard taxa (Anderson et al. 2008; Herrel et al. 2009) among which *Tupinambis* males exhibit larger body size than females (Anderson and Vitt 1990; Fitzgerald et al. 1991). A big head in *Tupinambis* lizards is attributed in part to a large adductor muscle mass (Rieppel 1980), with the pterygoideus muscle forming a large mass around the posterior portion of the lower jaw (McBrayer and White 2002). Individuals with greater heads could be more successful in male–male contest where jaws are considered as armaments (Bull and Pamula 1996). The expression of sexual characters often shows evidence of condition dependence. For example, some secondary sexual traits develop at sexual maturity, which generally enhances trait expression (Moller 1996). Traits that increase considerably in relative size with maturation are likely to be those that are necessary for successful breeding (Hendry and Berg 1999). Moreover, secondary sexual characters can indicate the reproductive condition or reproductive potential (Lailvaux and Irschick 2006). By choosing males with sexual ornaments, females would also benefit if such selection maximized the chances of females to mate with

high quality fertile males (Sheldon 1994). Another function of male sexual character could be that of signalling to other males the competitiveness of the ejaculate (Malo et al. 2005). Thus, sexual selection can operate through different processes in the same structure.

Competition for mating opportunities among males has long been recognized as a potent selective pressure shaping the evolution of secondary sexual traits (Simmons and Emlen 2006). Competition may differ in species with different sex ratio of individuals qualified to mate (Ahnesjö et al. 2001; de Jong et al. 2009) and has important consequences for sexual selection (Kvarnemo and Ahnesjö 1996). Variation in body size, sexual characters and gonadal investment among male lizards may be related to differences in reproductive strategies (Dial et al. 2008). Body size may be advantageous for reproductive behavior (Olsson 1993). Furthermore, interspecific variation in the degree of sexual body size dimorphism may provide additional information to interpret variation in sexual traits. Interpreting the relationship among sexual body size dimorphism, sex ratio, and jaw muscle traits between related species may contribute to our understanding of selective pressures acting on sexual characters.

Interpreting the proximate causes that lead to morphological differentiation between and within males and females can be crucial to elucidating the evolutionary pressures acting on each sex and species (Kaliontzopoulou et al. 2008). Accordingly, *Tupinambis merianae* and *T. rufescens* provide a good model system for studying evolution of sexual traits and seasonal changes therein because they are closely related species (Cabaña et al. 2013) and share bioecological traits (Cardozo et al. 2012). Their reproductive behaviour is limited to a period of the active season (Fitzgerald et al. 1991, 1993), and larger *Tupinambis* individuals are more aggressive and dominant than smaller ones (Herrel et al. 2009).

In the present study, we characterized the pterygoideus muscle in *T. merianae* and *T. rufescens* in a sexual selection context. First, we examined sexual differences in the jaw muscle in mature and immature individuals. Second, we examined the intrasexual variation, temporal dynamics of jaw muscle and the relationship between jaw muscle and reproductive condition. Finally, we characterized sexual size dimorphism and sex ratio in both species to interpret variations in jaw muscle size.

## Methods

### Species and Study Area

*Tupinambis merianae* and *T. rufescens* are big-sized Teiidae lizards that reach large body sizes at adulthood (Avila-Pires 1995; Andrade and Abe 1999) and that undergo a

great shift in body size during ontogeny. They are geographically close species that occur in the southernmost area of the distribution of the genus in South America (Cei 1993; Colli et al. 1998). These species overwinter in burrows and emerge during the warm season (October to March); they are seasonal breeders that reproduce from about October to January (Fitzgerald et al. 1991, 1993). Both species are included in Appendix II of the Convention on International Trade of Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES); in Argentina, commercial harvest is allowed (Porini 2006; Res. 11/2011, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación). Scientific studies based on the examination of specimens collected for the international skin trade provided important knowledge of the biology of the species (Shine et al. 1999).

#### Data Collection

*Tupinambis* individuals were caught weekly from wild populations by local authorized hunters in central Argentina (*T. rufescens*: 29°35'W, 64°10'S to 31°10'W, 63°15'S and *T. meriana*: 30°55'W, 63°40'S to 31°45'W, 62°15'S) between October and March. We are authorized by the government environmental agencies for scientific capture, and we selected and accompanied authorized local people to standardize the sampling protocol with the aim of avoiding sex and size bias in capture rates. Specimens were killed for the legal skin trade, in accordance with AVMA Guidelines on Euthanasia (AVMA 2007). We recorded species, date, sex and sexual maturity (mature or immature). We measured the snout vent length (SVL) to the nearest 0.5 cm with a ruler and body mass (BM) to the nearest 50 g with a balance. In males we dissected and weighed the mass of both testes (TM) to the nearest 0.1 g using an electronic balance (Traveler TA302; OHAUS; New Jersey, USA). We determined sex and sexual maturity of lizards by inspecting the reproductive organs. Females were considered reproductive if they had oviductal eggs or enlarged vitellogenic follicles. In males, we recorded the presence or absence of sperm in epididymides; samples of seminal fluid were examined under a phase contrast microscopy (model eclipse Ti; Nikon Instruments Inc.; Tokyo, Japan). We categorized mature males as sexually active males (with presence of sperm) or males without sperm. The SVL of the smallest reproductive female and male was used to estimate minimum size at sexual maturity (Madsen et al. 2006; Cardozo and Chiaraviglio 2011). In total, we evaluated 693 *T. meriana* and 130 *T. rufescens* individuals.

#### Muscle Dissection

We dissected the pterygoideus muscle for all individuals. We selected the superficial pterygoideus layer because it is

active during the power phase of biting in *Tupinambis* lizards and has an important role in both force production and jaw stabilization (Rieppel 1980; McBrayer and White 2002). The superficial pterygoideus muscle mass (PMM) was determined to the nearest 0.1 g using an electronic balance (Traveler TA302; OHAUS; New Jersey, USA). To show values for relative muscle mass in the figures, we used an index of PMM, which was calculated as PMM (g) divided by BM (g), multiplied by 100.

#### Data Analyses

An analysis of covariance (ANCOVA) was used to assess morphological changes, independent of variation in body size. Muscle mass, BM and TM were log<sub>10</sub> transformed. We compared PMM between sexes with an ANCOVA using BM as covariate in each species. We also compared between species with an ANCOVA using BM as covariate. We compared temporal changes in muscle mass using an ANCOVA, with sampling month as class effect and BM as covariate. We assessed the difference in PMM among mature males sampled during the breeding season using an ANCOVA, with presence or absence of sperm as class effect and body mass as covariate. We tested for homogeneity of slopes among treatment groups with a treatment by covariate interaction term, which we retained in model when significant and omitted when non significant. To compare the relative amount of variation in PMM between sexes we used the coefficient of variation (CV). We used Levene's test to examine whether the variance of PMM differed among months. Pterygoideus muscle mass was regressed on BM. The slope of these regressions estimated the relative relationships: a slope of 1 indicated isometry, a slope greater than 1.0 indicated positive allometry, and a slope less than 1.0 indicated negative allometry (Bonduriansky 2007; Araujo and Tschinkel 2010). We calculated sex ratio using sexually mature lizards during the breeding season; to test for difference in the proportion of sexes we used a Chi square test. We used SVL to calculate an index of sexual size dimorphism (SSD) (Lovich and Gibbons, 1992). A negative SSD value indicated that males were the larger sex and a positive SSD value indicated the opposite. All statistical analyses were made using SPSS 16.0 (SPSS 16.0 Inc., Chicago, IL, USA).

#### Results

The smallest sexually active male was 29.5 cm SVL for *T. meriana* and 30.5 cm SVL for *T. rufescens*. The smallest sexually active female was 32 cm SVL in both species. Pterygoideus muscle mass was greater in mature males than in mature females in each species (Table 1). In

immature individuals, PMM was similar between sexes in each species (Table 1), whereas it differed between species in mature males (ANCOVA: species effect term  $F_{1, 449} = 5.95$ ,  $P = 0.015$ ), being higher in *T. rufescens*; by contrast, PMM did not differ between species in mature females (ANCOVA: species effect term,  $F_{1, 292} = 0.12$ ,  $P = 0.732$ ).

We observed a positive relationship between PMM and BM in mature males and females of both species (Fig. 1) (*T. merianae* males:  $F_{1,363} = 1,799.12$ ,  $r = 0.83$ ,  $P < 0.001$ ; *T. merianae* females:  $F_{1,274} = 676.03$ ,  $r = 0.71$ ,  $P < 0.001$ ; *T. rufescens* males:  $F_{1,85} = 409.13$ ,  $r = 0.83$ ,  $P < 0.001$ ; *T. rufescens* females:  $F_{1,17} = 15.73$ ,  $r = 0.45$ ,  $P < 0.001$ ), but with a different slope between sexes (Table 1). Slopes were steeper for males than for females. The slope for each sex was similar between species (ANCOVA: Males: interaction term species\*covariate log10BM  $F_{1,448} = 0.69$ ,  $P = 0.407$ ; Females: interaction term species\*covariate log10BM  $F_{1,291} = 0.69$ ,  $P = 0.406$ ).

We observed differences in the CV of PMM between sexes in both species, which was approximately twice as high in males as in females for both species (CV *T. merianae* mature males: 73.68; CV *T. merianae* mature females: 34.19; CV *T. rufescens* mature males: 65.06; CV *T. rufescens* mature females: 26.66). The variance of PMM varied among months in *T. merianae* males; in *T. rufescens* males, although there were no statistical differences, a trend to temporal variation in CV is observed in Fig. 2 (Levene's test: *T. merianae*:  $F_{5,359} = 3.57$ ,  $P = 0.004$ ; *T. rufescens*:  $F_{5,81} = 2.21$ ,  $P = 0.061$ ). In females, the variance was homogeneous among months (Levene's test: *T. merianae*:  $F_{5,270} = 0.394$ ,  $P = 0.853$ ; *T. rufescens*:  $F_{4,14} = 2.625$ ,  $P = 0.080$ ). Pterygoideus muscle mass varied among months in mature males (ANCOVA: *T. merianae*: month effect term,  $F_{5,353} = 4.28$ ;  $P < 0.001$ ; *T. rufescens*: month effect term,  $F_{5,80} = 2.75$ ;  $P = 0.024$ )

(Fig. 2). The greatest PMM was observed in *T. merianae* males in the samples taken in November and December and in *T. rufescens* males in November.

During the period of sperm presence (October–December), males with sperm in epididymides showed greater PMM and TM than mature males without sperm (Table 2). The analysis of males with sperm showed that PMM and TM were similar between species (ANCOVA: PMM:  $F_{1,148} = 3.35$ ;  $P = 0.069$ ; TM:  $F_{1,146} = 3.582$ ;  $P = 0.06$ ). The difference in PMM between sexually active males and mature females during reproductive period (October–December) was similar between species (ANCOVA PMM 2 factors species and sex: interaction term species\*sex  $F_{5,387} = 0.05$ ,  $P = 0.827$ ).

Pterygoideus muscle mass was significantly associated with TM in sexually active males in both species during the breeding season. In addition, PMM was positively correlated with TM (Table 3) and the slope was similar between species (ANCOVA: interaction term  $F_{1,146} = 1.82$ ,  $P = 0.176$ ).

*Tupinambis rufescens* presented greater sexual size dimorphism than *T. merianae*. The index of SSD for *T. merianae* was -0.04 (ANOVA SVL,  $F_{1,661} = 31.93$ ;  $P < 0.001$ ) and -0.15 for *T. rufescens* (ANOVA SVL,  $F_{1,115} = 39.79$ ;  $P < 0.001$ ). During the breeding season (October–December), mature sex ratio of *T. rufescens* was = 4.11: 1 (70 males and 17 females) (Chi Square Test:  $\chi^2 = 32.29$ ; df = 1;  $P = 0.001$ ) and mature sex ratio of *T. merianae* was = 1.41: 1 (325 males and 245 females) (Chi Square Test:  $\chi^2 = 11.23$ ; df = 1;  $P = 0.001$ ).

## Discussion

*Tupinambis* males and females might be subjected to different selective pressure intensity on jaw muscles because

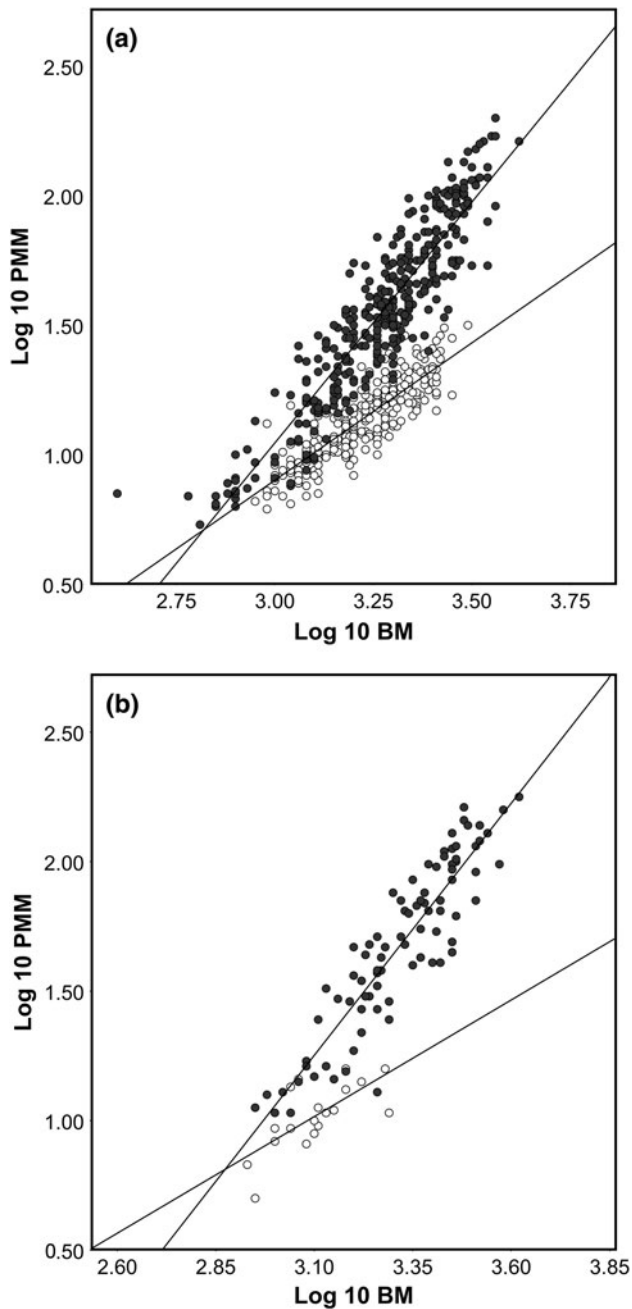
**Table 1** Mean of pterygoideus muscle mass (PMM) and ANCOVA results for log10-transformed PMM with sex as class effect and log10-transformed body mass (BM) as covariate for immature and mature individuals of both species studied

Species	Maturity class	Sex	N	Mean PMM (g) ± SE	Sex (F)	Covariate Log10 BM (F)	Interaction sex × Cov (F)	Model R <sup>2</sup>
<i>Tupinambis merianae</i>	Immature (df = 1,18)	Males	9	6.07 ± 1.52	0.11	53.67***	–	0.722
		Females	12	5.16 ± 0.45				
<i>Tupinambis merianae</i>	Mature (df = 1,637)	Males	365	46.09 ± 1.77	100.68***	1,772.44***	132.73***	0.886
		Females	276	14.43 ± 0.30				
<i>Tupinambis rufescens</i>	Immature (df = 1,8)	Males	4	5.16 ± 1.10	2.51	46.19***	–	0.841
		Females	7	6.26 ± 0.56				
<i>Tupinambis rufescens</i>	Mature (df = 1,102)	Males	87	62.43 ± 4.26	9.04**	79.12***	10.68**	0.891
		Females	19	10.88 ± 0.65				

Pterygoideus muscle mass is expressed in grams (g)

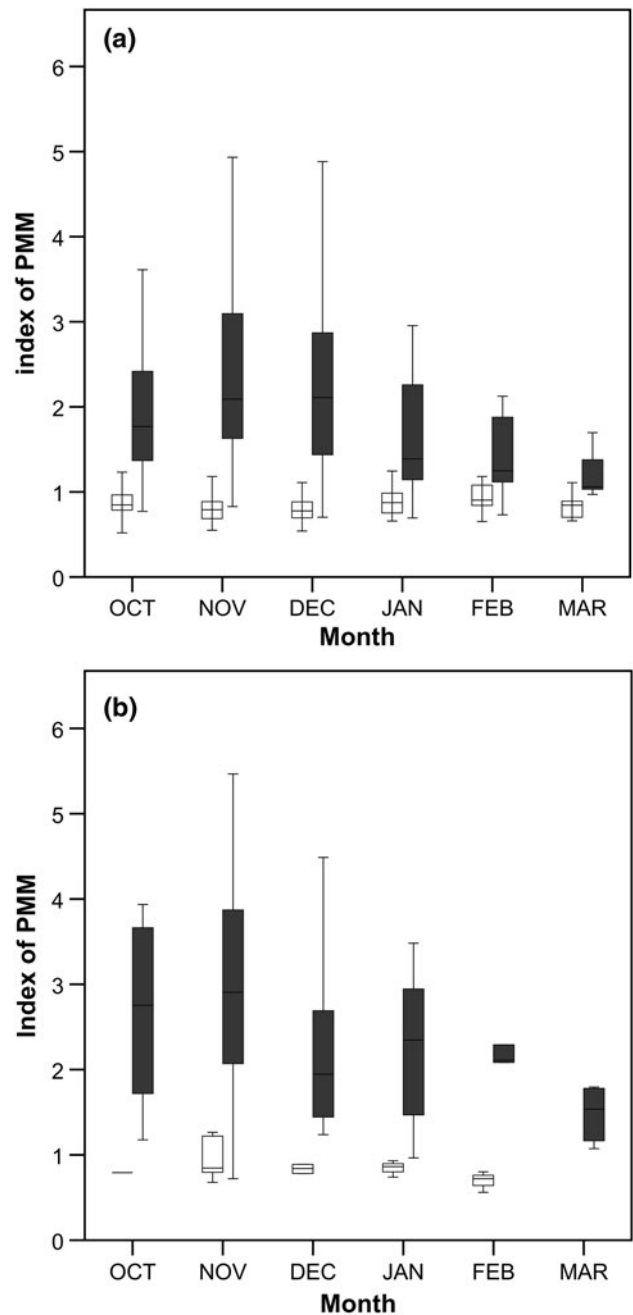
\*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$





**Fig. 1** Relationship between pterygoideus muscle mass (PMM) and body mass (BM) for mature males (solid symbols) and mature females (empty symbols) of *T. merianae* (a) and *T. rufescens* (b). Least-square regression lines are shown for males and females of each species (*T. merianae* males:  $y = -4.53 + 1.86 x$ ; *T. merianae* females:  $y = -2.27 + 1.06 x$ ; *T. rufescens* males:  $y = -4.78 + 1.95 x$ ; *T. rufescens* females:  $y = -1.75 + 0.89 x$ )

the pterygoideus muscle mass was sexually monomorphic in immature individuals and dimorphic at maturity. Moreover, males of both lizard species had larger jaw muscles than females. The sexual dimorphism observed in the jaw muscle was due to an increase in muscle mass in sexually active males. The results obtained in *T. merianae*



**Fig. 2** Plots of mean PMM index of mature males (grey) and females (white) of *T. merianae* (a) and *T. rufescens* (b). Presence of sperm: October–December

and *T. rufescens* indicate important sexual variation in terms of temporal dynamics of the pterygoideus muscle. Seasonal increase of muscle mass during the reproductive period and variation between immature and mature individuals can provide important insights into the function of jaw muscle as a secondary sexual character. Our data on wild populations of *T. merianae* and *T. rufescens* reveal similar patterns of sexual dimorphism in jaw muscle and temporal variation.

**Table 2** Means of pterygoideus muscle mass (PMM) and testis mass (TM) of mature males with and without sperm in epididymides during the breeding season (presence of sperm: October–December) and

ANCOVA results for log transformed data with presence of sperm as class effect and log10-transformed body mass (BM) as covariate

		With sperm (g) ± S.E	Without sperm (g) ± S.E	Sperm class ( <i>F</i> )	Covariate Log Body mass ( <i>F</i> )
<i>Tupinambis merianae</i>	PMM (df = 1,194)	55.07 ± 3.70 ( <i>N</i> = 103)	35.64 ± 2.67 ( <i>N</i> = 94)	76.77 ***	1,157.53 ***
	TM (df = 1,195)	5.93 ± 0.29 ( <i>N</i> = 102)	4.11 ± 0.30 ( <i>N</i> = 96)	23.76 ***	83.22 ***
<i>Tupinambis rufescens</i>	PMM (df = 1,56)	77.30 ± 6.35 ( <i>N</i> = 45)	37.61 ± 8.53 ( <i>N</i> = 14)	17.85 ***	351.56 ***
	TM (df = 1,54)	8.27 ± 0.67 ( <i>N</i> = 44)	4.52 ± 0.56 ( <i>N</i> = 13)	4.01 *	23.30 ***

Pterygoideus muscle mass and testis mass are expressed in grams (g)

\*\*\* *P* < 0.001; \*\* *P* < 0.01; \* *P* < 0.05

**Table 3** Regression results for the relationship of log10- transformed testis mass (TM) with total log10-transformed pterygoideus muscle mass (PMM) in sexually active males of the two species studied

	<i>N</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>	<i>P</i>	Slope	<i>a</i>
Log10 TM <i>Tupinambis merianae</i>	103	0.27	0.001	0.57	1.24
Log10 TM <i>Tupinambis rufescens</i>	45	0.46	0.001	0.79	1.12

*R*<sup>2</sup> squared correlation coefficient, *P* *P* value of *R*<sup>2</sup>, *Slope*, *a* intercept

It has been hypothesized that sexual selection would lead to the evolution of positive allometry, and that positive allometry would be a characteristic attribute of sexually selected traits (signal and weapon traits) (Petrie 1992; Kodric-Brown et al. 2006). Both in *T. merianae* and *T. rufescens*, the differences in the relationships between jaw muscle mass and body mass would be most likely related to sex. In females, this relationship was isometric, whereas in males jaw muscle increased more than proportional with increasing body size. Several studies have shown a direct link between relative head size and the ability to win male–male contests (Hews 1990; Molina Borja et al. 1998; Herrel et al. 2001; Gvozdik and Van Damme 2003). Moreover, during intersexual interactions (i.e., courtship, copulation), males may benefit from increased bite performance, because males with great muscle mass will be able to grasp a female to copulate (Gvozdik and Van Damme 2003), a behaviour observed in *Tupinambis merianae* (personal observation). When the male can grasp by biting the female, it will succeed to copulate with her. In addition, if males fight between them, males with high biting force might be favored. Pterygoideus muscle can have multiple functions and individuals with greater heads could be more successful in intrasexual contest and intersexual interaction where jaws are considered as armaments. Large body size can be considered a trait that is also involved in reducing the relative cost of carrying a large sex trait (Moller 1996); hence, *Tupinambis* males may benefit by increased body size.

Few studies have examined seasonal changes in dimorphism (Vitt and Cooper 1985) or addressed sexual characters as dynamic in relation to selective pressures. *Anolis* lizards with enlarged dewlaps tend to exhibit high bite forces, and a large dewlap is an important trait for polygynous lizards that often bite one another during male encounters (Vanhooydonck et al. 2005a, b). Irschick et al. (2006) indicated that head shape in green anoles remained constant across seasons, but bite force and dewlap changed. In *Tupinambis*, we observed that the variability in jaw muscle is associated with a temporal pattern in males. In addition, we observed males with increased muscle mass in the breeding season. According to Moller (1996), males may reduce the maintenance costs of secondary sexual characters by simply moulting those traits when they are not necessary. Based on our results, we highlight the importance of considering secondary sexual characters as dynamic traits because sexual selection would act not only by changing the size of the structure but also by adjusting the period of increased expression of the jaw muscle.

Signals are behavioural or morphological traits that influence other individuals (Henningesen and Irschick 2012); however, exploring what information is conveyed within a signal is a major challenge. For instance, in male green anoles the size of the dewlap is positively correlated with bite force, suggesting that it is a reliable signal (Vanhooydonck et al. 2005b; Irschick et al. 2006). Sexually active males of *Tupinambis* showed greater pterygoideus muscle mass than mature males without sperm in epididymides, independently of body size. Moreover, we found that sexually active males that had greater jaw muscle mass also had a greater testes mass. In *Tupinambis merianae* males in captivity, testosterone levels were found to be associated with reproductive activity (Chamut et al. 2012). Huyghe et al. (2010) showed that an increase in testosterone in *Gallotia galloti* caused an increase in jaw adductor muscle mass, without affecting bite force, however this muscle is situated at the side of the head, the muscle function may have become a visual signal (Herrel et al.

1999). Another explanation for the function of male sexual characters proposes that they advertise not only competitive ability, but also ejaculate quality (Sheldon 1994; Malo et al. 2005). We suggest that in *Tupinambis*, pterygoideus muscle may act as a signal of male quality because it is associated with the presence of sperm and testis size.

A male-biased sex ratio usually leads to increased intensity of sexual selection due to a greater competition among males, and often to strong mate choice in females (Clutton-Brock and Vincent 1991; Kvarnemo and Merilaita 2006). In *T. rufescens*, with a more male-biased sex ratio than *T. merianae*, the high intrasexual competition may be expected to lead to a greater increment in muscle mass in sexually active males than in *T. merianae*. However, our results show no difference in pterygoideus muscle mass of sexually active males between species, probably because sexual characters can be influenced not only by sex ratio but also by sexual differences in body size. Species like *T. merianae*, with less sexual body size dimorphism, are more likely to have intersexual pressures than species with marked sexual body size dimorphism, because males would need more force for grasping females during copulation. *Tupinambis merianae* and *T. rufescens* are different in sex ratio and sexual size dimorphism; however, they exhibit similar sexual dimorphism patterns of the jaw muscle (a sexually dimorphic and seasonal trait). Although sexual dimorphism of the jaw muscle could be a conservative trait in these closely related species, in *T. merianae*, muscle could be influenced mainly by intersexual pressures, whereas in *T. rufescens* the same character may be influenced by intrasexual competition.

To conclude, our results show that there is a significant positive correlation between muscle and testis mass; moreover, the increase in jaw muscle mass is associated with sperm presence, suggesting that the relative size of jaw muscle acts as an honest signal of reproductive condition of males. Furthermore, examining secondary sexual trait expression considering temporal processes proves helpful for understanding the factors shaping the processes of sexual selection.

**Acknowledgments** We are grateful to rural people from the study area for their invaluable assistance in the field, especially Carlos Beck of Villa del Rosario, Cordoba. This study was funded by Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCYT), MinCyT Córdoba -Préstamo BID-PID No. 013/2009, Secretaría de Ciencia y Tecnología (SeCyT) and Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. SN and CB are students of the Biological Doctorate of the Universidad Nacional de Córdoba and fellowship holders of the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). GC is a researcher of the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). MCH is Professor and senior scientist of the National University of Córdoba. The authors thank anonymous reviewers for constructive comments on previous versions of the manuscript.

**Ethical standards** The authors declare that this paper comply with the current laws of Argentina.

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

## References

- Ahnesjö, I., Kvarnemo, C., & Merilaita, S. (2001). Using potential reproductive rates to predict mating competition among individuals qualified to mate. *Behavioral Ecology*, 12(4), 397–401.
- Anderson, R. A., McBrayer, L. D., & Herrel, A. (2008). Bite force in vertebrates: Opportunities and caveats for use of a nonpareil whole-animal performance measure. *Biological Journal of the Linnean Society*, 93(4), 709–720.
- Anderson, R. A., & Vitt, L. J. (1990). Sexual selection versus alternative causes of sexual dimorphism in teiid lizards. *Oecologia*, 84(2), 145–157.
- Andersson, M. (1994). *Sexual selection*. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Andrade, D. V., & Abe, A. S. (1999). Gas exchange and ventilation during dormancy in the tegu lizard *Tupinambis merianae*. *Journal of Experimental Biology*, 202, 3677–3685.
- Araujo, M. B., & Tschinkel, W. R. (2010). Worker allometry in relation to colony size and social form in the fire ant *Solenopsis invicta*. *Journal of Insect Science*, 2010, 1–10.
- Avila-Pires, T. C. (1995). Lizards of Brazilian Amazonia (Reptilia: Squamata). *Zoologische Verhandelingen Leiden*, 299, 546–564.
- AVMA (American Veterinary Medical Association) (2007). *Guidelines on euthanasia. Formely report of the AVMA panel on euthanasia*. [http://www.avma.org/issues/animal\\_welfare/euthanasia.pdf](http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf).
- Berglund, A., Bisazza, A., & Pilastro, A. (1996). Armaments and ornaments: An evolutionary explanation of traits of dual utility. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58(4), 385–399.
- Bonduriansky, R. (2007). Sexual selection and allometry: A critical reappraisal of the evidence and ideas. *Evolution*, 61(4), 838–849.
- Braña, F. (1996). Sexual dimorphism in lacertid lizards: Male head increase vs. female abdomen increase? *Oikos*, 75(3), 511–523.
- Bull, C. M., & Pamula, Y. (1996). Sexually dimorphic head sizes and reproductive success in the sleepy lizard *Tiliqua rugosa*. *Journal of Zoology*, 240(3), 511–521.
- Butler, M. A., & Losos, J. B. (2002). Multivariate sexual dimorphism, sexual selection, and adaptation in Greater Antillean Anolis lizards. *Ecological Monographs*, 72(4), 541–559.
- Butler, M. A., Schoener, T. W., & Losos, J. B. (2000). The relationship between sexual size dimorphism and habitat use in Greater Antillean Anolis lizards. *Evolution*, 54(1), 259–272.
- Cabaña, I., Gardenal, C. N., Chiaraviglio, M., & Rivera, P. C. (2013). Natural hybridization in lizards of the genus *Tupinambis* (Teiidae) in the southernmost contact zone of their distribution range. *Annales Zoologici Fennici* (in press).
- Cardozo, G., & Chiaraviglio, M. (2011). Phenotypic plasticity of life history traits in relation to reproductive strategies in *Boa constrictor occidentalis*. *Evolutionary Ecology*, 25(5), 1163–1177.
- Cardozo, G., Naretto, S., Zak, M., & Chiaraviglio, M. (2012). The role of landscape in contact zones of sister species of lizards. In J. Tiefenbacher (Ed.), *Perspective on nature conservation—patterns, pressures and prospects* (pp. 161–176). Croatia: Intech.
- Cei, J. M. (1993). *Reptiles del Noroeste, Nordeste y Este de la Argentina. Herpetofauna de las Selvas Subtropicales, Puna y*

- Pampas*. Torino: Museo Regionale di Scienze Naturali, Monografie XIV.
- Chamut, S., Jahn, G. A., Arce, O. E. A., & Manes, M. E. (2012). Testosterone and reproductive activity in the male Tegu lizard, *Tupinambis merianae*. *Herpetological and Conservation Biology*, 7(3), 299–305.
- Clutton-Brock, T. H., & Vincent, A. C. J. (1991). Sexual selection and the potential reproductive rates of males and females. *Nature*, 351, 58–60.
- Colli, J., Peres, A. K., Jr, & Da Cunha, H. J. (1998). A new species of *Tupinambis* (Sauria, Teiidae) from central Brazil. *Herpetologica*, 54(4), 477–492.
- Cooper, W. E., & Vitt, L. J. (1989). Sexual dimorphism of head and body size in an iguanid lizard: Paradoxical results. *The American Naturalist*, 133(5), 729–733.
- Cooper, W. E., & Vitt, L. J. (1993). Female mate choice of male large broad-headed skinks. *Animal Behaviour*, 45(4), 683–693.
- Corl, A., Davis, A. R., Kuchta, S. R., Comendant, T., & Sinervo, B. (2009). Alternative mating strategies and the evolution of sexual size dimorphism in the side-blotched lizard, *Uta stansburiana*: A population level comparative analysis. *Evolution*, 64(1), 79–96.
- Cox, R. M., Butler, M. A., & John-Alder, H. B. (2007). The evolution of sexual size dimorphism in reptiles. In D. J. Fairbairn, W. U. Blanckenhorn, & T. Székely (Eds.), *Sex, size and gender roles: Evolutionary studies of sexual size dimorphism* (pp. 38–49). Oxford: Oxford University Press.
- Cox, R. M., Skelly, S. L., & John-Alder, H. B. (2003). A comparative test of adaptive hypotheses for sexual size dimorphism in lizards. *Evolution*, 57(7), 1653–1669.
- Darwin, C. R. (1871). *The descent of man and selection in relation to sex*. London: Murray.
- De Jong, K., Wacker, S., Amundsen, T., & Forsgren, E. (2009). Do operational sex ratio and density affect mating behaviour? An experiment on the two-spotted goby. *Animal Behaviour*, 78(5), 1229–1238.
- Dial, K. P., Greene, E., & Irschick, D. J. (2008). Allometry of behavior. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(7), 394–401.
- Fitch, H. S. (1981). Sexual size differences in reptiles. *Miscellaneous Publications of the Museum of Natural History University Kansas*, 70, 1–72.
- Fitzgerald, L. A., Chani, J. M., & Donadio, O. E. (1991). *Tupinambis* lizards in Argentina: implementing management of a traditionally exploited resource. In J. Robinson & K. Redford (Eds.), *Neotropical wildlife: Use and conservation* (pp. 303–316). Chicago, IL: University of Chicago.
- Fitzgerald, L. A., Cruz, F. B., & Perotti, G. (1993). The reproductive cycle and the size of maturity of *Tupinambis rufescens* (Sauria: Teiidae) in the Dry Chaco of Argentina. *Journal of Herpetology*, 27(1), 70–78.
- Gvozdk, L., & Van Damme, R. (2003). Evolutionary maintenance of sexual dimorphism in head size in the lizard *Zootoca vivipara*: A test of two hypotheses. *Journal of Zoology*, 259(1), 7–13.
- Hendrick, A. V., & Temeles, E. J. (1989). The evolution of sexual dimorphism in animal: Hypotheses and tests. *Trends in Ecology & Evolution*, 4(5), 136–138.
- Hendry, P. H., & Berg, O. K. (1999). Secondary sexual characters, energy use, senescence, and the cost of reproduction in sockeye salmon. *Canadian Journal of Zoology*, 77(11), 1663–1675.
- Henningsen, J. P., & Irschick, D. J. (2012). An experimental test of the effect of signal size and performance capacity on dominance in the green anole lizard. *Functional Ecology*, 26(1), 3–10.
- Herrel, A., Andrade, D. V., de Carvalho, J. E., Brito, A., Abe, A., & Navas, C. (2009). Aggressive behavior and performance in the Tegu Lizard *Tupinambis merianae*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 82(6), 680–685.
- Herrel, A. Van., Damme, R., & De Vree, F. (1996). Sexual dimorphism of head size in *Podarcis hispanica atrata*: testing the dietary divergence hypothesis by bite force analysis. *Netherlands Journal of Zoology*, 46(3), 253–262.
- Herrel, A., De Grauw, E., & Lemos-Espinal, J. A. (2001). Head shape and bite performance in xenosaurid lizards. *Journal of Experimental Zoology*, 290(2), 101–107.
- Herrel, A., Spithoven, L., Van Damme, R., & De Vree, F. (1999). Sexual dimorphism of head size in *Gallotia galloti*: Testing the niche divergence hypothesis by functional analyses. *Functional Ecology*, 13(3), 289–297.
- Hews, D. (1990). Examining hypotheses generated by field measures of sexual selection on male lizards. *Uta palmeri*. *Evolution*, 44(8), 1956–1966.
- Hews, D. K. (1996). Size and scaling of sexually-selected traits in the lizard *Uta palmeri*. *Journal of Zoology*, 238(4), 743–757.
- Husak, J. F., Lappin, A. K., Fox, S. F., & Lemos-Espinal, J. A. (2006). Bite force performance predicts dominance in male venerable collared lizards (*Crotaphytus antiquus*). *Copeia*, 2006(2), 301–306.
- Huyghe, K., Husak, J. F., Moore, I. T., Vanhooydonck, B., Van Damme, R., Molina-Borja, M., et al. (2010). Effects of testosterone on morphology, performance and muscle mass in a lizard. *Journal of Experimental Zoology*, 313, 9–16.
- Huyghe, K., Vanhooydonck, B., Scheers, H., Molina-Borja, M., & Van Damme, R. (2005). Morphology, performance and fighting capacity in male lizards, *Gallotia galloti*. *Functional Ecology*, 19(5), 800–807.
- Irschick, D. J., Herrel, A., Vanhooydonck, B., & Van Damme, R. (2007). A functional approach to sexual selection. *Functional Ecology*, 21, 621–626.
- Irschick, D. J., Ramos, M., Buckley, C., Elstrott, J., Carlisle, E., Lailvaux, S. P., et al. (2006). Are morphology performance relationships invariant across different seasons? A test with the green anole lizard (*Anolis carolinensis*). *Oikos*, 114(1), 49–59.
- Kalioztopoulou, A., Carretero, M. A., & Llorente, G. A. (2008). Head shape allometry and proximate causes of head sexual dimorphism in Podarcis lizards: Joining linear and geometric morphometrics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 93(1), 111–124.
- Kodric-Brown, A., Sibly, M. R., & Brown, J. H. (2006). The allometry of ornaments and weapons. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America*, 103(23), 8733–8738.
- Kratochvil, L., Fokt, M., Reháč, I., & Frinta, D. (2003). Misinterpretation of character scaling: A tale of sexual dimorphism in body shape of common lizards. *Canadian Journal of Zoology*, 81(6), 1112–1117.
- Kvarnemo, C., & Ahnesjö, I. (1996). The dynamics of operational sex ratios and competition for mates. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(10), 404–408.
- Kvarnemo, C., & Merilaita, S. (2006). Mating distribution and its temporal dynamics affect operational sex ratio: A simulation study. *Biological Journal of the Linnean Society*, 89(3), 551–559.
- Lailvaux, S., Herrel, A., Vanhooydonck, B., Meyers, J., & Irschick, D. J. (2004). Performance capacity, fighting tactics, and the evolution of life-stage morphs in the green anole lizard (*Anolis carolinensis*). *Proceedings of the Royal Society of London*, 271(1556), 2501–2508.
- Lailvaux, S., & Irschick, D. J. (2006). A functional perspective on sexual selection: insights and future prospects. *Animal Behaviour*, 72(2), 263–273.
- Lappin, A. K., & Husak, J. F. (2005). Weapon performance, not size, determines mating success and potential reproductive output in

- the collared lizard (*Crotaphytus collaris*). *The American Naturalist*, 166(3), 426–436.
- Lovich, J. E., & Gibbons, J. W. (1992). A review of techniques for quantifying sexual size dimorphism. *Growth, Development, and Aging*, 56(4), 269–281.
- Madsen, T., Ujvari, B., Shine, R., & Olsson, M. (2006). Rain, rats and phytons: Climate driven population dynamics of predators and prey in tropical Australia. *Austral Ecology*, 31(1), 30–37.
- Malo, A. F., Roldan, E. R. S., Garde, J., Soler, J., & Gomendio, M. (2005). Antlers honestly advertise sperm production and quality. *Proceedings of the Royal Society B*, 272, 149–157.
- McBrayer, L. D., & White, T. D. (2002). Bite force, behavior, and electromyography in the teiid lizard, *Tupinambis Teguxin*. *Copeia*, 2002(1), 111–119.
- Molina Borja, M., Padron Fumero, M., & Alfonso Martin, T. (1998). Morphological and behavioural traits affecting the intensity and outcome of male contests in *Gallotia galloti galloti* (Family Lacertidae). *Ethology*, 104(4), 314–322.
- Moller, A. P. (1996). The cost of secondary sexual characters and the evolution of cost-reducing traits. *Ibis*, 138(1), 112–119.
- Mowles, S. L., & Ord, T. J. (2012). Repetitive signals and mate choice: Insights from contest theory. *Animal Behaviour*, 84(2), 295–304.
- Olsson, M. (1993). Male preference for large females and assortative mating for body size in the sand lizard (*Lacerta agilis*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 32, 337–341.
- Petrie, M. (1992). Are all secondary sexual display structures positively allometric and, if so, why? *Animal Behaviour*, 43(1), 173–175.
- Porini, G. M. (2006). Proyecto *Tupinambis*, una propuesta para el manejo de *Tupinambis rufescens* y *T. merianae* en la Argentina. In M.L. Bolkovic & D. Ramadori (Eds.), *Manejo de Fauna Silvestre en la Argentina. Programas de uso sustentable* (pp. 65–75). Buenos Aires: Dirección de Fauna Silvestre, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable.
- Pough, F. H., Andrews, R., Cadle, J., Crump, M., Savitzky, A., & Wells, K. (2001). *Herpetology*. New Jersey: Prentice Hall.
- Resolución No 11/2011. Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación. Boletín Oficial No 32304.
- Rieppel, O. (1980). The trigeminal jaw adductor musculature of *Tupinambis*, with comments on the phylogenetic relationships of the Teiidae (Reptilia, Lacertilia). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 69(1), 1–29.
- Schoener, T. W. (1977). Competition and the niche. In C. Gans & D. Tinkle (Eds.), *Biology of the reptilia* (pp. 35–136). London: Academic Press.
- Sheldon, B. C. (1994). Male phenotype, fertility, and the pursuit of extra-pair copulations by female birds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, 257(1348), 25–30.
- Shine, R., Ambariyanto, Harlow, P. S., & Mumpuni, (1999). Reticulated pythons in Sumatra: Biology, harvesting and sustainability. *Biological Conservation*, 87(3), 349–357.
- Simmons, L. W., & Emlen, D. J. (2006). Evolutionary trade-off between weapons and testes. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America*, 103(44), 16346–16351.
- Stamps, J. (1983). Sexual selection, sexual dimorphism and territoriality. In R. B. Huey, E. R. Pianka, & T. W. Schoener (Eds.), *Lizard ecology: Studies of a model organism* (pp. 169–204). Cambridge: Harvard University Press.
- Vanhooydonck, B., Herrel, A. Y., Van Damme, R., & Irschik, D. J. (2005a). Does dewlap size predict male bite performance in Jamaican *Anolis* lizards? *Functional Ecology*, 19(1), 38–42.
- Vanhooydonck, B., Herrel, A. Y., Van Damme, R., Meyers, J. J., & Irschik, D. J. (2005b). The relationship between dewlap size and performance changes with age and sex in a Green Anole (*Anolis carolinensis*) lizard population. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 59(1), 157–165.
- Vitt, L. J., & Cooper, W. E., Jr. (1985). The evolution of sexual dimorphism in the skink *Eumeces laticeps*: An example of sexual selection. *Canadian Journal of Zoology*, 63(5), 995–1002.

# Female mediation of competitive fertilization success in *Drosophila melanogaster*

Stefan Lüpold<sup>a,1</sup>, Scott Pitnick<sup>a</sup>, Kirstin S. Berben<sup>a</sup>, Cecilia S. Bengini<sup>a,b</sup>, John M. Belote<sup>a</sup>, and Mollie K. Manier<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Biology, Syracuse University, Syracuse, NY 13244; and <sup>b</sup>Instituto de Diversidad y Ecología Animal, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba X5000JJC, Argentina

Edited by Andrew G. Clark, Cornell University, Ithaca, NY, and approved May 20, 2013 (received for review January 18, 2013)

**How females store and use sperm after remating can generate postcopulatory sexual selection on male ejaculate traits. Variation in ejaculate performance traits generally is thought to be intrinsic to males but is likely to interact with the environment in which sperm compete (e.g., the female reproductive tract). Our understanding of female contributions to competitive fertilization success is limited, however, in part because of the challenges involved in observing events within the reproductive tract of internally fertilizing species while discriminating among sperm from competing males. Here, we used females from crosses among isogenic lines of *Drosophila melanogaster*, each mated to two genetically standardized males (the first with green- and the second with red-tagged sperm heads) to demonstrate heritable variation in female remating interval, progeny production rate, sperm-storage organ morphology, and a number of sperm performance, storage, and handling traits. We then used multivariate analyses to examine relationships between this female-mediated variation and competitive paternity. In particular, the timing of female ejection of excess second-male and displaced first-male sperm was genetically variable and, by terminating the process of sperm displacement, significantly influenced the relative numbers of sperm from each male competing for fertilization, and consequently biased paternity. Our results demonstrate that females do not simply provide a static arena for sperm competition but rather play an active and pivotal role in postcopulatory processes. Resolving the adaptive significance of genetic variation in female-mediated mechanisms of sperm handling is critical for understanding sexual selection, sexual conflict, and the coevolution of male and female reproductive traits.**

cryptic female choice | heritability | sperm ejection

**B**ecause females of many species mate with multiple males within a reproductive cycle (1–3), sexual selection can continue after mating. When sperm from different males co-occur in the female reproductive tract, they compete for fertilization of the eggs, and females may bias sperm use to favor some males over others. Such sperm competition and cryptic female choice are regarded as the postcopulatory equivalents of premating male–male competition and female choice, respectively (4, 5). However, this characterization may be overly simplistic and belie differences between selection episodes that are critical for understanding selection dynamics.

Adaptations arising through premating versus postcopulatory sexual selection are likely to differ in phenotypic and genotypic complexity. With premating sexual selection, male armaments and ornaments tend to be complex somatic traits under the control of multiple genes (e.g., ref. 6), and female mate preferences predominantly have sensory and cognitive bases (7–9). In contrast, the principal target of postcopulatory sexual selection on males is the ejaculate. (Note: Penis and copulatory courtship traits are excluded here for the sake of argument.) Postcopulatory ornaments and armaments thus predominantly include single active molecules such as accessory gland proteins (Acps) that are controlled by single genes (10, 11) and traits borne by haploid single cells [e.g., sperm structures, membrane-bound proteins, energetics (12, 13)]. The genetics of these traits are relatively unresolved (12, 14–17). The primary targets of postcopulatory sexual selection on

females will be aspects of reproductive tract biochemistry, neurophysiology, and morphology that interact with ejaculates and potentially bias paternity (5, 18–21). The genetics of cryptic female choice also are not well resolved (but see ref. 22). Because ejaculate competition and processes of female sperm selection occur within the female reproductive tract, the relative competitiveness of ejaculates is predicted to be a function of ejaculate–female compatibility. If so, then sperm competition and cryptic female choice represent more of a continuum than dichotomous processes, especially (but not exclusively; e.g., refs. 23–26) in internally fertilizing species (20, 21).

Adaptations arising through premating versus postcopulatory sexual selection also are likely to differ fundamentally in the extent to which intersexual interactions influence their expression. Sex-specific, premating traits generally are considered separate entities with distinct phenotypes and fitness consequences. In contrast, consider ejaculate processing and function within females. Seminal fluid is biochemically complex, with ~150 Acps being inseminated into female *Drosophila melanogaster* (27, 28). Most Acps are believed to have unique target receptors within the female (11), although to date only one [for sex peptide (29)] has been identified. Moreover, phenotypic expression of some Acps follows modification (e.g., proteolytic cleavage) within the female, a process thought to require both male and female secretory contributions (11, 21). Likewise, sperm may complete maturation, capacitate, or otherwise undergo modification within the female. In some cases, these modifications are known to involve biochemical ejaculate–female interactions (21), with direct implications for competitive fertilization success [e.g., (30, 31)]. A major focus in the study of postcopulatory sexual selection has been to understand the evolution of ejaculate quality traits that are likely to influence competitive fertilization success, such as swimming velocity [reviewed by (32–34)]. Variation in these phenotypes has almost exclusively been assayed *in vitro* and interpreted as intrinsic to males. However, to the extent that ejaculate phenotypes are influenced by females and/or are the product of male-by-female interactions, ejaculate phenotypes in the narrow sense may not exist outside of the biochemically and structurally complex environment of the female reproductive tract. Rather, they may have to be considered a special case of gene-by-environment interactions (also see ref. 35).

Therefore, the use of assays conducted *in vivo* under competitive conditions to investigate genetically variable traits that influence competitive fertilization success and the respective contribution of the sexes to their expression would strengthen our knowledge of postcopulatory sexual selection and its role in maintaining variation and driving diversification. In a series of pioneering experiments using fixed-chromosome lines of *D. melanogaster*, Clark and colleagues (36–40) demonstrated male, female, and

Author contributions: S.L., S.P., J.M.B., and M.K.M. designed research; S.L., S.P., K.S.B., C.S.B., and M.K.M. performed research; J.M.B. contributed new reagents/analytic tools; S.L. analyzed data; and S.L., S.P., and M.K.M. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: sluepold@gmail.com.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1300954110/-DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1300954110/-DCSupplemental).







a disproportionate number of second-male compared with first-male sperm, presumably because the sperm of the second male had more time to achieve entry into the sperm-storage organs and to displace first-male sperm residing there. In fact, our data indicate that this bias was driven primarily by displacement of first-male sperm rather than by variation in second-male sperm storage, both in terms of absolute numbers displaced and the proportion of each male's total sperm mass that was ejected. The potential adaptive significance of sperm ejection time is evident in its direct influence on paternity, which was determined by the relative numbers of sperm in the fertilization set (also see refs. 44–46).

Once the fertilization set is established, female *D. melanogaster* may not be able to bias competitive fertilization per se further, given that sperm for fertilization in this species derive primarily from the SR and in direct proportion to their representation (46). This pattern of sperm use contrasts starkly with that of *Drosophila simulans*, in which females may influence relative fertilization success directly even after sperm ejection. In this species, sperm for fertilization derive equally from the spermathecae and SR, and each sperm-storage organ exhibits a significant bias: favoring first-male sperm in the SR and second-male sperm in the spermathecae, with females able to shift toward one or the other storage organ depending on the mating order of males of differing quality (46, 47). Nevertheless, in the present study we also did find genetic variation in female remating intervals and progeny production rates (also see refs. 48–50), both of which can generate postcopulatory sexual selection on males.

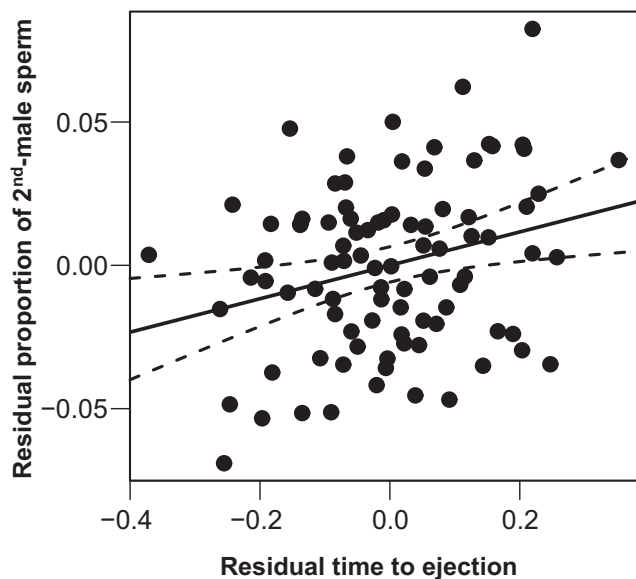
Previous experimental evolution research with *D. melanogaster* found heritable variation in SR length and revealed that the evolution of longer SRs drove the evolution of longer sperm (e.g., ref. 51). This latter result was attributed to a demonstrated interaction between SR length and sperm length that influenced competitive fertilization success (51). Longer sperm were found to be superior to shorter sperm in displacing, and resisting displacement by, competing sperm (52) (also see ref. 44), and this

advantage increased with SR length (51). In the absence of systematic variation in sperm length, SR length variation was unrelated to the pattern of sperm precedence (53). Here, we similarly found significant heritable variation in SR length and the lack of any relationship to the second-male paternity share ( $P_2$ ) in the absence of sperm-length variation. We did, however, find that females with relatively long SRs remated faster, tended to produce progeny at a higher rate during that period, stored more sperm initially, and had more sperm remaining in storage after 3 d of oviposition than females with a shorter SR; all these factors may contribute to postcopulatory sexual selection on males (53). The underlying mechanisms for these relationships currently remain unresolved. It is possible that females with longer SRs are more strongly influenced by male seminal proteins that are known to mediate various aspects of female sperm storage, receptivity, and oviposition (10, 11), because the longer organ receives or retains more seminal plasma and/or because it possesses more seminal fluid protein receptors. Alternatively, SR length may be genetically correlated with female quality and thus fecundity, with highly fecund females remating faster and more frequently than females of poor quality (e.g. refs. 54–56, but see refs. 57 and 58).

In addition to sperm-ejection time, females potentially could have impacted the composition of the fertilization set, and hence  $P_2$ , by influencing either the number of sperm transferred during copulation (e.g., ref. 59) or the behavior of sperm (i.e., swimming velocity). Sperm velocity has been found to be a critical determinant of fertilization success in diverse taxa, with faster sperm having an advantage in some taxa (e.g., refs. 60 and 61) and slower sperm having an advantage in others (44, 62). In *D. melanogaster*, slower sperm have been shown to be superior in displacing and resisting displacement by faster sperm, with sperm velocity significantly influenced by male genotype (44). However, we found no significant female genetic variation for copulation duration or the number of sperm transferred, supporting the contention that these phenomena are under male control in *D. melanogaster* and related species (ref. 63 and references therein). The absence of a relationship between the number of sperm transferred and female genetic background further reinforces the interpretation that the number of sperm entering or remaining in storage is attributable primarily to female effects rather than to differential male allocation relative to the female genotype (see above). Similarly, we found that neither female genetic background nor SR length significantly affected sperm velocity. This negative result is potentially important; although a few previous investigations have shown significant female and/or male-by-female interaction effects on sperm velocity (23–26), all these studies have been conducted in vitro with externally fertilizing species and were not designed to explore genetic variation.

It is important to note that variation in reproductive phenotypes attributed to female-mediated genetic variation in the present study (where competing male genotypes were held constant) and attributed to male-mediated genetic variation in a previous study (ref. 44, in which female genotypes were held constant) may be explained in part or entirely by genetic variation in male-by-female interactions (22, 37–39, 64). An investigation in progress soon will sort out these results. Such interaction between the sexes is predicted by genetic compatibility models of sexual selection (e.g., refs. 65 and 66) and is expected to be mediated often by physiological interactions between ejaculates and female reproductive tracts [e.g., via seminal fluid proteins and female receptors for them (21)]. Whatever the adaptive significance may be, genetic variation in male and female reproductive characters identified in investigations of our isolines likely represent some of the mechanisms underlying previous demonstrations of genetic male-by-male and male-by-female interactions in sperm precedence (e.g., refs. 37–39 and 41).

Cryptic female choice is defined as “nonrandom paternity biases resulting from female morphology, physiology, or behavior that occur after coupling” (67), and our results meet those criteria. Nevertheless, because our investigation was designed to reveal strictly female-mediated genetic variation in traits relevant to postcopulatory sexual selection, which necessitated standardizing



**Fig. 2.** Partial residual plot reflecting the significant relationship between the respective partial residuals of the time to female sperm ejection and the proportion of second-male sperm in storage ( $S_2$ ) postejaculation ( $t = 2.68$ ,  $P = 0.009$ ). Data points depict mean values for each of the 90 isoline crosses; dashed lines indicate the 95% confidence interval. Both axes are controlled for the number of first-male resident sperm at remating and the number of sperm transferred by the second male (full statistics of the multiple regression model are given in the main text).



1. Arnqvist G, Rowe L (2005) *Sexual Conflict* (Princeton Univ Press, Princeton, NJ).
2. Hosken DJ, Stockley P (2003) Benefits of polyandry: A life history perspective. *Evol Biol* 33:173–194.
3. Jennions MD, Petrie M (2000) Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biol Rev Camb Philos Soc* 75(1):21–64.
4. Parker GA (1970) Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biol Rev Camb Philos Soc* 45(4):526–567.
5. Thornhill R (1983) Cryptic female choice and its implications in the scorpionfly *Harporhynchus nigricipes*. *Am Nat* 122(6):765–788.
6. Lande R (1980) Sexual dimorphism, sexual selection, and adaptation in polygenic characters. *Evolution* 34(2):292–305.
7. Jennions MD, Petrie M (1997) Variation in mate choice and mating preferences: A review of causes and consequences. *Biol Rev Camb Philos Soc* 72(2):283–327.
8. Kirkpatrick M, Rand AS, Ryan MJ (2006) Mate choice rules in animals. *Anim Behav* 71(5):1215–1225.
9. Ryan MJ (1990) Sexual selection, sensory systems and sensory exploitation. *Oxf Surv Evol Biol* 7:157–195.
10. Chapman T (2001) Seminal fluid-mediated fitness traits in *Drosophila*. *Heredity (Edinb)* 87(Pt 5):511–521.
11. Ravi Ram K, Wolfner MF (2007) Seminal influences: *Drosophila* Acps and the molecular interplay between males and females during reproduction. *Integr Comp Biol* 47(3):427–445.
12. Dorus S, Karr TL (2009) *Sperm Biology: An Evolutionary Perspective*, eds Birkhead TR, Hosken DJ, Pitnick S (Academic Press, San Diego), pp 435–469.
13. Pitnick S, Hosken DJ, Birkhead TR (2009) *Sperm Biology: An Evolutionary Perspective*, eds Birkhead TR, Hosken DJ, Pitnick S (Academic Press, San Diego), pp 69–149.
14. Pitnick S, Dobler R, Hosken DJ (2009) Sperm length is not influenced by haploid gene expression in the flies *Drosophila melanogaster* and *Scathophaga stercoraria*. *Proc Biol Sci* 276(1675):4029–4034.
15. Simmons LW, Moore AJ (2009) *Sperm Biology: An Evolutionary Perspective*, eds Birkhead TR, Hosken DJ, Pitnick S (Academic Press, San Diego), pp 405–434.
16. Fiumera AC, Dumont BL, Clark AG (2005) Sperm competitive ability in *Drosophila melanogaster* associated with variation in male reproductive proteins. *Genetics* 169(1):243–257.
17. Fiumera AC, Dumont BL, Clark AG (2007) Associations between sperm competition and natural variation in male reproductive genes on the third chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 176(2):1245–1260.
18. Birkhead TR (1998) Cryptic female choice: Criteria for establishing female sperm choice. *Evolution* 52(4):1212–1218.
19. Birkhead TR, Pizzari T (2002) Postcopulatory sexual selection. *Nat Rev Genet* 3(4):262–273.
20. Eberhard WG (1996) *Female Control: Sexual Selection by Cryptic Female Choice* (Princeton Univ Press, Princeton, New Jersey).
21. Pitnick S, Wolfner MF, Suarez SS (2009) *Sperm Biology: An Evolutionary Perspective*, eds Birkhead TR, Hosken DJ, Pitnick S (Academic Press, San Diego), pp 247–304.
22. Giardina TJ, Beavis A, Clark AG, Fiumera AC (2011) Female influence on pre- and post-copulatory sexual selection and its genetic basis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Ecol* 20(19):4098–4108.
23. Evans JP, Marshall DJ (2005) Male-by-female interactions influence fertilization success and mediate the benefits of polyandry in the sea urchin *Helicodidaris erythrogramma*. *Evolution* 59(1):106–112.
24. Rosengrave P, Gemmill NJ, Metcalf V, McBride K, Montgomerie R (2008) A mechanism for cryptic female choice in chinook salmon. *Behav Ecol* 19(6):1179–1185.
25. Urbach D, Folstad I, Rudolfsen G (2005) Effects of ovarian fluid on sperm velocity in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Behav Ecol Sociobiol* 57(5):438–444.
26. Simmons LW, Roberts JD, Dziminski MA (2009) Egg jelly influences sperm motility in the externally fertilizing frog, *Crinia georgiana*. *J Evol Biol* 22(1):225–229.
27. Findlay GD, MacCoss MJ, Swanson WJ (2009) Proteomic discovery of previously unannotated, rapidly evolving seminal fluid genes in *Drosophila*. *Genome Res* 19(5):886–896.
28. Findlay GD, Yi X, MacCoss MJ, Swanson WJ (2008) Proteomics reveals novel *Drosophila* seminal fluid proteins transferred at mating. *PLoS Biol* 6(7):e178.
29. Yapici N, Kim Y-J, Ribeiro C, Dickson BJ (2008) A receptor that mediates the post-mating switch in *Drosophila* reproductive behaviour. *Nature* 451(7174):33–37.
30. Peng J, et al. (2005) Gradual release of sperm bound sex-peptide controls female postmating behavior in *Drosophila*. *Curr Biol* 15(3):207–213.
31. Fricke C, Wigby S, Hobbs R, Chapman T (2009) The benefits of male ejaculate sex peptide transfer in *Drosophila melanogaster*. *J Evol Biol* 22(2):275–286.
32. Snook RR (2005) Sperm in competition: Not playing by the numbers. *Trends Ecol Evol* 20(1):46–53.
33. Pizzari T, Parker GA (2009) *Sperm Biology: An Evolutionary Perspective*, eds Birkhead TR, Hosken DJ, Pitnick S (Academic, San Diego), pp 207–245.
34. Simmons LW, Fitzpatrick JL (2012) Sperm wars and the evolution of male fertility. *Reproduction* 144(5):519–534.
35. Ingleby FC, Hunt J, Hosken DJ (2010) The role of genotype-by-environment interactions in sexual selection. *J Evol Biol* 23(10):2031–2045.
36. Clark AG, Begun DJ (1998) Female genotypes affect sperm displacement in *Drosophila*. *Genetics* 149(3):1487–1493.
37. Clark AG, Begun DJ, Prout T (1999) Female x male interactions in *Drosophila* sperm competition. *Science* 283(5399):217–220.
38. Clark AG, Dermitzakis ET, Civetta A (2000) Nontransitivity of sperm precedence in *Drosophila*. *Evolution* 54(3):1030–1035.
39. Chow CY, Wolfner MF, Clark AG (2010) The genetic basis for male x female interactions underlying variation in reproductive phenotypes of *Drosophila*. *Genetics* 186(4):1355–1365.
40. Zhang R, Clark AG, Fiumera AC (2013) Natural genetic variation in male reproductive genes contributes to nontransitivity of sperm competitive ability in *Drosophila melanogaster*. *Mol Ecol* 22(5):1400–1415.
41. Bjork A, Starmer WT, Higginson DM, Rhodes CJ, Pitnick S (2007) Complex interactions with females and rival males limit the evolution of sperm offence and defence. *Proc Biol Sci* 274(1619):1779–1788.
42. Parsons PA, Hosgood SMW (1968) Genetic heterogeneity among the founders of laboratory populations of *Drosophila*. I. Scutellar chaetae. *Genetica* 38(3):328–339.
43. David JR, et al. (2005) Isofemale lines in *Drosophila*: An empirical approach to quantitative trait analysis in natural populations. *Heredity (Edinb)* 94(1):3–12.
44. Lüpold S, et al. (2012) How multivariate ejaculate traits determine competitive fertilization success in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* 22(18):1667–1672.
45. Manier MK, et al. (2010) Resolving mechanisms of competitive fertilization success in *Drosophila melanogaster*. *Science* 328(5976):354–357.
46. Manier MK, et al. (2013) Rapid diversification of sperm precedence traits and processes among three sibling *Drosophila* species. *Evolution*, 10.1111/evo.12117.
47. Manier MK, Lüpold S, Pitnick S, Starmer WT (2013) An analytical framework for estimating fertilization bias from multiple sperm-storage organs during sperm competition. *Am Nat*, 10.1086/671782.
48. Gromko MH, Newport MEA (1988) Genetic basis for remating in *Drosophila melanogaster*. II. Response to selection based on the behavior of one sex. *Behav Genet* 18(5):621–632.
49. Casares P, Carracedo MC, Piñeiro R, San Miguel E, Garcia-Florez L (1992) Genetic basis for female receptivity in *Drosophila melanogaster*: A diallel study. *Heredity (Edinb)* 69(Pt 5):400–405.
50. Piñeiro R, Carracedo MC, Izquierdo JL, Casares P (1993) Bidirectional selection for female receptivity in *Drosophila melanogaster*. *Behav Genet* 23(1):77–83.
51. Miller GT, Pitnick S (2002) Sperm-female coevolution in *Drosophila*. *Science* 298(5596):1230–1233.
52. Pattarini JM, Starmer WT, Bjork A, Pitnick S (2006) Mechanisms underlying the sperm quality advantage in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 60(10):2064–2080.
53. Miller GT, Pitnick S (2003) Functional significance of seminal receptacle length in *Drosophila melanogaster*. *J Evol Biol* 16(1):114–126.
54. Gage MJG (1998) Influences of sex, size, and symmetry on ejaculate expenditure in a moth. *Behav Ecol* 9(6):592–597.
55. Wedell N, Cook PA (1999) Butterflies tailor their ejaculate in response to sperm competition risk and intensity. *Proc Biol Sci* 266(1423):1033–1039.
56. Simmons LW, Kvarnemo C (1997) Ejaculate expenditure by male bushcrickets decreases with sperm competition intensity. *Proc Biol Sci* 264(1385):1203–1208.
57. Pitnick S, Brown WD, Miller GT (2001) Evolution of female remating behaviour following experimental removal of sexual selection. *Proc Biol Sci* 268(1467):557–563.
58. Pitnick S, Garcia-González F (2002) Harm to females increases with male body size in *Drosophila melanogaster*. *Proc Biol Sci* 269(1502):1821–1828.
59. Pilastro A, Simonato M, Bisazza A, Evans JP (2004) Cryptic female preference for colorful males in guppies. *Evolution* 58(3):665–669.
60. Gage MJG, et al. (2004) Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic salmon: Relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. *Curr Biol* 14(1):44–47.
61. Malo AF, et al. (2005) Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biol Reprod* 72(4):822–829.
62. Dziminski MA, Roberts JD, Beveridge M, Simmons LW (2009) Sperm competitiveness in frogs: Slow and steady wins the race. *Proc Biol Sci* 276(1675):3955–3961.
63. Mazzi D, Kesäniemi J, Hoikka A, Klappert K (2009) Sexual conflict over the duration of copulation in *Drosophila montana*: Why is longer better? *BMC Evol Biol* 9:132.
64. Nilsson T, Fricke C, Arnqvist G (2003) The effects of male and female genotype on variance in male fertilization success in the red flour beetle (*Tribolium castaneum*). *Behav Ecol Sociobiol* 53(4):227–233.
65. Zeh JA, Zeh DW (1997) The evolution of polyandry II: Post-copulatory defences against genetic incompatibility. *Proc Biol Sci* 264(1378):69–75.
66. Tregenza T, Wedell N (2000) Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: Invited review. *Mol Ecol* 9(8):1013–1027.
67. Pitnick S, Brown WD (2000) Criteria for demonstrating female sperm choice. *Evolution* 54(3):1052–1056.
68. Yeates SE, et al. (2009) Atlantic salmon eggs favour sperm in competition that have similar major histocompatibility alleles. *Proc Biol Sci* 276(1656):559–566.
69. Gillingham MAF, et al. (2009) Cryptic preference for MHC-dissimilar females in male red junglefowl, *Gallus gallus*. *Proc Biol Sci* 276(1659):1083–1092.
70. Bishop JDD, Jones CS, Noble LR (1996) Female control of paternity in the internally fertilizing compound ascidian *Diplosoma listerianum*. II. Investigation of male mating success using RAPD markers. *Proc Biol Sci* 263(1369):401–407.
71. Olsson M, Shine R, Madsen T, Gullberg A, Tegelström H (1996) Sperm selection by females. *Nature* 383(6601):585.
72. Bretman A, Wedell N, Tregenza T (2004) Molecular evidence of post-copulatory inbreeding avoidance in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. *Proc Biol Sci* 271(1535):159–164.
73. Pizzari T, Birkhead TR (2000) Female feral fowl eject sperm of subordinate males. *Nature* 405(6788):787–789.
74. Nonidez JF (1920) The internal phenomena of reproduction in *Drosophila*. *Biol Bull* 39(4):207–230.
75. Zuur AF, Ieno EN, Walker NJ, Saveliev AA, Smith GS (2009) *Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R* (Springer, New York).
76. Nakagawa S, Schielzeth H (2013) A general and simple method for obtaining  $R^2$  from generalized linear mixed-effects models. *Methods Ecol Evol* 4(2):133–142.