

**PATRONES DE PRODUCCIÓN ESPERMÁTICA EN
ESCORPIONES (ARACHNIDA, SCORPIONES): UNA
APROXIMACIÓN COMPARADA Y EXPERIMENTAL.**

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

por

Biol. David Eduardo Vrech

**Director: Alfredo V. Peretti
Co-Director: Camilo I Mattoni**

**Laboratorio de Biología Reproductiva y Evolución.
Cátedra de Diversidad Animal I**



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

Córdoba, Argentina

2013

COMISIÓN ASESORA

Margarita Chiaraviglio, Laboratorio de Biología del Comportamiento, Universidad Nacional de Córdoba.

Alfredo V. Peretti, Laboratorio de Biología Reproductiva y Evolución, Universidad Nacional de Córdoba.

Martin Ramírez, Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, Buenos Aires.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:.....

Aclaración:

Firma:.....

Aclaración:.....

Firma:.....

Aclaración:.....

Listado de publicaciones derivadas de la tesis

1. Vrech, David E., Alfredo V. Peretti, and Camilo I. Mattoni (2011). Sperm package morphology in scorpions and its relation to phylogeny. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 161: 463-483.

Índice	
Listado de publicaciones derivadas de la tesis	4
Resumen	10
Summary	11
LINEAMIENTOS GENERALES Y ORGANIZACIÓN DE LA PRESENTE TESIS	12
SECCIÓN A: PAQUETES ESPERMÁTICOS.....	14
1. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LOS PAQUETES ESPERMÁTICOS EN EL ORDEN SCORPIONES	16
1.1. INTRODUCCIÓN	16
1.2. OBJETIVOS.	18
1.2.1. General	18
1.2.2. Específicos.....	18
1.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
1.3.1. Especies estudiadas	19
1.3.2. Procedimiento general para la extracción de los paquetes de esperma y preparado de las muestras	21
1.3.2.1. Preparados para microscopía óptica	21
1.3.2.2. Preparados para microscopía electrónica de barrido (SEM)	22
1.3.3. Análisis del material	22
1.3.3.1. Morfología general de paquetes espermáticos y medidas	22
1.3.4. Análisis de correlación de mediciones.....	24
1.3.5. Ajuste a la hipótesis filogenética.....	24
1.3.6. Determinación de la cantidad de espermatozoides por paquete espermático	26
1.4. RESULTADOS	27
1.4.1 Morfología general de paquetes espermáticos	27
1.4.1.1 Análisis cualitativo	27
1.4.1.2 Análisis cuantitativo (mediciones)	49
1.4.1.3 Análisis de correlación	51
1.4.1.4 Ajuste a la hipótesis filogenética.	52
1.4.1.5 Determinación de la cantidad de espermatozoides por paquete espermático.....	56
1.5 DISCUSIÓN.....	60
2 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD MORFOLÓGICA DE PAQUETES ESPERMÁTICOS DENTRO DE UN INDIVIDUO. ¿PODEMOS HABLAR DE HETEROMORFISMO DE PAQUETES ESPERMÁTICOS EN ESCORPIONES?	
.....	68

2.1 INTRODUCCION.....	68
2.2 OBJETIVOS	70
2.2.1 General	70
2.2.2 Específicos.....	70
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	71
2.3.1 Especies estudiadas y extracción de material	71
2.3.2 Variabilidad de paquetes espermáticos.....	71
2.3.2.1 Caracterización de la variabilidad morfológica	71
2.3.2.2 Cuantificación de la concentración vesicular y estimación del porcentaje de paquetes con variantes morfológicas en especies de Bothriuridae.....	72
2.3.2.3 Evaluación del efecto de la temporada de captura y la condición corporal sobre el polimorfismo en <i>Brachistosternus ferrugineus</i> (Bothriuridae)	72
2.3.2.4 Influencia del número de espermátóforos depositados durante una temporada reproductiva sobre el conteo de paquetes espermáticos con variantes morfológicas en machos de <i>Timogenes elegans</i>	73
2.4 RESULTADOS	74
2.4.1 Variación morfológica intra-individuo de los paquetes espermáticos.....	74
2.4.1.1 Caracterización de la variación morfológica	74
2.4.2 Cuantificación de la concentración vesicular y estimación del porcentaje de paquetes espermáticos con variantes morfológicas en especies de la familia Bothriuridae.....	81
2.4.3 Evaluación del efecto de la temporada de captura y condición corporal sobre el polimorfismo de <i>Brachistosternus ferrugineus</i>	82
2.4.4 Influencia de apareamientos sucesivos sobre la producción de paquetes espermáticos con variante en el arreglo espacial en <i>Timogenes elegans</i>	83
2.5 DISCUSION.....	85
2.5.1 Ausencia de polimorfismo propiamente dicho en Bothriuridae	85
2.5.2 Posible presencia de polimorfismo real en <i>Caraboctonus keyserlingi</i> (Iuridae)	87
SECCIÓN B: VARIABLES DE PRODUCCIÓN ESPERMÁTICA.....	89
3 Análisis intraespecífico de la producción, almacenamiento y transferencia del esperma y sus variables asociadas	92
3.1 INTRODUCCIÓN.....	92
3.2 OBJETIVOS	94

3.2.1 General	94
3.2.2 específicos	94
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS	95
3.3.1 Especies analizadas.....	95
3.3.2 Descripción de producción espermática	95
3.3.2.1 Extracción y medición del órgano de producción (Testículos)...	95
3.3.2.2 Descripción del almacenamiento en el macho (vesículas seminales).....	96
3.3.2.3 Descripción del volumen y la concentración espermático a transferir (espermátforo pre-inseminación)	97
3.3.3. Análisis en <i>Timogenes elegans</i>	98
3.3.4. Influencia del número de espermátforos depositados durante una temporada reproductiva sobre el volumen y la concentración de esperma en machos de <i>Timogenes</i>	98
3.3.5. Análisis intraespecífico de modelos con variables que influyen la masa testicular, el volumen vesicular y la concentración de esperma en los machos	98
3.4 RESULTADOS	100
3.4.1 Descripción del volumen de esperma general del macho.....	100
3.4.2 Concentración en vesícula seminal	102
3.4.2.2 Concentración de espermatozoides en el volumen contenido dentro del espermátforo de Timogenes	104
3.4.3. Análisis en <i>Timogenes elegans</i>	104
3.4.4 Apareamientos sucesivos en especies del género <i>Timogenes</i>	106
3.4.5 Análisis intraespecífico de modelos con variables que influyen la masa corporal, la masa testicular, el volumen vesicular y la concentración de esperma en los machos	107
3.5 DISCUSION.....	109
3.5.1 Volumen de esperma	109
3.5.2 Concentración de espermatozoides	110
3.5.3 Influencia de variables sobre la producción espermática.....	113
4 ANÁLISIS COMPARATIVO INTERESPECIFICO DE VARIABLES ESPERMÁTICAS Y SU RELACIÓN CON PATRONES DE ALOMETRÍA	115
4.1 INTRODUCCIÓN	115
4.2 OBJETIVOS	117
4.2.1 Generales	117
4.2.2 Objetivos específicos	117

4.3 MATERIALES Y METODOS.....	118
4.3.1 Especies analizadas.....	118
4.3.2 Variables registradas.....	118
4.3.2.1 Obtención de la masa corporal	119
4.3.2.2 Extracción y medición de los testículos.....	119
4.3.2.3 Extracción y medición de las vesículas seminales.....	119
4.3.2.4 Obtención y medición de Espermatozoides	119
4.3.2.5 Obtención y medición de la cápsula del espermatóforo	120
4.3.3 Influencia del tamaño corporal. Evaluación del efecto alométrico y relaciones entre variables	121
4.3.4. Control filogenético.....	122
4.4 RESULTADOS	123
4.4.1 Análisis descriptivo y efecto alométrico	123
4.4.1.1 Análisis descriptivo de la masa testicular y relación alométrica	123
4.4.1.2 Largo total de espermatozoides, variación y alometría	126
4.4.2 Volumen vesicular y volumen del espermatóforo: descripción y crecimiento alométrico	128
4.4.2.1 Volumen vesicular	128
4.4.2.2 Volumen del espermatóforo	130
4.4.3 Síntesis comparativa de la secuencia integral de producción espermática y relación entre los diferentes sitios ligados a la reproducción	130
4.4.4 Relación entre órganos reproductivos	133
4.5 DISCUSIÓN.....	134
Resumen	142
5 INFLUENCIA DEL RIESGO DE COMPETENCIA ESPERMÁTICA SOBRE VARIABLES DE PRODUCCIÓN ALMACENAMIENTO Y TRANSFERENCIA DE ESPERMATOZOIDES EN ESCORPIONES DE LA FAMILIA BOTHRIURIDAE	143
5.1 INTRODUCCIÓN.....	143
5.2 OBJETIVOS	148
5.2.1 General	148
5.2.2 Específicos.....	148
5.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	149
5.3.1 Especies Analizadas.	149

5.3.2. Análisis de la influencia de la poliandria sobre variables de producción espermática	149
5.4 RESULTADOS	151
5.4.1 Testículo	151
5.4.2 Largo del espermatozoide y variabilidad del largo en espermatozoides	151
5.4.3 Vesícula seminal	152
5.4.4 Espermatóforo.....	152
5.5 DISCUSIÓN	155
5.5.1 Efecto de la competencia espermática sobre variables de producción de espermática.....	155
5.5.1.1 Influencia de la poliandria sobre la masa testicular.....	155
5.5.1.2 Poliandria y caracteres relacionados con el tamaño del espermatozoide.....	157
5.5.2 Efecto de la competencia espermática sobre variables de almacenamiento y transferencia	159
5.5.2.1 Efecto de la poliandria sobre la vesícula seminal.....	159
5.5.2.2 Efecto de la poliandria sobre el volumen del espermatóforo ...	160
Conclusiones generales y perspectivas futuras	162
BIBLIOGRAFIA.....	165

Resumen

La competencia espermática es un tipo de selección sexual que moldea diversos aspectos de la biología reproductiva de los organismos. Un carácter que se ve frecuentemente influenciado es el tamaño y la forma de los espermatozoides. Los escorpiones son excelentes modelos para el análisis de la competencia espermática, fundamentalmente porque las hembras son poliándricas y almacenan esperma en espermatecas pares. Los escorpiones presentan los espermatozoides de tipo filiforme flagelar y agrupados dentro de paquetes espermáticos. La morfología general de estos paquetes espermáticos tienen implicancia filogenética, y existe una gran variabilidad en cuanto a formas y tamaños. Prevalece sin embargo la forma plegado en donde el paquete espermático se dobla en la zona de las piezas medias de los espermatozoides que lo componen. La forma ancestral carecía de paquetes espermáticos, y esta condición que fue seguida por la generación de paquetes plegados en grupos más derivados. Los espermatozoides que forman dichos paquetes muy probablemente deriven de una sola espermátida. Luego los paquetes espermáticos evolucionaron en las formas que vemos actualmente. Existen algunas variantes dentro de los mismos machos que en general no se catalogan como polimorfismo y serían más bien variantes de la forma patrón que presenta la especie. Existen sin embargo algunas especies a las que se les puede atribuir algún tipo de polimorfismo.

A nivel interespecífico, la masa corporal ya no tiene efecto sobre la masa testicular y esta se relaciona de forma directa con el volumen total que puede caber en el espermatóforo. Así se observa que testículos mayores producen un eyaculado mayor, tal y como se sugiere para especies con altos niveles de competencia espermática. La única variable que incide sobre el tamaño del espermatozoide es la masa corporal y lo hace de forma inversa. Finalmente el nivel de poliandria, tomado aquí como una medida del riesgo de competencia espermática, mostró un efecto significativo sobre la masa testicular lo que refuerza aún más la idea de que la selección sexual por intermedio de la competencia espermática es una fuerza evolutiva que tiene consecuencias fuertes sobre la biología reproductiva de los escorpiones.

Summary

Sperm competition is a widespread phenomenon that shapes diverse aspects of the organism's reproductive biology. Size and form of spermatozoa are aspects that are frequently influenced by this type of sexual selection. Scorpions are excellent model organisms for analyzing sperm competition mainly because of polyandric females and female sperm reservoirs. These arachnids show filiform-flagellate spermatozoa grouped in sperm packages. These packages bear phylogenetic information and show a wide variability of shapes and sizes, with the bend type of sperm package being the most common type among families. In an evolutive scale, loosely aggregated sperm derived into bend sperm packages that then produced the wide diversity shown today. There are some variants inside males that are not considered sperm package polymorphisms, but normal variants of the basic pattern of sperm packages of the species. Some species, nevertheless, have some sort of polymorphic states in their ejaculates.

Intra-specifically, body mass influences directly testes mass in an isometric way. Inter-specifically, body mass lacks influence over testes mass, but testes mass is related directly to the spermatophore's theoretical volume. Thus, larger testes produce larger ejaculates, as suggested for species with higher levels of sperm competition risk. Sperm length scales allometrically with body mass, showing a negative association. Finally, polyandry levels, measured as a proxy of sperm competition risk, showed a positive effect over testes mass. This result strengthens the idea that sexual selection acting through sperm competition is a strong evolutionary force that could be driving scorpion's reproductive biology.

LINEAMIENTOS GENERALES Y ORGANIZACIÓN DE LA PRESENTE TESIS

La anisogamia es un fenómeno recurrente en el reino animal. La anisogamia es la diferencia de tamaño entre las células sexuales femeninas y masculinas que presentan fusión binaria y apareamiento no selectivo (Bell, 1978, Birkhead et al., 2009). Existe un gran debate para tratar de explicar y entender la aparición y el mantenimiento de la anisogamia (Bell, 1978). Una de las hipótesis más aceptadas sugiere que la anisogamia evolucionó sujeta a dos fuerzas antagónicas; por un lado, incrementar el tamaño del cigoto, y por el otro aumentar el número de gametas. Una solución fue la aparición de dos sexos diferentes, uno, el femenino, que produce macrogametas (los óvulos) y el otro, el masculino, que produce microgametas móviles (los espermatozoides) (Andersson, 1994). Sin embargo existen algunas excepciones a estas características, ya que algunos espermatozoides se han vuelto secundariamente largos (Pitnick et al. 1996) o inmóviles (Morrow, 2004).

Los espermatozoides en los animales superiores se producen por medio del proceso denominado espermatogénesis, por el cual se transforman gradualmente células germinativas en espermatozoides, durante un periodo de tiempo dado y dentro de los túbulos seminíferos de los testículos (Hess, 1999).

Dentro de la selección sexual, la competencia espermática es un poderoso agente selectivo que provoca adaptaciones tanto morfológicas, fisiológicas como comportamentales (Birkhead y Møller 1998; Simmons, 2001). Los espermatozoides también son blancos de esta fuerza selectiva. De hecho la competencia espermática puede afectar el número, el tamaño y la morfología de los espermatozoides (Sivinski 1984; Pizzari y Birkhead, 2002; Snook, 2005).

Con respecto a los escorpiones, ellos se presentan como excelentes organismos para el estudio de la competencia espermática si se tiene en cuenta que se trata de un grupo con espermatogénesis continua, presencia de vesículas seminales y transferencia espermática indirecta por medio de un espermatóforo (Alberti, 1980; Polis y Sissom, 1990; Peretti, 2010). Se suma que son en general promiscuos y las hembras tienen sitios bien definidos para el almacenamiento de los espermatozoides hasta tanto fertilizan los huevos, produciendo crías por viviparidad (Hjelle, 1990; Volschenk et al., 2008; Farley, 2001) De este modo, un estudio en escorpiones podría arrojar datos de valor para un mejor conocimiento de las estrategias reproductivas en los arácnidos, aportando adicionalmente

información útil para cotejar con la existente en otros artrópodos sobre selección sexual en general y competencia espermática en particular.

En este Marco, esta tesis pretende refinar el estudio del empaquetamiento de espermatozoides en escorpiones, sus diferencias y particularidades, analizando también las principales variables de producción espermática, en un marco evolutivo. Para ello, el trabajo se organizó en dos grandes secciones. La primera sección está, por su parte, dividida en dos capítulos que tienen a los paquetes espermáticos de escorpiones como centro de estudio. El primer capítulo describe la morfología general de los paquetes espermáticos con una mirada global al Orden. Aquí se analizan las principales formas y se discute la probable evolución de este carácter en el Orden. En el segundo capítulo se analizan las variantes de paquetes espermáticos que aparecen a diferentes niveles dentro del Orden y se analizan las evidencias para dilucidar si se trata de un verdadero polimorfismo. La segunda sección esta dividida en tres capítulos que están relacionados con la producción de esperma en sentido amplio, abarcando la producción propiamente dicha, el almacenamiento y la transferencia del esperma. El primer capítulo, pretende ser un análisis intra-específico tomando como objeto de estudio algunas especies de una de las familias más diversas del Orden, en donde se evalúa el volumen y la concentración de esperma en diferentes etapas del ciclo y en donde se consideran diferentes variables que puedan influenciarlos, como la masa corporal y la época reproductiva. En los siguientes dos capítulos, el análisis se vuelve comparativo, entre especies y teniendo en cuenta las relaciones filogenéticas entre ellas. Se evalúan aquí algunas de las variables analizadas en el estudio intra-específico, como por ejemplo la masa corporal y se añaden otras variables ligadas a la reproducción como es el tamaño del espermatozoide. Finalmente, en el último capítulo, se analiza la influencia del riesgo de competencia espermática sobre las variables de producción de esperma. Hacia el final del trabajo, se resumen los hallazgos principales de la tesis y se delinean las perspectivas futuras del estudio.

SECCIÓN A: PAQUETES ESPERMÁTICOS

Existe una gran variación en tamaño, heteromorfismo (producción de dos o más formas diferentes) y agregación de esperma entre organismos (Jamieson, 1987; Simmons y Siva-Jothy, 1998; Higginson y Pitnick, 2011). Estos dos fenómenos, el heteromorfismo y la agregación de esperma, han sido interpretados como formas de cooperación entre espermatozoides (Silberglie et al., 1984; Sivinski, 1984; Buckland-Nicks, 1998; Kura y Nakashima, 2000; Holman y Snook, 2006; Immler, 2008; Pizzari y Foster, 2008; Pizzari y Parker, 2009), y son frecuentes en el reino animal (Higginson y Pitnick, 2011).

Si bien la mayoría de las especies poseen espermatozoides sueltos, algunos, como por ejemplo ciertos órdenes de insectos poseen espermatozoides que permanecen agrupados entre ellos de diferentes formas (conjugación de esperma *sensu* Higginson y Pitnick, 2011). En general la terminología usada en la bibliografía que abarca a los espermatozoides agrupados es muy diversa desde el punto de vista de la designación de los acúmulos de esperma. Los nombres más utilizados son espermatozeugma, espermatoesmo, haz de esperma (*sperm bundle*), paquete de esperma, pero también existen otros (Higginson y Pitnick, 2011). En este trabajo, se realizó una revisión que describe la conjugación de espermatozoides, haciendo una clasificación de los mismos según el momento en el cual los espermatozoides se agrupan (Higginson y Pitnick, 2011). La unión de los espermatozoides puede estar mediada por secreciones testiculares o por la presencia de una caperuza a la que se anclan sus respectivas cabezas. Las secreciones testiculares pueden consistir de componentes carbohidrogenados PAS+ como sucede en peces (Downing y Burns, 2005), a lo que también se le podría añadir la existencia de contactos intercelulares (Maiorova y Adrianov, 2005). Las caperuzas, por su parte, mantienen anclados a los espermatozoides y son remanentes de la espermiogénesis ya que es el resultado de la permanencia del espermiocisto al concluir este proceso (Jurečić, 1988).

Entre los artrópodos, la conjugación de esperma puede ser muy variable en los insectos. Puede haber espermatoesmos, conjugaciones heteromórficas (asociación entre dos formas diferentes) y es muy común la aparición de haces de esperma (*sperm bundles*). En quelicerados, sobre todo en arañas, se encuentran conjugaciones de tipo sincitial, coenospermia o synspermia (ej. Herberstein et al., 2011). En los solífugos, en tanto, los espermatozoides son aflagelados y pueden encontrarse agrupados o no (Alberti, 2000). En general las especies de artrópodos que presentan paquetes de esperma o haces de esperma tienen un número fijo de

espermatozoides. Este número dependería del proceso mismo de división celular y responde a números que están ligados a una serie geométrica, según el número de divisiones celulares (Virkki, 1969).

Así, en los próximos dos capítulos se aborda el análisis de la conjugación de esperma encontrada en escorpiones, los paquetes espermáticos (término que se utilizará a partir de ahora para designar a los *haces de esperma* de escorpiones, basado en Peretti y Battán-Horenstein (2003) y Michalik y Mercati (2009). Para ello, primero se analizó la morfología general en el orden y en una de las familias más diversas del mismo, para luego analizar las variaciones intra-específicas de los paquetes espermáticos en los machos de algunas de las especies estudiadas. Se discuten las implicancias de estos fenómenos desde un punto de vista filogenético y de selección sexual.

1. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LOS PAQUETES ESPERMÁTICOS EN EL ORDEN SCORPIONES

1.1. INTRODUCCIÓN

Los escorpiones presentan espermatozoides con una morfología muy homogénea (André, 1959, 1963; Hood et al., 1972; Cruz-Landim y Ferreira, 1972, 1973; Jespersen y Hartwick, 1973, Phillips, 1974). Son del tipo filiforme-flagelado y alargado dividido en tres partes (cabeza, pieza intermedia y flagelo) (Jespersen y Hartwick, 1973; Alberti, 2000; Michalik y Mercati, 2009). Todas estas piezas muestran diferencias estructurales tales como la organización del axonema o el complejo acrosomal (Michalik y Mercati, 2009). Además, parece que existen diferencias en la morfología de los axonemas de los flagelos entre la familia Buthidae C. L. Koch, 1837 y otras familias analizadas (Vignoli et al., 2008; Michalik y Mercati, 2009; Peretti, 2010). La mayoría de las especies de escorpiones presentan paquetes espermáticos en el sistema genital masculino (final de los tubos de los testículos y las vesículas seminales) y en los espermatóforos (Peretti y Battán-Horenstein, 2003; Mattoni, 2003; Vignoli et al., 2008; Michalik y Mercati, 2009). La presencia de los paquetes espermáticos fue citado por primera vez por Jespersen y Hartwick (1973) en *Hadrurus arizonensis* Ewing, 1928 (Iuridae Thorell, 1876). Sin embargo, muy poca información descriptiva de los paquetes espermáticos se proporciona en dicho artículo. Treinta años más tarde, Peretti y Battán-Horenstein (2003) informan de la presencia de paquetes espermáticos en algunas especies de Bothriuridae Simon 1880. Estudios recientes indican que los paquetes de esperma están ampliamente distribuidos en el orden Scorpiones C. L. Koch, 1850 (Mattoni, 2003; Michalik y Mercati, 2009). Así, se demostró su presencia en las especies de una amplia variedad de familias: Bothriuridae (Peretti y Battán-Horenstein, 2003), Troglotayosicidae Lourenço, 1998 (Vignoli et al., 2008), Scorpionidae Latreille, 1802 (Michalik y Mercati, 2009) Euscorpiidae Laurie 1896 (Althaus et al., 2010), Iuridae (Jespersen y Hartwick, 1973). A pesar de esta gran distribución de paquetes espermáticos en el orden, hasta la fecha, los paquetes espermáticos no se han observado en la familia Buthidae C. L. Koch, 1837 (Cruz-Landim y Ferreira, 1973; Alberti, 1983; Peretti y Battán-Horenstein, 2003). Buthidae se considera una familia basal en el orden (Stockwell, 1989; Sissom, 1990; Prendini, 2000; Soleglad y Fet, 2003; Prendini et al, 2006), sin otras familias estrechamente relacionadas (Prendini, 2000, 2003; Soleglad y Fet, 2003; Volschenk et al., 2008). Tampoco se sabe con certeza lo que ocurre en

Chaerilidae Pocock, 1893, otra familia considerada basal desde el punto de vista filogenético, ni con Pseudochactidae Gromov, 1998, una familia considerada casi un *fósil viviente* (Stockwell, 1989; Sologlad y Fet, 2003; Prendini et al, 2006). Se carece de datos del resto de las familias de escorpiones como Diplocentridae Karsch, 1880, Superstitionidae Stahnke, 1940, Typhlochactidae Mitchell, 1971, Heteroscorpionidae Kraepelin, 1905, Urodacidae Kraepelin, 1905, Vaejovidae Thorell, 1876, Chaerilidae Pocock, 1893, Chactidae Pocock, 1893, Liochelidae Fet y Bechly, 2001 y Hemiscorpiidae Pocock, 1893. La morfología de los paquetes espermáticos demostró ser muy variable y se presenta de valor como contenido de información filogenética, dentro de la familia Bothriuridae (Mattoni, 2003,). Los estudios demostraron la existencia de paquetes rectos y plegados, (Peretti y Battán-Horenstein, 2003; Mattoni, 2003). Los espermatozoides de los paquetes espermáticos en general parecen estar agrupados en una matriz electrodensa de material aún por determinar, sin vaina de la secreción a su alrededor (Vignoli et al., 2008; Michalik y Mercati, 2009). Trabajos previos sugieren que los paquetes espermáticos en escorpiones contienen aproximadamente entre 70, 100 (Peretti y Battán-Horenstein, 2003), 150 (Vignoli et al., 2008) o 250 espermatozoides (Michalik y Mercati, 2009) por paquete espermático. La función exacta de los paquetes de esperma es aún desconocida. Peretti y Battán-Horenstein (2003) sugieren que la presencia de paquetes de espermatozoides puede estar relacionada con la forma de transferir los espermatozoides. Althaus et al. (2010) encontraron que los paquetes espermáticos ayudaban a formar un tapón genital que aparece en la hembra luego de la cópula con el macho. A pesar de estos hechos, el conocimiento de los paquetes de esperma en los escorpiones es limitado (Vignoli et al., 2008). Si bien ya existen datos generales de dimensiones y morfología, no se ha realizado un análisis minucioso y no se sabe qué patrones morfológicos existen en el orden escorpiones. El objetivo principal de este estudio comparativo fue hacer el primer análisis morfológico de los paquetes de esperma abarcando algunos de los géneros más representativos de todo el orden pero haciendo hincapié en la familia Bothriuridae, que es la familia más diversa de Sudamérica (Mattoni, 2003). Para llevar a cabo esta tarea, la morfología general de los paquetes de esperma fue descrita en la mayoría de las familias del orden y se abarcaron todos los géneros de la familia Bothriuridae. Las principales formas y diseños se identificaron y describieron, y además de los análisis cualitativos también se realizaron análisis cuantitativos con medidas generales. También se presenta la nueva información para evaluar la monofilia del género *Bothriurus*, y

evaluar si la forma del paquete de esperma puede realmente considerarse un carácter filogenético importante para la evaluación a nivel de familia y de especie.

1.2. OBJETIVOS.

1.2.1. General

Realizar un análisis cualitativo y cuantitativo de la morfología general de los paquetes espermáticos en las familias del orden Scorpiones, con hincapié en la familia Bothriuridae.

1.2.2. Específicos

1. Describir las características generales morfológicas de los paquetes espermáticos en el orden Scorpiones;
2. Analizar y comparar el largo total y el área en las especies seleccionadas del orden Scorpiones;
3. Analizar el largo de la cabeza del paquete espermático y la proporción que este ocupa en el largo total del paquete espermático en especies de la familia Bothriuridae;
4. Realizar un seguimiento filogenético del cambio morfológico general y del largo total y área de los paquetes espermáticos en el orden y particularmente en la familia Bothriuridae;
5. Comparar el número de espermatozoides que conforman los paquetes espermáticos tomando como modelo a cuatro especies de la familia Bothriuridae.

1.3. MATERIALES Y MÉTODOS

1.3.1. Especies estudiadas

Se estudiaron 89 especies de 62 géneros de 16 familias. No se obtuvo material para examinar de Microcarmidae (familia recientemente sinonimizada con Buthidae, Volschenk et al., 2008) y Pseudochactidae. Dentro de Bothriuridae se aumentó el muestreo en *Bothriurus* por ser el género morfológicamente más diverso dentro de Bothriuridae (Mattoni, 2003; Ojanguren-Affilastro, 2005). En esta familia, se muestrearon casi todos los géneros aceptados hasta el momento con excepción de *Pachakutej*. También dentro de Bothriuridae y cuando el número de individuos lo permitió, se observaron diferentes grupos dentro de los géneros. En las demás familias y siempre que fuera posible, se buscó abarcar grupos alejados para tratar de encontrar diferencias más marcadas. La clasificación taxonómica sigue los lineamientos de Soleglad y Sissom, (2001) y Prendini y Wheeler (2005):

Familia Bothriuridae:

Bothriurus (*Bothriurus*) *araguayae* Vellard, 1934, *B. (B.) asper* Pocock, 1893, *B. (B.) bonariensis* (CL Koch, 1842), *B. (B.) chacoensis* Maury y Acosta, 1993, *B. (B.) rochai*, Mello-Leitão 1932, *B. (B.) aff. rochai*, *B. (B.) bocki* Kraepelin, 1911, *B. (B.) inermis* Maury, 1981, *Bothriurus* (*Andibothriurus*) *coriaceus* Pocock, 1893, *B. (A.) keyserlingi* Pocock, 1893, *B. (A.) rochensis* San Martín, 1965, *B. (A.) flavidus* Kraepelin, 1911, *B. (A.) cordubensis* Acosta, 1995, *B. (A.) noa* Maury, 1984, *B. (A.) burmeisteri* Kraepelin, 1894, *B. (A.) olaen* Acosta, 1997, *Brachistosternus* (*Leptosternus*) *angustimanus* Ojanguren-Affilastro y Alsina Roig, 2001, *Br. (L.) pentheri* Mello-Leitão, 1931, *Br. (Ministernus)* *ferrugineus* Thorell de 1876, *Centromachetes obscurus* Mello-Leitão, 1932, *C. pocockii* (Kraepelin, 1894), *Cercophonius squama* (Gervais, 1843), *Lisposoma josehermana* Lamoral, 1979, *Orobothriurus tamarugal* Ochoa et al., 2012, *Phoniocercus pictus*, *Rumikiru lourencoi* Ochoa, 2011, *Tehuanka moyanoi* Cekalovic de 1973, *Thestylus aurantiurus* Yamaguti y Pinto da Rocha, 2003, *Timogenes dorbignyi* (Guérin Méneville, 1843), *T. elegans* (Mello-Leitão, 1931), *Urophonius brachycentrus* (Thorell, 1876), *U. tregualemuensis* Cekalovic de 1981, *Vachonia martinezi* Abalos, 1954.

Familia Buthidae:

Ananteris arcadioi Botero-Trujillo, 2008, *Babycurus jacksoni* (Pocock, 1890), *Buthus occitanus* (Amoreux, 1789), *Grosphus ankarana* Lourenço y Goodman, 2003, *Hottentotta caboverdensis* Lourenço y Ythier, 2006, *Isometrus maculatus*

(DeGeer, 1778), *Lychas obsti* Kraepelin, 1913, *Mesobuthus* cf. *tamulus*, *Microtityus waeringi* Francke y Sissom, 1980, *Parabuthus granulatus* (Ehrenberg, 1831), *Pseudolychas ochraceus* (Hirst, 1911), *Tityus elii* Armas y Marcato Fondeur, 1992, *Zabius fuscus* (Thorell, 1876).

Familia Chactidae:

Brotheas sp., *Brotheochactas nitidus* Pocock, 1893, *Chactas aequinoctialis* (Karsch, 1879), *Chactopsis anduzei* González-Sponga, 1982, *Nullibrotheas allenii* (Wood, 1863), *Teuthrastes* sp.

Familia Chaerilidae:

Chaerilus variegatus Simon, 1877, *C. juliettae* Lourenço, 2011.

Familia Diplocentridae:

Cazierius garridoi, Armas, 2005, *Diplocentrus lindo*, Stockwell y Baldwin, 2001, *Nebo hierichonticus* (Simon, 1872).

Familia Euscorpiidae: *Megacormus gertschi* Díaz Nájera, 1966, *M. aff. grubbsi*, *Euscorpius (Tetratrachobothrius) flavicaudis* (DeGeer, 1778); *Euscorpiops longimanus* (Pocock, 1893); *Scorpiops hardwickei* (Gervais, 1843); *Troglocormus ciego* Francke, 1981.

Familia Hemiscorpiidae:

Hemiscorpius lepturus Peters, 1861.

Familia Heteroscorpionidae:

Heteroscorpion goodamani.

Familia Iuridae:

Caraboctonus keyserlingi Pocock, 1893, *Hadrurus arizonensis* Ewing, 1928, *Iurus dufourei* (Brullé, 1832).

Familia Liochelidae:

Hadogenes troglodytes (Peters, 1861), *Liocheles* aff. *waigiensis*, *Opisthacanthus capensis* Thorell, 1876, *O. valerioi* Lourenço, 1980.

Familia Scorpionidae:

Pandinus (Pandinus) imperator (CL Koch, 1841), *Scorpio maurus* Linnaeus, 1758.

Familia Superstitionidae:

Superstitiona donensis Stahnke, 1940.

Familia Troglotayosicidae:

Troglotayosicus humiculum Botero-Trujillo y Francke, 2009.

Familia Typhlochactidae:

Alacran tartarus Francke, 1982, *Typhlochactas* sp..

Familia Urodacidae:

Urodacus planimanus Pocock, 1893.

Familia Vaejovidae: *Smerigurus mesaensis* (Stahnke, 1957), *S. grandis* (Williams, 1970), *Syntropis williamsi*, Soleglad, Lowe y Fet, 2007, *Uroctonus glimmei* Kraepelin 1911, *U. mordax* (Thorell, 1876), *Vaejovis mexicanus* C. L. Koch, 1836, *Vaejovis spinigerus* (Wood, 1863), *V. variegatus* Pocock, 1898, *Vejovoidus longiunguis* (Williams, 1969).

1.3.2. Procedimiento general para la extracción de los paquetes de esperma y preparado de las muestras

Se analizaron especímenes de colección conservados en etanol 80%. Se disecaron machos adultos. Se hizo un corte en la zona pleural izquierda y con el uso de pinzas de punta fina se extrajo el órgano paraxial. El órgano paraxial contiene la vesícula seminal, donde se almacenan los paquetes espermáticos. Se extrajeron tres muestras de paquetes espermáticos de la vesícula seminal. Dos muestras sirvieron para el análisis de la morfología de los paquetes espermáticos. Una muestra se montó en un preparado temporal con glicerina líquida (ver detalles debajo) para la totalidad de las especies examinadas y sirvió también para la caracterización del polimorfismo. Otra muestra se preparó para microscopia electrónica de barrido (SEM, ver detalles debajo) en 25 de las especies para reforzar el análisis de la morfología.

1.3.2.1. Preparados para microscopia óptica

Para el preparado temporal con glicerina, se esparció la muestra de paquetes espermáticos en una gota de glicerina líquida pura sobre una cámara de *Neubauer* (*Improved Neubauer*, Boeco Alemania) y se cubrió con un cubreobjetos. La cámara de *Neubauer* proporcionó un soporte adecuado para poder tomar luego medidas, ya que se pudo utilizar la grilla de la cámara como escala bajo el microscopio óptico. Se tomaron fotografías digitales en un microscopio óptico con contraste de fases (Nikon *Eclipse* 50i) mediante el uso de una cámara digital (Nikon DIGITAL SIGHT DS-fi1) montada en dicha óptica. Tanto la glicerina como el alcohol no modifican la morfología de los paquetes espermáticos. De hecho la glicerina pura logró mantener la integridad de los paquetes espermáticos por más de un año. Para corroborar que ninguno de los dos productos modificaba la morfología de los paquetes espermáticos, se realizaron comparaciones entre material fresco y conservado en 4 especies de la familia Bothriuridae y no se encontraron diferencias significativas. Si la preservación del espécimen fue

adecuada, los paquetes espermáticos se mantuvieron en óptimas condiciones y se pueden usar especímenes preservados en etanol hace mucho tiempo proveniente de colectas antiguas.

1.3.2.2. Preparados para microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las muestras destinadas a SEM se deshidrataron usando un gradiente creciente de alcoholes etílicos hasta etanol absoluto. Para el secado se usaron indistintamente dos técnicas, punto crítico y el tratamiento con un compuesto orgánico volátil. Ambas técnicas no afectan la morfología del material analizado. En el segundo método, el etanol se ve desplazado por un líquido orgánico de alta volatilidad, hexametildisilizano (HMDS), que a temperatura y presión ambiental se evapora rápidamente. La muestra se sumerge en cinco gotas del compuesto y se deja reposar dos horas y luego se le agregan cinco gotas más y se deja reposar durante toda la noche para permitir que se seque la totalidad del compuesto. Una vez secada la muestra se montó sobre un taco metálico provisto de cinta adhesiva de doble capa. Finalmente se metalizó el preparado con Oro (Au) y Paladio (Pd). Por último, las muestras se analizaron en un microscopio electrónico Hitachi S-4700 Field Emission SEM. El procesamiento de los materiales y la toma de las imágenes en el SEM se realizaron en el American Museum of Natural History (New York, USA).

1.3.3. Análisis del material

1.3.3.1. Morfología general de paquetes espermáticos y medidas

1.3.3.1.1. Análisis cualitativo

Se tomaron las fotografías digitales de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido para realizar la descripción cualitativa de los paquetes espermáticos en las familias analizadas del orden. Primero se describió la forma general de los paquetes espermáticos citando los patrones más importantes observados en el orden. Luego, se describió la o las morfologías presentadas por las especies estudiadas de cada una de las familias analizadas y se compararon entre ellas. Se estudia en general al Orden Escorpiones con al menos un representante por familia y se hace hincapié en la familia Bothriuridae por ser esta una familia muy diversa y disponible en las colecciones.

Se realizó también una optimización de la morfología general del paquete espermático en un árbol filogenético de las familias analizadas (Coddington et al., 2004). Luego este análisis se amplió incluyendo las especies analizadas (Ver detalle debajo, apartado 1.3.7).

El carácter mostró 4 estados, ausencia de paquetes espermáticos, presencia-plegado, presencia-recto y presencia-esférico. Se tomaron a estos cuatro estados como estados patrón de los cuales luego existen variantes (ver descripciones del apartado 1.4.1.1.2 y Capítulo 2).

1.3.3.1.2. Análisis cuantitativo

Para el análisis cuantitativo, se utilizó un software de procesamiento de imágenes *ImageJ 64bits* (Schneider et al., 2012), con el que se procedió a tomar mediciones del largo total, ancho y ángulos (ver debajo), donde la morfología de los paquetes lo permitía, para luego comparar las mediciones entre las especies. Las medidas para el largo total se tomaron con el la herramienta línea recta del software Image J, midiendo por la zona media del paquete espermático desde el borde anterior donde se encuentran los nucleos espermáticos, hasta el borde posterior donde están los flagelos de los espermatozoides. Para el área se utilizó la función área del mismo software y se siguió el contorno del paquete espermático. Luego de un análisis preliminar para identificar la forma del paquete espermático (utilizando microscopia óptica, contraste de fases y SEM) se seleccionaron las fotografías de los paquetes espermáticos que mejor reflejaban la morfología general para su posterior análisis.

1.3.3.1.2.1. Generales para todo el Orden

En general para las especies analizadas de las familias de todo el orden se tomaron preferentemente medidas de largo total (Lt) y área (Ar) del paquete espermático, medidas estándares factibles de registrar en todos los casos. Cuando el paquete no era totalmente recto o presentara pliegues, se procedió a medir el largo observable del paquete espermático y el largo total se estimó teniendo en cuenta el número de pliegues que presentaba. Por ejemplo, para los paquetes plegados a la mitad, los valores netos medidos se multiplicaban por dos, mientras que en los circulares donde se podían ver dos pliegues, el valor neto se multiplicaba por cuatro, para poder obtener una aproximación del tamaño real. Se tornó difícil tomar, en las especies cuyos paquetes espermáticos estaban plegados, otras medidas de caracteres, tales como el ángulo entre el eje del cuerpo del paquete espermático y su cabeza o el largo de las cabezas ya que el

plegamiento dificultaba la medición. Para las especies con paquetes plegados se analizaron los valores medidos de 10 paquetes espermáticos por especie y con ello se realizó un análisis de varianza de una vía y un test *PosHoc* de Tukey, ambos con un alfa del 5%.

1.3.5.1.2.2. Familia Bothriuridae

Para las especies de la familia Bothriuridae fue posible el análisis más detallado de la estructura de los paquetes espermáticos. Para estas especies se analizaron además de las variables de largo total y área, que se tomaron para analizar las demás especies del orden, otras variables complementarias: el largo de la zona donde se alojan las cabezas de los espermatozoides, el ángulo entre el eje principal del cuerpo y la zona de las cabezas espermáticas y ancho de la zona de las cabezas espermáticas.

1.3.4. Análisis de correlación de mediciones

Se realizaron análisis de correlación de Spearman entre las diferentes variables registradas a los fines de detectar si existe alguna asociación entre ellas. Para las especies del orden se analizó el largo total vs. el área del paquete espermático, en tanto que con los valores promedio de cada especie, y para la familia Bothriuridae además se incluyó el largo de la zona donde se alojan las cabezas espermáticas analizando la proporción del largo de las cabezas y el largo total del paquete espermático con los valores promedio obtenido de cada uno de los machos de cada especie. Para tal fin se dividió el largo total de la cabeza por el largo total del paquete de esperma. Los datos se analizaron utilizando el software estadístico R de código abierto (R Core Team, 2012). Las especies analizadas fueron escogidas porque para ellas se contaba con un número mínimo de individuos que permitían la realización de este análisis y que no se contaban en otras especies.

1.3.5. Ajuste a la hipótesis filogenética.

Para la optimización de caracteres de las familias del orden escorpiones se tomaron las siguientes especies: *Parabuthus granulatus* [Buthidae], *Chactas aequinoctialis*, *Nullibrotheas allenii*, *Chactopsis anduzei*, *Brotheas* sp. [Chactidae], *Megacormus gertschi*, *M. aff. grubbsi*, *Troglocormus ciego*, *Scorpiops hardwicki*, *Euscorpiops longimanus*, *Caraboctonus keyserlingi*, *Iurus dufourei*, *U. mordax*, *Vaejovis mexicanus*, *Vejovoidus longiunguis*, *Superstitiona donensis*, *Alacran tartarus*, *Troglotayosicus humiculum*, *Hemiscorpius lepturus*, *Opisthacanthus*

capensis, *Liocheles* aff. *waigiensis*, *Urodacus planimanus*, *Heteroscorpion goodmanii*, *Diplocentrus lindo*, *Scorpio maurus*, *Pandinus imperator*, *Lisposoma josehermana*, *Thestylus auriantius*, *Brachistosternus ferrugineus*, *Brachistosternus pentheri*, *Brachistosternus angustimanus*, *Orobothriurus tamarugal*, *Tehuanka moyanoi*, *Centromachetes obscurus*, *Cercophonius squama*, *Phoniocercus pictus*, *Urophonius tregualemuensis*, *Urophonius brachycentrus*, *Bothriurus keyserlingi*, *Bothriurus rochensis*, *Bothriurus noa*, *Bothriurus cordubensis*, *Bothriurus coriaceus*, *Bothriurus olaen*, *Bothriurus burmeisteri*, *Bothriurus flavidus*, *Bothriurus bocki*, *Vachonia martinezi*, *Timogenes elegans*, *Timogenes dorbignyi*, *Bothriurus rochai*, *Bothriurus araguayae*, *Bothriurus chacoensis*, *Bothriurus bonariensis*. Así, se analizaron representantes de *Luridae*, *Vaejovidae*, *Typhlochactidae*, *Superstitionidae*, *Troglotayosicidae*, *Scorpiopidae*, *Euscorpiidae*, *Chactidae*, *Diplocentridae*, *Liochelidae*, *Scorpionidae*, *Hemiscorpiidae*, *Urodacidae*, y *Heteroscorpidae*. Si bien se excluyó a *Chaerilidae* y *Buthidae* por carecer en general de paquetes espermáticos, se incluyeron dos especies de *Buthidae* que presentaron algún tipo de agregación de esperma, *Parabuthus granulatus* y *Ananteris arcadioi* (véase resultados).

La familia *Bothriuridae* se analizó por separado y también fue incluida dentro del análisis del orden. Se optimizaron dos caracteres continuos, el largo total del paquete espermático y el área del mismo. Para esta familia, se optimizaron, además del largo total y el área, otros caracteres como el largo de la cabeza del paquete de esperma y el ángulo entre la cabeza y el cuerpo. Para la optimización de variables se construyó un árbol filogenético basado en las hipótesis filogenéticas actuales construidas con caracteres morfológicos y de ADN (Coddington et al., 2004 para el Orden; Mattoni, 2003; Mattoni y Prendini, 2007 para la familia *Bothriuridae*). El árbol filogenético se generó utilizando el programa de análisis filogenético *Mesquite* v. 2.75 (Madison y Madison, 2011). Para el análisis de *Bothriuridae*, se excluyó *Bothriurus asper*, y *B. inermis* porque las fotografías no estaban claras para su medición. Para optimizar caracteres continuos en la filogenia escogida, se creó un intervalo (media \pm un desvío estándar) con los caracteres, como se recomienda en Goloboff et al. (2006). Estos valores se ingresaron como caracteres continuos junto al cladograma en el software de análisis filogenético *TNT 1.1* (Goloboff et al., 2008). Los valores se optimizaron en el cladograma utilizando el método de parsimonia (Farris, 1970) y se registraron los valores para los nodos internos (ancestros hipotéticos) (Goloboff et al., 2006).

se analizaron los valores de dos medidas de ajuste para evaluar como los caracteres individuales se ajustan al cladograma. Para ello se analizaron dos índices, el índice de consistencia (Kluge y Farris, 1969) y el índice de retención (Farris, 1989). El primero de los índices mide la cantidad de homoplasia mostrada por el carácter. El máximo valor posible del índice de consistencia es 1, lo que indica un ajuste perfecto del carácter al cladograma, mientras que el mínimo valor posible es cercano a cero y está dado por m/g (Farris, 1989). El índice de retención, por su parte también mide el grado de homoplasia pero teniendo en cuenta que tan bien las sinapomorfias explican el cladograma. Al igual que ocurre con el índice de consistencia, los valores cercanos a 1 muestran un mejor ajuste del carácter al cladograma y se define como cero para caracteres que no informan sobre parsimonia. Se analizaron los patrones generales de cambio de los caracteres optimizados en la filogenia. Con los datos de morfología obtenidos en el apartado 1.3.5.1.1, se optimizaron las diferentes formas en un árbol filogenético de las familias analizadas y a un nivel más fino, en un árbol con todas las especies analizadas. Se ingresaron los taxones junto a los estados del carácter “forma del paquete espermático” y finalmente se agregó el árbol filogenético del grupo. La optimización del carácter mostró de una manera general los cambios de forma de los paquetes espermáticos sufridos durante la evolución del orden.

1.3.6. Determinación de la cantidad de espermatozoides por paquete espermático

Se realizó un conteo de espermatozoides por paquete espermático mediante fotografías tomadas en el microscopio electrónico de transmisión en especies seleccionadas de la familia Bothriuridae. *Timogenes elegans*, *Bothriurus bonariensis*, *Urophonius brachycentrus*, *Bothriurus rochensis* y *Brachistosternus ferrugineus*. Estas especies fueron elegidas por su disponibilidad en los muestreos, analizando en detalle en MET un macho en cada una. Para el análisis se tomó una vesícula seminal de un individuo y se fijó en formol al 4% y glutaraldehído al 2% (este último lo preparamos desde una inicial al 25% y una intermedia que se hace al 8%) en *buffer* cacodilato (pH 7,3, 0,1 M) durante dos horas y, a continuación fijación con tetróxido de osmio al 1% en el mismo *buffer*. Después de la deshidratación en concentraciones crecientes de acetona, las muestras fueron incrustadas en araldita y se polimerizó a 60 °C. Luego se obtuvieron secciones delgadas transversales de paquetes espermáticos con una cuchilla de diamante en un ultramicrotomo JEOL JUM-7 y fotografiado en un

microscopio electrónico de transmisión Zeiss LEO 906E. Se contaron los espermatozoides en los cortes transversales realizados a nivel de la pieza media, zona que fácilmente pueden identificarse los mismos para tal fin.

1.4. RESULTADOS

1.4.1 Morfología general de paquetes espermáticos

1.4.1.1 Análisis cualitativo

1.4.1.1.1 Patrones generales

Catorce de las dieciseis familias analizadas presentaron paquetes espermáticos. Buthidae presentó espermatozoides libres o débilmente agregados en pocas especies y Chaerilidae sólo presentó espermatozoides libres. Existe una gran cantidad de tipos y variantes de paquetes espermáticos. Los más abundantes son los de tipo plegados, rectos y esféricos (Fig. 1). Sus variantes son, para los rectos, recto en forma de bastón (con la zona anterior curvada en unos 45 grados) y otros paquetes rectos que varían en otras características como el grosor o el largo (Ver familia Bothriuridae en las descripciones más adelante). El tipo plegado parece ser el tipo más común de paquete espermático en las especies estudiadas (Fig. 1a). Apareció en el 57% de las familias analizadas y en un 39% de las especies con paquetes espermáticos analizadas. Este tipo de paquete espermático se encontró también frecuentemente asociado a paquetes circulares ver descripciones más adelante en este capítulo). La morfología de los paquetes espermáticos fue variable en el orden pero la variabilidad fue más notoria en la familia Bothriuridae (Fig. 1b). En esta familia aparecieron cuatro tipos generales de paquetes espermáticos (plegado, recto, circular, bastón), algunos de estos con variantes sutiles y serán descriptas en detalle más adelante. En Bothriuridae es muy común el paquete recto en forma de bastón que se observa en 35% de las especies analizadas en la familia (Fig. 1b). En Bothriuridae también se encontraron paquetes plegados en los géneros *Timogenes*, *Vachonia* y algunos *Bothriurus* (un total aproximado de 26% de las especies estudiadas en Bothriuridae). Estas especies también tienen paquetes en forma de anillo que parecen ser más común en algunas especies que en otros (por ejemplo, en *Bothriurus inermis*, ver más adelante). A continuación se presenta la descripción detallada de cada familia analizada.

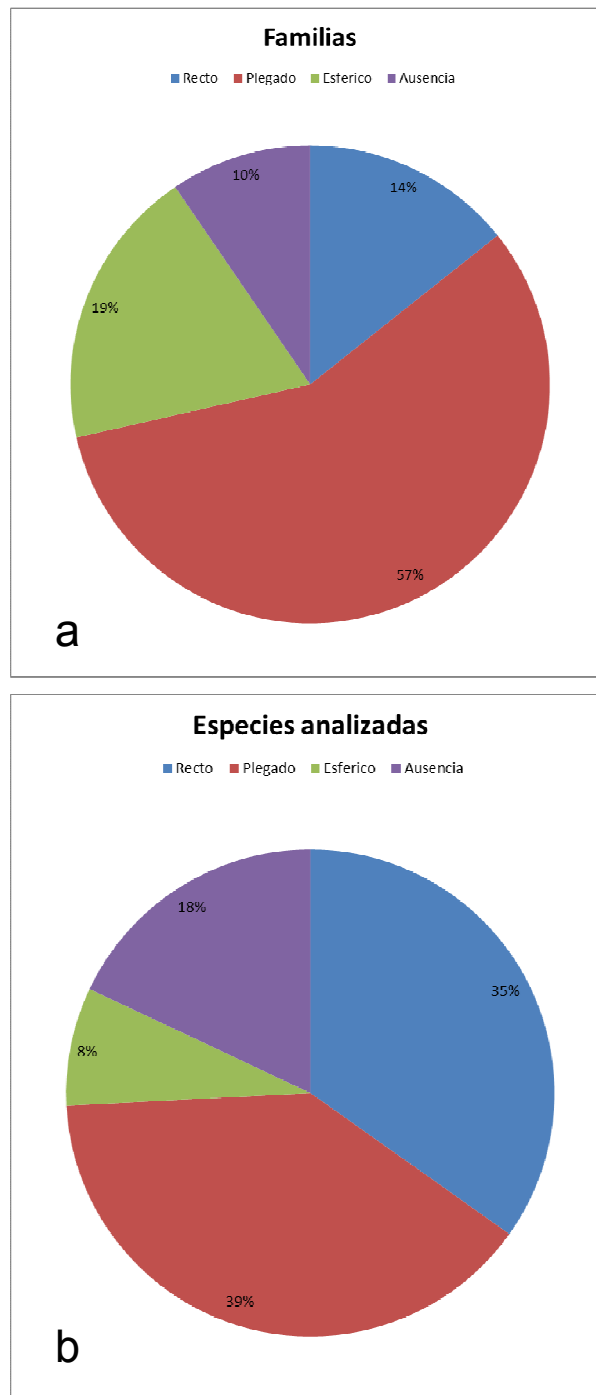


Fig. 1. Porcentaje de los principales tipos morfológicos de paquetes espermáticos, junto al porcentaje de las especies con ausencia de paquetes espermáticos. a) Porcentaje de los principales tipos morfológicos en las Familias del Orden Scorpiones. Se observa la amplia predominancia de los paquetes plegados. b) Porcentaje de tipos morfológicos básicos contemplando las especies analizadas dentro de las Familias. Se observa un incremento en el porcentaje de tipo recto debido al amplio muestreo en la Familia Bothriuridae en donde la mayoría de las especies analizadas presentan paquetes rectos o variantes del mismo (ej. paquete en forma de bastón). Ver texto para una explicación más detallada.

Tabla 1. Valores de largo total y área de las especies que permitieron la medida de dichas variables. Los datos se representan como el promedio \pm desvío estándar.

Familia	Especies	Largo total (μm)	Area (μm^2)
Bothriuriidae	<i>Bothriurus araguayae</i>	199 \pm 5	1408 \pm 106
	<i>Bothriurus bocki</i>	159 \pm 5	948 \pm 71
	<i>Bothriurus bonariensis</i>	249 \pm 11	1041 \pm 161
	<i>Bothriurus burmeisteri</i>	287 \pm 19	1850 \pm 148
	<i>Bothriurus chacoensis</i>	226 \pm 11	1026 \pm 79
	<i>Bothriurus cordubensis</i>	302 \pm 3	1695 \pm 121
	<i>Bothriurus coriaceus</i>	329 \pm 7	2022 \pm 130
	<i>Bothriurus flavidus</i>	212 \pm 23	1472 \pm 176
	<i>Bothriurus keyserlingi</i>	300 \pm 14	1633 \pm 98
	<i>Bothriurus noa</i>	332 \pm 16	1647 \pm 162
	<i>Bothriurus olaen</i>	328 \pm 9	2430 \pm 265
	<i>Bothriurus rochai</i>	201 \pm 33	1716 \pm 477
	<i>Bothriurus rochensis</i>	269 \pm 15	1201 \pm 145
	<i>Brachistosternus angustimanus</i>	253 \pm 1	2349 \pm 61
	<i>Brachistosternus ferrugineus</i>	233 \pm 8	1875 \pm 395
	<i>Brachistosternus pentheri</i>	205 \pm 13	1855 \pm 246
	<i>Centromachetes obscurus</i>	354 \pm 10	2703 \pm 185
	<i>Cercophonius squama</i>	227 \pm 20	1369 \pm 35
	<i>Lisposoma josehermana</i>	288 \pm 8	2943 \pm 668
	<i>Orobothriurus aff curvidigitus</i>	193 \pm 5	541 \pm 37
	<i>Phoniocercus pinto</i>	165 \pm 6	709 \pm 147
	<i>Rumikiru lorencoi</i>	158 \pm 3	355 \pm 52
	<i>Tehuanka moyanoi</i>	324 \pm 6	2480 \pm 358
	<i>Thestylus aurantiurus</i>	162 \pm 7	553 \pm 33
	<i>Timogenes dorbigyi</i>	227 \pm 14	1261 \pm 198
	<i>Timogenes elegans</i>	240 \pm 17	1651.13 \pm 281
	<i>Urophonius brachycentrus</i>	311 \pm 7	2589 \pm 29
	<i>Urophonius tregualemuensis</i>	264 \pm 4	2376 \pm 125
	<i>Vachonia martinezi</i>	200 \pm 9	1243 \pm 183
Buthidae	<i>Ananteris arcadioi</i>	152 \pm 19	NA
	<i>Parabuthus granulatus</i>	230 \pm 28	4819 \pm 629
Chactidae	<i>Brotheas sp</i>	210 \pm 8	2181 \pm 374
	<i>Chactas aequinoctialis</i>	144 \pm 4	783 \pm 180
	<i>Chactopsis anduzei</i>	244 \pm 6	2904 \pm 808
	<i>Nullibrotheas alleni</i>	231 \pm 3	1802 \pm 128
	<i>Teuthrastes sp</i>	246 \pm 27	NA
Diplocentridae	<i>Diplocentrus lindo</i>	192 \pm 7	5299 \pm 437
Euscorpiidae	<i>Euscorpius flavicaudis</i>	112 \pm 5	899 \pm 87
	<i>Megacormus aff grubbsi</i>	217 \pm 4	1644 \pm 236
	<i>Megacormus gertschi</i>	230 \pm 2	2133 \pm 437

Familia	Especies	Largo total (μm)	Area (μm²)
Hemiscorpidae	<i>Hemiscorpius lepturus</i>	195±12	2548±271
Heteroscorpidae	<i>Heteroscorpion goodmanii</i>	171±14	1556±332
Iuridae	<i>Iurus duforensis</i>	335±14	2679±89
	<i>Caraboctonus keyserlingi</i>	323±6	6917±600
Liochelidae	<i>Liocheles aff waigiensis</i>	146±4	462±48
	<i>Opisthacanthus capensis</i>	151±8	1213±58
Scorpionidae	<i>Pandinus imperator</i>	158±8	881±51
	<i>Scorpio maurus</i>	149±4	539±61
Scorpiopidae	<i>Euscorpiops longimanus</i>	166±3	1085±56
	<i>Scorpiops hardwicki</i>	193±19	1542±296
	<i>Troglocormus ciego</i>	130±17	2888±732
Superstitionidae	<i>Superstitiona danensis</i>	231±46	2154±366
Troglotayosicidae	<i>Troglotayosicus humiculum</i>	145±3	1049±140
Typhlochatidae	<i>Alacran tartarus</i>	177±21	2002±616
Urodacidae	<i>Urodacus planimanus</i>	282±35	2216±375
Vaejovidae	<i>Uroctonus mordax</i>	203±9	3924±1500
	<i>Vaejovis mexicanus</i>	160±7	1366±153
	<i>Vaejovoidus longiunguis</i>	187±4	2101±621

1.4.1.1.2 Descripción de la morfología general de los paquetes espermáticos por familia

Familias Buthidae y Chaerilidae

Se analizaron individuos de 13 especies de Buthidae. Aproximadamente el 77% (10/13) de las especies estudiadas muestran espermatozoides sueltos sin ningún arreglo aparente dentro de la vesícula seminal (Fig. 2 a-e). Hubo tres excepciones, *Ananteris arcadioi*, *Parabuthus granulatus* y *Hottentotta caboverdensis* (Fig. 2 f- h). *Ananteris arcadioi* no mostró paquetes espermáticos de ningún tipo, pero mostró agrupamientos grandes de espermatozoides, similares a grandes bloques de espermatozoides (Fig. 2 f). Al extraerlos de la vesícula seminal se veían como polígonos que encajaban uno con otro de lado. *Parabuthus granulatus* sí mostró arreglos de espermatozoides de unos 150 a 200 μm de longitud de forma ahusada, similares a paquetes espermáticos (Fig. 2 g). De la misma manera, *H. caboverdensis* tuvo arreglos de unas 100 μm de longitud (Fig. 2 h). Los espermatozoides en estas dos últimas especies se mostraron alineados pero la agregación no era comparable a la firme agregación de los paquetes espermáticos que se observaron en las demás familias. Los espermatozoides estaban agrupados de manera laxa.

En la familia Chaerilidae, se observó la misma organización de espermatozoides que en la mayoría de los Buthidae. Las dos especies analizadas, *Chaerilus variegatus* y *C. juliettae*, no presentaron paquetes espermáticos y los espermatozoides estaban sueltos dentro de la vesícula seminal formando una gran masa desordenada de espermatozoides (Fig. 3 a, b).

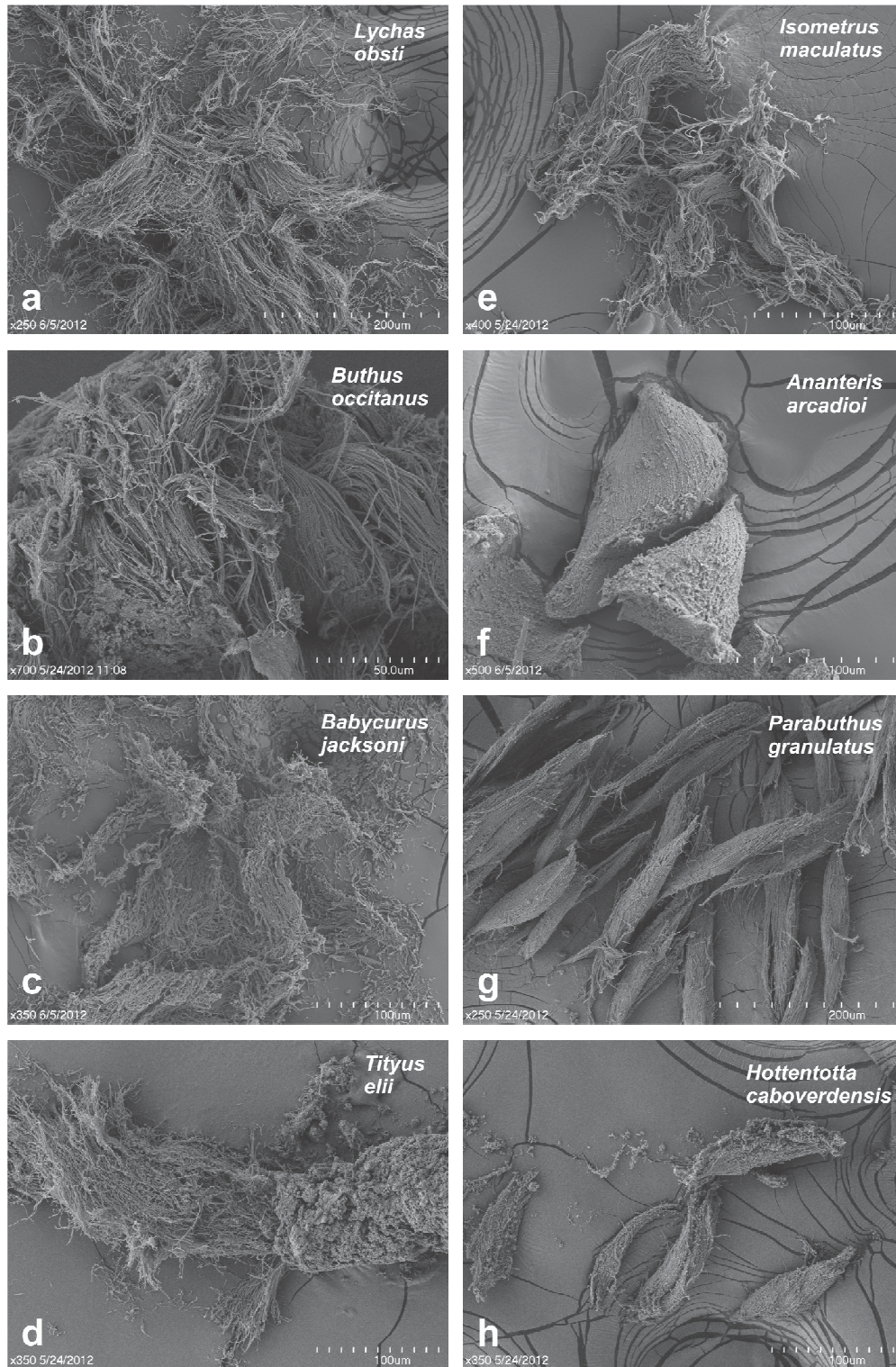


Fig. 2. Espermatozoides libres y agrupamiento de esperma en la Familia Buthidae. a-e) Especies en donde los espermatozoides se encuentran sueltos sin indicios de agrupación. f-h) Especies en donde se observó agrupamiento de esperma.

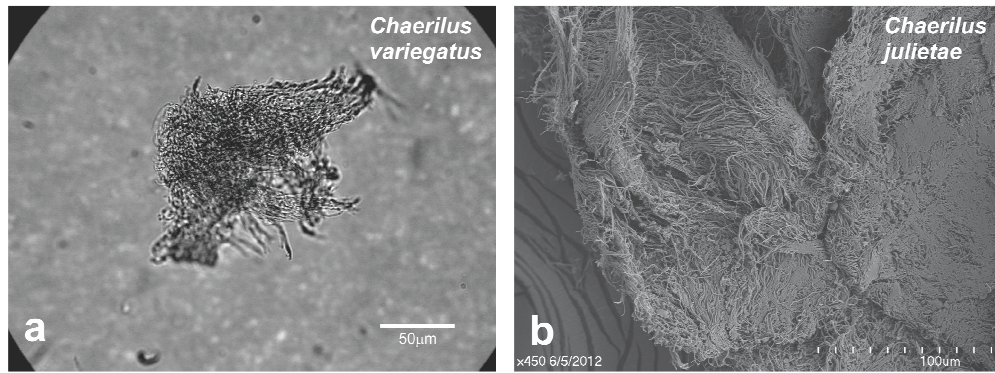


Fig. 3. Espermatozoides libres en dos representantes de la familia Chaerilidae.

Familia Chactidae

Esta familia mostró paquetes espermáticos esféricos o plegados. El género *Chactas* mostró paquetes espermáticos esféricos (Fig. 4 a) mientras que los demás géneros tuvieron paquetes más ovoides similares en algunos casos a los paquetes plegados vistos en otras familias (Fig. 4 b-f). La morfología de los paquetes espermáticos de *Chactopsis anduzei* fue muy diferente a los demás, con una forma más ahusada y con patrones de líneas en el centro del paquete espermático al ser observado bajo microscopio óptico (Fig. 4 f). Las micrografías electrónicas en *Brotheas*, *Nullibrotheas* y *Teuthrastes*, mostraron la presencia de una membrana que cubría la totalidad del paquete espermático dándole una apariencia más lisa que los paquetes espermáticos de las demás familias (ej. Fig. 4 b).

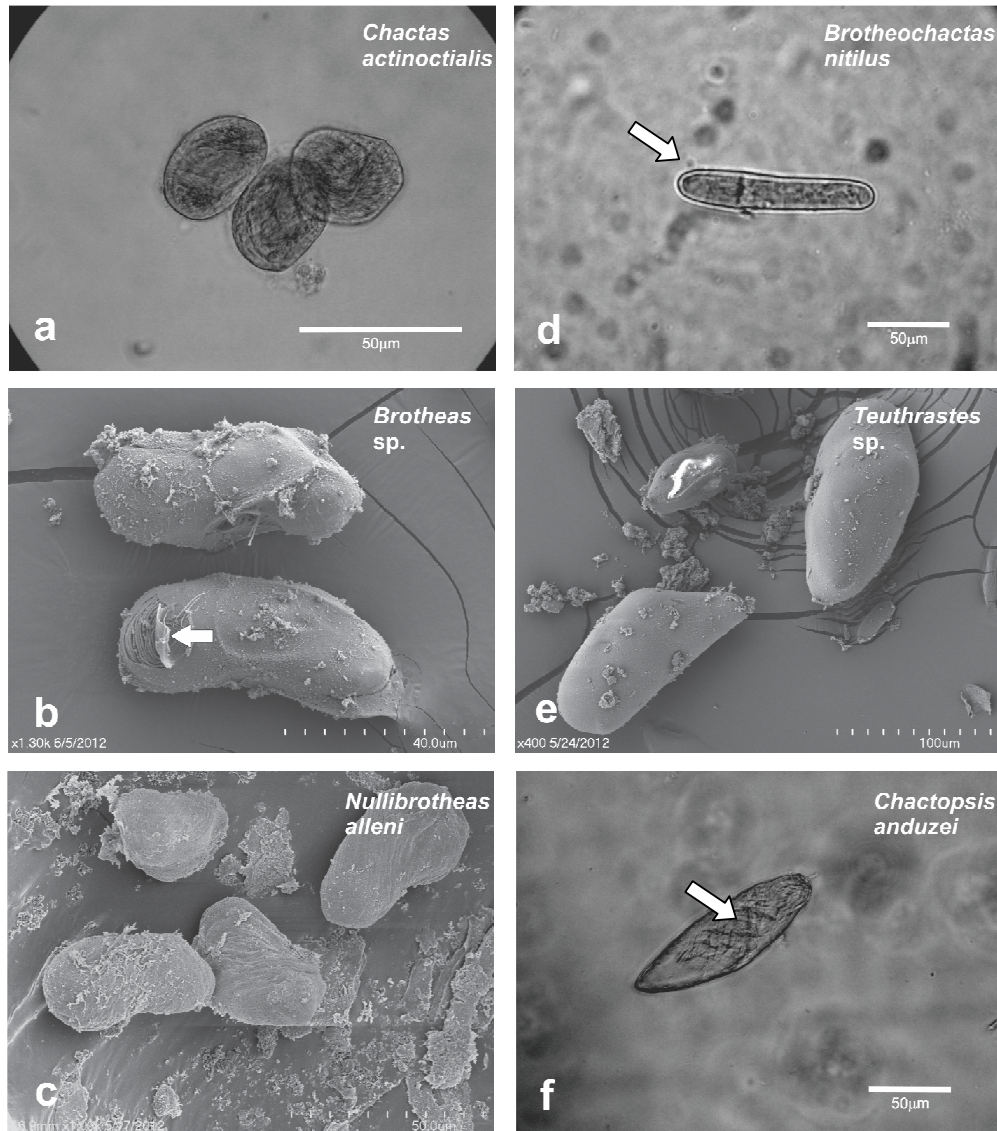


Fig. 4. Diversidad de paquetes espermáticos dentro de la familia Chactidae. En la imagen (b) (*Brotheas* sp.) nótese a la izquierda la presencia de una membrana que recubre la totalidad del paquete espermático (flecha blanca). Debajo de la membrana, pueden verse los espermatozoides agrupados. La flecha en la imagen (d) muestra la zona donde se alojan las cabezas de los espermatozoides en el paquete espermático. La imagen (f) (*Chactopsis anduzei*) la flecha indica los patrones de líneas que se observan bajo microscopía óptica.

Familias Diplocentridae, Euscorpiidae, Hemiscorpiidae, Heteroscorpionidae, Liochelidae, Scorpionidae, Troglotayosicidae, Typhlochactidae, Urodacidae, Vaejovidae

Como sucede con algunos representantes de la familia Bothriuridae, las especies analizadas de estas 10 familias presentan paquetes espermáticos plegados, es decir doblados a la mitad justo por la zona en la que se encuentra la pieza media de los respectivos espermatozoides que lo constituyen (Fig. 5 a-f; Fig. 6 a, e; Fig. 7 a, c, d, e, f). En general no se observaron diferencias marcadas entre las especies en cuanto al tipo de plegamiento o su tamaño. También se observaron variantes de este plegamiento en algunas de las especies que pertenecían a estas familias (ej. Fig. 6 a, b, c, f; Fig. 7 b, c, d). Euscorpiidae mostró ser una familia diversa ya que en los géneros estudiados aparecieron varias formas, que si bien son similares, se pueden identificar las diferencias (Fig. 6). Por ejemplo, *Megacormus gertschi* y *M. aff. grubbsi* mostraron sólo paquetes esféricos (Fig. 6 b, c), pero el otro Euscorpiidae analizado, *Euscorpius flavicaudis*, además de los paquetes esféricos también presentó paquetes plegados, estos últimos con las cabezas grandes y trapezoidales (Fig. 6 a). *Euscorpiops longimanus* tiene paquetes circulares con la zona anterior rugosa, esta rugosidad se observa tanto en imágenes de microscopio óptico como en SEM. Otra particularidad, que comparte con los Chactidae analizados, es la presencia de una membrana que recubre la totalidad del paquete espermático (Fig. 6 d). La especie *Scorpiops hartwickei* muestra paquetes plegados de los más comunes en el orden (Fig. 6 e). *Troglocormus ciego* (Fig. 6 f) posee paquetes esféricos de plegado doble sin membrana visible. Los paquetes de plegado doble están formados por paquetes plegados de los más abundantes, en donde se pliega una vez más por su parte media, generando un paquete más redondeado y corto (Fig. 6 f). En Scorpionidae, *Pandinus imperator* presentó paquetes plegados uniformes en ancho y *Scorpio maurus* mostró paquetes esféricos similares a los de Euscorpiidae (Fig. 7 a, b). En Liochelidae, *Liocheles aff. waigiensis* presentó paquetes plegados y circulares, mientras que las especies de *Opisthacanthus* muestra solamente paquetes plegados (Fig. 7 d, e). Por último, la familia Diplocentridae (Fig. 8 a-c) mostró paquetes plegados (Fig. 8 a) y también paquetes esféricos sin membrana visible (Fig. 8 b).

Familia Superstitionidae

La familia Superstitionidae contiene un solo género y una única especie, *Superstitiona donensis*. Esta especie presenta paquetes rectos diferentes a los

que posee luridae o algún representante de la familia Bothriuridae, con un notorio ensanchamiento en la zona donde se encuentran los núcleos de los espermatozoides y se va adelgazando hacia la zona de los flagelos (Fig. 8 d).

Familia luridae

La familia luridae mostró paquetes espermáticos rectos, algunos como en el caso de *lurus dufourei* son delgados y pueden doblarse en la zona anterior (Fig. 8 e), otros como *Caraboctonus keyserlingi* tienen un aspecto más grueso que los de *lurus* (Fig. 8 f). La forma exacta del sector de las cabezas de los espermatozoides en los paquetes de *C. keyserlingi* no es completamente visible, ya que siempre apareció rota o abierta (probablemente el proceso de separación de espermatozoides comenzaba allí). El primer tercio del paquete (justo detrás de donde se divisaba la zona de las cabezas) es más suave y más compacto. El cuerpo, en general, parece más ancho que el cuello, siendo la cola como una punta de flecha (Fig. 8 f). También en las mismas muestras aparecieron paquetes espermáticos rectos y finos notablemente diferentes a los que se describieron previamente (Ver Capítulo 2).

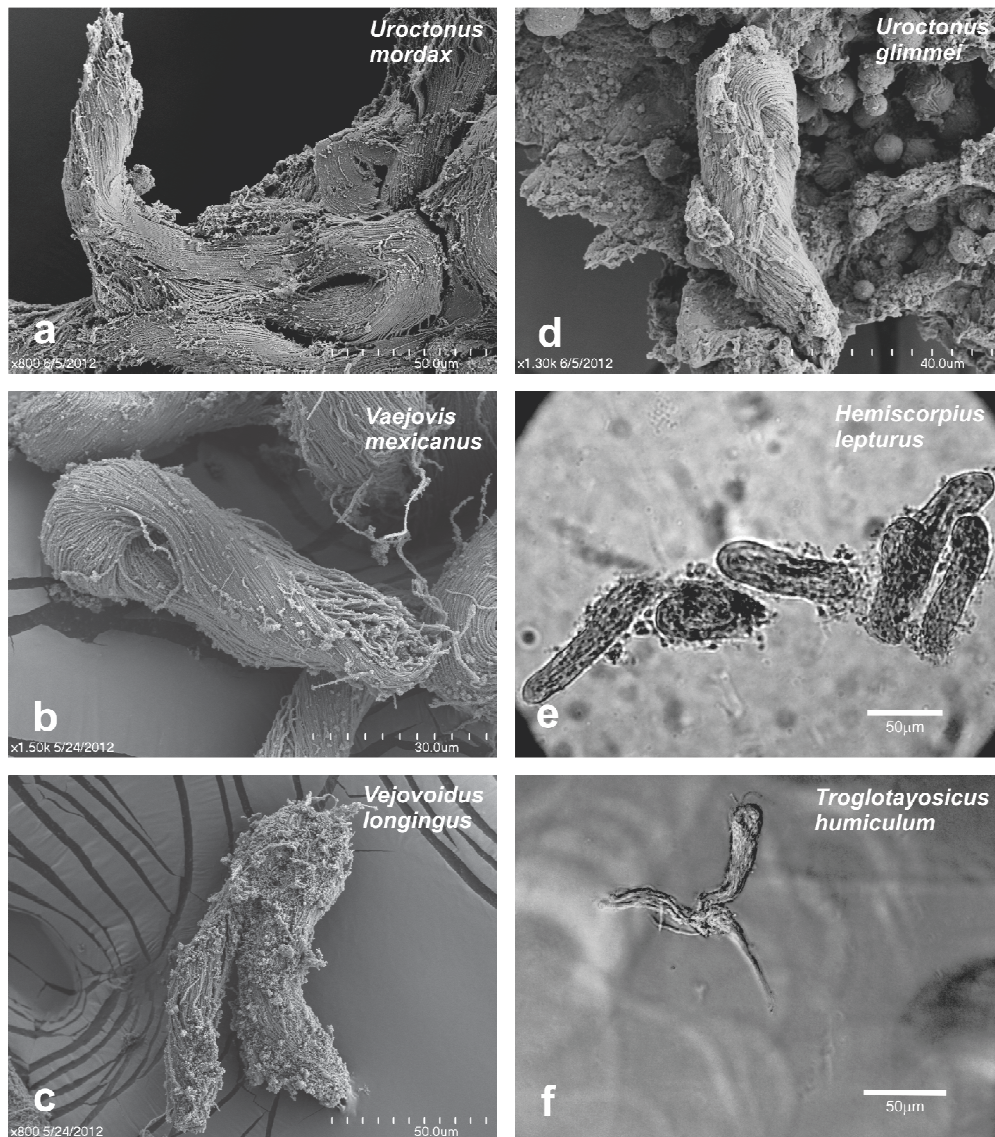


Fig. 5. Paquetes plegados en diferentes familias del Orden Scorpiones. a-d) Vaejovidae. e) Hemiscorpiidae. f) Troglotayosicidae.

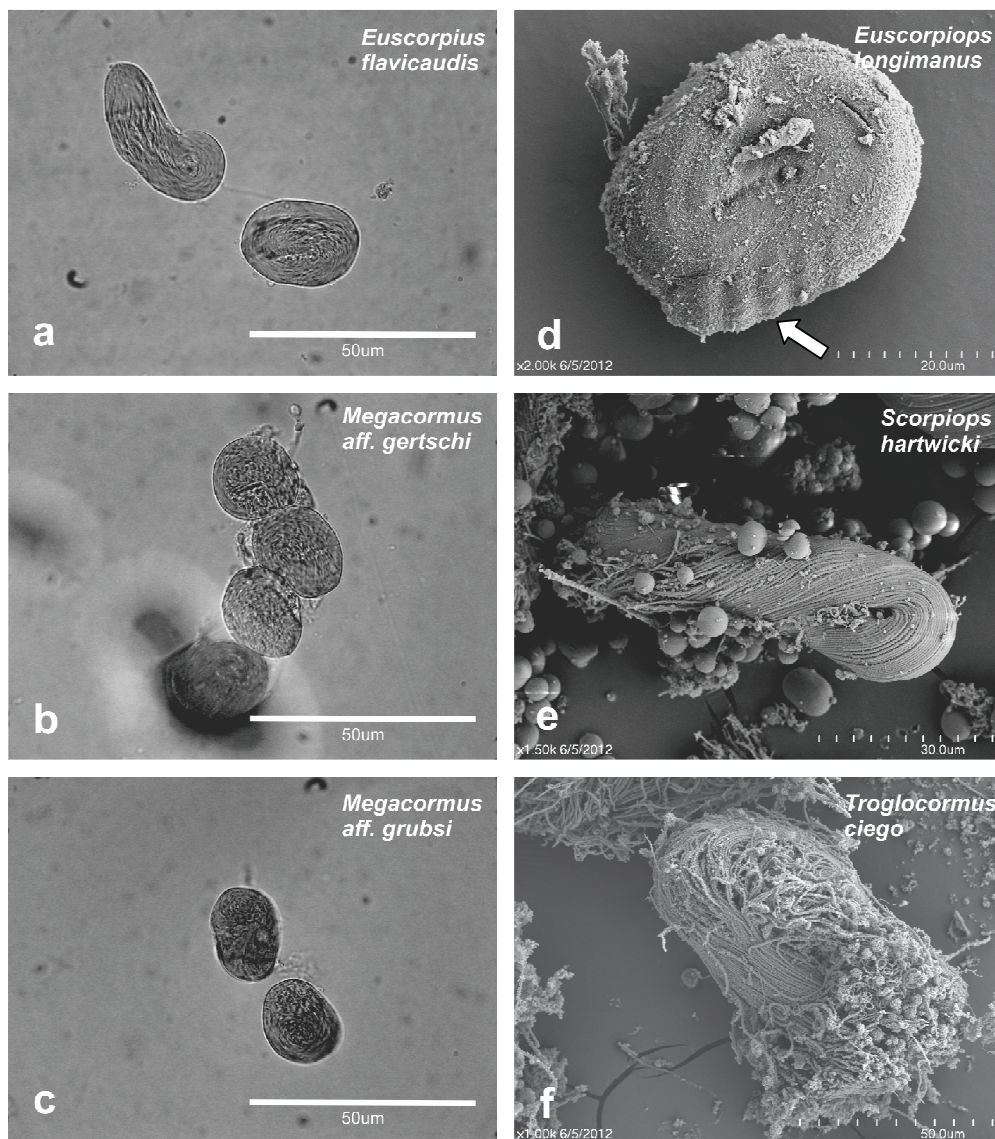


Fig. 6. Diversidad de paquetes espermáticos en la familia Euscorpidae. Nótese la gran variabilidad que muestra esta familia. En la imagen (d), se identifica una membrana que recubre el paquete espermático y la parte anterior parece estar ondulada (flecha).

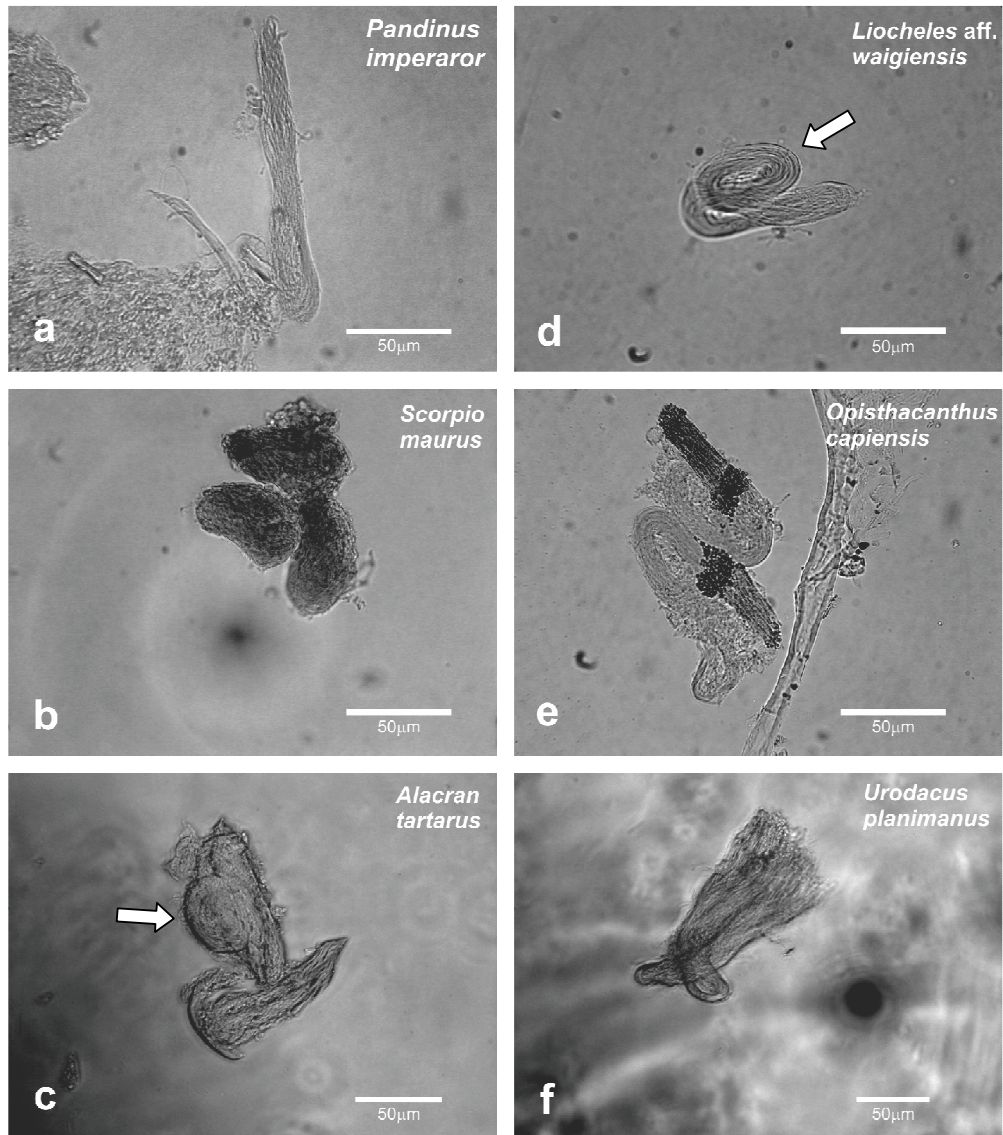


Fig. 7. Paquetes plegados en diferentes familias del Orden Scorpiones y sus variantes. a-b) Scorpionidae; c) Typhlochactidae; d-e) Liochelidae; f) Urodacidae. Nótese que es muy frecuente la aparición de paquetes circulares o esféricos acompañando a los paquetes plegados (flechas figs. c y d).

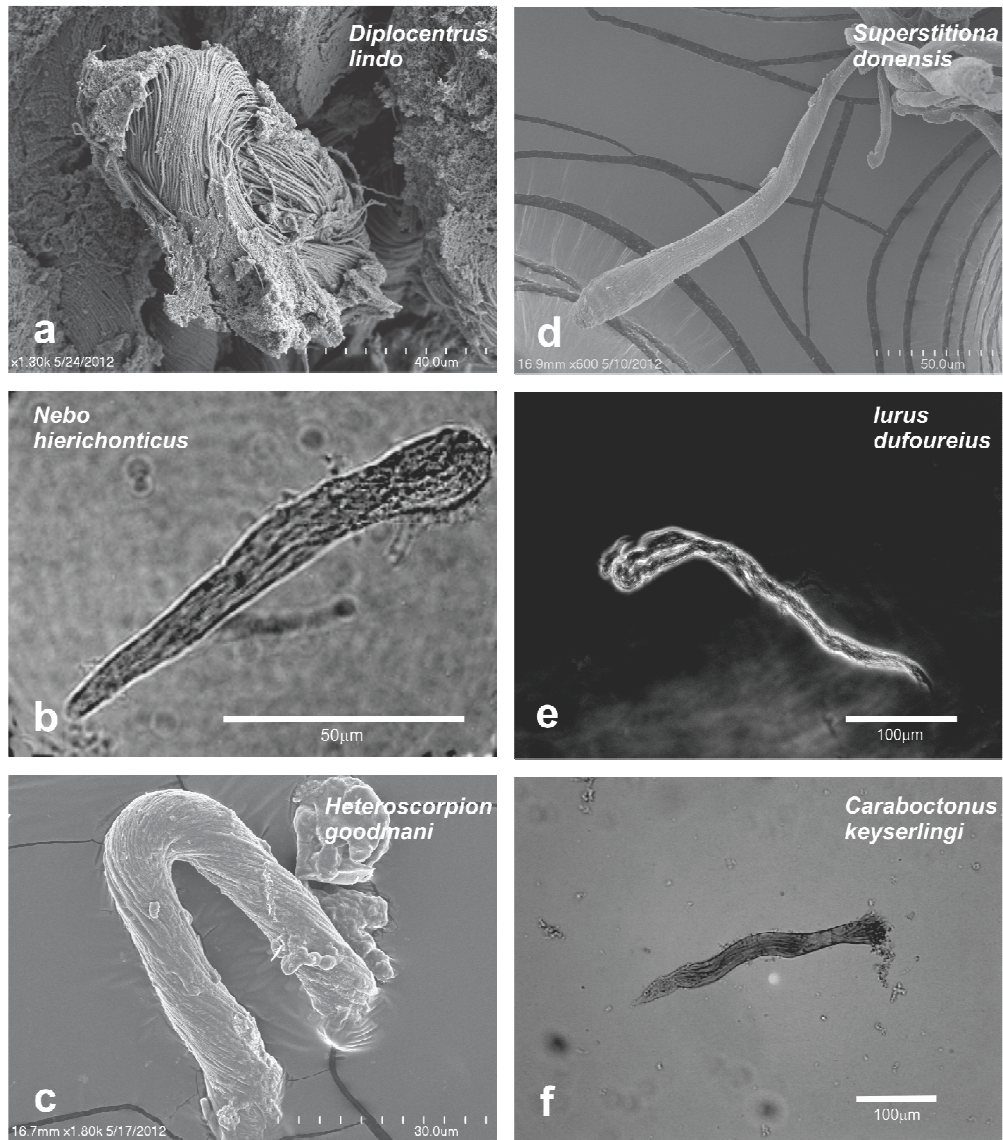


Fig. 8. Diversidad de paquetes espermáticos en cuatro familias del Orden Scorpiones. a-b) Diplocentridae; c) Heteroscorpionidae; d) Supertitionidae. e-f) Iuridae. Estas tres últimas especies, pertenecientes a dos familias no presentan paquetes plegados sino paquetes rectos.

Familia Bothriuridae

Género Bothriurus

Se analizaron 16 especies del género *Bothriurus*. Todas las especies presentaron paquetes espermáticos. En general el paquete espermático más común fue el de tipo bastón (apareció en el 50% de las especies analizadas de la familia). El paquete tipo bastón es recto con un arqueamiento en la zona anterior ensanchada donde se encuentran los núcleos de los espermatozoides y se va adelgazando hacia la zona del flagelo de los mismos. La zona de los núcleos espermáticos mostró una inclinación en un ángulo ligeramente mayor a un ángulo recto con respecto al eje del cuerpo del paquete espermático. Los paquetes de este tipo se encontraron sólo en esta familia y la mayoría de las especies que mostraron paquetes en forma de bastón pertenecen al subgénero *Andibothriurus* (Fig. 9 a-h). Existe variación en el largo total pero todas las especies muestran paquetes de morfología muy similar. En las especies del subgénero *Bothriurus* hubo mayor variación de formas, comparado con el subgénero anterior. Los paquetes en general fueron rectos con un ancho uniforme entre la zona de las cabezas de esperma y la zona de sus flagelos (Fig. 10 a-c). En *B. araguayae* los paquetes rectos mostraron la zona de las cabezas marcadamente definida y larga comparado con las demás especies (Fig. 10 a). *Bothriurus bonariensis* y *B. chacoensis* presentaron también paquetes rectos similares a los de *B. araguayae* aunque ligeramente más delgados (Fig. 10 b, c). Un lote de individuos de *B. chacoensis* y *B. bonariensis* presentaron paquetes rectos con ondulaciones en la zona anterior donde se alojan los núcleos de los espermatozoides y un cuerpo significativamente más delgado que el descrito en este apartado. *Bothriurus bocki* y *B. inermis* presentaron paquetes plegados con un ancho uniforme a lo largo de todo el paquete con un ligero adelgazamiento hacia la zona de los flagelos de los espermatozoides (ej. Fig. 10 d). La zona donde se alojan los núcleos de los espermatozoides es similar a *B. araguayae*. En *B. inermis* también aparecieron gran cantidad de paquetes circulares (Fig. 10 e). Ambos tipos de paquetes, los plegados y los circulares, comúnmente aparecieron juntos en las especies con paquetes plegados en la mayoría de las familias. Los paquetes circulares fueron mucho más comunes en *B. inermis* que en otras especies en las que también aparecieron. Surgen dudas con el tipo de paquetes espermáticos que presentan *B. asper*, *B. cacule* y *B. rochai*. Fue difícil identificar el tipo de paquete pero se obtuvieron algunas fotografías que muestran paquetes rectos (Fig. 10 f-h). *Bothriurus asper* presentó agregaciones que parecían mostrar paquetes rectos

pero no se identificaban con precisión. *Bothriurus cacule*, afín al grupo rochai, mostró paquetes rectos y uniformes, con la zona que aloja los núcleos espermáticos muy corta a comparación de lo que ocurre por ejemplo en *B. araguayae* y *B. bocki*. *Bothriurus rochai* presento paquetes rectos pero no uniformes como los de *B. araguayae* ni los de *B. cacule* (Fig. 10 h).

Géneros *Brachistosternus*, *Tehuanka*, *Urophonius*, *Phoniocercus*, *Cercophonius*.

Estos cinco géneros presentan principalmente paquetes espermáticos en forma de bastón, con excepción de *Cercophonius* que también muestra plegamiento.

Brachistosternus presenta paquetes espermáticos con la zona de los núcleos de los espermatozoides corta y ancha, el cuerpo del paquete espermático se va adelgazando uniformemente hacia la zona de los flagelos (Fig. 11 a-c).

Brachistosternus angustimanus mostró paquetes ligeramente más largos que las otras dos especies (Tabla 1).

Tehuanka mostró paquetes largos que se adelgazan uniformemente hacia posterior. Las cabezas son conspicuas pero no tan largas en comparación a su tamaño total y presentan un fuerte ángulo entre la cabeza y el cuerpo (Fig. 11 d).

Phoniocercus y *Urophonius* presentaron paquetes espermáticos bastante similares (Fig. 11 e-g). La zona de las cabezas espermáticas se encuentra en un ángulo recto o ligeramente mayor con respecto al cuerpo. El cuerpo del paquete espermático se adelgaza abruptamente hacia la zona de los flagelos. En *U. brachycentrus* la zona media del paquete espermático en ocasiones mostró ondulaciones (Fig. 11 e). *Cercophonius*, por su parte, tiene una estructura similar a *Urophonius*, pero fueron ligeramente más delgados y la mayoría se presentó plegado (Fig. 11 h). Sin embargo se diferencia de los demás paquetes plegados en que la zona que aloja los núcleos espermáticos no es recta (como en *Timogenes*) sino que, al igual que en *Urophonius* y *Phoniocercus*, está formando un ángulo cercano a los 90 grados (Fig. 11 h). El cuerpo de los paquetes espermáticos se adelgaza marcadamente hacia la zona de los flagelos. El largo de los paquetes espermáticos en *Phoniocercus* fue menor al de los otros géneros (ver debajo).

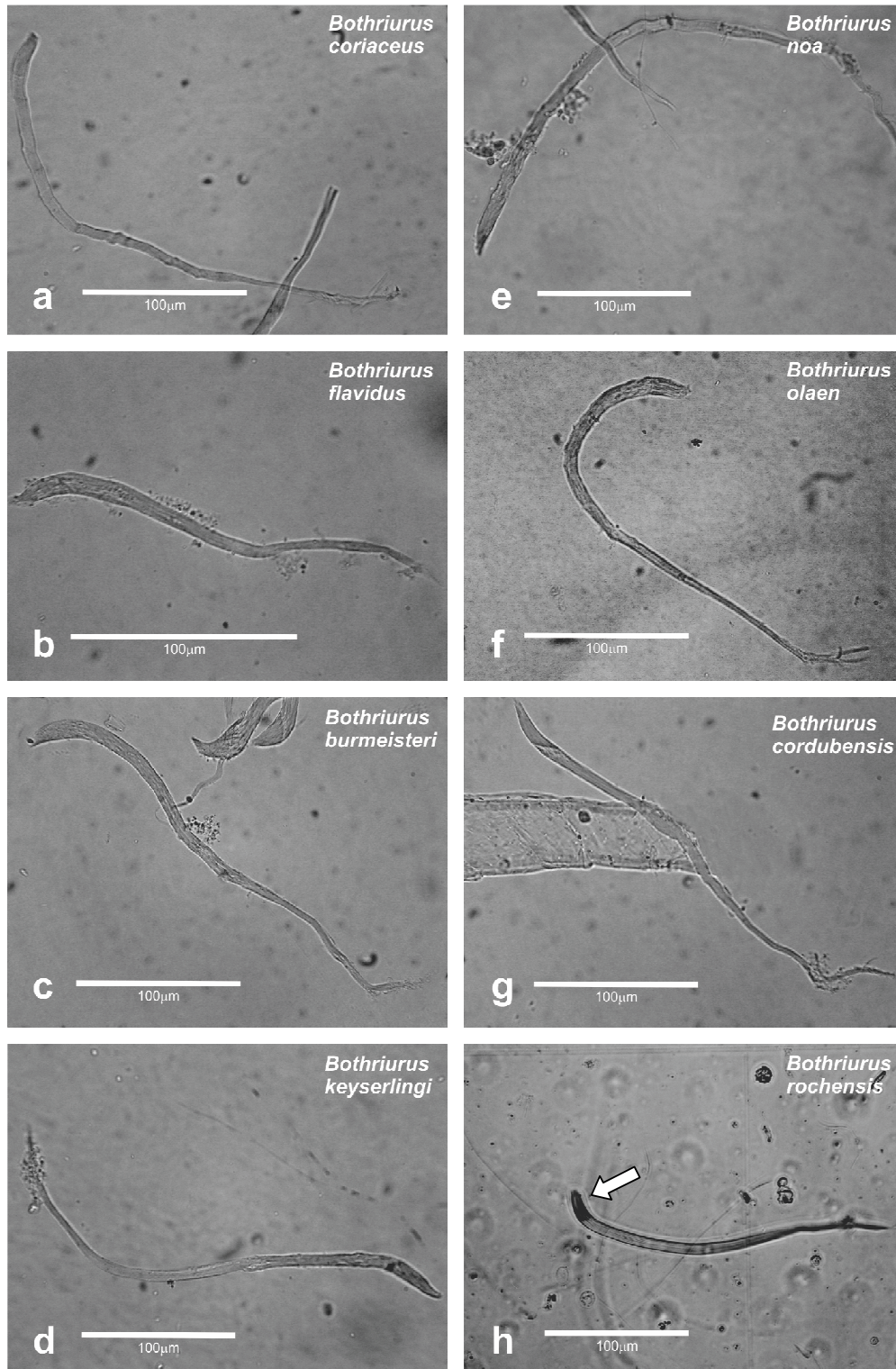


Fig. 9. Diversidad de paquetes espermáticos en la familia Bothriuridae, subgénero *Bothriurus* (*Andibothriurus*). Todos los representantes muestran paquetes rectos en forma de bastón. En la fig. h se identifica la zona de los núcleos espermáticos (flecha) y se aplica a las demás figuras.

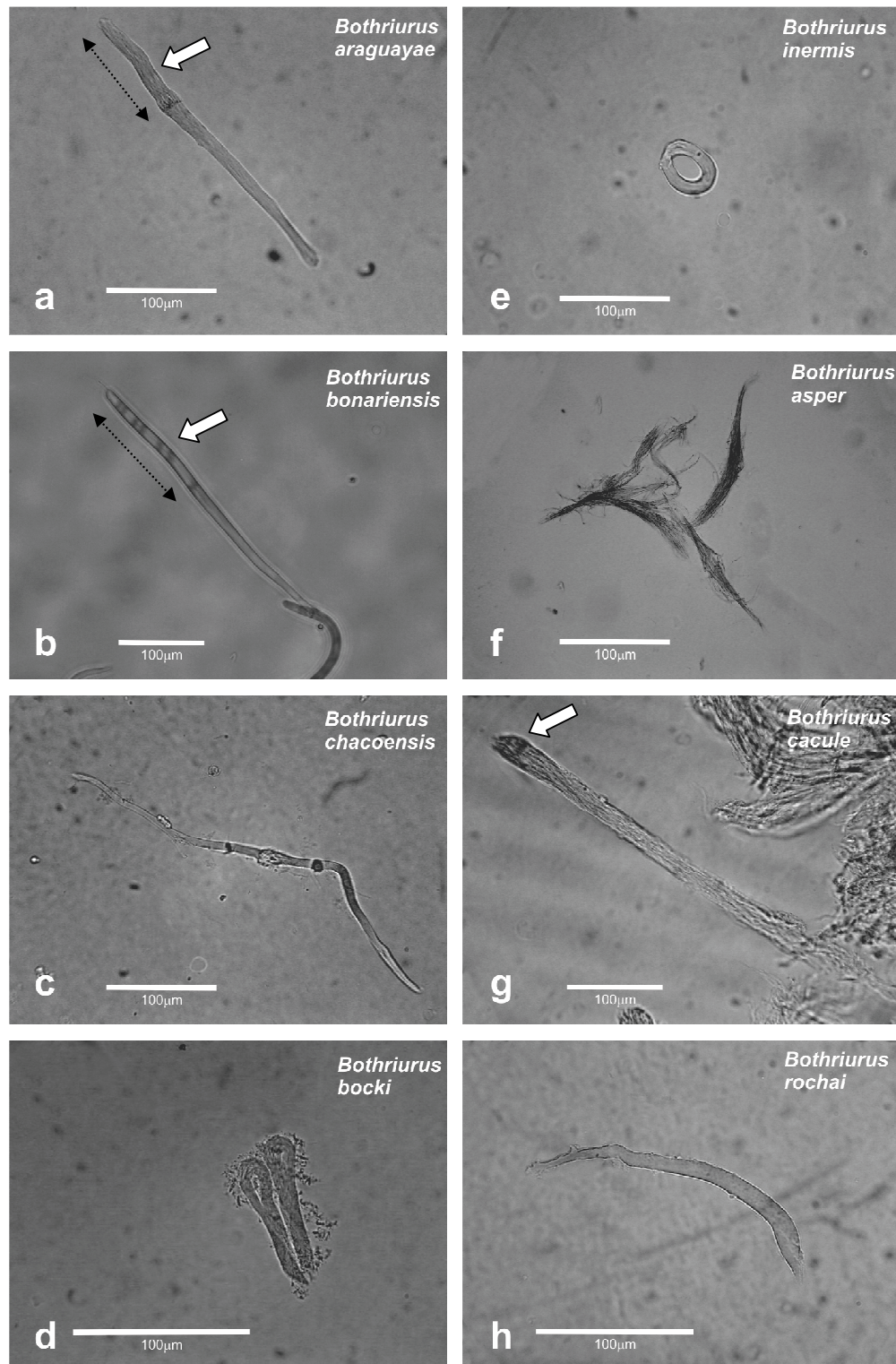


Fig. 10. Diversidad de paquetes espermáticos en Bothriuridae, subgénero *Bothriurus* (*Bothriurus*). Figs. a) b) y d) núcleos espermáticos en la cabeza del paquete espermático (flechas). Nótese la diferencia de a) y b) con los paquetes del subgénero *Andibothriurus*. e) Paquete circular que se frecuentemente asociado a paquetes plegados en muestras provenientes de un mismo individuo.

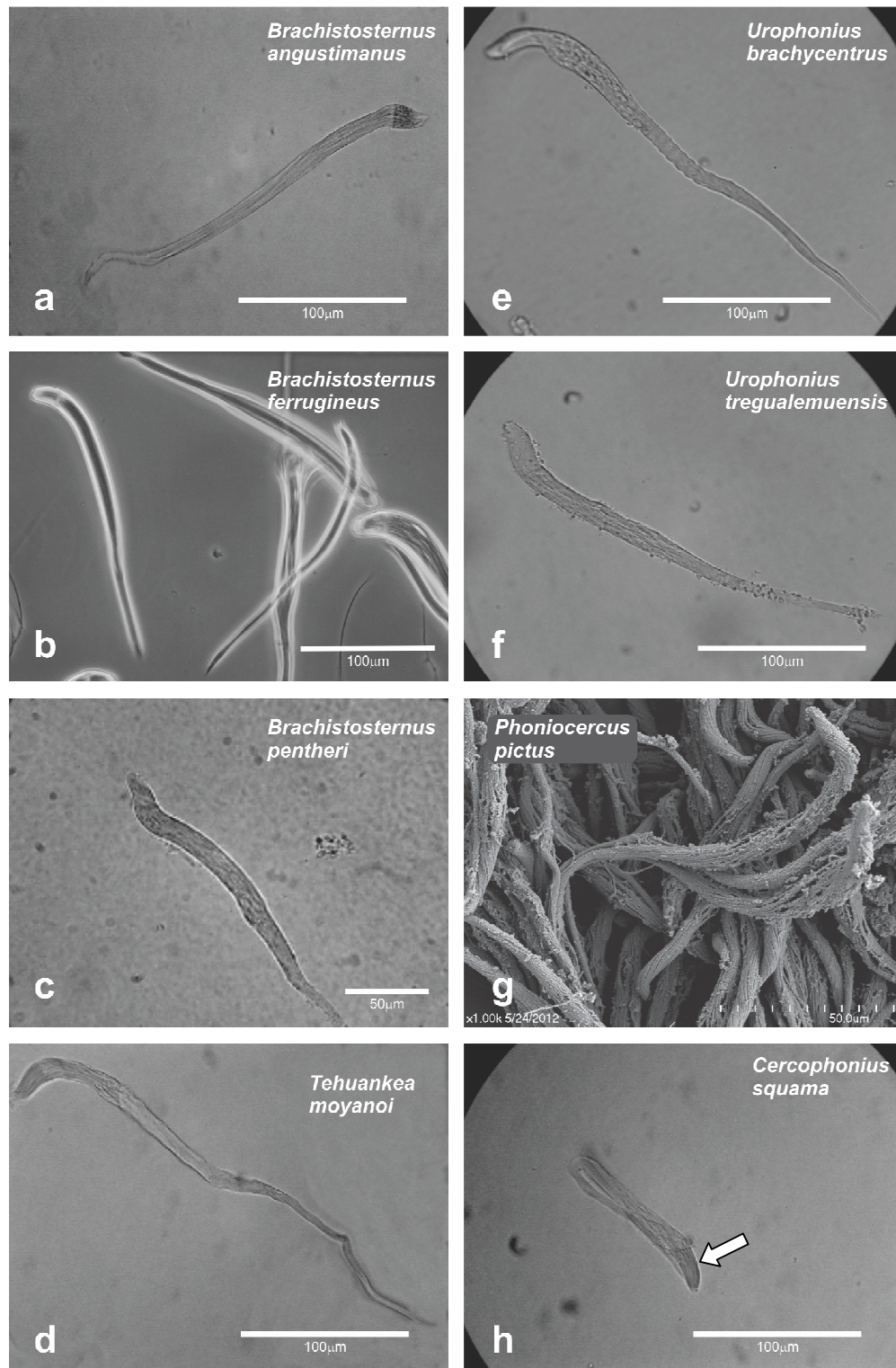


Fig. 11. Diversidad de paquetes espermáticos en la familia Bothriuridae. a-c) Género *Brachistosternus*; d) Género *Tehuantea*; e-h) Géneros relacionados a *Urophonius*. Fig. h se muestra la zona de los núcleos espermáticos de los espermatozoides que componen el paquete espermático (flecha). Compárese luego con la Fig. 12 g en donde esa zona es recta y de mayor longitud.

Género *Centromachetes*

Centromachetes mostró paquetes espermáticos largos con una zona de núcleos de espermatozoides corta (Fig. 12 Fig. 12 a, b). El cuerpo del paquete se adelgaza hacia la zona de los flagelos. Presenta una estructura similar a *Br. angustimanus* (Fig. 11 a).

Género *Lisposoma*

Lisposoma mostró paquetes gruesos rectos con la zona de las cabezas de espermatozoides poligonal (Fig. 12 c). Esta característica es muy similar a lo que muestra *Superstitiona donensis* (Superstitionidae, Fig. 8 d).

Géneros *Thestylus*, *Rumikiru* y *Orobothriurus*

Los tres géneros presentan paquetes cortos y finos comparado con otras formas rectas como por ejemplo *B. araguayae* (Fig. 10 a). El cuerpo es uniforme hasta la zona media y se va adelgazando hacia el extremo distal en los tres géneros (Fig. 12 d, e, f). Los tres géneros mostraron la zona de los núcleos espermáticos de gran longitud, sobre todo cuando se tomó en cuenta el tamaño total del paquete espermático. Esta zona es difícil de ver en fotos de microscopía óptica a aumentos normales (40x). Estos fueron los paquetes espermáticos más pequeños que se observaron en la familia junto a *Phoniocercus*.

Géneros *Timogenes* y *Vachonia*

Estos dos géneros presentaron casi de manera exclusiva paquetes con un ancho uniforme que aparecen plegados a la mitad del cuerpo del paquete espermático (Fig. 12 g, h). También aquí aparecieron paquetes circulares y paquetes completamente rectos sin estar plegados por la mitad, pero estos aparecieron en menor número.

Un resumen gráfico de la distribución y relación de las diferentes formas presentadas por las familias analizadas en este ítem, acompañado de largos absolutos se presenta en la Fig. 13. Aquí también se ilustra la evolución de la morfología de los paquetes espermáticos en todas las especies. Vemos que el carácter ancestral es la ausencia de paquetes espermáticos como lo representa *Buthidae*. Luego aparecen los paquetes plegados que se diseminan por el árbol y cambian a paquetes rectos en *Luridae*, *Superstitionidae* y *Bothriuridae* y a paquetes esféricos en *Chactidae* y algunos *Euscorpiidae* (Fig. 13).

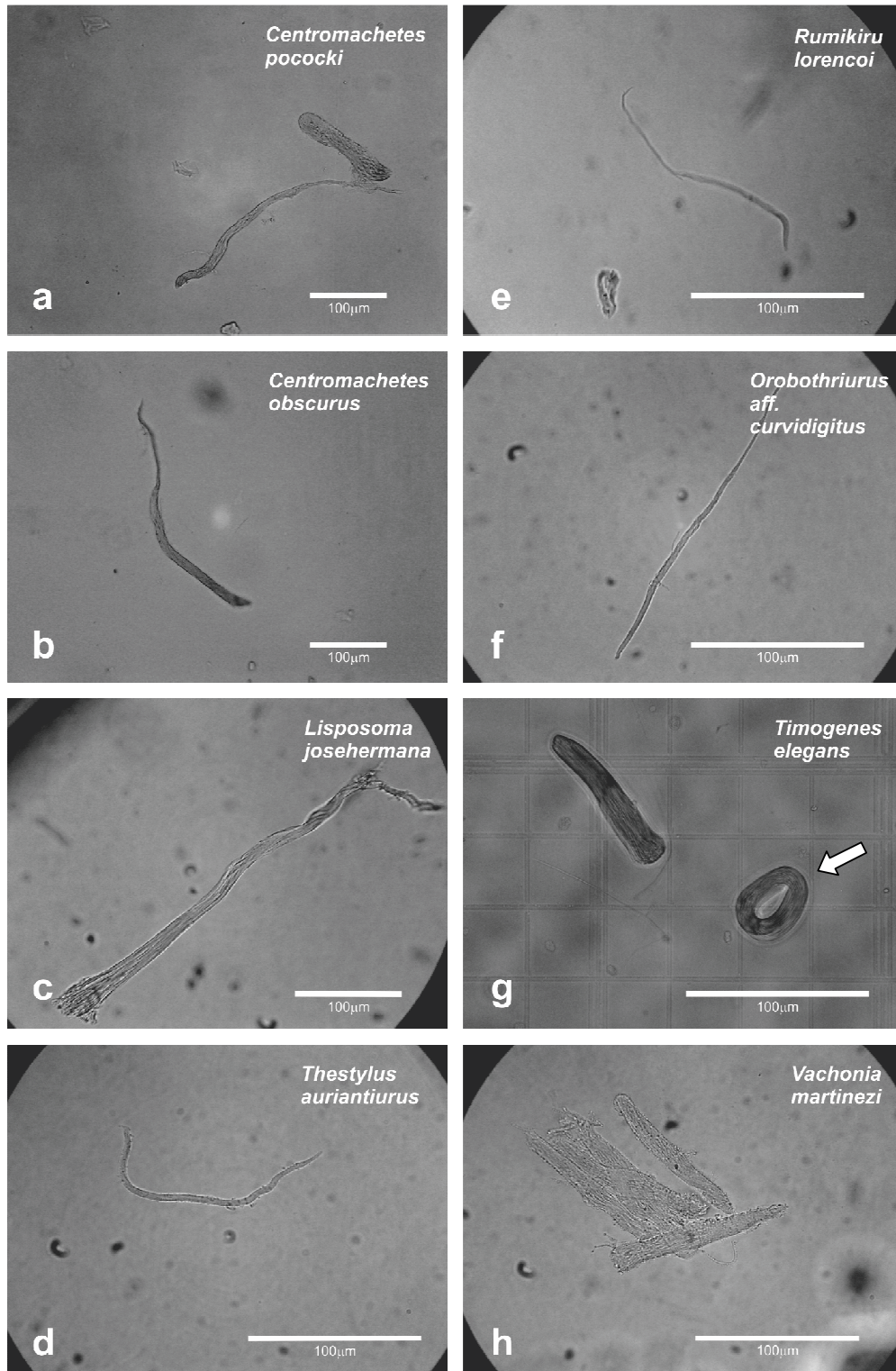


Fig. 12. Diversidad de paquetes espermáticos en la familia Bothriuridae. Paquetes plegados en el resto de los géneros analizados. Nótese en las imágenes (g) y (h), la aparición de paquetes plegados. En la fig. g se puede apreciar junto a un paquete plegado, un paquete con forma de anillo (flecha) que aparece frecuentemente en especies con paquetes plegados.

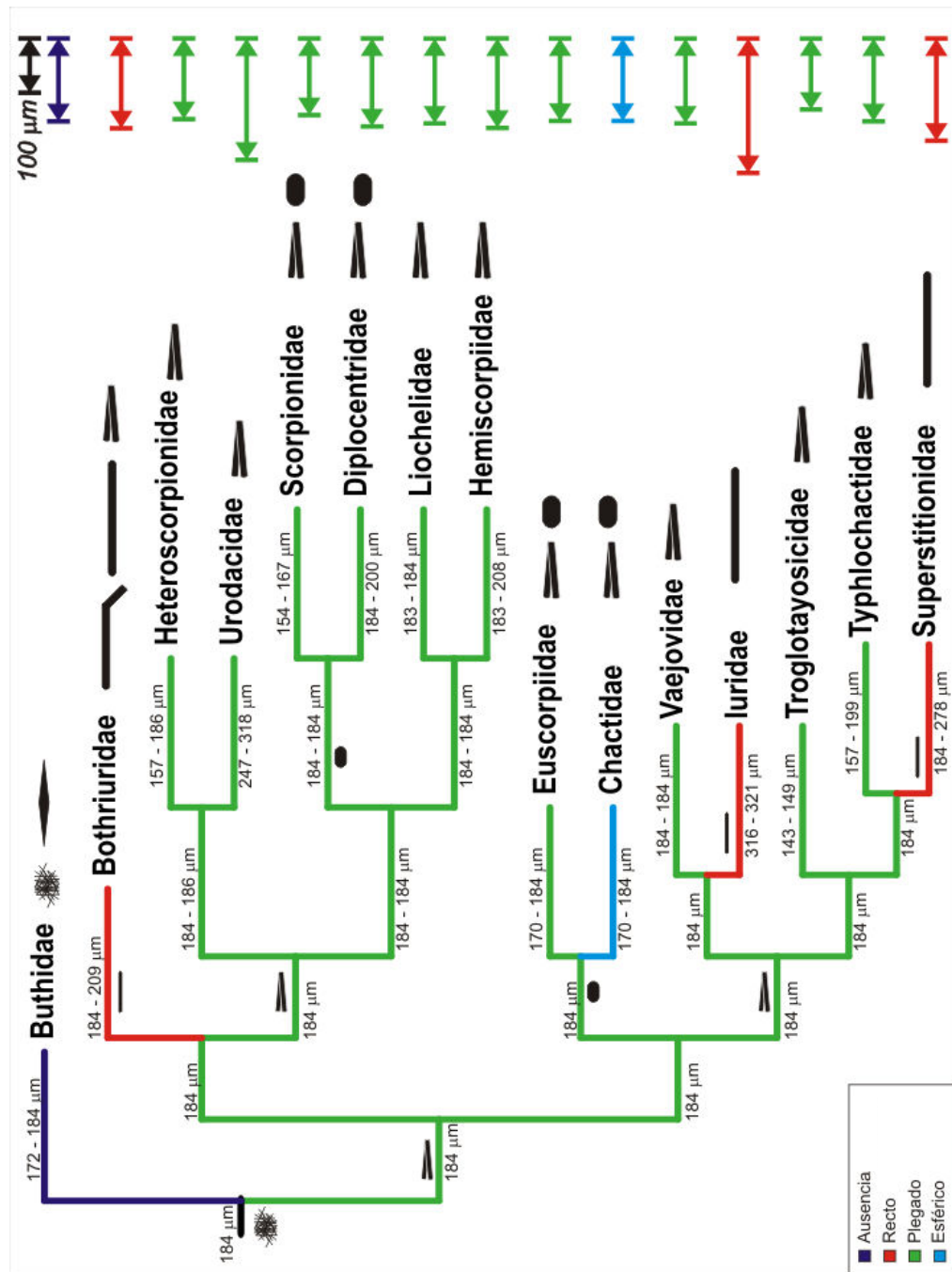


Fig. 13. Resumen de la morfología en las Familias analizadas del Orden Scorpiones. Se optimizaron el largo total (valores aparecen en las ramas del árbol) y la morfología general (plegado, recto y esférico con colores en las ramas). Como anexo al valor del largo total se dibujaron barras para mostrar la variación de tamaño entre las familias. La barra superior representativa la escala en μm . También se agregaron esquemas de las morfologías más comunes en cada una de las familias.

1.4.1.2 Análisis cuantitativo (mediciones)

Orden Scorpiones

En la Tabla 1 se muestra un resumen de las medidas obtenidas para cada una de las especies analizadas del orden. No se detallan todas las especies analizadas porque el estado de conservación de algunas no permitió realizar mediciones. Las especies con menores valores de largo total muestran valores de 112 ± 5 (*Euscorpius flavicaudis*) o $130 \pm 17 \mu\text{m}$ (*Troglocormus ciego*), mientras que las especies con mayores valores de paquetes espermáticos muestran valores como $354 \pm 10 \mu\text{m}$ o $335 \pm 14 \mu\text{m}$, poco más del doble que las especies con menores valores. Los valores del área total del paquete mostraron a otras especies con los valores extremos. Las especies con menores valores de área se encontraron entre *Rumikiru lourencoi* *Liocheles* aff. *waigiensis* y *Scorpio maurus*, en tanto en el otro extremo se encuentra *Caraboctonus keyserlingi* y *Diplocentrus lindo*.

En cuanto a la forma general, como vimos previamente, predomina la morfología de paquete plegado. Las especies con este tipo de paquetes tienen un largo total estimado mucho menor en la mayoría de los casos a las especies con paquetes rectos. Comparando los largos totales únicamente de las familias con paquetes plegados, se observa una variación en el largo total (Fig. 13) que va desde los $143 \mu\text{m}$ a los $223 \mu\text{m}$ (183 ± 40). El análisis de varianza de una vía de las medias de estas especies muestra que existe una diferencia entre las especies en cuanto a su largo total ($F_{(12,57)} = 13,3$; $p < 0,0001$). Se realizó un Test *PosHoc* Tukey (*HSD*) y aparecieron tres grupos bien diferenciados, uno el de Urodacidae con la media mayor, luego un grupo intermedio con Typhlochactidae y Heteroscorpidae y por último Euscorpidae con la menor media. Las áreas no necesariamente son menores en los grupos con paquetes plegados. Salvando el caso de Urodacidae, se observa en general una tendencia a que las especies con paquetes plegados no necesariamente muestren valores grandes de largo total (Fig. 14 a). Los paquetes espermáticos de mayor largo total tienen una morfología general recta y pertenecen a Luridae.

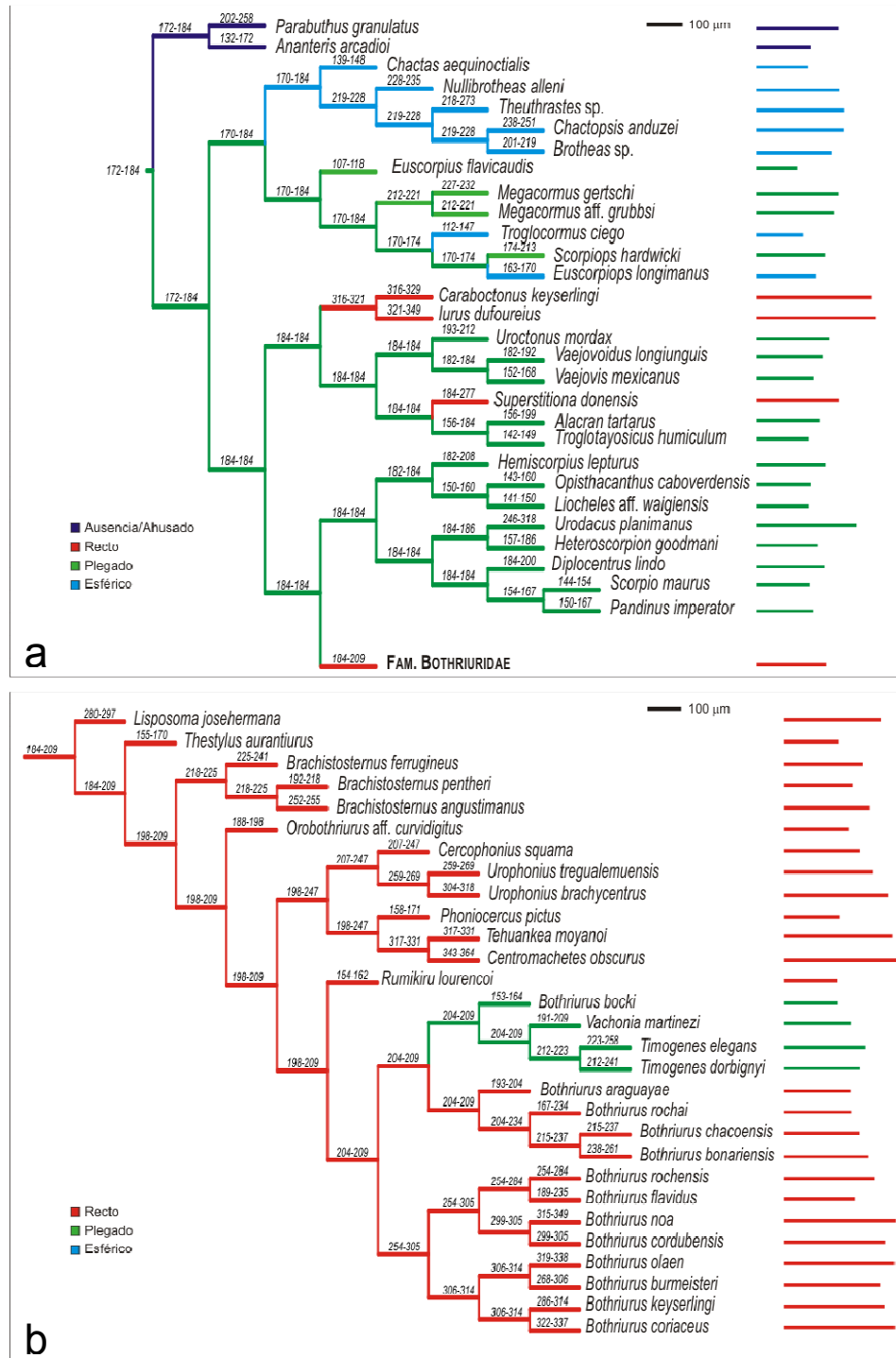


Fig. 14. Optimización del largo total y la morfología general teniendo en cuenta cada una de las especies analizadas de cada familia junto a los largos totales (barras). Este grafico es una ampliación del grafico anterior (Fig. 13) y muestra los detalles dentro de cada familia. los valores mostrados en las ramas son los valores del limite superior e inferior del largo total del paquete espermático en μm . No se incluyeron los Buthidae que no presentan empaquetamiento de esperma porque no se tuvo acceso a una filogenia para las especies contempladas.

Familia Bothriuridae

Variables principales de Bothriuridae

Los paquetes tipo bastón en *Bothriurus* midieron entre $212 \pm 2 \mu\text{m}$ (*Bothriurus flavidus*) y $332 \pm 7 \mu\text{m}$ (*Bothriurus noa*). *Brachistosternus angustimanus* mostró paquetes más largos que las otras dos especies ($253 \pm 1 \mu\text{m}$). En la familia Bothriuridae, los rangos de longitud total van desde $158 \pm 4 \mu\text{m}$ (*Rumikiru lourencoi*) a $354 \pm 10 \mu\text{m}$ (*Centromachetes obscurus*) (Fig. 14). La media general de las especies estudiadas en la familia fue de $254 \pm 52 \mu\text{m}$. *Orobothriurus tamarugal* mostró paquetes con cabezas pequeñas ($8 \mu\text{m}$), alrededor de ocho veces menor que la misma región en paquetes de *Bothriurus araguayae*. El ángulo que forma la zona de las cabezas de los espermatozoides en el paquete espermático con el eje del cuerpo del paquete varió según las especies. Los paquetes en forma de bastón tuvieron ángulos que fueron desde los 90 grados hasta los 135 grados. Especies como *B. araguayae* o las especies del género *Timogenes* presentaron ángulos rectos cercanos a los 180 grados. Este ángulo le da un aspecto totalmente recto a todo el paquete espermático (Fig. 12 g).

1.4.1.3 Análisis de correlación

Se observó una asociación lineal positiva y significativa entre el largo total del paquete espermático y su área ($r_s = 0,58$; $p < 0,0001$) en las especies analizadas del orden. El valor del coeficiente de correlación muestra que la asociación es intermedia (58%). En Bothriuridae, únicamente en *Br. pentheri* y *T. dorbignyi* se observó correlación significativa y positiva entre el largo total y el área del paquete espermático, con la primera mostrando un índice de correlación mayor (Tabla 2). Solo dos especies, *B. araguayae* y *B. pentheri*, mostraron una correlación significativa entre el largo total del paquete espermático y el largo de la zona donde se alojan las cabezas espermáticas. Así mismo, en las demás especies hubo dos (*B. flavidus* y *U. tregualemuensis*) con un alto valor de coeficiente de correlación pero baja significancia estadística. Estas cuatro especies mostraron paquetes espermáticos largos con zona de cabezas espermáticas también largas. Cuando el largo total de la zona de las cabezas espermáticas se dividió por el largo total del paquete espermático, los porcentajes variaron de 3,97% (*R. lourencoi*) a 31,57% (*B. araguayae*). Sin embargo la mayor parte de los valores se situaron entre 10% al 12% (N = 10 paquetes/ macho).

Tabla 2. Relación entre variables cuantitativas en algunas especies de la familia Bothriuridae. Los valores significativos están indicados en negrita. Abreviaturas: AR = Área, LT = Largo total, LC = Largo de la cabeza. r_s = Coeficiente de Correlación de Spearman, p = probabilidad estadística.

Especies	AR vs LT		LC vs LT	
	r_s	p	r_s	p
<i>Bothriurus araguayae</i>	0,4182	0,2291	0,6970	0,0251
<i>Bothriurus flavidus</i>	0,4857	0,3287	0,6571	0,1562
<i>Brachistosternus ferrugineus</i>	0,4134	0,2351	0,3587	0,3088
<i>Brachistosternus pentheri</i>	0,9394	0,0001	0,7842	0,0072
<i>Centromachetes obscurus</i>	0,3000	0,6238	0,2000	0,7441
<i>Timogenes dorbignyi</i>	0,7091	0,0217	0,4904	0,1497
<i>Timogenes elegans</i>	0,0952	0,8225	0,6905	0,0580
<i>Urophonius tregualemuensis</i>	0,4000	0,5046	0,7000	0,1881

1.4.1.4 Ajuste a la hipótesis filogenética.

Familias del Orden

La longitud de los paquetes espermáticos en el orden no varió demasiado entre la mayoría de las familias (Fig. 13). El promedio general ronda los $197 \pm 55 \mu\text{m}$. Buthidae, representado únicamente por *Parabuthus granulatus*, mostró un valor que se ubicó cercano al rango medio. Dentro de los no Buthidae, tres familias, Urodacidae, Iuridae y Superstitionidae presentaron un aumento en la longitud de los paquetes espermáticos comparado con el resto. Estas familias poseen, como ya se mencionó, paquetes largos y rectos, o bien del tipo plegados como en el caso de Urodacidae. Las familias Scorpionidae, Euscorpiidae, Chactidae y Troglotayosicidae presentan una disminución del largo total de paquete espermático (Fig. 13, Fig. 14a). La disminución mayor se encuentra en Euscorpiidae con un valor cercano a la mitad del valor de la media general de todas las familias ($112 \pm 5 \mu\text{m}$) (Fig. 13). Las especies con paquetes plegados en general tienen paquetes con una longitud total menor en comparación con los paquetes rectos. Las excepciones son *Nullibrotheas alleni* y *Urodacus planimanus*, los cuales poseen paquetes con plegamientos y tienen valores de longitud total mayores. La longitud media entre las familias con paquetes plegados es de $184 \pm 41 \mu\text{m}$, mientras que en las familias con paquetes rectos es de $283 \pm 73 \mu\text{m}$.

Analizando las medidas de ajuste del cladograma, el valor de índice de consistencia del largo del paquete espermático optimizado en el árbol con las especies analizadas (Fig. 14) fue mayor para la morfología general, mostrando menor homoplasia que para los caracteres de largo total y área, lo mismo ocurrió

para el índice de retención (Tabla 3). El árbol resultante de la optimización de la morfología general, muestra que en los no Buthidae, el estado más primitivo fue el paquete plegado, mientras que los paquetes en forma recta y esférica derivarían de estos paquetes plegados (Fig. 14 a). Aquí también se observa que en la familia Bothriuridae hubo un cambio en el estado del carácter que hizo que el paquete espermático pasara de ser plegado a recto y luego hubo una reversión al estado ancestral (Fig. 14 b).

Comparando entre si los ajustes de los caracteres cuantitativos (largo total y área), se observa un valor mayor del índice de consistencia para el área, pero un valor mayor de índice de retención para el largo total (Tabla 3). En la optimización del área del paquete espermático, el clado que contiene a Scorpionidae y Diplocentridae presenta valores muy extremos. Esta variación también aparece en Bothriuridae, Urodacidae, Chactidae Superstitionidae y Typhlochactidae. Así, Los rangos en general se notan muy amplios.

Familia Bothriuridae

Siguiendo el valor del índice de consistencia (Tabla 4), las variables que mejor se ajustaron a la hipótesis filogenética fueron el ángulo cabeza cuerpo del paquete espermático (CI = 0,54) cuyo índice de retención es también el mayor de los cuatro caracteres contemplados (Tabla 4) y el largo de la cabeza (CI = 0,44) (Fig. 15 b). Las demás variables mostraron un índice de consistencia menor a 0,32, área = 0,31 y largo total = 0,28 (Fig. 14 b). La longitud total del paquete de esperma tiende a ser mayor en las especies más derivadas Fig. 14 b. La excepción es *Lisposoma josehermana*. Aunque esta especie se considera ancestral, tiene más caracteres "derivados" en el paquete de esperma (por ejemplo, una mayor longitud total). En la optimización, la variable del ángulo cabeza-cuerpo no muestra un notable incremento de los valores en los nodos internos, ya que siguen siendo generalmente constante (Fig. 15 a).

Tabla 3. Resumen de los valores de estadísticos filogenéticos derivados de la optimización de caracteres en el cladograma de las especies analizadas del orden (Fig. 14a).

Carácter	Índice de consistencia	Índice de retención
Morfología general	0,44	0,81
Largo total	0,16	0,44
Área	0,25	0,30

Tabla 4. Resumen de los valores de ajuste filogenéticos derivados de la optimización de caracteres en el cladograma de las especies analizadas en la familia Bothriuridae (Fig. 14).

Carácter	Índice de consistencia	Índice de retención
Angulo cabeza-cuerpo	0,54	0,63
Largo cabeza	0,44	0,42
Área	0,31	0,37
Largo total	0,28	0,42

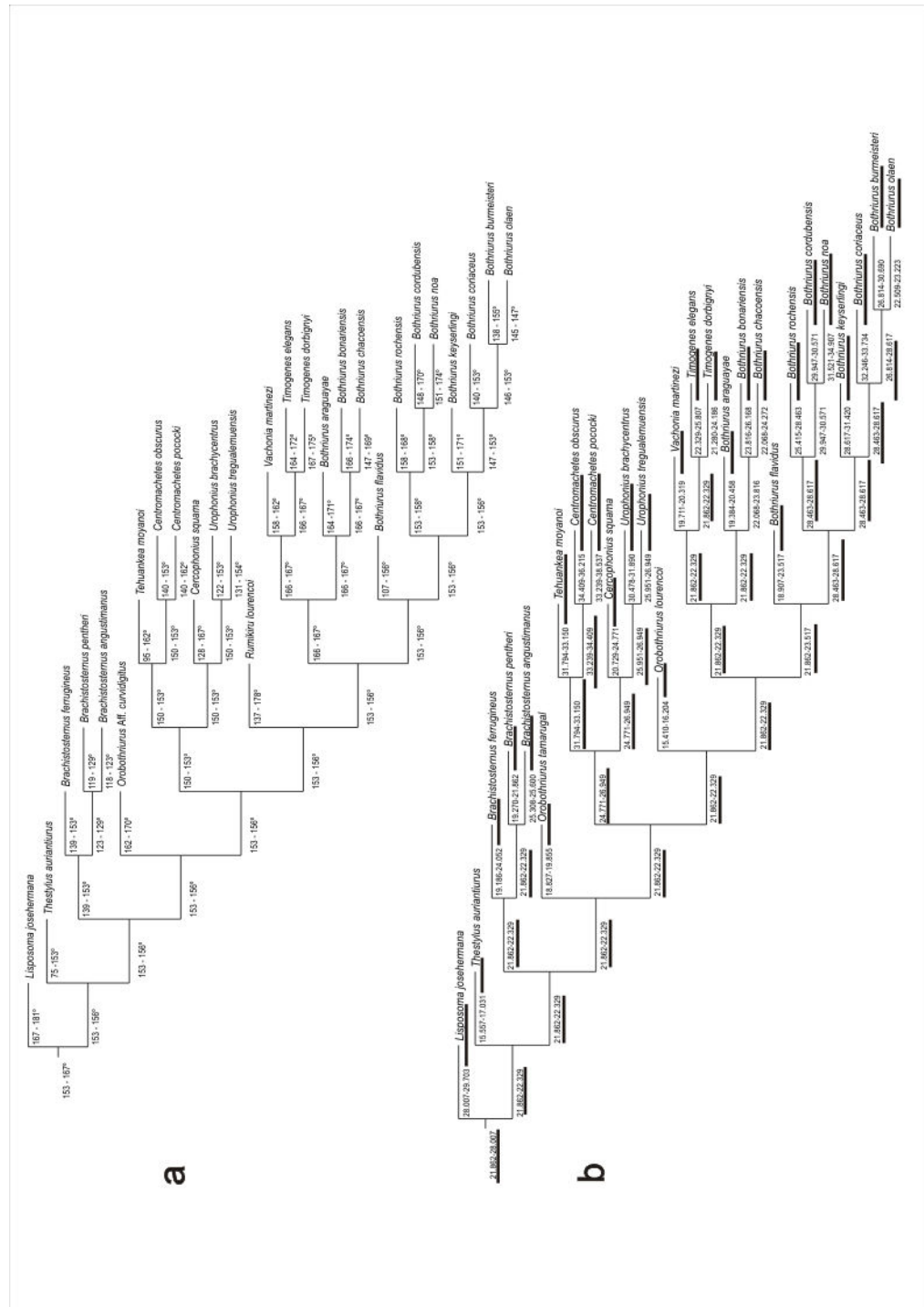


Fig. 15. Optimización de variables en la familia Bothriuridae. a) Angulo entre la zona de los nucleos espermáticos (cabeza del paquete) y la zona del la pieza media y el flagelo de los espermatozoides (cuerpo del paquete). b) Largo de la cabeza del paquete espermático. Las barras negras representan el largo promedio de la rama. Los valores de las ramas denotan los limites inferiores (media – 1 desvío estandar) y superiores (media + 1 desvío estandar) del valor del angulo en grados variables en la familia Bothriuridae.

1.4.1.5 Determinación de la cantidad de espermatozoides por paquete espermático

El análisis de TEM muestra que todos los espermatozoides están alineados unos a otros y que la conjugación de espermatozoides carece de membrana que los rodee, al menos en las especies de Bothriuridae y en la mayoría de las especies analizadas (sin embargo ver Chactidae y Euscorpiidae Fig. 4 b; Fig. 6 d). Las diferentes secciones muestran diferentes características. Un corte por la zona de la cabeza del paquete espermático (sector que se corresponde con la zona de los acrosomas de los espermatozoides) se observa con una tonalidad bien oscura (Fig. 16 a1). En la zona de la pieza media se pueden divisar el arreglo de las mitocondrias y la disposición de los microtúbulos de los espermatozoides (Fig. 16 a2). Se observa claramente que *B. bonariensis* tiene solo dos mitocondrias a los lados del axonema (Fig. 17 a), mientras que el resto de las especies analizadas presentan tres mitocondrias alrededor del axonema (Fig. 17b-e). Finalmente en la zona flagelar sólo se ve la disposición de los microtúbulos (Fig. 16 a1). Los microtúbulos siguen la disposición 9+0, sin par central. Si bien los espermatozoides se encuentran alineados, esa alineación parece no ser perfecta ya que si se toman las zonas terminales como la zona de los núcleos o de los flagelos, el conteo es siempre menor comparado con el conteo en la zona de la pieza media. Esto concuerda con el aspecto ahusado que muestran los paquetes espermáticos en sus extremos. En *Timogenes elegans* los paquetes espermáticos tienen aproximadamente 256 espermatozoides (244 ± 35 espermatozoides, $n = 15$ paquetes espermáticos) (Fig. 16 b). *Brachistosternus ferrugineus* (Fig. 16 c) también mostró valores cercanos a los 256 espermatozoides dentro del paquete espermático (260 ± 25 espermatozoides, $n = 15$ paquetes espermáticos). Analizando la zona de la pieza media, se notó que algunos paquetes de espermatozoides tenían menos cantidad de espermatozoides (ver Capítulo 2). *Bothriurus bonariensis* (Fig. 16 f) fue la especie con menor cantidad de espermatozoides en sus paquetes de espermatozoides de las analizadas, con menos de 100 espermatozoides por paquete (96 ± 16 espermatozoides, $n = 15$ paquetes espermáticos). *Urophonius brachycentrus* (Fig. 16 e) presentó 169 ± 19 espermatozoides por paquete de espermatozoides ($n = 15$ paquetes espermáticos). En la micrografía se notan muy bien las esferas pequeñas que acompañan a los paquetes espermáticos y que son muy visibles en microscopio óptico y electrónico de barrido (Fig. 15 e) y no aparecieron en las otras especies analizadas. La composición de estos gránulos es desconocida, pero podrían ser de naturaleza grasa. Finalmente para

el caso de *Bothriurus rochensis* (Fig. 16 d) no se obtuvieron datos porque si bien la muestra estaba en perfecto estado de conservación las micrografías fueron imposibles de analizar. Puede haber sido un artificio de técnica, ya que en las otras especies la morfología de los paquetes espermáticos se reflejaba muy bien en los cortes para microscopía electrónica de transmisión.

En estos casos analizados se ve que el ancho de los paquetes espermáticos estaría dado por la cantidad de espermatozoides que lo forman, más que por el ancho de los mismos, el cual es bastante uniforme. Comparando los datos de cantidad de espermatozoides con el tamaño del paquete espermático en estas pocas especies, se observa una ligera tendencia, en tres de las cinco especies, a que los paquetes con mayor número de espermatozoides sean un poco más cortos que los que tienen menor cantidad (Tabla 5). No se realizaron análisis estadísticos sobre estos datos debido al bajo número de los mismos.

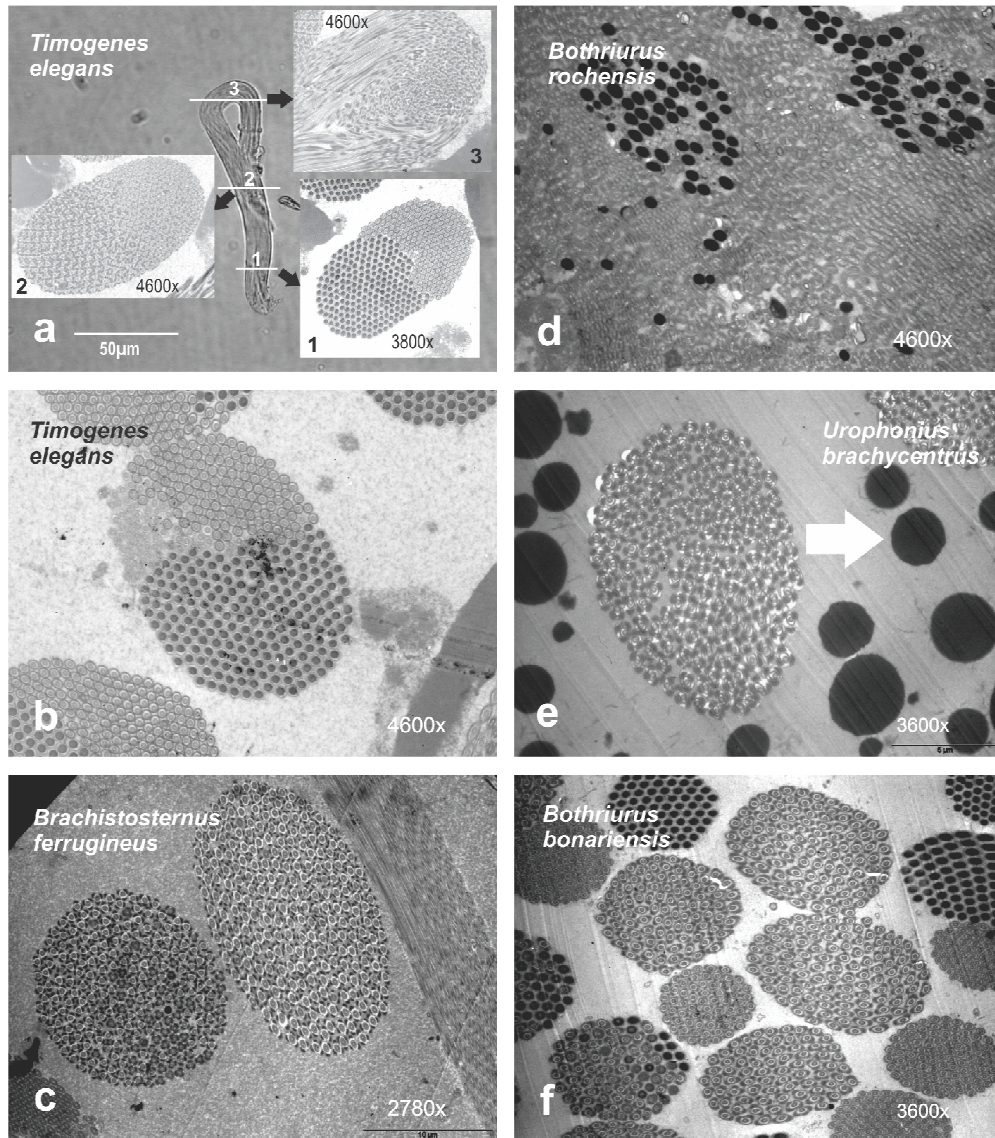


Fig. 16. Micrografías electrónicas de cortes transversales de paquetes espermáticos. a) Composición fotográfica mostrando cortes a diferentes alturas a lo largo del paquete espermático. a1) Corte por la zona de los acrosomas y del axonema del flajelo. a2) Corte por zona de la pieza media, donde se ven las mitocondrias. a3) Corte por la zona donde se dobla el paquete espermático. c-f) Cortes de los paquetes espermáticos a la altura de la pieza media de los espermatozoides. e) La flecha indica una de las esferas que aparecen en los eyaculados en *Urophonius*.

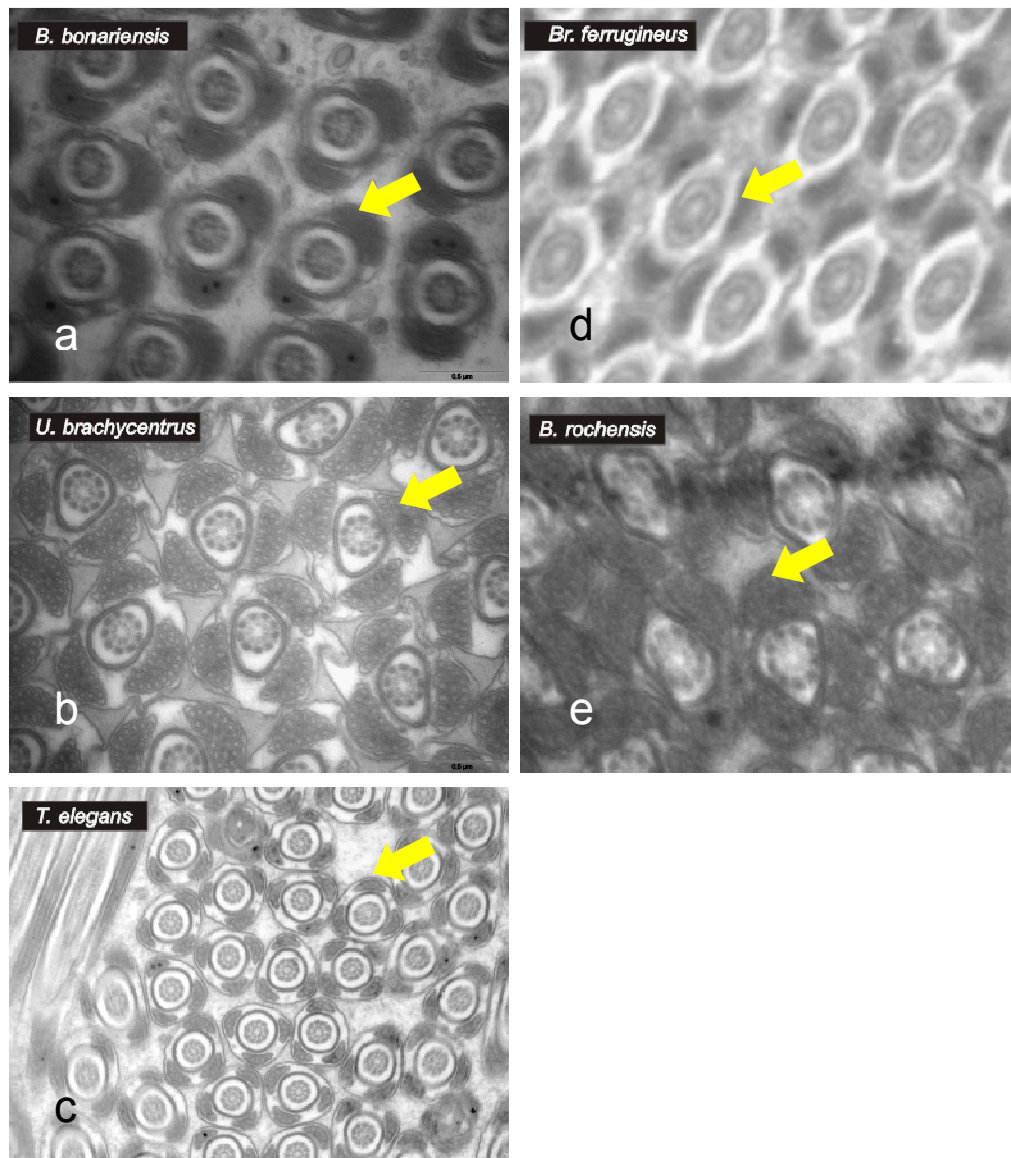


Fig. 17. Detalle de la zona de la pieza media de los espermatozoides que forman un paquete espermático en cinco especies de Bothriuriidae. a) Presencia de dos mitocondrias a los lados del axonema. b-c) Cuatro especies que presentan tres mitocondrias a los lados del axonema. Las flechas en las figuras señalan una de las mitocondrias.

Tabla 5. Valores de número total de espermatozoides y largo total en los paquetes espermáticos de cinco especies de Bothriuridae. No se obtuvieron datos de número de espermatozoides para *B. rochensis*. Se observa una ligera tendencia en las primeras tres especies a tener menor número de espermatozoides y conjuntamente paquetes espermáticos de mayor longitud. *Bothriurus bonariensis* es la excepción mostrando valores similares al largo total de *Br. ferrugineus* pero presentando relativamente poca cantidad de espermatozoides en sus paquetes espermáticos.

Especies	No. Espermatozoides	Largo total
<i>Br. ferrugineus</i>	260 ± 25	233 ± 8
<i>T. elegans</i>	244 ± 35	241 ± 16
<i>U. brachycentrus</i>	169 ± 19	301 ± 9
<i>B. bonariensis</i>	96 ± 16	233 ± 13
<i>B. rochensis</i>	¿?	269 ± 15

1.5 DISCUSIÓN

Esta tesis presenta un análisis que llegó a abarcar casi la totalidad de los géneros descritos hasta el momento en la familia Bothriuridae. También al análisis morfológico descriptivo se le sumó el análisis de ciertas medidas de morfometría clásica que ayudan a comprender mejor las características generales de los paquetes espermáticos en el orden Escorpiones. La optimización de caracteres en la filogenia permitió analizar y describir los patrones morfológicos existentes, así como el grado de ajuste de los caracteres. Con los resultados obtenidos se agrega información nueva e interesante sobre los paquetes espermáticos en escorpiones.

. Se llevó a cabo un muestreo mayor al existente actualmente abarcando 16 de las 17 familias aceptadas hasta el momento en el orden (Prendini y Wheeler, 2005) y 89 especies de 62 géneros. Este hecho no es menor ya que hasta el momento, en total y sin contar con la publicación que surgió como parte de este capítulo (Vrech et al., 2011), se conocían los datos de sólo 15 especies pertenecientes a 7 familias (*Bothriurus bonariensis*, *Bothriurus flavidus*, *Bothriurus cordubensis*, *Brachistosternus ferrugineus*, *Timogenes elegans*, *Urophonius brachycentrus* [Bothriuridae] (Peretti y Battán-Horenstein, 2003); *Buthus occitanus*, *Zabius fuscus* [Buthidae] (Alberti, 1983; Peretti y Battán-Horenstein, 2003); *Euscorpius sicanus* (C. L. Koch, 1837) [Euscorpiidae] (Michalik datos no publicados); *Anuroctonus phaidactylus* (Wood, 1863), *Hadrurus arizonensis* [Luridae] (Jespersen y Hartwick, 1973); *Opisthophtalmus penrithorum* Lamoral, 1979 [Scorpionidae] (Michalik y Mercati, 2009); *Belisarius xambuei* Simon, 1879

[Troglotayosicidae] (Vignoli et al., 2008); *Uroctonus mordax* (Thorell, 1876), *Vaejovis puritanus* [Vaejovidae] (Jespersen y Hartwick, 1973), menos de la mitad de las familias existentes. Siguiendo este enfoque, hasta el momento se habían realizado estudios en solo seis especies pertenecientes a cuatro géneros dentro de Bothriuridae.

El empaquetamiento de esperma estuvo ausente en Buthidae y Chaerilidae. La ausencia de paquetes espermáticos en Buthidae ha sido ampliamente reportada (Peretti y Battán-Horenstein, 2003; Vignoli et al., 2008; Michalik y Mercati, 2010). Los espermatozoides en su estado más basal estarían libres como sucede en Buthidae, Chaerilidae y posiblemente en Pseudochactidae. Luego en algunos grupos de Buthidae se observa un agrupamiento laxo de los espermatozoides generando acúmulos semejantes a los paquetes espermáticos observados en el resto de las familia de “no Buthidae”. Las especies de Buthidae en donde aparecieron estos acúmulos fueron pertenecientes a los géneros *Parabuthus* y *Ananteris*. *Parabuthus granulatus* mostró una organización mucho más parecida a un verdadero paquete espermático comparado con los grandes acúmulos de esperma de *Ananteris arcadioi*. Esta asociación laxa de espermatozoides muy diferente a la presentada por el resto de las familias del orden. Si bien se hicieron réplicas de machos diferentes, estos pertenecían todos a un mismo evento de colecta por lo que no se puede desestimar que estemos ante la presencia de un artificio de técnica debido quizá al modo en el cual fueron conservados los especímenes. Por esto y hasta que no se hagan más análisis con mayor cantidad de grupos relacionados a estas especies, considero que los Buthidae no presentarían paquetes espermáticos, tal como lo sostienen otros investigadores (Peretti y Battán-Horenstein, 2003; Vignoli et al., 2008; Michalik y Mercati, 2010, Vrech et al., 2011). Lamentablemente, no se pudo analizar a la familia Pseudochactidae por la imposibilidad de identificar la vesícula seminal. Esta especie presenta una morfología genital muy reducida, y totalmente diferente a la conocida en el resto del orden (Prendini et al., 2006). La inclusión de esta familia hubiera sido muy importante para poder generar hipótesis de la evolución de los paquetes espermáticos más precisas.

El análisis de la morfología de los paquetes espermáticos en el resto de las familias del orden Scorpiones reveló que si bien existen diferencias notables entre algunas (Vignoli et al., 2008), la mayoría de las familias presentan un tipo común de paquete espermático que se encuentra plegado por la región correspondiente a la zona de la pieza media de los espermatozoides. La presencia de este tipo de paquete espermático en más de una familia ya había sido sugerida por Michalik y

Mercati (2010) con datos en tres familias (Bothriuridae, Troglotayosicidae, Vaejovidae). Vignoli et al (2008) discuten la evolución de la morfología de los paquetes espermáticos en escorpiones, sugiriendo que el estado basal de los espermatozoides es un acumulo laxo, luego se agrupan mejor en paquetes rectos, posteriormente éstos se plegarían una vez y en las formas más derivadas se pliegan más de una vez generando paquetes esféricos. La optimización de la morfología de los paquetes espermáticos demostró que el paquete plegado es en realidad la forma basal en los no Buthidae. Esta característica explica la enorme cantidad de especies que poseen este tipo morfológico. Las otras dos formas básicas son el paquete recto, representado en Iuridae, Superstitionidae y Bothriuridae, y el paquete en forma esférica que resulta del plegamiento sobre sí mismo de un paquete ya plegado que se observa en Chactidae y una especie de Euscorpiidae. La secuencia planteada según los datos obtenidos en este capítulo sería: un cambio en las espermátidas generaría la producción de espermatozoides agrupados en vez de espermatozoides individuales como sucede en Buthidae y Chaerilidae, así el esperma suelto se agruparía y formaría paquetes espermáticos plegados, luego el carácter cambiaría de estado compactándose aún más y generaría un paquete de tipo esférico. En otros clados se desdoblaría y generaría paquetes rectos. Los paquetes de esperma plegados han evolucionado en más de un episodio en los escorpiones: en la base de las familias lameliformes y una vez en el interior de la familia Bothriuridae. Los paquetes rectos han evolucionado al menos tres veces independientemente: en Iuridae y en Bothriuridae y Superstitionidae. Para Bothriuridae la forma recta representaría la forma ancestral de los paquetes de esperma para esta familia. De ésta derivaría la forma en bastón que se disemina por gran parte de la familia. Otras formas, con paquetes enrollados o plegados, se limitan a ciertos clados, y podría ser citado como una sinapomorfía de estos grupos, de hecho el paquete plegado habría tenido una aparición secundaria en Bothriuridae.

Tal vez la amplia presencia de paquetes plegados y/o esféricos se explicaría por la necesidad evolutiva de mejorar la transferencia de esperma de los machos. En escorpiones se ha sugerido que la tendencia a aumentar el empaquetamiento de los espermatozoides haría que los paquetes sean más fácil transferir (Michalik y Mercati, 2010). Por ejemplo, en insectos, la interacción entre los espermatozoides y el tracto masculino favorecería el plegamiento de los agregados de esperma que ellos observan (Mojica y Bruck, 1996, 2003; Joly et al., 2003, 2008). Los autores sugieren que el plegamiento podría facilitar el transporte de largos haces de esperma (*sperm bundles*) a través de los testículos. Esta idea se vería reforzada

por trabajos de Bruck (1978) y Virkki y Bruck (1994). Los resultados morfológicos de este capítulo mostrarían quizá que los paquetes esféricos representan la cúspide del plegamiento en escorpiones, sobre todo con el agregado de una membrana accesoria que recubre a los espermatozoides. Según trabajos previos, los paquetes espermáticos en escorpiones carecerían de cubierta protectora (Vignoli et al., 2008, Michalik y Mercati, 2010). Peretti y Battán-Horenstein (2003) habían sugerido la presencia de una cubierta rodeando a todos los espermatozoides de los paquetes espermáticos. Análisis posteriores, incluyendo el presente capítulo, no apoyaron claramente estas observaciones, al menos en las especies citadas en dicho trabajo. Sin embargo, se observó la aparición de membranas accesorias que cubren los espermatozoides en los paquetes de algunas Familias. Por ejemplo, dentro de Chactidae se detectó la presencia de membrana recubriendo los paquetes espermáticos, así como adicionalmente la existencia de formas esféricas al igual que Euscorpiidae. Complementariamente a mejorar la transferencia espermática la presencia de una membrana le confiere al paquete espermático una protección extra contra agentes nocivos con los cuales puede tener que interactuar durante el apareamiento o bien evitar la pérdida de viabilidad durante la transferencia espermática por pérdida de humedad o factores similares (Peretti, 2010).

El largo total y área fueron las únicas medidas que pudieron ser obtenidas en la mayoría de las especies analizadas. Se puede señalar que las medidas de largo total serían más precisas comparadas con las medidas de área, ya que estas últimas muchas veces están influidas por el estado de fijación del material en las colecciones, contrario a lo que sucede con el largo total. En una escala comparativa se observó una amplia variación del largo del paquete espermático en el orden Scorpiones como así también en la familia Bothriuridae.

Los estadísticos de la filogenia muestran que el carácter cualitativo morfológico se ajusta mejor a la filogenia comparado con los caracteres cualitativos (largo total y área). Por su parte, la optimización del área muestra menor homoplasia pero el largo total es un carácter más informativo desde el punto de vista filogenético.

Dentro de Bothriuridae los índices de consistencia fueron mayores para el largo total y otras variables, lo cual sugiere que para análisis de bajo nivel taxonómico, estos caracteres muestran menor nivel de homoplasia. Por ejemplo, en el género *Bothriurus*, los paquetes espermáticos muestran que pueden ser usados como caracteres morfológicos para la identificación de grupos dentro del género. La morfología de los paquetes espermáticos estaría sugiriendo que *Bothriurus* no es monofilético, tal y como fue sugerido mediante el uso de otros caracteres

(Prendini, 2000, 2003; Mattoni, 2003; Mattoni y Prendini, 2007). La morfología de los paquetes espermáticos permite identificar tres grupos potenciales. El primer grupo consta de las especies incluidas dentro del subgénero *Bothriurus* (*B. araguayae*, *B. bonariensis*, *B. chacoensis*) con paquetes espermáticos rectos y gruesos uniformes en ancho. Otro grupo lo compone *B. bocki*, y *B. inermis* con paquetes plegados similares a los de *Timogenes* y *Vachonia*, que como vimos es el tipo más característico del orden. Finalmente el tercer grupo está compuesto por las especies pertenecientes al subgénero *Andibothriurus* y se caracterizan por contener todos paquetes rectos en forma de bastón. Trabajos preliminares hablan de la ausencia de paquetes de esperma en algunas especies del género *Bothriuridae* (*Bothriurus* pertenecientes al grupo Rochai y *B. asper*) y se especulaba que respondía a una ausencia secundaria del carácter y eran incluidos así en un cuarto grupo dentro de *Bothriurus*. Nuevos análisis sobre estas especies mostraron agregación de esperma en paquetes espermáticos, si bien hubo dificultades para identificarlos. Esto se debería posiblemente al hecho de que los individuos analizados de estos *Bothriurus* quizá no estuvieron bien conservados y por eso los paquetes espermáticos no se preservaron adecuadamente lo que resultó negativamente para la observación y descripción morfológica. Como se advierte y tal y como lo sugieren trabajos recientes (Vignoli et al., 2008; Michalik y Mercati, 2010) la morfología de los paquetes espermáticos es a priori un buen carácter para ser usado en filogenia del grupo.

Los datos de largo total muestran que los paquetes plegados no son necesariamente más largos que los rectos, sugiriendo que el plegamiento es independiente del tamaño total y que paquetes largos no necesariamente deben plegarse para poder ser transportados. Una excepción a este patrón son las familias Urodacidae y Chactidae que presentaron paquetes largos y de morfología plegada. En Chactidae no puede descartarse que pueda haber una sobreestimación por parte del observador del largo total de paquete espermático debido a la complejidad del plegamiento. Los paquetes más largos aparecen entre los grupos con paquetes rectos como Superstitionidae o Iuridae. Siguiendo la idea anterior, en estas últimas dos familias la transferencia de esperma por los ductos no debe presentar un problema como quizá presenta para el resto de las familias que presentan plegamiento o empaquetamiento más compacto.

En la mayoría de los *Bothriuridae* se aprecia un patrón en donde la longitud total del paquete tiende a ser mayor en aquellas especies con caracteres generales evolutivamente más derivados. En las especies con paquetes rectos y largos, tales como *C. keyserlingi* (Iuridae), el largo del espermatozoide quizá está

seleccionado por la selección sexual principalmente debido a competencia espermática. Por ejemplo, las vesículas seminales de los machos y las espermatecas de las hembras (Volschenk et al., 2008) son mucho más grandes que las otras especies del orden, lo cual sugeriría que los machos copularían reiteradas veces dado que el volumen de almacenamiento del espermatóforo en sí mismo es muy pequeño. Adicionalmente, la presencia de paquetes espermáticos de gran tamaño y polimórficos (Ver capítulo siguiente) sugeriría el uso de estrategias relacionadas con un alto riesgo de competencia espermática (Simmons, 2001).

Los análisis de correlación de medidas mostraron que la tendencia en el orden es que exista una correlación entre el largo total y el área del paquete espermático. Sin embargo cuando se realizó el análisis en Bothriuridae se vio que un gran porcentaje de las especies no mostró asociación lineal significativa y los paquetes más largos no necesariamente sean los que tengan mayor área. En cuanto a la proporción existente entre el largo de la cabeza del paquete espermático y el largo total, se vio una gran variación pero el promedio fué de 13%, lo cual es similar a los valores obtenidos en espermatozoides en especies donde se analizan estas variables (Cummins y Woodall, 1985; Malo et al., 2006 [Mamíferos]; Peretti, 2010 [Escorpiones]). Esto estaría sugiriendo que si bien existiría un pequeño desfase en la alineación de los espermatozoides dentro de los paquetes, en éstos las proporciones entre sus regiones seguirían siendo las mismas.

Se sabe en especies de Bothriuridae que los espermatozoides poseen un movimiento que les permite separarse unos de otros cuando entran en contacto con solución salina (Peretti y Battán-Horenstein, 2003, Vrech observación personal), pero hasta el momento no existen indicios de un claro movimiento activo de traslación de los paquetes espermáticos, al menos in vitro, y se piensa que el transporte es de hecho pasivo. Se descarta así que el empaquetamiento sirva para movilizarse por las paredes de los tractos reproductivos como sucede en algunos insectos con sus espermatozoides (Werner y Simmons, 2008) o con los haces de esperma que son similares a los paquetes espermáticos (Robison, 1966; Ross y Robison, 1969; Nur, 2005 [Homoptera, Coccoidea]). Tampoco se tienen indicios de que los espermatozoides cooperen en el nado (Werner y Simmons, 2008; Pitnick et al., 2009).

Según análisis previos en insectos el número final de espermatozoides se obtiene de una serie geométrica de la forma 2^n (Virkki, 1969; Schiff et al., 2001). El número n de esta serie geométrica proviene del número de mitosis premeióticas

que sufre el espermatogonio más dos (Virkki 1969; Phillips, 1970; Sivinski, 1980; Jurečić, 1988; Dias et al., 2013). Los paquetes espermáticos en escorpiones también parecen derivar de un solo espermatogonio y el número de espermatozoides por paquete se puede asociar a un número que provenga de la serie geométrica propuesta por Virkki (1969). Así, *Br. ferrugineus* y *T. elegans* muestran números muy cercanos a 256 lo que estaría indicando aproximadamente seis divisiones mitóticas y dos meioticas en la formación del paquete espermático ($2^8 = 256$). *Bothriurus bonariensis* tuvo valores cercanos a los 128 espermatozoides, número que se formaría de aproximadamente cinco procesos mitóticos y dos meioticos. En *U. brachycentrus* el número de replicaciones celulares resulta ambiguo, pero sugeriría que tienen lugar cerca de seis mitosis más las dos meiosis. Estos valores son en general superiores a los 70 o 100 espermatozoides por paquete citados por Peretti y Battán-Horenstein (2003) para especies de esta familia, pero se encuentran cercanos a los 250 que Michalik y Mercati (2009) citan para especies de Scorpionoidea. En cuanto a las características morfológicas, se corroboró claramente la ausencia de una membrana que recubra externamente a los espermatozoides de estas especies. Sí se observó, sin embargo, una matriz cementante de composición desconocida. Se corroboró también el ordenamiento de los espermatozoides, que se encuentran alineados con los acrosomas juntos en la misma dirección. Si bien la alineación no es perfecta, se puede estimar sin problemas el largo de los espermatozoides utilizando el largo de los paquetes espermáticos (Peretti, 2010). Los pares centrales de microtúbulos se han perdido en el axonema como lo propone Michalik y Mercati (2009). En cuanto a las mitocondrias casi todas las especies presentaron tres mitocondrias lo cual es ligeramente menor a lo citado por Michalik y Mercati (2009), en donde el promedio es de cuatro mitocondrias en la pieza media. La contradicción a ese patrón lo mostró *B. bonariensis* quien solo tuvo dos mitocondrias a los lados del axonema. Este patrón de número de mitocondrias lo coloca con los Buthidae quienes suelen presentar dos mitocondrias (Michalik y Mercati, 2009). Se observa una ligera tendencia a que los paquetes con mayor número de espermatozoides sean más cortos que los que tienen menor número. Esto podría estar ligado a un intercambio directo entre el largo total y la cantidad de espermatozoides (Pitnick, 1996; Oppliger et al., 1998; Gage y Morrow, 2003; Pitnick et al., 2008). Los paquetes espermáticos podrían estar bajo selección sexual y podría existir un *trade-off* entre largo total y el número, teniendo en cuenta las premisas de los modelos clásicos (ej. Parker et al., 2010). En insectos se ha analizado la relación entre el número total de

espermatozoides por paquete y su relación con el grado evolutivo del grupo (White, 1955; Virkki, 1969; Jurečić, 1988; Schiff et al., 2001). Estos análisis muestran que las especies consideradas más primitivas, contienen mayor cantidad de espermatozoides por agregado espermático. Si bien se cuenta con un número muy bajo de especies, en escorpiones se ve un patrón similar en donde las especies más basales tendrían un número mayor de espermatozoides, pero este patrón no se continua en *T. elegans*. Al parecer, en el clado que contiene a *Timogenes* hubo un regreso a la condición “primitiva” representada por *Br. ferrugineus* en nuestro análisis. De todas formas los valores de las especies consideradas ancestrales en insectos son muy superiores a los mostrados aquí en escorpiones. Se necesitaría un análisis con especies que sean más basales desde el punto de vista evolutivo que estas especies de Bothriuridae, hecho que permitiría visualizar un panorama más claro de este interesante patrón.

2 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD MORFOLÓGICA DE PAQUETES ESPERMÁTICOS DENTRO DE UN INDIVIDUO. ¿PODEMOS HABLAR DE HETEROMORFISMO DE PAQUETES ESPERMÁTICOS EN ESCORPIONES?

2.1 INTRODUCCION

En un marco de selección sexual, la competencia espermática puede influenciar diferentes caracteres. En muchos organismos la competencia espermática no solo actúa a nivel de órganos, sino que muchas veces también a nivel de las gametas reproductivas (Birkhead y Møller, 1998). Se observa una variación marcada en cuanto a caracteres como el largo, el heteromorfismo y la agregación de espermatozoides entre diferentes organismos (Jamieson 1987; Simmons y Siva-Jothy, 1998). Si bien el tamaño y la variación morfológica se han estudiado con bastante detalle en espermatozoides, existen menos análisis en cuanto a los agregados de espermatozoides.

Diferentes estudios han mostrado que existe un rango natural de variación de la morfología de los espermatozoides dentro del individuo, (resumido en Calhim et al., 2007), esa variación puede tener una función adaptativa o ser solo causa de un pobre control de calidad y de errores en la espermiogénesis (Cohen, 1967; Hunter y Birkhead, 2002). Entre los ejemplos de diversificación de la morfología de espermatozoides se encuentran los polimorfismos, en donde dos o más tipos diferentes de espermatozoides están contenidos en un solo eyaculado del macho (Swallow y Wilkinson, 2002; Pitnick et al., 2009). En muchos artrópodos y principalmente en insectos existen muchos casos de polimorfismo sobre todo de espermatozoides. Por ejemplo, Sasakawa (2009) describe cuatro tipos diferentes de polimorfismo en insectos proponiendo él mismo un quinto tipo. Las especies muestran espermatozoides con diferentes características que podrían servir para diferentes funciones a la hora de fertilizar. Cuando se habla de heteromorfismo, en general se tiene la idea de diferentes morfotipos que tienen diferentes tareas o persiguen diferentes fines. En algunos artrópodos que poseen conjugación de espermatozoides (agrupación de espermatozoides del mismo tipo) se ha visto también diferentes morfologías dentro de un individuo (Moya et al., 2007). Como vimos, esta tesis y trabajos previos sugieren que los paquetes espermáticos en escorpiones contienen aproximadamente entre 200 y 400 (Jespersen y Hartwick, 1973 [Vaejovidae]), entre 70, 100 (Peretti y Battán-Horenstein, 2003 [Bothriuridae]) y

entre 100 y 200 (Capítulo 1, apartado 1.4.1.4 [Bothriuridae]), 150 (Vignoli et al., 2008 [Troglogayosicidae]) o 250 espermatozoides (Michalik y Mercati, 2009 [Scorpionoidea]). Esto refleja la variabilidad que presentaría normalmente el orden. Sin embargo, análisis preliminares en escorpiones dieron la pauta de que algún tipo de polimorfismo podría existir dentro de un mismo individuo. Habría así dos tipos de polimorfismos, uno que tiene que ver con el grosor del paquete de esperma y otro que tiene que ver con la conformación espacial de los mismos. Estos datos fueron obtenidos en especies de la familia Bothriuridae y en un representante de Iuridae. Puntualmente se desconoce si se trata o no de un verdadero polimorfismo en donde existan dos o más tipos de paquetes en un mismo eyaculado o se trata de variaciones normales en la distribución morfológica de los paquetes a ese nivel. Además, no se sabe con precisión qué sucede en las demás familias en variación en la forma o ancho, así como tampoco se tiene conocimiento si la variabilidad en el ancho de los paquetes se asocia con la cantidad de espermatozoides o con su grosor. Teniendo en cuenta esto, el propósito principal de este capítulo fue evaluar la presencia de polimorfismo tomando a especies de Bothriuridae como modelo. Complementariamente, se planteó también realizar un primer análisis de presencia y caracterización de polimorfismo en otras especies del orden. Para ello se realizó una caracterización del polimorfismo y luego se realizó un seguimiento de la presencia de polimorfismo en el orden. Tomando como modelo algunas especies de la familia Bothriuridae, se realizó un análisis de la cantidad de espermatozoides contenidos dentro de un paquete espermático y por último, se realizó un recuento de paquetes polimórficos almacenados en la vesícula seminal y en el espermatóforo.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 General

Evaluar, analizar y cuantificar la existencia de polimorfismo de paquetes espermáticos en especies de escorpiones.

2.2.2 Específicos.

1. Caracterizar la variabilidad morfológica de los paquetes espermáticos en especies del orden Scorpiones;
2. Estimar el porcentaje de paquetes con variantes morfológicas en vesículas seminales de especies de la familia Bothriuridae;
3. Evaluar el efecto de la temporada de captura y la condición corporal sobre la variabilidad morfológica de los paquetes espermáticos en *Brachistosternus ferrugineus* (Bothriuridae);
4. Analizar la Influencia del número de espermatóforos depositados durante una temporada reproductiva sobre la cantidad de paquetes espermáticos con variantes morfológicas en *Timogenes elegans*.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Especies estudiadas y extracción de material

Se realizó un relevamiento general del orden en todas las especies analizadas previamente en el Capítulo 1. Adicionalmente se analizaron, de una manera más exhaustiva, tres especies pertenecientes a la familia Bothriuridae, a saber: *Bothriurus bonariensis*, *Brachistosternus ferrugineus*, y *Urophonius brachycentrus* y en algunos análisis se sumó una especie de la familia Iuridae *Caraboctonus keyserlingi*. Para *Brachistosternus ferrugineus*, y *Urophonius brachycentrus* (Bothriuridae) se contó con individuos vivos obtenidos de campañas de colecta. *Br. ferrugineus* fueron colectados en la reserva provincial Chancaní y *U. brachycentrus* se colectó al pie de las sierras de la localidad de Tanti, Córdoba, Argentina. *Bothriurus bonariensis* fue obtenido de la colección personal de Paola Olivero depositada en el Laboratorio de Biología Reproductiva y Evolución de la Cátedra de Diversidad Animal I, y para el análisis en *C. keyserlingi* se utilizó material proveniente de las colecciones personales de Camilo Mattoni y Alfredo Peretti también depositadas en el Laboratorio de Biología Reproductiva. Se seleccionaron estas especies por cuestiones de logística y facilidad de muestreo en Bothriuridae y Iuridae.

Los especímenes macho examinados estaban conservados en etanol 80%. Los individuos vivos se colocaban en un recipiente con éter en saturación. Luego los especímenes se trataban igual al resto del material de colección. Para la extracción del material se siguieron los lineamientos expuestos en el capítulo anterior.

2.3.2 Variabilidad de paquetes espermáticos

2.3.2.1 Caracterización de la variabilidad morfológica

Se describieron las variantes que presentaban los paquetes espermáticos en cada una de las especies examinadas. Esta descripción se realizó en base al análisis de fotografías digitales tomadas a paquetes espermáticos dentro del preparado temporal con glicerina. En *Brachistosternus ferrugineus* y *Bothriurus bonariensis* y *Caraboctonus keyserlingi* se tomaron fotografías de 10 paquetes espermáticos al azar en 10 machos diferentes. En las fotografías de microscopía óptica, se midió el ancho de los paquetes espermáticos mediante el uso del software de medición *ImageJ*. Con estos datos se realizó un chequeo estadístico

de la distribución de los anchos con un Test de Normalidad de Shapiro-Wilks y luego se realizó un chequeo gráfico ajustando curvas suavizadas al histograma en las tres especies. También se incorporaron datos de MET para realizar conteos de espermatozoides de paquetes con diferente grosor en *Br. ferrugineus* y *B. bonariensis*. Este análisis se realizó como una primera aproximación para dilucidar si realmente existe dimorfismo en estas especies o se trata sólo de la variación normal de anchos en las muestras.

2.3.2.2 Cuantificación de la concentración vesicular y estimación del porcentaje de paquetes con variantes morfológicas en especies de *Bothriuridae*

Se extrajo el volumen de la vesícula seminal y se diluyó en solución fisiológica. Esta disolución se realizó para las vesículas seminales de cuatro especies de *Bothriuridae*. Las especies elegidas para el recuento fueron *Timogenes elegans*, *Bothriurus bonariensis*, *Urophonius brachycentrus*, y *Brachistosternus ferrugineus*. Se efectuó un conteo de paquetes espermáticos que permitió estimar el número de paquetes que presentaba variantes morfológicas así como su concentración. Los conteos de paquetes espermáticos se realizaron en cámaras de Neubauer del tipo Improved Neubauer (Boeco, Hamburgo, Alemania). Para el conteo se siguió el protocolo de recuento de células grandes en cámara de Neubauer (Bastidas, 2010). Se contabilizaron las células encuadradas dentro de los cuatro cuadrados grandes de las esquinas. El área de cada cuadrante es de 1 mm^2 obteniendo así 4 mm^2 en total, al ser cuatro cuadrantes. La profundidad de la cámara de Neubauer es de 0,1 mm. Multiplicado se obtiene un volumen de $0,4 \text{ mm}^3$ ($1 \text{ mm}^3 = 1 \text{ }\mu\text{l}$) de los cuatro cuadrantes juntos. El número total de células contabilizadas en los cuatro cuadrantes se dividió por el producto de este último volumen multiplicado por la disolución, en caso de haberse realizado una. La ecuación de trabajo utilizada derivada de la explicación previa fue: $[\text{spemtz.}]/\text{ml} = \text{no. células contadas} \times 10000/4 \times \text{factor de dilución}$.

2.3.2.3 Evaluación del efecto de la temporada de captura y la condición corporal sobre el polimorfismo en *Brachistosternus ferrugineus* (*Bothriuridae*)

Se evaluó la influencia de la época de captura dentro de la temporada de apareamiento así como la condición corporal del macho sobre la concentración de paquetes polimórficos en *Br. ferrugineus*. La condición corporal fue reflejada en un índice que combina el largo del cuerpo (largo del prosoma) y el peso corporal. Se

tomó un Índice de masa corporal, similar al utilizado en humanos para medir obesidad, $IMC = PC / (LC)^2$, en donde PC es el peso corporal y LC el largo corporal. Se tomó como modelo *Br. ferrugineus* por su facilidad de colecta, se obtuvieron mediciones de una gran cantidad de machos (N = 23) en épocas diferentes dentro de la temporada reproductiva (Noviembre-Febrero). Con un análisis de regresión de modelo lineal, se evaluó el efecto de la temporada reproductiva sobre la cantidad de paquetes espermáticos con variantes morfológicas. Para este análisis se utilizó el paquete estadístico de código abierto R (R Core Team, 2012).

2.3.2.4 Influencia del número de espermátóforos depositados durante una temporada reproductiva sobre el conteo de paquetes espermáticos con variantes morfológicas en machos de Timogenes elegans

Se capturaron machos en el parque provincial Chancaní durante el mes de enero de 2011 (N = 3) y 2012 (N = 1). Los individuos se acondicionaron en cajas plásticas redondas de 8 cm x 10 cm (Alto x diámetro), con un algodón húmedo como bebedero, siendo alimentados con larvas de *Tenebrio molitor* cada 15 días. Cada apareamiento fue registrado en un terrario de observación de vidrio de 35 cm x 15 cm x 20 cm (largo x ancho x alto), conteniendo sustrato (tierra, piedras y trozos de corteza de árbol) proveniente del sitio de captura. Se colocó a la hembra 30 minutos antes de introducir al macho a los fines de su aclimatación al terrario. Las secuencias de apareamiento (N = 8) fueron interrumpidas inmediatamente después de que el macho depositaba el espermátóforo en el sustrato. De esta manera se obtuvieron espermátóforos en estado pre-inseminación (es decir, no utilizados). El contenido espermático del espermátóforo era extraído manualmente mediante presión directa con una pinza de disección sobre la cara dorsal de la lámina (palanca) del mismo. Esto provocaba presión de la lámina sobre el tronco del espermátóforo, con la consiguiente salida del esperma a través del foramen (abertura), el cual era vertido directamente sobre un portaobjetos. El esperma vertido fue recogido con una micropipeta 1-10 µl (Finnpipet). Seguidamente, se realizó la disolución colocando el volumen total del eyaculado en 100 µl de solución fisiológica y se colocó por capilaridad una alícuota de aproximadamente 12 µl en la cámara de *Neubauer* a los fines de proceder al conteo de los paquetes y sus variantes. Para dar lugar a la regeneración de los hemiespermátóforos dentro de los machos, éstos realizaron su siguiente apareamiento una vez transcurridos entre 7 a 10 días del previo. En total se obtuvieron un total de 8

espermátóforos, provenientes de sus respectivos apareamientos: dos por cada uno de los cuatro machos que pudieron ser analizados en detalle. Cabe señalar, que el número de espermátóforos no pudo incrementarse debido a una baja predisposición sexual de los machos colectados para depositar un segundo espermátóforo. Uno de los individuos analizados, realizó tres eventos de apareamiento pero aquí solo se analizarán dos debido a que hubo problemas con la contabilización de la concentración de paquetes con variantes en este último macho. Los tres apareamientos de este macho serán utilizados en el capítulo siguiente para el análisis de la concentración general de espermatozoides.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Variación morfológica intra-individuo de los paquetes espermáticos

2.4.1.1 Caracterización de la variación morfológica

Los paquetes espermáticos de los machos de al menos 12 especies distribuidas en Bothriuridae, Scorpionidae, Luridae, Liochelidae y Euscorpidae, presentaron variantes en los paquetes espermáticos dentro de la muestra de esperma de un mismo individuo (Fig. 19 a-f y Fig. 20 a-f). Se presentaron dos tipos básicos de diferencias morfológicas. Primero, en los machos de algunas especies aparecieron paquetes espermáticos marcadamente más delgados que los respectivos paquetes de ancho promedio dentro de la muestra de un mismo individuo, las que denominaremos variante de grosor: *Bothriurus bonariensis*, *Brachistosternus ferrugineus*, *Brachistosternus angustimanus*, *Brachistosternus pentheri*, *Bothriurus araguayae*, *Cercophonius squama*, *Urophonius treguemuensis* (Bothriuridae), y *Caraboctonus keyserlingi* (Luridae) (ver Fig. 19 a-f). En *Bothriurus bonariensis* y *Brachistosternus ferrugineus* los paquetes más delgados que los normales mostraron valores por debajo de los 9 μm de ancho en *Br. ferrugineus* y debajo de 6 μm en *B. bonariensis* (Fig. 18). Las medias generales y de paquetes normales no variaron en estas especies (Fig. 18). La distribución de las medidas se aproximó bastante a una distribución normal, (Fig. 21 a-b). Sin embargo cuando se analizó la normalidad de los datos los resultados mostraron que no eran normales en *Br. ferrugineus* (Test de Normalidad de Shapiro-Wilks: $W_{(Br. ferrugineus)} = 0,94$, $p = 0,11$; $W_{(B. bonariensis)} = 0,96$, $p < 0,0039$). Por otro lado, se observó una variación muy marcada en *C. keyserlingi* (Luridae) (Fig.

21 c). En ésta, los paquetes más abundantes fueron grandes, gruesos y acompañados por otros paquetes notablemente más delgados en una proporción 2 a 1 a favor de los paquetes patrón (Fig. 19 e). El ancho de los paquetes finos midió en promedio casi un tercio que el de los paquetes espermáticos de tamaño grande (Fig. 18). Comparativamente, en *C. keyserlingi*, estos paquetes delgados parecen ser más comunes que los respectivos paquetes delgados de *Br. ferrugineus* y *B. bonariensis*. La frecuencia de distribución de los anchos de los paquetes muestra dos picos, es decir una distribución bimodal que dista mucho de ser una distribución normal de los datos (Test de Normalidad Shapiro-Wilks: $W = 0,79$; $p < 0,0001$) (Fig. 21 c). En cuanto a los coeficientes de variación, se observa que estos disminuyen si se excluyen los paquetes delgados. La disminución es muy marcada en *C. keyserlingi* con un descenso de la variabilidad de casi 40% contra descensos de menos del 10% en las otras dos especies (Tabla 6). Los coeficientes de variación en el pool de paquetes finos fueron comparativamente más altos que los de los paquetes normales (Tabla 6).

Por otro lado, el segundo tipo de variante refleja diferencias en el arreglo espacial y número de plegamientos sobre el eje longitudinal de los espermatozoides que componen el paquete espermático. A esta variante la denominaremos de ahora en más variante de arreglo espacial. *Timogenes elegans*, *Timogenes dorbignyi*, *Vachonia martinezi*, *Bothriurus bocki*, y *Bothriurus Inermis Cercophonius squama* (Bothriuridae) *Scorpio maurus* (Scorpionidae), *Liocheles aff. waigiensis* (Liochelidae) y *Euscorpius flavicaudis* (Euscorpiidae) presentaron diferencias en el número de pliegues o conformación espacial en las muestras intra-específicas analizadas. Aparecieron tres casos diferentes: en el primero, las especies tenían paquetes “dobladados” en la zona de la pieza media de los espermatozoides resultando la variante patrón (ej. Fig. 20 a-b). En las mismas muestras aparecían en menor medida paquetes espermáticos con forma recta en donde desaparece el pliegue en la zona media (Fig. 20 b). Este caso se presenta en bajos números (menor a 1:100) en las especies de *Timogenes* y en *V. martinezi*. Otra variante que frecuentemente acompaña a la variante patrón, es el paquete “en forma de anillo” que es más común en las muestras de los machos de *B. bocki* (Fig. 20 a) y *L. aff. waigiensis* (Fig. 7 d) que en las muestras de los machos de las otras especies que muestran dicha variante. De hecho en las dos especies citadas el patrón está representado por los paquetes en forma de anillo. Por último, también asociados a la variante patrón aparecen “paquetes esféricos”, consecuencia de un nivel de plegamiento mayor que el que ocurre en los paquetes plegados (ej. ver Fig. 4). En *C. squama* aparecen paquetes de la variante patrón (plegados) y la

variante rectos en las muestras de un macho (Fig. 20 f). Dentro de la variante recta, aparecieron algunos con variante de grosor, mostrando paquetes más delgados que el ancho promedio. A diferencia de los paquetes plegados de *Timogenes*, que presentan un ancho muy uniforme a lo largo de toda su estructura, *C. squama* presenta paquetes que se van adelgazando abruptamente hacia la zona distal del paquete espermático, lugar donde se encuentran los flagelos de los espermatozoides que lo componen (Fig. 11 h). Por otro lado, más raramente en algunas muestras (Fig. 20 e) aparecieron paquetes con variante de arreglo espacial (variante plegados) en especies que no los presentaban habitualmente, tal es el caso de *U. brachycentrus*. Esto sucedió en tres muestras colectadas en esta especie durante el final de la temporada reproductiva.

Tabla 6. Valores de coeficientes de variación de paquetes patrón (promedio) y variante (delgado) y del total (agrupando ambos), en tres especies de escorpiones seleccionadas.

Coef. Variación	<i>Br. ferrugineus</i>	<i>B. bonariensis</i>	<i>C. keyserlingi</i>
Normal (promedio)	14%	11%	10%
Variante (delgado)	24%	20%	25%
Total	20%	19%	53%

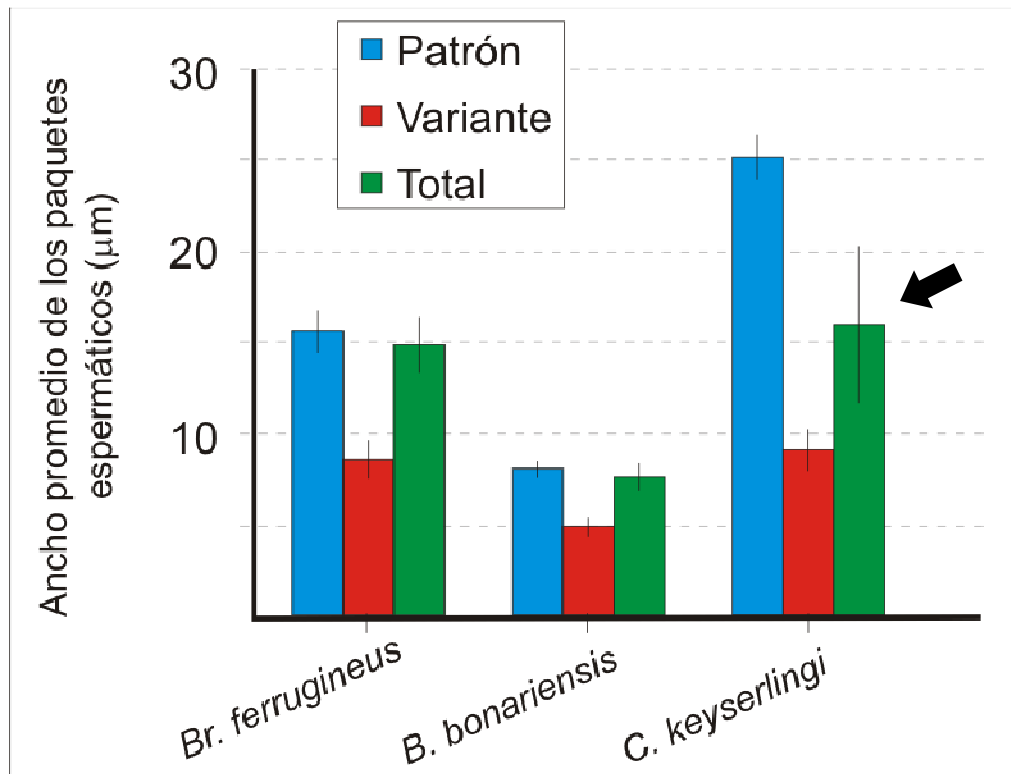


Fig. 18. Valores de ancho promedio de paquetes espermáticos de tipo patrón (el valor promedio normal y más abundante), variante (en este caso paquete notablemente mas delgado al patrón), y el ancho promedio del total que considera ambos tipos (patrón y variante). Nótese que el ancho total no varía considerablemente en las dos primeras especies pertenecientes a la familia Bothriuridae, mientras que la variación es considerable en *C. keyserlingi* (Iuridae) (flecha). Las líneas sobre las barras representan el desvío estándar.

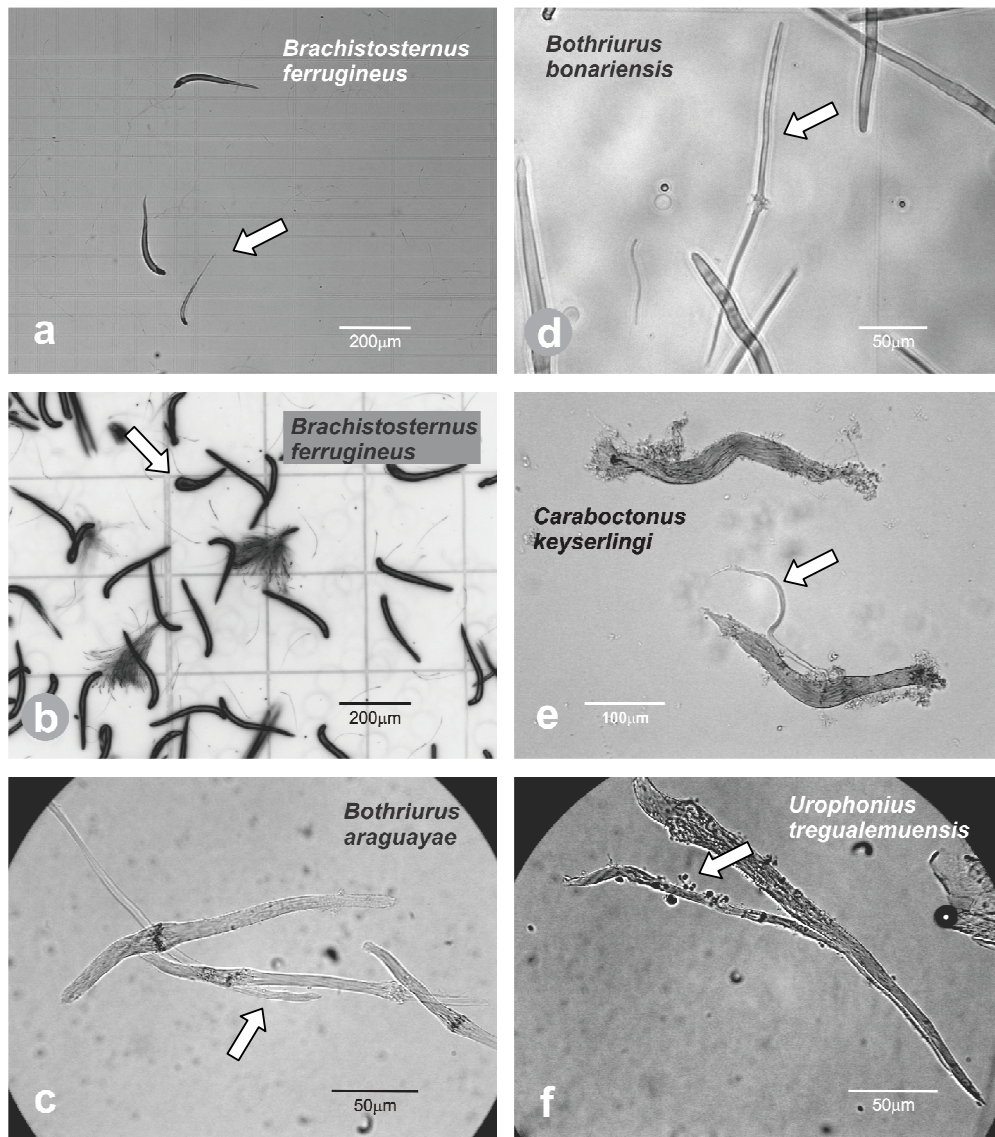


Fig. 19. Variación morfológica en el ancho de los paquetes espermáticos en diferentes especies de Bothriuridae y una especie de la Familia Luridae (e). Con flechas se señalan las variantes morfológicas.

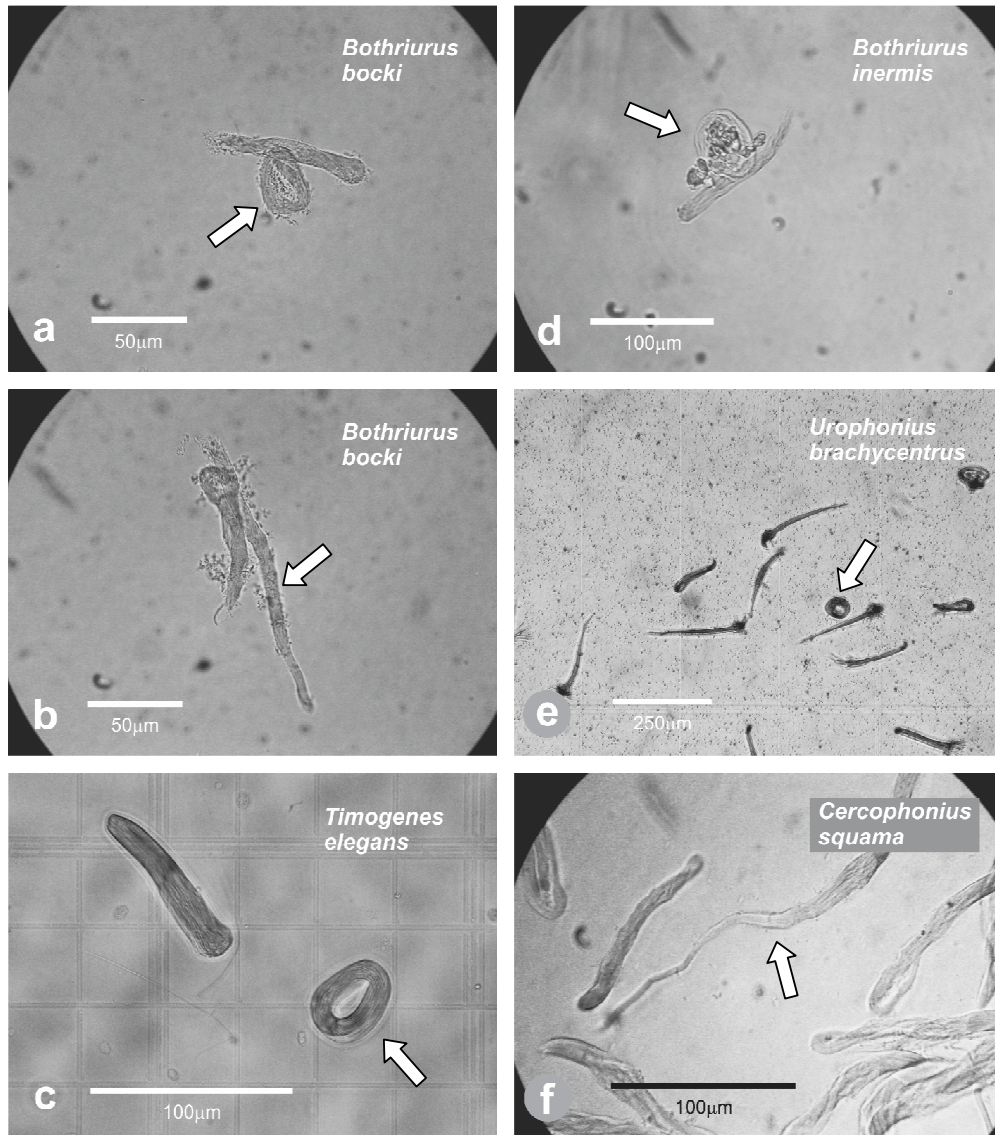


Fig. 20. Variación morfológica en el grado de plegamiento en diferentes especies de la Familia Bothriuridae.

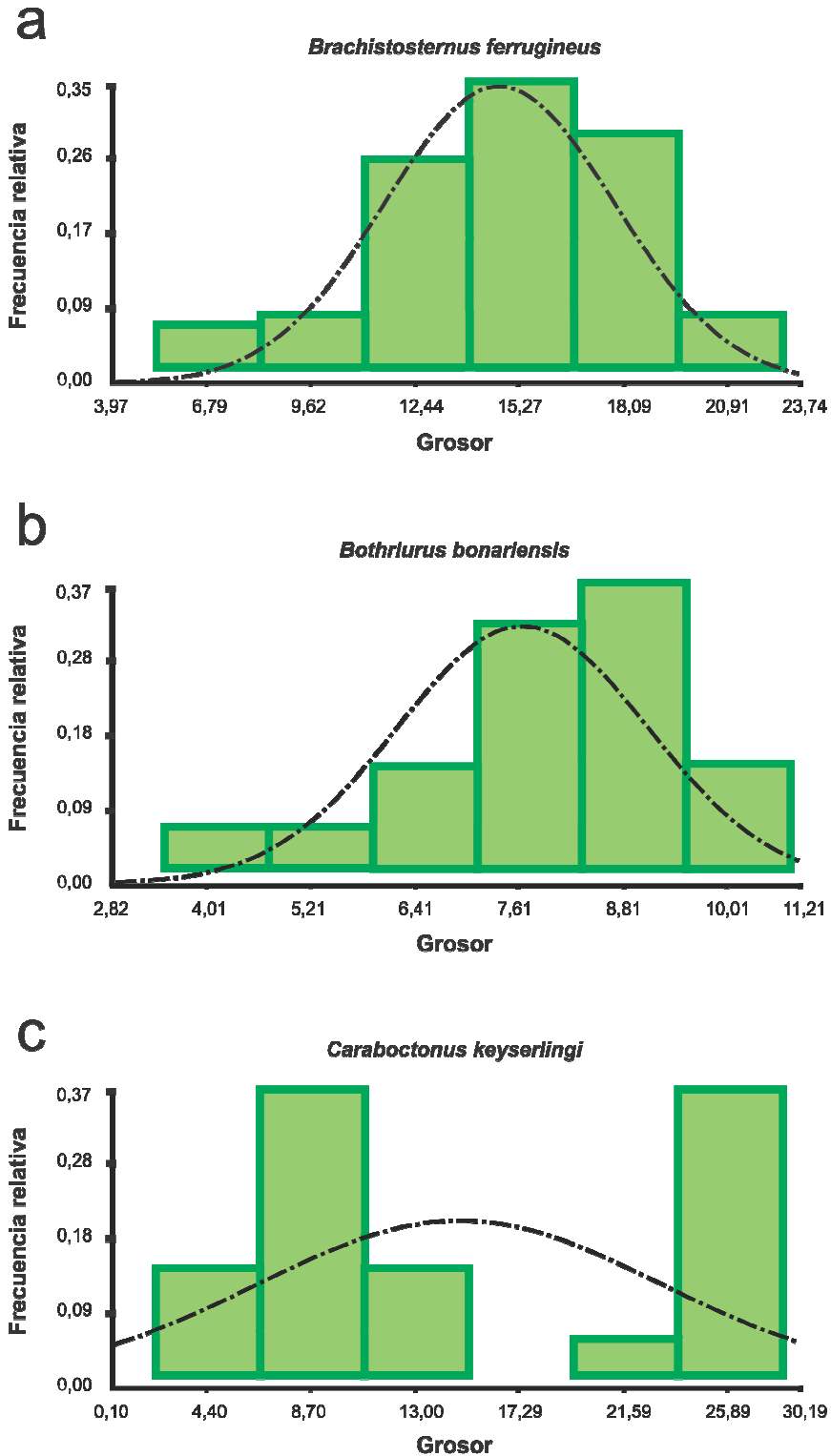


Fig. 21. Distribución del ancho de los paquetes espermáticos en tres especies del orden Scorpiones. a) *Brachistosternus ferrugineus* (distribución Normal); b) *Bothriurus bonariensis* (distribución no normal, solo levemente sesgada a la derecha); c) *Charaboctonus keyserlingi* (distribución bimodal).

2.4.2 Cuantificación de la concentración vesicular y estimación del porcentaje de paquetes espermáticos con variantes morfológicas en especies de la familia Bothriuridae

En la Tabla 7 se resumen los valores y el porcentaje de variante intra-específicas encontradas entre los paquetes espermáticos de las especies analizadas, destacándose los grandes desvíos estándar registrados que presentan. Comparando entre las especies que poseen variante de grosor, *Br. ferrugineus* presentó menor cantidad promedio de paquetes con dicha variante en los eyaculados, en relación a *B. bonariensis*. Sin embargo se observa que el porcentaje promedio de paquetes finos es ligeramente mayor en *Br. ferrugineus* que en *B. bonariensis* (Tabla 7). La frecuencia de la aparición de estos dos tipos de paquetes en *B. ferrugineus* fue del 42% (8/19 individuos) y del 36% en *Bothriurus bonariensis* (4/11 individuos). El conteo de paquetes delgados en los machos de *Br. ferrugineus* que presentaron este tipo de variante fue de 5625 (N = 8). Si se considera que el promedio total de paquetes delgados en el total de machos (n = 19) fue de 2368 paquetes, surge que hubo ausencia de dicha variante en 11 machos. En resumen, los 2368 paquetes espermáticos delgados representan solo el 2,47% del promedio total de paquetes espermáticos de *Br. ferrugineus* (n = 19). Sin embargo, si solo se contabilizan los 8 machos en donde se encontraron paquetes finos, este porcentaje aumenta al 10%.

El análisis en TEM llevado a cabo en *Br. ferrugineus* muestra que en la variante de grosor, los paquetes más delgados cuentan con menor cantidad de espermatozoides y no con espermatozoides de menor diámetro (Fig. 22). Mientras que en general los paquetes espermáticos poseen aproximadamente 256 espermatozoides en *Br. ferrugineus* y 128 en *B. bonariensis* (ver capítulo anterior), los paquetes más delgados tuvieron, respectivamente, 186 ± 10 espermatozoides (N = 9 paquetes espermáticos de un macho) y 84 ± 8 espermatozoides (N = 10 paquetes proviniendo de un macho).

En cuanto a las especies que mostraron variante de arreglo espacial, *T. elegans* presentó mayor cantidad de paquetes circulares que su especie cogenérica *T. dorbignyi* (Tabla 7). De los machos analizados, el 62% (8/13) presentó paquetes circulares en *T. elegans*, en tanto el 33% (1/3) en *T. dorbignyi*.

Tabla 7. Conteo de paquetes total y conteo de paquetes con variantes morfológicas. Se reporta también el porcentaje de paquetes variante morfológica contabilizados en el conteo de cada especie.

Especie	Cantidad de paquetes total ($\times 10^4$)	Cantidad de paquetes con variante morfológica ($\times 10^4$)	% paquetes con variante morfológica
<i>Brachistosternus ferrugineus</i>	9,60 \pm 7,29	0,24 \pm 0,33	2,50
<i>Bothriurus bonariensis</i>	93,36 \pm 59,94	1,57 \pm 3,19	1,68
<i>Timogenes elegans</i>	46,48 \pm 39,84	3,88 \pm 8,67	8,35
<i>Timogenes dorbignyi</i>	4,59 \pm 3,17	0,08 \pm 0,14	1,74

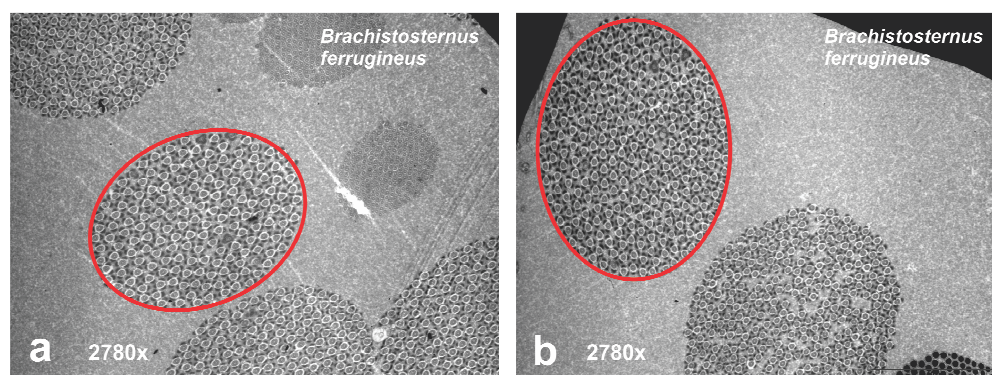


Fig. 22. Variante en grosor en un macho de *Brachistosternus ferrugineus*. Aquí se observa la variabilidad en el número de espermatozoides que puede existir.

2.4.3 Evaluación del efecto de la temporada de captura y condición corporal sobre el polimorfismo de *Brachistosternus ferrugineus*

Existe efecto de la temporada de captura sobre el nivel de polimorfismo en los machos de *Br. ferrugineus* (Anova, $F_{(2,20)} = 6,07$, $p = 0,01$). El test *PosHoc* de Tukey mostró que, de los tres meses muestreados, el polimorfismo fue mayor en noviembre que en enero y febrero (Fig. 23). En noviembre el 67% de los machos analizados (6/9 individuos) presentaron paquetes delgados. En enero ese porcentaje se redujo a un 14% de los machos (1/7), en tanto que en febrero no se observaron paquetes delgados. El efecto de la condición del macho sobre la concentración de paquetes espermáticos con variante de grosor no fue estadísticamente significativa ($F_{(1,21)} = 1,10$, $p = 0,30$).

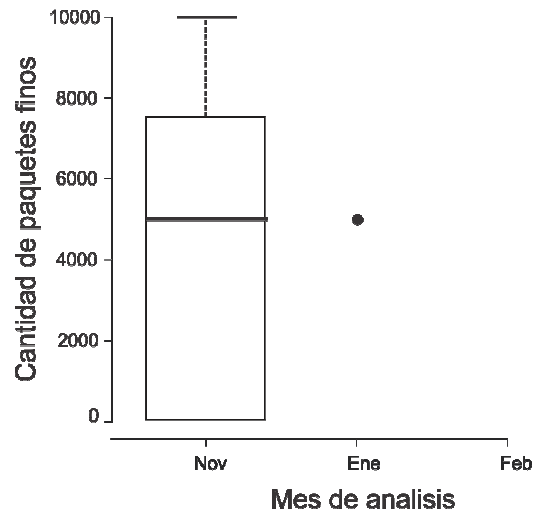


Fig. 23. Gráfico de cajas que muestra la incidencia de paquetes finos en diferentes meses de colecta en *Brachistosternus ferrugineus*.

2.4.4 Influencia de apareamientos sucesivos sobre la producción de paquetes espermáticos con variante en el arreglo espacial en *Timogenes elegans*

En dos de los machos analizados, la concentración de paquetes con variante de arreglo espacial (forma de anillo) aumentó en el segundo apareamiento. En efecto, en el primer espermatóforo no se observaron paquetes polimórficos, mientras que en el segundo, se contaron 5000 paquetes polimórficos en uno de los machos y 2500 en el otro. El tercer macho tuvo un número similar de paquetes con forma de anillo entre los dos espermatóforos (Tabla 8). En el macho restante, no aparecieron paquetes polimórficos en su segundo espermatóforo (Tabla 8).

Tabla 8. Conteo de espermatozoides con variación en el arreglo espacial en el espermatóforo de especies de *Timogenes elegans* con sucesivos apareamientos.

Macho	Apareamiento	Concentración paquetes	Concentracion
		polimórficos (finos)	Paquetes patrón
<i>T. elegans</i> m01	Apareamiento 1	0	5.600.000
	Apareamiento 2	2500	9500
<i>T. elegans</i> m05	Apareamiento 1	7500	17.492.500
	Apareamiento 2	7500	32.492.500
<i>T. elegans</i> m06	Apareamiento 1	0	9.400.000
	Apareamiento 2	5000	26.295.000
<i>T. elegans</i> m09	Apareamiento 1	2500	5.597.500
	Apareamiento 2	0	4.700.000

2.5 DISCUSION

Se encontraron variantes a los tipos patrones de paquetes espermáticos que presenta cada especie. Se sabe que los paquetes espermáticos sacados de diferentes lugares de la vesícula seminal siempre muestran la misma morfología (Mattoni, 2003), descartándose así la posibilidad de un cambio de forma debido al movimiento del espermatozoide en la parte final del tracto reproductivo masculino. Aparecieron dos grandes variantes, una que afectaba el grosor del paquete espermático y otra que afectaba la conformación espacial del mismo. Estas variantes coexisten con las variantes patrón en el eyaculado y en las vesículas seminales de un mismo macho, una coexistencia intra-macho.

2.5.1 Ausencia de polimorfismo propiamente dicho en Bothriuridae

Los resultados obtenidos en Bothriuridae no dan un fuerte soporte a la idea de la existencia de verdadero polimorfismo en los paquetes espermáticos de los machos de estas especies, al menos tal como se ha reportado en otros artrópodos (ej. Joly y Lachaise, 1994 [*Drosophila*] o Sasakawa, 2009 [*Bombix mori*]). En efecto, en la frecuencia de distribución de las variantes de paquetes no se detectan picos marcados que podrían definirlos claramente como un polimorfismo. En otras palabras, se tratan de variantes reconocibles pero que se encuadran dentro de los rangos de los paquetes normales de la especie. Además, los paquetes con variante de grosor y con variante en arreglo espacial fueron muy poco comunes (no más del 10%). De hecho los valores de variabilidad no cambian considerablemente cuando se incorporan o se excluyen dichas variantes. Existen, sin embargo, especies de insectos en donde la producción de paquetes con una variante dada (particularmente parasperma) muestre una baja proporción, por debajo incluso del 10% (ej. Swallow y Wilkinson, 2002 [Diptera y Lepidoptera]). Más allá de la carencia de un polimorfismo definido, aparecieron variaciones interesantes en grosor y forma general de los paquetes en el eyaculado de un mismo macho, es decir variabilidad de tipo intra-individual. Dentro de Bothriuridae, los paquetes espermáticos con diferencias en el plegamiento (variantes en el arreglo espacial) fueron observados en el eyaculado de un mismo macho en varios miembros de *Bothriurus*. Es interesante destacar que las especies de *Bothriurus* pertenecientes al grupo *bonariensis* (*B. bonariensis* y *B. chacoensis*), así como *B. araguayae*, especie muy relacionada, no muestran este tipo de variaciones. Sí se han detectado paquetes con variantes en grosor en estas especies. Por el contrario, las especies de *Bothriurus* del subgénero

Andibothriurus no mostraron variantes intra-individuales. A partir de los resultados del capítulo anterior, ahora se pudo analizar mejor el cambio en las formas dentro de un macho. Por ejemplo, los paquetes esféricos observados en el semen de machos de algunas especies de Euscorpidae y Scorpionidae, provendrían de paquetes plegados, que se pliegan más veces sobre sí mismos. Un pliegue genera un paquete plegado al medio y dos o más genera un paquete esférico. En estas especies el patrón sería el plegado, mientras que la variante del paquete patrón sería un paquete esférico (plegados múltiples veces). Esto sería explicado según los datos de filogenia que sugieren que la forma inicial fue la plegada que luego derivó en las otras formas dentro de ellas la forma esférica en donde se pliega sobre sí mismo y se compacta más. Lo mismo ocurriría en el caso en donde aparecen paquetes rectos. Estos derivarían de un enderezamiento de un paquete plegado simple. Futuros trabajos podrían examinar si estas formas tendrían una función adaptativa o se trata simplemente de teratologías en el eyaculado de un macho. A la fecha, no se tiene una explicación satisfactoria sobre la modificación que deberían sufrir los paquetes plegados para llegar a generar paquetes circulares o si derivan directamente de paquetes de plegado simple ya formados.

Las variaciones en el ancho del paquete de *Br. ferrugineus* y *B. bonariensis* podrían ser el resultado de un número menor de mitosis en las células productoras de esperma, generándose así menor número de espermatozoides, tal como fue observado en insectos (Virkki, 1969). También se ha observado en paquetes rectos, la activación prematura de algunos espermatozoides dentro del macho, lo que produce que estos haces de espermatozoides se separen de los paquetes espermáticos. Esta variación también podría estar originada en fallas de tipo teratológico, debidas por ejemplo a errores durante la formación de los paquetes espermáticos dentro de los testículos (ej., deficiencias en la nutrición o problemas endógenos). La idea del origen teratológico de los paquetes con variantes morfológicas, se vería reforzada por los datos que sugieren una influencia de la temporada reproductiva sobre su frecuencia de aparición. Los resultados en *Br. ferrugineus* mostraron un mayor número de paquetes espermáticos delgados al principio de la temporada reproductiva. Esto podría indicar algún tipo de teratología asociada al gran esfuerzo masculino en generar mucha cantidad de espermatozoides al inicio de la temporada, momento en el que las hembras son aún vírgenes y existiría mucha competencia entre machos para inseminar el mayor número (Peretti y Carrera, 2005; Peretti, 2010). Estudios de teratospermia de espermatozoides en vertebrados han sugerido, por el contrario,

que el mayor número de malformaciones o falencias aparecerían durante la época no reproductiva (ej. Brun y Rumppler, 1990). Podría entonces argumentarse, alternativamente, que lo observado en escorpiones resulta de una teratoespermia a nivel de paquetes ocurrida durante el invierno pero que se manifiesta a nivel del eyaculado al inicio de la temporada sexual. De cualquier manera, los paquetes delgados observados en *Br. ferrugineus* podrían tener una desventaja desde el punto de vista de la competencia espermática. No en cuanto a la propulsión dentro del tracto reproductivo de la hembra como sucede en otros artrópodos, (Mackie y Walker, 1974; Sivinski, 1980; Pizzari y Foster, 2008; Higginson y Pitnick, 2011), sino más bien por la cantidad de esperma transferido que sería menor a medida que aumentara la concentración de paquetes espermáticos finos en los eyaculados de un macho. De todos modos, y contradiciendo un poco la hipótesis anterior, se puede tomar a este fenómeno de mayor concentración de paquetes finos como una estrategia que podrían adoptar algunos machos. Así, hipotéticamente, los machos que puedan generar paquetes espermáticos rápidamente a costa de incluir menor cantidad de espermatozoides, para adelantarse a buscar hembras en la temporada reproductiva, tendrían una ventaja sobre los machos que esperen a generar paquetes con una cantidad normal promedio de espermatozoides. Estos machos que pueden adelantarse en la temporada reproductiva, tendrían más chances de llevarse una mayor cantidad de progenie. Será muy interesante llevar a cabo en el estudio sobre la frecuencia de ocurrencia de variantes de paquetes a lo largo de todo el año a los fines de definir mejor la factibilidad de estas explicaciones.

En cuanto a la aparición de variantes de paquetes en sucesivos espermátóforos depositados por un mismo macho, los resultados encontrados no son concluyentes. No se descarta, sin embargo, que esto se deba al bajo número de machos que llegaron a depositar un segundo espermátóforo y, por ende, no pudo alcanzarse un tamaño de muestra apreciable.

2.5.2 Posible presencia de polimorfismo real en *Caraboctonus keyserlingi* (Iuridae)

A diferencia de lo que ocurrió con *Br. ferrugineus* y *B. bonariensis* (Bothriuridae), en el Iuridae *C. keyserlingi* aparecen dos variantes que podrían ser interpretadas como dimórficas. En efecto, en esta especie se observa claramente una variante visiblemente gruesa, así como otra marcadamente delgada. Futuros estudios podrían explorar si esta variación en los paquetes espermáticos es parte de una

estrategia para la competencia espermática, tal como se ha sugerido en algunos insectos con situaciones similares (ej. Wigby y Chapman, 2004; Takami y Sota, 2007 [Escarabajos]). De todas formas no se puede precisar mejor la estrategia puntual, ya que no se sabe como se comportan los paquetes espermáticos *in vivo*. En el caso de *C. keyserlingi*, así como otros *Luridae*, los machos en general poseen vesículas muy grandes y tienen paquetes espermáticos largos. Ambos caracteres, junto con la presencia de paquetes dimórficos, tal vez estén reflejando entre la existencia entre los machos de un apreciable riesgo de competencia espermática.

En este sentido, el polimorfismo o las diferencias en formas se han citado principalmente en los espermatozoides (ej. Swallow y Wilkinson, 2002; Wigby y Chapman, 2004; Holman y Snook, 2006; Moya et al, 2007), pero existen referencias para paquetes de esperma en donde ambos morfotipos contienen espermatozoides fértiles (eusperma-eusperma) (ej. Joly y Lachaise, 1994; Snook 1998; Takami y Sota, 2007). El polimorfismo de esperma se piensa que está bajo control de la selección sexual a través de la competencia espermática sobre todo en especies con morfotipos que tienen diferentes tipos de espermatozoides (Snook, 1998; Holman et al., 2006; Birkhead et al., 2009; Higginson y Pitnick, 2011). La competencia espermática en los machos puede producir tipos adicionales de esperma que pueden ayudar al esperma viable de diferentes maneras para alcanzar y fertilizar un set de óvulos (ej. Wigby y Chapman, 2004).

Se necesitan en el futuro más análisis sobre la biología reproductiva de ciertos grupos para poder tener una visión más global de la posible influencia de la competencia espermática sobre las variables morfológicas generales, así como también sobre la posible aparición de paquetes polimórficos en especies con un alto riesgo de competencia espermática.

SECCIÓN B: VARIABLES DE PRODUCCIÓN ESPERMÁTICA

Los animales con reproducción sexual, transfieren sus gametas en una secuencia que involucra los siguientes pasos: producción, almacenamiento y transferencia (Davey, 1985; de-Wilde y de-Loof, 1973; Wedell y Hosken, 2010). Los testículos, que en general son pares, se encargan de producir los espermatozoides por medio de la espermatogénesis (Franzén, 1956). Los espermatozoides en muchos grupos animales, incluidos los artrópodos, se almacenan temporalmente en reservorios masculinos comúnmente llamados vesículas seminales (Chapman, 1998). En general pueden ser órganos bien definidos o solo ensanchamientos de los vasos deferentes. Finalmente, y en algunos casos luego de un proceso de maduración y selección de gametas, los espermatozoides son transferidos al tracto reproductivo femenino (Chapman, 1998). En artrópodos, este proceso se puede dar de forma directa mediante el uso de un pene u órgano intromitente o de forma indirecta mediante el uso de un espermatóforo, estructura generada por el macho, (Proctor, 1998; Wedell y Hosken, 2010). En la hembra el esperma se puede almacenar temporalmente en el atrio genital o directamente ser transportado a los receptáculos seminales, órganos encargados del almacenamiento de esperma hasta el momento de la fertilización. En general las hembras poliándricas poseen algún tipo de almacenamiento espermático que interviene en la selección sexual poscopulatoria (Keller y Reeve, 1995; Eberhard, 1996; Birkhead y Møller, 1998). Según el grupo animal se puede producir una progenie por ovoviviparidad o viviparidad (Blackburn, 1999).

En general los testículos en vertebrados superiores se encargan de producir no sólo esperma, sino también otras sustancias, tales como hormonas. En artrópodos, esto es diferente ya que los testículos producen solo esperma (Chapman, 1998). El testículo es una estructura que varía mucho en cuanto a tamaño y morfología en diferentes grupos animales y ésta variación está mediada por diversos factores, dentro de los que se encuentran la selección sexual (Simmons, 2001; Wedell y Hosken, 2010). La selección sexual es un mecanismo que influye directamente en el desarrollo de caracteres sexuales masculinos como por ejemplo la morfología de la genitalia y órganos sexuales, glándulas accesorias y hasta caracteres de la historia de vida del organismo (Parker, 1970; Short 1979; Eberhard, 1985; Birkhead y Møller, 1998; Simmons, 2001). Las vesículas

seminales como los testículos estarían también bajo la influencia de la selección sexual (Dixson, 1998), que en muchos casos resulta en la aparición de una gran variedad de morfologías y tamaños (ej. Dixson, 1998 [Primates]; Stockwell, 1989 [Scorpiones]; Chowdhury y Joy, 2007 [Teleósteros]) y diversidad en las secreciones seminales (ej. Simmons, 2001 [Insectos]; Herberstein et al., 2011 [Arañas]).

Los espermátóforos no son ajenos a la influencia de la selección sexual, y de hecho han sido objeto de estudios en varios artrópodos, en particular insectos y arácnidos (Thomas y Zeh, 1984; Peretti, 2003; Wedell y Hosken, 2010). Las características del eyaculado (ej. su volumen) reflejan el nivel de competencia espermática presente en la población. Si bien el modelo de “lotería” (Martin et al., 1974; Martin y Dziuk, 1977; Parker y Simmons, 1991) de competencia espermática sugiere que los machos deberán destinar mucho espermatozoos en los apareamientos (Parker, 1990), se sabe que la producción de eyaculados es algo costoso (Dewsbury, 1982; Nakatsuru y Kramer, 1982; Olsson et al., 1997) por lo que los machos deben labrar estrategias para la producción de los mismos (Engqvist y Reinhold, 2007).

Dentro de los artrópodos, en los arácnidos existen pocos trabajos que se hayan enfocado en el análisis del tamaño de los testículos y vesículas seminales desde una perspectiva de competencia espermática. Las arañas presentan, en general, precedencia de espermatozoos, debido al diseño del tracto reproductivo femenino (Elgar, 1998). Esta característica, sumada a la corta vida de los machos adultos luego de la cópula, favorecería otras estrategias en ellos. Estas estrategias son diferentes a la producción de una gran cantidad de espermatozoos (vinculada a la competencia en un modelo de “lotería”), e incluyen el cuidado de la pareja por combate físico, la reducción de la atractividad o receptividad femenina, el ajuste de la duración de la cópula y por último el infanticidio (Elgar, 1998; Modanu et al., 2013). Estas estrategias están enfocadas en la remoción de espermatozoos y en la precedencia de espermatozoos, más que en el aumento del número de espermatozoos, como también lo sugieren Helberstein et al., (2011). El análisis de los testículos estuvo enfocado a la descripción general del aparato reproductivo (Burger y Michalik, 2010; Michalik y Lipke, 2013), o a la descripción del fenómeno de vaciamiento de espermatozoos permanente que ocurre en ciertos grupos (Michalik y Ritchsoff, 2011; Modanu et al., 2013).

En este marco, en la presente sección se lleva a cabo una aproximación al estudio de la producción espermática en escorpiones, siendo el primer intento para el grupo a nivel mundial. Cabe destacar que el término producción

espermática se emplea en un sentido completo, es decir abarcando no solo la producción testicular sino también lo concerniente al almacenamiento de la misma y su ulterior transferencia al tracto reproductivo femenino. Así, la producción de esperma será particularmente analizada en detalle en representantes de la familia Bothriuridae. Los análisis principalmente se orientan a relacionar variables generales y reproductivas, tales como la masa corporal o el nivel de poliandria respectivamente, con los tamaños y características adicionales de los órganos y estructuras masculinas involucradas en la producción, almacenamiento y transferencia espermática.

3 Análisis intraespecífico de la producción, almacenamiento y transferencia del esperma y sus variables asociadas

3.1 INTRODUCCIÓN

En numerosas especies, la producción, almacenamiento y transferencia de los eyaculados están bajo la influencia de la selección sexual, en particular de la competencia espermática (Dixson, 1998; Damiens y Boivin, 2005; Soulsbury y Iossa, 2010; Vahed y Gilbert, 1996; Williams et al., 2005). Existen reportes detallados sobre producción y calidad de espermatozoides, así como otros componentes del eyaculado, en vacas, cerdos y diversas aves, muchos de ellos enmarcados en producción animal para el comercio (Bertani et al., 2002; Einarsson et al., 2009, Igboeli y Rakha, 1971, Lunstra et al., 1978, Quartuccio, et al., 2011, Queiroz y Cardoso, 1987; Ritar et al., 1992, Vom Saal et al., 1998; Suwanpugdee et al., 2009; Swierstra, 1971). De hecho, conteos de espermatozoides no son muy comunes fuera de los animales de importancia económica. Los estudios sobre competencia espermática a menudo se nutren precisamente de técnicas originalmente aplicadas a dichos grupos así como de la andrología (ej. Simmons et al., 2003). Algunos pocos trabajos analizan la producción en un sentido más amplio en grupos, tales como himenópteros (Baer y Boomsma, 2004; Lacoume, et al, 2007; Schluns, et al., 2003), musarañas (Parapanov et al., 2009) y ratones (Peirce y Breed, 2001). De este modo se ha podido progresivamente ir determinando que en varias especies animales el número de espermatozoides, y sobre todo el volumen de eyaculado, suele estar influenciado directamente por decisiones masculinas orientadas a destinar el esperma de forma estratégica (*sperm allocation*) (Ingleby, et al., 2010; Pizzari, 2002; Williams et al., 2005). Existen dos estrategias generales que muestran respectivamente dos posibles resultados bajo competencia espermática (Engqvist y Reinhold, 2007). La primera implica que los machos produzcan y destinen un volumen mayor de eyaculado para poder desplazar físicamente a los eyaculados rivales. La otra, por el contrario, apunta a que los machos depositen volúmenes menores de eyaculado, orientándose a buscar un mayor número de hembras para copular (Engqvist y Reinhold, 2007). Los análisis de *sperm allocation* en general no muestran datos volúmenes o conteos espermáticos, concentrándose principalmente en los aspectos teóricos.

Los escorpiones, a diferencia de algunos arácnidos (ej. solífugos y varias arañas), producen esperma a lo largo de toda su vida adulta. No se tiene registro

de cuánto volumen producen realmente los testículos, ni de lo almacenado en las vesículas seminales. Además, tampoco se sabe qué proporción de lo producido y/o almacenado es destinado al espermatóforo a los fines de ser transferido a la hembra durante el apareamiento. Con el fin de cubrir este vacío actual de conocimiento para el orden, en este capítulo se analizará la concentración de espermática contenida en las vesículas seminales así como dentro del espermatóforo. Para tal fin, este estudio es llevado a cabo de forma intraespecífica en cuatro especies seleccionadas de la familia Bothriuridae, en particular lo referido a producción testicular. Adicionalmente, también se analizan las posibles variables comportamentales y estacionales que podrían estar influyendo a las variables de producción espermática. Se considera que a partir de lo ofrecido por este estudio, se podrá llegar, al menos preliminarmente, a dilucidar si en escorpiones existe o no un patrón que sugiera existencia de competencia espermática de tipo “numérica” en donde en sistemas con mezcla de esperma dentro de las hembras, los machos que producen mayor cantidad de espermatozoides tienen una ganancia proporcional en las fertilizaciones (Wigby y Chapman, 2004). Cabe destacar que luego, en el siguiente capítulo, se tomarán como punto de partida los valores aquí obtenidos para entonces realizar un análisis similar pero a la escala interespecífica, con mayor número de especies, y, principalmente, teniendo en cuenta la filogenia del grupo.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 General

Realizar un análisis intraespecífico del volumen y concentración del esperma durante las etapas de producción, almacenamiento y transferencia, considerando la influencia de la masa corporal y de la época reproductiva, en especies seleccionadas de Bothriuridae.

3.2.2 específicos

1. Analizar en cuatro especies de Bothriuridae los volúmenes y concentraciones de espermatozoides en los machos a nivel de cada órgano y/o estructura reproductiva (testículo, vesícula seminal, espermatóforo);
2. Describir en detalle la ruta completa de producción, almacenamiento y transferencia de espermatozoides en una especie modelo, utilizando a *Timogenes elegans* para tal fin;
3. Comparar el volumen de eyaculado y la concentración de esperma contenido en la cápsula del espermatóforo entre sucesivos apareamientos en dos especies de *Timogenes*;
4. Analizar posible modelos que permitan predecir el comportamiento de las variables de producción, almacenamiento y transferencia, teniendo en cuenta la condición del individuo y la época reproductiva en especies seleccionadas de Bothriuridae.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Especies analizadas

Las cuatro especies seleccionadas de la familia Bothriuridae fueron las siguientes, todas colectadas en la provincia de Córdoba, Argentina (sitio de colecta entre paréntesis): *Timogenes elegans* (Chancaní, n = 20); *Timogenes dorbignyi* (Chancaní, n = 9), *Brachistosternus ferrugineus* (Chancaní, n = 37); *Urophonius brachycentrus* (Tanti, n = 14). Se seleccionaron estas especies por tres razones principales: las dos especies de *Timogenes* presentan, comparativamente con otras, muy buena receptividad sexual para la realización y observación de apareamientos en el laboratorio (Peretti, 1993). Esto permitió utilizar como modelos a estas especies para lo concerniente a volumen del eyaculado contenido en el espermatóforo. *Brachistosternus ferrugineus* es siempre muy abundante en las colectas (Nime, Mattoni y Vrech observaciones personales), y, por último, *U. brachycentrus* posee un interesante sistema de apareamiento, en donde los machos depositan un tapón genital muy eficaz dentro del atrio genital femenino (Peretti, 2010; C. Mattoni, D. Vrech y A. Peretti, datos inéditos).

3.3.2 Descripción de producción espermática

3.3.2.1 Extracción y medición del órgano de producción (Testículos)

3.3.2.1.1 Masa y volumen testicular

Se tomaron los valores de la masa testicular para las cuatro especies seleccionadas. En primer término se practicaron incisiones en las zonas pleurales de los machos para remover la parte dorsal del mesosoma. Los testículos fueron separados cuidadosamente del hepatopáncreas para evitar perder alguna parte de los mismos. Una vez aislados, se les practicó un corte en la unión con la vesícula seminal. Las dos ramas testiculares, derecha e izquierda, extraídas fueron colocadas sobre un portaobjeto para ser pesadas. En la balanza se procedió a tomar nota de los datos 30 segundos después de que los valores en el visor se estabilizaran, anotando la masa testicular (pt) expresada en gramos, con una exactitud de 0,0001g. Posteriormente, se procedió a obtener los valores de volumen de los testículos. Para tal fin y siguiendo lineamientos generales utilizados en otros artrópodos (ej. Gage 1994), se empleó un dispositivo

compuesto por dos portaobjetos, el primero de ellos, en el cual se colocará los testículos, con dos cubreobjetos a ambos lados con una altura conocida de 0,16 mm. Una vez colocados los testículos en el primer portaobjeto, se lo cubría con el segundo portaobjetos. Este aplastamiento controlado produce una expansión de los testículos hasta que los portaobjetos que los cubre hacen tope con los cubreobjetos laterales. Para que la presión fuese uniforme, se utilizaron cuatro prensas de librería para hojas. Se puede obtener así un área formada por los testículos entre ambos portaobjetos. Esta área, expresada en mm^2 , fue medida con el software *ImageJ* 64 Bits (Schneider et al., 2012) y luego multiplicada por la altura constante de los dos cubreobjetos (0,16 mm), obteniéndose de este modo el volumen de los testículos (vt) en mm^3 . Esta técnica de aplastamiento también se usó para obtener los volúmenes seminales de otras estructuras en este capítulo, tales como los de las vesículas seminales y espermatóforo.

3.3.2.2 Descripción del almacenamiento en el macho (vesículas seminales)

3.3.2.2.1. Volumen y masa de las vesículas seminales

Para extraer las vesículas seminales se cortó la base del órgano paraxial, el cual contenía un hemiespermatóforo y la vesícula seminal anexa. Mediante la técnica de aplastamiento descrita en el apartado anterior, se obtuvo el volumen de ambas vesículas seminales. Éstas luego se colocaron en un portaobjetos con el que previamente se calibró la balanza, obteniendo la masa vesicular total (pv) expresada en gramos. Esta variable será luego utilizada en el próximo capítulo.

3.3.2.2.2. Concentración de espermatozoides en las vesículas seminales

Una vez pesadas, las vesículas seminales se desgarraron embebidas en solución fisiológica y bajo lupa estereoscópica a los fines de liberar los paquetes espermáticos. Esta solución fue succionada con una micropipeta (Finnpipet 1-10 μl) y mezclada con 100 o 1000 μl más de solución fisiológica (según la especie, porque pueden haber variaciones tanto en el tamaño total como en la proporción de llenado, ver más adelante) para así contar finalmente el número paquetes espermáticos en la cámara de *Neubauer*. En cada etapa el volumen de la solución era anotado a los fines de posteriormente hacer los cálculos correspondientes de la disolución una vez contados los paquetes. El conteo de éstos se realizó en los cuatro cuadrantes mayores de las esquinas de la grilla de la cámara de *Neubauer* y se utilizó la ecuación $[\text{spmztz}]/\text{ml} = \text{cc} \cdot 10000 / 4 \cdot \text{fd}$, en donde $[\text{spmztz}]/\text{ml}$ es la

concentración de espermatozoides por mililitro, y está en función de *cc*, que es el número de células contabilizadas en la cámara de *Neubauer* y *fd* que hace referencia al factor de dilución en caso de que se hubiese utilizado alguno para muestras muy concentradas. Para estimar el número final de espermatozoides se multiplicó la concentración de paquetes espermáticos por mililitro, por la cantidad promedio de espermatozoides contenidos por paquete (Capítulo 1, apartado 1.4.1.4). Para expresar la concentración de espermatozoides se utilizó notación científica y se uniformaron los valores expresándolos todos a la séptima potencia. Se utilizó el coeficiente de variación (CV) para ver la variabilidad que existe en la producción de las vesículas seminales de las especies analizadas. El coeficiente de variación se obtiene de la división del desvío estándar por la media, en este caso de la producción de las vesículas seminales, y se expresa en porcentaje.

3.3.2.3 Descripción del volumen y la concentración espermático a transferir (espermatóforo pre-inseminación)

En dos especies del género *Timogenes* se obtuvieron valores de concentración y volumen de esperma contenido dentro del espermatóforo. Este análisis solo se realiza en *Timogenes* porque, como ya dijimos anteriormente sus especies aparean fácilmente, lo que nos permite obtener espermátóforos en estado pre-inseminación (sin utilizar). Se utiliza el término “volumen de transferencia espermática” para referirse al volumen del eyaculado transportado por el espermatóforo. Se examinaron los contenidos seminales en un total de 18 espermátóforos en sus estados pre-inseminación, producidos respectivamente de 13 machos de *T. elegans* y 5 machos de *T. dorbignyi*. Al igual que para el apartado anterior, se obtuvo el coeficiente de variación para analizar la variabilidad de producción en estas dos especies. Como en estas especies se obtuvieron valores de concentración tanto en la vesícula seminal como en el espermatóforo, se compararon los coeficientes de variación de las concentraciones de esperma entre ambas utilizando el paquete estadístico R (R Core Team, 2012). Para el registro de los apareamientos, extracción del contenido espermático del espermatóforo y conteo de los paquetes espermáticos se siguió la metodología ya expuesta en el ítem 2.2.2.4 del Capítulo 2. De forma anexa y enfocado más al análisis del próximo capítulo, se obtuvieron los valores de volumen potenciales de la cápsula del espermatóforo, mediante la medición de la misma en espermátóforos pre-inseminación conservados. Para ello se tomaron las medidas de alto, largo y ancho de la cápsula en mm y se obtuvo un volumen

en mm³ al multiplicar los tres valores. Con esto se comparó el porcentaje total de llenado de la cápsula del espermatozóforo.

3.3.3. Análisis en *Timogenes elegans*

Debido a la cantidad de individuos analizados (N = 13) y a que es una especie que presenta todas las variables analizadas hasta este punto, se decidió tomar a *T. elegans* como modelo para comparar las variables obtenidas de testículos, vesículas seminales y espermatozóforo (masa testicular, volumen vesicular y volumen del espermatozóforo). Para ello se realizaron Análisis de varianza de una vía y regresión lineal simple ($\alpha = 0,05$) para comparar la producción en esta especie. Se utilizó el paquete estadístico R (R Core Team, 2012).

3.3.4. Influencia del número de espermatozoforos depositados durante una temporada reproductiva sobre el volumen y la concentración de esperma en machos de *Timogenes*

Para este análisis se utilizaron los mismos machos de *T. elegans* analizados en el capítulo 2, apartado 2.2.2.4, y un único macho de *T. dorbignyi* capturado en el parque provincial Chancaní en 2010, que efectuó tres apareamientos sucesivos. En todos los individuos, se midió el volumen y la concentración de espermatozoides según los lineamientos citados en los apartados previos de este capítulo (3.3.2). Se realizó un test pareado de Wilcoxon no paramétrico para cotejar si las diferencias en los valores entre apareamientos existen. En el caso de *T. dorbignyi* sólo se realizará una comparación de valores sin ningún test estadístico. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico R (R Core Team, 2012)

3.3.5. Análisis intraespecífico de modelos con variables que influncian la masa testicular, el volumen vesicular y la concentración de esperma en los machos

Para cada macho de cada una de las especies analizadas se tomaron las siguientes variables: mes y año de colecta, masa corporal, masa testicular (ambos con una precisión de 0,0001 g), volumen vesicular (mm³) y concentración de espermatozoides de la vesícula seminal expresado en notación científica elevados a la séptima potencia (ej. $0,01 \times 10^7$) para que sea más fácil comparar los valores. Para la obtención de la masa corporal, los machos eran sedados con éter etílico y

luego pesados en una microbalanza (Ohaus Pioneer PA114; precisión de 0,0001 g). Posteriormente, los machos eran expuestos a una sobredosis de éter para prepararlos para la disección de sus órganos reproductivos. Como variable respuesta se tomaron el peso del macho para ver si existía alguna variación con respecto al mes y año de captura, la masa testicular para ver qué relación alométrica existía con la masa corporal del macho y como influían el mes y año de captura sobre la primera. Luego se evaluó como era influido el volumen de las vesículas seminales por la masa corporal, la masa testicular y la época de captura. Por último se evaluó el efecto de la masa corporal, la masa testicular, el volumen vesicular y la época de captura sobre la concentración de espermatozoides por mililitro. El volumen del espermatóforo pre-inseminación no fue tenido en cuenta porque no se tienen datos para todas las especies.

Para testear como las variables predictoras influenciaron las variables respuesta, se utilizaron todas las combinaciones posibles de modelos de uno a dos parámetros ($y = 1$, $y = a$; basado en Costa-Schmidt y Machado, 2012). El modelo con un solo parámetro fue incluido para los casos en que ninguna variable explicara mejor a la variable respuesta. Los modelos se compararon utilizando el criterio de información de Akaike corregido para muestras pequeñas (AICc), tal como fue sugerido por Burnham y Anderson (2002). El modelo con el menor valor de AICc y los modelos cuyo cambio en AICc eran menores a 2 ($\Delta AICc < 2$) (ver Burnham y Anderson, 2002), fueron seleccionados como los modelos que presentaban la mayor verosimilitud para explicar la variable respuesta. Todos los modelos se resumieron en una tabla en donde puede ser observada la variable respuesta y sus respectivos predictores. En cada celda se muestra el valor de peso de Akaike que representa las chances del modelo de explicar adecuadamente la variable respuesta. Se resaltó con color los modelos con mayor peso de Akaike obtenido para cada variable respuesta. En un análisis preliminar se eliminaron los modelos con más de dos parámetros por mostrar valores muy altos de AICc.

Cuando la influencia de la masa corporal sobre la masa testicular era significativa, se evaluaba el tipo de alometría según el valor de la pendiente, y se estimaba la probabilidad de que dicha pendiente fuese distinta de 1 (isometría) de la siguiente manera: con *Microsoft Excel* se determinó el valor de probabilidad de dos colas correspondiente a ese valor con la ayuda de la siguiente fórmula $p = TDIST(tratio, df, 2)$, en donde *TDIST* es el nombre de la función en *Microsoft Excel* y entre paréntesis aparecen los parámetros, *tratio* es el valor de t obtenido de la resta del valor de la pendiente al número uno y este valor se dividió por el error

estándar ($[\text{slope}-1]/\text{SE}$), df es la cantidad de grados de libertad y el numero dos se refiere a que el análisis de la probabilidad es a dos colas.

Para todos los análisis estadísticos se utilizó el paquete estadístico R de código abierto (R Core Team, 2012) y la librería *bbmle* para la obtención de los valores de los parámetros en el análisis de selección de modelos.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Descripción del volumen de esperma general del macho

Los valores de volumen de producción testicular, almacenamiento y transferencia se observan en la Tabla 9. Los volúmenes de la vesícula seminal en cada especie, siempre fueron mayores a los de volumen testicular, excepto en *Br. ferrugineus*. Esta especie produce un volumen equivalente a 8,17 mm³ y almacena menos de la mitad de ese volumen en las vesículas seminales. Las otras tres especies, por el contrario, almacenan aproximadamente el doble del volumen del testículo, inclusive casi tres veces más en *T. dorbignyi*.

Los volúmenes de las vesículas seminales no siempre son iguales debido a una diferencia en el grado de llenado total (machos con vesículas seminales más llenas que otros), como puede ocurrir en *Br. ferrugineus* o en una diferencia de tamaño total de la misma vesícula (machos presentan comparativamente diferentes tamaños de vesículas seminales) como ocurre en *T. elegans* (ver Fig. 24).

Tabla 9. Volúmenes de espermatozoides en diferentes sitios del tracto reproductivo masculino en cuatro especies de la familia Bothriuridae. Los datos están expresados en mm³.

Especies	Volumen Testículo (mm ³)	Volumen Vesícula (mm ³)	Volumen eyaculado (mm ³)	Volumen Espermatóforo (cápsula) (mm ³)
<i>Br. ferrugineus</i>	8,17	3,97	0,59	2,70
<i>U. brachycentrus</i>	3,43	6,17	0,62	1,86
<i>T. elegans</i>	7,36	11,7	1,47	4,41
<i>T. dorbignyi</i>	1,19	3,81	0,58	1,27

También se observa que en cada especie, el volumen potencial de la cápsula del espermatóforo es mayor al volumen que realmente se transfiere a la hembra. Así *Br. ferrugineus* transfiere aproximadamente el 22% de la capacidad potencial de la cápsula, mientras que *U. brachycentrus* y *T. elegans* el 33%. Únicamente *T. dorbignyi* se aproxima al 50% de la capacidad. Cabe destacar que en los

espermátóforos de todas las especies examinadas se observó la presencia de una sustancia similar a un gel transparente en el fondo de la cápsula.

A partir de dichos volúmenes reales de transferencia, retroactivamente pueden señalarse las siguientes relaciones en cada especie: a partir del volumen del testículo, (volumen del testículo/volumen del eyaculado) *Br. ferrugineus* produce potencialmente 14 eyaculados que serían transferidos en 14 espermátóforos, *U. brachycentrus* 6, *T. elegans* 5 y *T. dorbignyi* solo 2. Sin embargo, teniendo en cuenta el volumen almacenado en las vesículas seminales (volumen de las vesículas seminales/volumen de eyaculado, ver Tabla 9), *Br. ferrugineus* y *T. dorbignyi* almacenan 7 eyaculados, o sea un equivalente al volumen para rellenar 7 espermátóforos, *U. brachycentrus* 10, y *T. elegans* 8.

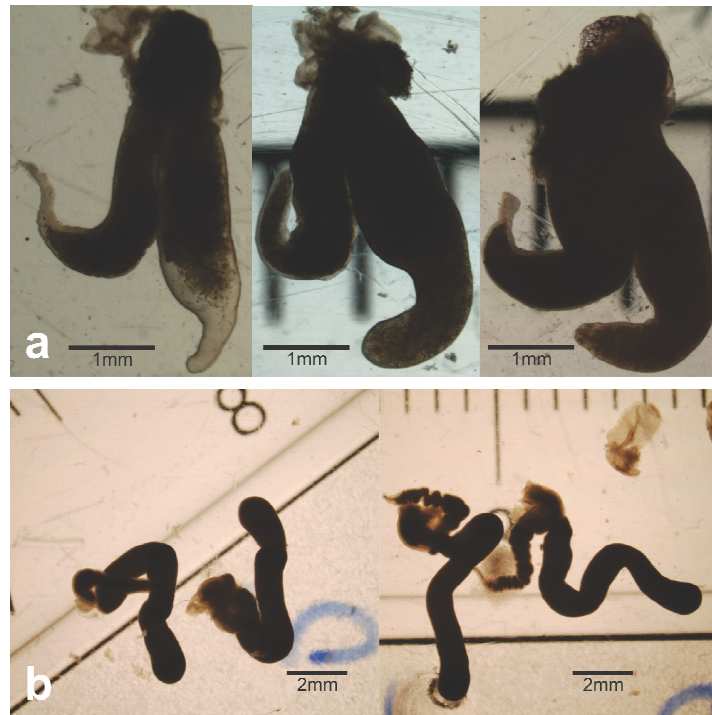


Fig. 24. Variación en el volumen y tamaño de las vesículas seminales en diferentes machos de la Familia Bothriuridae. a) *Brachistosternus ferrugineus* vesículas de similar tamaño con diferencias en el llenado total; b) *Timogenes elegans*, vesículas igualmente llenas pero con diferencias en el tamaño total.

3.4.2 Concentración en vesícula seminal

Los valores de cuantificación del esperma se observan en la Tabla 10. Analizando la concentración almacenada en la vesícula seminal, se observa una mayor cantidad de espermatozoides por mililitro en *T. elegans*. Los que menos producen son *Br. ferrugineus* y *T. dorbignyi*. Una situación intermedia muestra *U. brachycentrus*, quien tiene un conteo ligeramente superior al de *Br. ferrugineus*. En las vesículas seminales hay una gran variación en la concentración de espermatozoides en *T. dorbignyi* (donde el *cv* fue mayor, Tabla 10) y valores similares entre *Br. ferrugineus* y *T. elegans*. *Urophonius brachycentrus* mostró una variación del 54% comparativamente la menor variación mostrada por las especies analizadas. La concentración espermática de las cuatro especies fue estadísticamente significativa (Anova de una vía $F_{(3,68)} = 36,98$; $p < 0,001$). El test a posteriori de Tukey mostró tres grupos bien diferenciados. La especie con mayor concentración de esperma en vesícula fue *T. elegans*. Por su parte, *Br. ferrugineus* y *U. brachycentrus* tuvieron una concentración también alta pero por debajo de *T. elegans*, mientras que ésta fue muy baja en *T. dorbignyi* (Fig. 25).

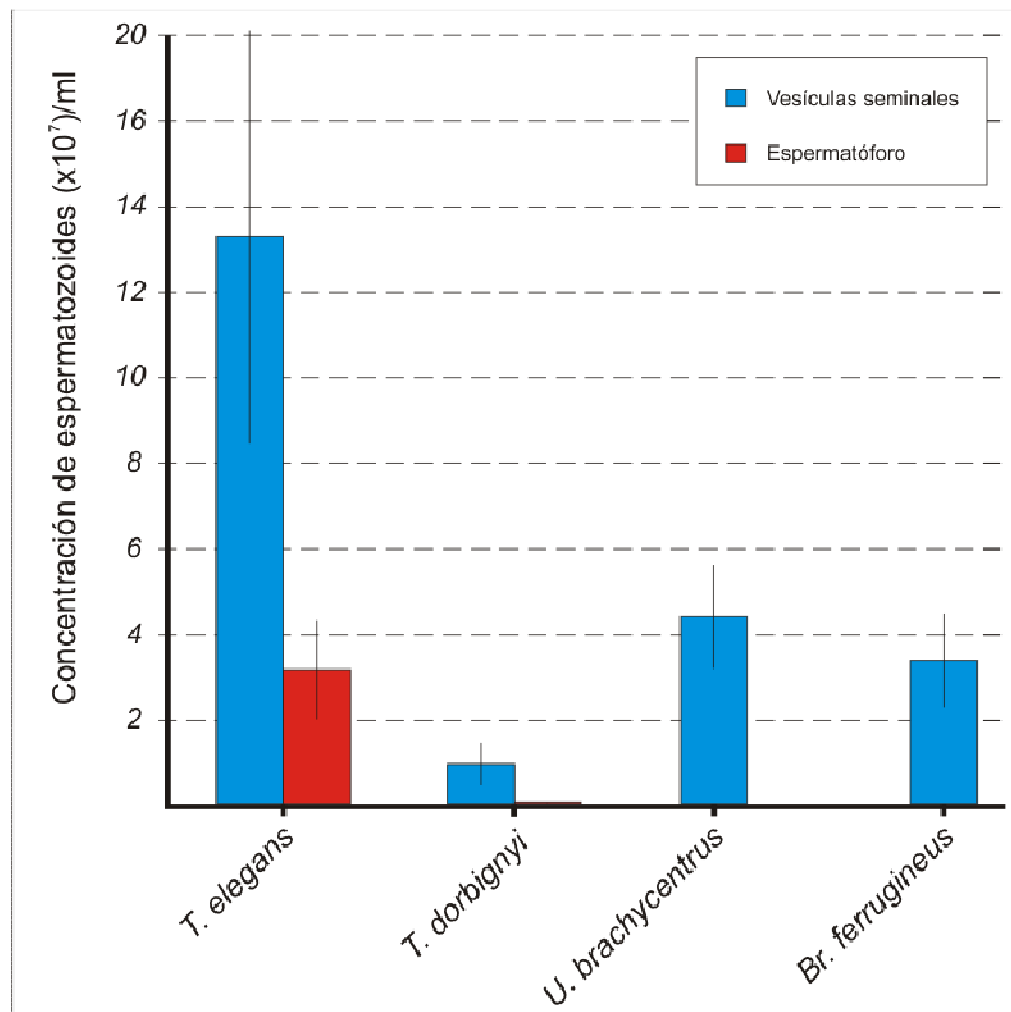


Fig. 25. Concentración de espermatozoides contabilizados en la vesícula seminal y en el espermátóforo. La concentración de espermatozoides en vesícula seminal se obtuvo para las cuatro especies analizadas. Los valores de concentración espermática para los espermátóforos sólo se obtuvieron para las especies del género *Timogenes*. Las líneas sobre las barras representan el desvío estándar.

Tabla 10. Coeficientes de variación de la concentración de espermatozoides en la vesícula seminal y en el eyaculado.

Especies	Vesículas seminales	Espermátóforo
<i>T. elegans</i>	71%	72%
<i>T. dorbignyi</i>	102%	22%
<i>U. brachycentrus</i>	54%	-
<i>B. ferrugineus</i>	72%	-

3.4.2.2 Concentración de espermatozoides en el volumen contenido dentro del espermatóforo de *Timogenes*

Timogenes elegans presentó mayor cantidad de espermatozoides en su espermatóforo, al igual que mayor variabilidad, en comparación a *T. dorbignyi* (Tabla 10). El patrón de variabilidad del contenido del espermatóforo en *T. elegans* es similar al encontrado en sus vesículas seminales (Test-z de dos colas, $Z = 0,10$; $p = 0,95$), mientras que es mucho menor en *T. dorbignyi* (Test-z de dos colas, $Z = 2,60$; $p = 0,01$). Comparando con los conteos realizados en las vesículas seminales de ambas especies, se ve que en los espermatóforos el eyaculado está menos concentrado que en sus vesículas seminales (Tabla 10). Así, en *T. elegans* y *T. dorbignyi* los espermatozoides contenidos en el espermatóforo representaron el 24% y 6% de los almacenados en las vesículas seminales, respectivamente (Tabla 10).

3.4.3. Análisis en *Timogenes elegans*

El análisis de varianza de la concentración de esperma mostró también diferencias significativas (Anova de una vía $F_{(2,43)} = 24$; $p < 0,001$), en donde el análisis a posteriori mostró similitud entre las medias de las concentraciones de las vesículas y testículos pero una diferencia significativa entre la concentración de estos órganos y la concentración en el espermatóforo (ver Fig. 26 a). La concentración de espermatozoides en cada uno de los tres sitios mostró un patrón similar al del volumen, siendo la concentración de espermatozoides en el espermatóforo menor a la concentración medida en los otros dos órganos (Fig. 26 b). La menor variabilidad en la concentración correspondió a la vesícula seminal. Como se puede ver en la Fig. 27, ambas variables (volumen y concentración) estuvieron relacionadas, tal como se lo aprecia en la ecuación de regresión logarítmica, $\text{Log}_{10}(\text{concentración de espermatozoides/ml}) = 0,2659 + 0,7570 * \text{Log}_{10}(\text{volumen del órgano contenedor})$. El análisis de regresión muestra que el Log_{10} volumen del órgano es un buen predictor de la concentración de espermatozoides ($R^2 = 0,6614$; $F_{(1,24)} = 49,82$; $p < 0,001$).

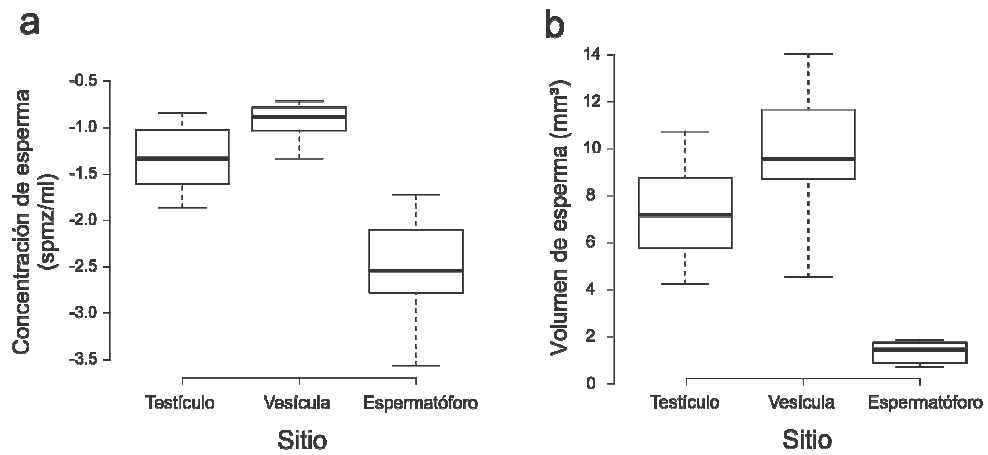


Fig. 26. Comparación de la concentración y el volumen de espermatozoides en testículo, vesícula seminal, y espermatóforo en machos de *Timogenes elegans*. a) Concentración ($10^7/\text{ml}$); b) Volumen almacenado en la vesícula seminal (ml).

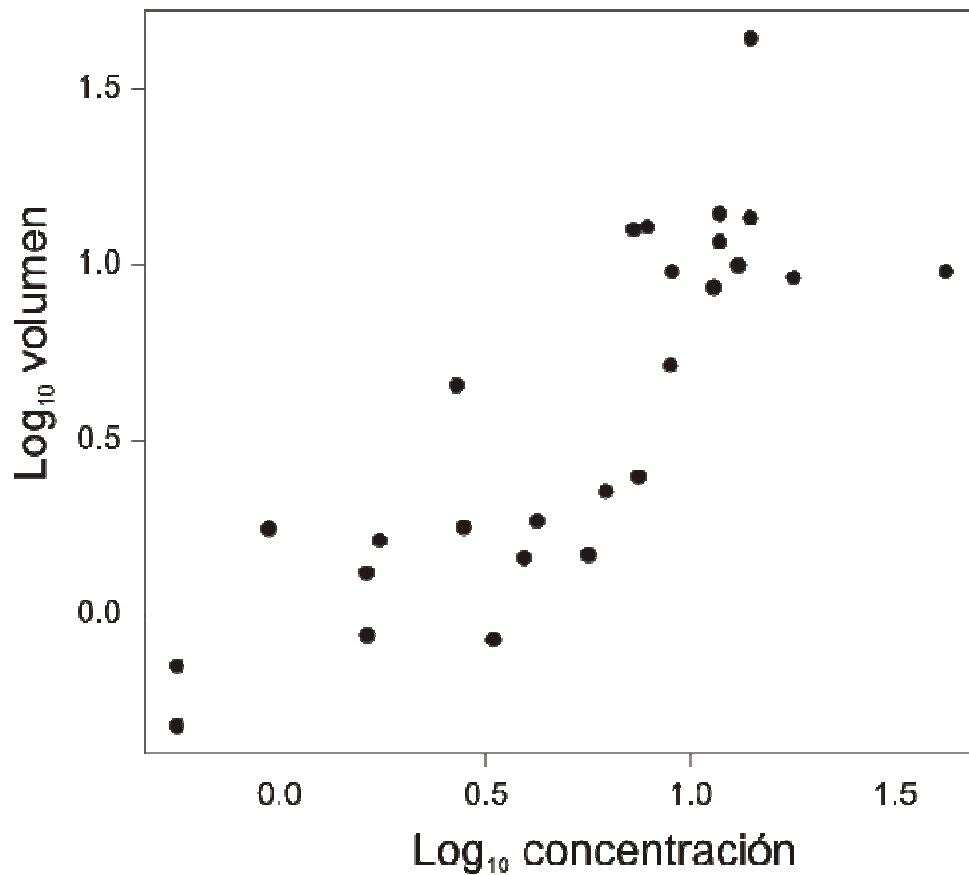


Fig. 27. Relación entre el volumen y la concentración de los espermatozoides de la vesícula seminal obtenida de un grupo de valores pertenecientes a las cuatro especies analizadas.

3.4.4 Apareamientos sucesivos en especies del género *Timogenes*

Tanto el volumen seminal contenido en el espermatozóforo como su concentración de espermatozoides no variaron significativamente entre los espermatozóforos producidos en sucesivos apareamientos en *T. elegans*. (*Test pareado de rangos de Wilcoxon* $W_{(\text{volumen})} = 9$, $p = 0,25$; $W_{(\text{concentración})} = 3$, $p = 0,62$, respectivamente). Si bien los datos no son significativos desde el punto de vista estadístico, se pueden destacar algunos detalles. Por ejemplo, la concentración de espermatozoides fluctuó en uno a dos órdenes de magnitud entre el primero y el segundo apareamiento (ej. *T. elegans* 01, Tabla 11). El macho *T. elegans* 09 (Tabla 10), por su parte realizó un apareamiento adicional, produciendo así un total de tres espermatozóforos. En este macho los valores del volumen seminal se mantuvieron bastante constantes, apenas disminuyendo ligeramente desde el primer espermatozóforo al último. Por el contrario, la concentración de espermatozoides se mantuvo similar en los dos primeros apareamientos pero cayó drásticamente en el tercer espermatozóforo. En *Timogenes dorbignyi* los valores de volumen fueron disminuyendo paulatinamente, pero los valores de recuento se mantuvieron aproximadamente estables (Tabla 11).

Tabla 11. Volumen y concentración de espermatozoides del eyaculado en apareamientos sucesivos en cuatro machos de *Timogenes elegans* y en un macho de *T. dorbignyi*.

ID	Apareamiento	Fecha	Volumen espermatofoforo (mm ³)	Conteo espermatozoides (x10 ⁷ /ml)
<i>T. elegans</i> 06	Apaream. 1	17/02/2011	1,7719	0,9375
	Apaream. 2	04/03/2011	1,3863	2,6250
<i>T. elegans</i> 01	Apaream. 1	21/02/2011	0,7217	0,5625
	Apaream. 2	11/03/2011	0,0433	0,0012
<i>T. elegans</i> 05	Apaream. 1	24/02/2011	1,6463	1,7500
	Apaream. 2	11/03/2011	1,6860	3,2500
<i>T. elegans</i> 09	Apaream. 1	26/01/2012	0,4866	0,5625
	Apaream. 2	30/01/2012	0,1103	0,4687
	Apaream. 3	22/02/2012	0,2127	0,0540
<i>T. dorbignyi</i> 07	Apaream. 1	08/01/2010	0,5257	4,0273
	Apaream. 2	19/01/2010	0,2962	6,0301
	Apaream. 3	08/03/2010	0,0994	5,0298

3.4.5 Análisis intraespecífico de modelos con variables que influyen la masa corporal, la masa testicular, el volumen vesicular y la concentración de espermatozoides en los machos

La Tabla 12 resume los valores de peso de Akaike para los modelos contemplados que analizan la influencia de diferentes variables sobre la masa corporal, la masa testicular, el volumen vesicular y la concentración de espermatozoides por especie. Los modelos con mayor peso fueron los seleccionados y sus parámetros se ven en la Tabla 13. En *Br. ferrugineus* los modelos seleccionados incluyeron dos modelos, además otros dos modelos en donde se seleccionó el modelo nulo. En esta especie la masa testicular y el volumen de las vesículas seminales fue explicada por la masa corporal, y ambos modelos poseen una relación positiva entre el predictor y la variable respuesta con una alometría de tipo isométrica (*Test T*, $t_{35} = 0,50$, $p = 0,62$). *Timogenes elegans* por su parte, mostró en principio tres modelos con valores altos de peso de Akaike y un modelo que si bien tuvo un peso de Akaike alto, estuvo compartido con el modelo nulo y resultó no ser estadísticamente significativo. El peso del macho mostró diferencias entre los distintos meses muestreados, con una media baja en diciembre, alta en enero y moderada en febrero y marzo. Luego, la masa testicular fue explicada de manera directa por el peso del macho mostrando también isometría (*Test T* $t_{12} = 0,93$, $p = 0,40$). El volumen de las vesículas seminales en *T. elegans* fueron explicadas de manera positiva por la masa testicular, y por último, como dijimos previamente, la concentración de espermatozoides en la vesícula seminal parecía ser explicada por el año pero la relación no fue significativa (Tabla 13). En el caso de la especie hermana, *T. dorbignyi*, los dos modelos seleccionados tuvieron al año de captura como predictor. Hubo diferencia significativa de la masa testicular entre los machos capturados en 2008 y 2011, siendo la masa testicular de los machos de 2008 mayor a la de los machos de 2011. De manera inversa, el volumen de las vesículas seminales, fue mayor en los machos capturados en 2011. La última especie analizada, *U. brachycentrus*, mostró una influencia de la masa corporal sobre la masa testicular y sobre la concentración de espermatozoides en la vesícula seminal. Las relaciones de las variables en ambos modelos fue positiva, siendo isométrica en la masa testicular (*Test T*, $t_{12} = 0,8870$, $p = 0,3925$) y presentando alometría positiva para la concentración de espermatozoides en la vesícula seminal (test *T*, $t_{12} = 2,67$; $p = 0,02$).

Tabla 12. Análisis intraespecífico en cuatro especies de la Familia Bothriuridae. En la primer columna se muestra la variable respuesta, luego sus predictores y a continuación se detallan cada una de las cuatro especies analizadas. En cada casilla se detalla el peso de Akaike a modo de proporción. lpt = \log_{10} peso testículo; lpm= \log_{10} peso macho; lce = \log_{10} concentración espermatozoides; lvv = \log_{10} volumen vesicular; mes y año hacen referencia a las épocas de captura; pred = predictores; v resp = variable respuesta.

V resp	pred	Bf	Te	Td	Ub
Log ₁₀ masa corporal (lpm)	1	0,57	0,17	0,83	0,72
	mes	0,08	0,76	0,08	0,14
	año	0,35	0,07	0,08	0,14
Log ₁₀ masa testicular (lpt)	1	0,01	0,00	0,18	0,05
	lpm	0,99	0,99	0,03	0,92
	mes	0,00	0,00	0,11	0,01
	año	0,00	0,01	0,68	0,01
Log ₁₀ volumen vesicular (lvv)	1	0,00	0,01	0,00	0,40
	lpm	0,99	0,32	0,00	0,12
	lpt	0,01	0,65	0,00	0,30
	mes	0,00	0,00	0,00	0,09
	año	0,00	0,01	0,99	0,09
Log ₁₀ concentración espermática vesicular (lce)	1	0,32	0,27	0,50	0,01
	lpm	0,13	0,15	0,05	0,99
	lpt	0,10	0,21	0,05	0,00
	lvv	0,18	0,10	0,08	0,00
	mes	0,15	0,01	0,23	0,00
	año	0,12	0,27	0,11	0,00

Tabla 13. Análisis estadístico de los modelos seleccionados en el análisis de selección de modelos (Tabla 9). Se muestran los valores de regresión para las variables predictoras cuantitativas y los valores de análisis de varianza para las variables predictoras cualitativas, no mostrando valores de pendientes, error estándar y R^2 ajustado (Adj R^2) para estos últimos. Al lado del nombre de la especie se especifica entre paréntesis el número muestral. Para el valor F (F-value) se pone antes de su valor de los grados de libertad entre paréntesis.

Especie	Modelos	Pendiente	Error estándar	F-Value	Adj R^2	p
<i>B. ferrugineus</i> (n =37)	lpt ~ lpm	1,16	0,32	(1;35) = 13,10	0,25	0,0009
	lvv ~ lpm	1,33	0,27	(1;35) = 24,54	0,39	0,0001
	lpm ~ mes	-	-	(3;16) = 4,77	-	0,0157
<i>T. elegans</i> (n = 20)	lpt ~ lpm	1,42	0,30	(1;18) = 23,21	0,54	0,0001
	lvv ~ lpt	0,83	0,24	(1;18) = 12,20	0,37	0,0026
	lce ~ año	-	-	(1;18) = 2,71	-	0,1170
<i>T. dorbignyi</i> (n = 9)	lpt ~ año	-	-	(1;7) = 4,16	-	0,0197
	lvv ~ año	-	-	(1;7) = 9,06	-	0,0000
<i>U. brachycentrus</i> (n =14)	lpt ~ lpm	1,37	0,42	(1;12) = 10,76	0,43	0,0070
	lce ~ lpm	2,28	0,48	(1;12) = 22,17	0,62	0,0005

3.5 DISCUSSION

3.5.1 Volumen de esperma

En este capítulo se han examinado los resultados intraespecíficos de producción global de esperma, entendido no sólo como la producción del testículo sino también el almacenaje y el eyaculado destinado para la transferencia. Estos resultados difieren de los que se contemplarán en el capítulo siguiente, en donde datos de las mismas estructuras son comparados entre especies de la familia Bothriuridae. La gran mayoría de los análisis que existen se enfocan en este último tipo de análisis interespecífico, pero es importante saber previamente que ocurre con los machos dentro de las especies analizadas. Así, podemos destacar ahora que, por ejemplo, en *Br. ferrugineus* se almacenaría una cantidad menor de la que se produce, patrón que es contrario a lo que se observó en las otras tres especies estudiadas. En general, las vesículas seminales en insectos son órganos de almacenamiento que contiene volúmenes mayores de esperma que los testículos (Chapman, 1998; Wedell y Hosken, 2010). Por cuestiones prácticas y para observar un patrón general inicial, el volumen del testículo se tomó integralmente, pero es importante señalar que no todo el volumen equivaldría a esperma en sentido estricto, ya que existe tejido parenquimático productor de espermatozoides. Podría entonces argumentarse que el testículo de *B. ferrugineus* podría tener mayor tejido parenquimático, lo que resultaría en que el testículo se más grande que el de las demás especies. Lamentablemente no se han podido analizar cortes transversales de los testículos para poder afirmar esta posibilidad.

En cuanto a los volúmenes de almacenamiento, se encontró que se pueden llegar a almacenar el equivalente a 10 eyaculados en la vesícula seminal. En vertebrados, por ejemplo, Møller (1989) sugiere que las reservas almacenan 20 eyaculados independientemente del tamaño del cuerpo. En el caso del contenido del espermatóforo, es interesante que el volumen de esperma se encuentra por debajo del potencial de almacenamiento de la cápsula. La sustancia transparente, similar a un gel, que está por debajo del semen en la cápsula, raramente sale al exterior durante la transferencia espermática. Sin embargo, presionando artificialmente al espermatóforo se puede forzar la salida. Aparentemente esta sustancia serviría para ayudar a evertir la gota de esperma cuando se acciona el espermatóforo (Francke, 1979; Peretti, 2003). Alternativamente y teniendo en cuenta que en muchas especies las hembras consumen el espermatóforo luego

de la transferencia espermática, esta sustancia gelatinosa podría ser comparable al espermatofilax, un regalo nupcial que los machos entregan en algunas especies de insectos (ej. Wedell, 1993; Vahed et al., 2011). En estas especies el tamaño del espermatofilax está directamente relacionado con el volumen de eyaculado que la hembra recibe.

3.5.2 Concentración de espermatozoides

Por primera vez se documentan los valores de concentración de espermatozoides en escorpiones, los cuales están en el orden de 10^7 espermatozoides por mililitro de solución, tanto en las vesículas seminales como en el espermatóforo. En la Tabla 14 se compara la concentración de esperma de órganos de almacenamiento y de espermatóforos en diferentes grupos animales. dentro de esta pequeña revisión en otros organismos (Tabla 14), los valores encontrados en escorpiones se ubican entre las especies con grandes valores en el reservorio del macho, doblando por ejemplo, el orden de magnitud de la especie con menor concentración (*Bucculatrix ainsliella*, Lepidoptera, Lyonetiidae) de la revisión. En esta comparación, los valores de concentración de eyaculado casi que triplican los de la especie con menor concentración, aunque se encuentran cercanos a los valores intermedios (Tabla 14).

Dentro de los escorpiones analizados, el esperma en la vesícula seminal de *T. elegans* es más concentrado que el del resto de las tres especies analizadas. Por el contrario, *T. dorbignyi* presentó las vesículas seminales con menor concentración de espermatozoides. Desde una perspectiva funcional, estas diferencias podrían estar relacionadas con el efecto de “dilución” que experimentan las especies con grandes volúmenes corporales en comparación con aquellas más pequeñas (Brody, 1945; Peters, 1983; Calder, 1984; Short, 1981). Es así que, como el tamaño del espermatozoide individual es relativamente constante, los animales grandes tienen que producir mayor número de espermatozoides que los organismos pequeños debido al incremento en el volumen del tracto reproductivo femenino, que es en donde el eyaculado se distribuye (Short, 1981). Este aumento del número de espermatozoides producidos para contrarrestar este efecto de dilución, puede quizá ser la causa de la mayor concentración de espermatozoides en *T. elegans* comparativamente con *T. dorbignyi*.

Tabla 14. Cuadro resumiendo diferentes artículos en donde se citan el valores de concentración de espermatozoides en zonas de almacenamiento y de eyaculado. En negrita se resaltan las especies analizadas en el presente trabajo.

Especies	Conteo de esperma	Sitio	Referencia
<i>B. ainsliella</i>	9,00E+03	Vesícula seminal	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>F. casta</i>	1,74E+04	Vesícula seminal	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>P. acerifoliella</i>	1,91E+04	Vesícula seminal	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>A. pomelaria</i>	2,00E+04	Vesícula seminal	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>A. thuiella</i>	2,45E+04	Vesícula seminal	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>T. yuccasella</i>	2,54E+04	Vesícula seminal	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>H. behrensi</i>	1,25E+05	Vesícula seminal	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>P. polyxenes</i>	4,37E+05	Vesícula seminal	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>S. virginica</i>	5,26E+05	Vesícula seminal	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>C. russula</i>	1,70E+06	Cauda del epidídimo	Parapanov et al., 2009
<i>M. sexta</i>	2,40E+06	Vesícula seminal	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>S. murinus</i>	3,30E+06	Cauda del epidídimo	Parapanov et al., 2009
<i>T. dorbignyi</i>	9,73E+06	Vesícula seminal	Trabajo actual
<i>P. modesta</i>	1,03E+07	Vesícula seminal	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>S. araneus</i>	1,32E+07	Cauda del epidídimo	Parapanov et al., 2009
<i>N. fodiens</i>	3,01E+07	Cauda del epidídimo	Parapanov et al., 2009
<i>Br. ferrugineus</i>	3,34E+07	Vesícula seminal	Trabajo actual
<i>U. brachycentrus</i>	4,37E+07	Vesícula seminal	Trabajo actual
<i>T. elegans</i>	1,32E+08	Vesícula seminal	Trabajo actual
<i>H. sapiens</i>	4,40E+08	Reserva de esperma	Møller, 1989
<i>R. novegicus</i>	7,00E+08	Reserva de esperma	Møller, 1989
<i>M. auratus</i>	1,20E+09	Reserva de esperma	Møller, 1989
<i>O. cuniculus</i>	2,20E+09	Reserva de esperma	Møller, 1989
<i>M. mulatta</i>	1,30E+10	Reserva de esperma	Møller, 1989
<i>B. taurus</i>	6,90E+10	Reserva de esperma	Møller, 1989
<i>E. caballus</i>	7,70E+10	Reserva de esperma	Møller, 1989
<i>O. aries</i>	1,65E+11	Reserva de esperma	Møller, 1989
<i>S. scrofa</i>	1,85E+11	Reserva de esperma	Møller, 1989
<i>A. fusca</i>	6,24E+02	Espermatóforo	Dallai et al., 2009
<i>O. villosa</i>	1,72E+03	Espermatóforo	Dallai et al., 2010
<i>D. subobscura</i>	5,00E+03	Espermatóforo	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>D. pseudoobscura</i>	2,50E+04	Espermatóforo	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>S. becarri</i>	2,59E+04	Espermatóforo	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>D. apicalis</i>	2,98E+04	Espermatóforo	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>T. quadriguttata</i>	3,29E+04	Espermatóforo	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>D. fumipennis</i>	3,84E+04	Espermatóforo	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>C. whitei</i>	5,45E+04	Espermatóforo	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>P. napi</i>	5,70E+04	Espermatóforo	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>S. brevicornis</i>	5,79E+04	Espermatóforo	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>C. whitei</i>	7,10E+04	Espermatóforo	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>C. quinqueguttata</i>	9,66E+04	Espermatóforo	Swallow y Wilkinson, 2002

Especies	Conteo de esperma	Sitio	Referencia
<i>P. possypiella</i>	1,06E+05	Espermatóforo	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>E. kuehniella</i>	1,26E+05	Espermatóforo	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>C. dalmanni</i>	1,33E+05	Espermatóforo	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>P. rapae</i>	1,35E+05	Espermatóforo	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>P. interpunctella</i>	1,38E+05	Espermatóforo	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>T. ni</i>	1,78E+05	Espermatóforo	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>H. virescens</i>	1,81E+05	Espermatóforo	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>P. separata</i>	2,94E+05	Espermatóforo	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>L. pseudaryia</i>	5,02E+05	Espermatóforo	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>L. dispar</i>	5,11E+05	Espermatóforo	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>T. dorbignyi</i>	5,73E+05	Espermatóforo	Trabajo actual
<i>S. litura</i>	1,05E+06	Espermatóforo	Swallow y Wilkinson, 2002
<i>T. elegans</i>	3,13E+07	Espermatóforo	Trabajo actual
<i>R. novegicus</i>	4,40E+07	Eyaculado	Møller, 1989
<i>P. vannamei</i>	5,21E+07	Espermatóforo	Leung-Trujillo y Lawrence, 1991
<i>M. auratus</i>	6,80E+07	Eyaculado	Møller, 1989
<i>O. cuniculus</i>	7,30E+07	Eyaculado	Møller, 1989
<i>P. setiferus</i>	8,34E+07	Espermatóforo	Leung-Trujillo y Lawrence, 1991
<i>P. stylirostris</i>	2,11E+08	Espermatóforo	Leung-Trujillo y Lawrence, 1991.
<i>H. sapiens</i>	2,25E+08	Eyaculado	Møller, 1989
<i>M. mulatta</i>	1,18E+09	Eyaculado	Møller, 1989
<i>O. aries</i>	1,74E+09	Eyaculado	Møller, 1989
<i>E. caballus</i>	8,40E+09	Eyaculado	Møller, 1989
<i>B. taurus</i>	9,60E+09	Eyaculado	Møller, 1989
<i>S. scrofa</i>	7,80E+10	Eyaculado	Møller, 1989

Los resultados muestran que el eyaculado en el espermatóforo se diluye con respecto a la vesícula seminal en las especies de *Timogenes*. Los espermatóforos son sitios con alto grado de estrés para los espermatozoides y quizá la dilución del eyaculado mejore la viabilidad y el tiempo de mantenimiento de los espermatozoides, agregando mayor proporción de líquido seminal (den-Boer et al., 2008).

En *Timogenes* no se observó una disminución significativa del volumen y concentración de esperma del espermatóforo en sucesivos apareamientos, descartando así la existencia de agotamiento de esperma (*sperm depletion* Møller, 1991; Lombardo et al., 2002; Lombardo et al., 2004; Sato et al., 2005; Birkhead et al., 2009; Michalik y Rittschof, 2011;), al menos entre dos secuencias de apareamiento. Además, se piensa que en escorpiones la producción de espermatozoides sería continua, al contrario de lo que ocurre por ejemplo en otros

arácnidos (Michalik y Richtsoff, 2011 [arañas], Punzo, 1998 [Solífugos]). Estos datos en escorpiones no se conciben con datos existentes en lepidóptera, donde se observa que el volumen de esperma decrece exponencialmente en los sucesivos apareamientos (ver Royer y McNeil, 1993). En escorpiones, no hay seguridad de cuantos espermátóforos llega a producir un macho durante su vida en la naturaleza (Polis y Sissom, 1990; Peretti, 1993). Sin embargo, en algunas especies se sabe que salen pocas noches durante la temporada reproductiva en busca de hembras (Polis, 1990; M. Nime, observaciones personales). Esto, al menos, sugeriría que el número de apareamientos sucesivos no llegarían a ser tantos como para que exista un agotamiento de las reservas de esperma.

3.5.3 Influencia de variables sobre la producción espermática

La masa corporal en *T. elegans*, se vio influenciada por el mes de captura de los individuos. Los resultados sugieren que, a principio de la temporada reproductiva (Diciembre) se encontrarían individuos de masas corporales menores, en enero aparecen individuos mayores y el promedio de tamaño aumenta. Para estabilizarse en los periodos de febrero-marzo. Quizá esta sea una estrategia de los machos pequeños que aparecen bien empezada la temporada reproductiva para poder arrebatarse algún apareamiento a los machos de mayor tamaño (Mattoni y Peretti comunicación personal).

La masa testicular se vio influenciada por la masa corporal en tres de las cuatro especies analizadas y el crecimiento de la masa testicular sería isométrico y la masa testicular crecería de forma proporcional a la masa corporal. La excepción a este patrón la presentó *U. brachycentrus* cuya masa testicular se vio influenciada por el año de captura de los ejemplares. Según los datos, los machos presentaron masas testiculares mayores en 2008 comparado con 2011. Según análisis comparativos en diferentes especies, la masa testicular estaría bajo una fuerte presión de selección, sobre todo en especies donde la competencia espermática es similar a una rifa. Por ello cabría esperar que el crecimiento de la masa testicular fuera alométrico positivo como ocurre con otras estructuras bajo presión de selección sexual (Eberhard, 2009 [Genitalia]). En otros artrópodos como *Scathophaga stercoraria* (Diptera, Scathophagidae) no se ha encontrado una relación entre la medida del cuerpo y de los testículos (Ward y Simmons, 1991). La mayoría de los trabajos que comparan estas dos variables se han realizado a lo largo de un gran número de especies y son de carácter comparativo (Kenagy y

Trombulak, 1986; Gage y Freckleton, 2003; Møller y Briskie, 1995; Hosken, 1997). Para escorpiones, este tipo de análisis se realizará en el próximo capítulo.

El volumen de las vesículas seminales solo fue influenciado por la masa corporal en *Br. Ferrugineus*. El volumen de las vesículas seminales aumenta proporcionalmente al aumento de la masa corporal del macho. *Timogenes elegans*, por su parte, tuvo a la masa testicular como predictor del volumen de las vesículas seminales lo que sugiere que en esta especie, testículos mayores están asociados a vesículas seminales mayores. El volumen de las vesículas seminales en *T. dorbignyi* fue afectado por el año de captura de los ejemplares (2008 y 2011). Así se observó que, comparando ambos años, el volumen de las vesículas seminales fue menor en 2008. Si tomamos en cuenta que la masa testicular también se vio afectada por el año en esta especie, se observa que los machos en 2008 presentan testículos mayores y volúmenes menores de vesículas seminales, contrariamente a lo que ocurrió en 2011. Quizá los machos pueden optar por diferentes estrategias según el clima, o algún parámetro poblacional como la proporción de sexos o el riesgo de competencia espermática. Según los datos estadísticos del tiempo para cada uno de los años tomados por la estación meteorológica 876480 (SAZD) localizada en villa Dolores una localidad cercana a la zona de colecta de estos individuos, el año 2008 fue un año más húmedo con una precipitación total acumulada anual de 952,46 mm comparado con los 744,43 mm computados para 2011

(http://www.tutiempo.net/clima/Dolores_Aerodrome/2008/876480.htm). Esto quizá influyó en la abundancia de presas y favoreció una mayor condición de los machos que optaron por una táctica de gran producción y poco almacenaje.

La concentración de esperma en la vesículas seminales aumenta de forma alométrica y positiva en *U. brachycentrus*, lo que sugiere que el volumen de las vesículas seminales crece de forma desproporcionada con respecto a la masa corporal y por ende individuos de mayor tamaño tendrán comparativamente vesículas seminales con un volumen desproporcionadamente mayor que las especies más pequeñas (Reiss, 1991; Eberhard, 2009).

Hasta aquí se ha dado una imagen general de lo que ocurre con las variables de producción espermática en sentido amplio. En los siguientes capítulos se utilizarán estas mismas variables para analizar el efecto que tendrían tanto el tamaño corporal como el riesgo de competencia espermática sobre las variables de producción, almacenamiento y transferencia de esperma, enfocado a nivel inter-específico y teniendo en cuenta las relaciones filogenéticas de los grupos analizados.

4 ANÁLISIS COMPARATIVO INTERESPECIFICO DE VARIABLES ESPERMÁTICAS Y SU RELACIÓN CON PATRONES DE ALOMETRÍA

4.1 INTRODUCCIÓN

Los análisis alométricos de sistemas de órganos reproductivos proveen una descripción matemática de los cambios relativos en tamaño de la estructura con respecto al tamaño del cuerpo (Woodall y Johnstone, 1988). Los análisis alométricos en general constan de dos variables relacionadas con el tamaño, una de las variables es en general un carácter morfológico de interés, pero puede también ser un carácter fisiológico o ecológico del organismo (Schmidt-Nielsen, 1984). La otra variable es una medida del tamaño corporal. Ambas medidas están correlacionadas y la ecuación alométrica tiene una forma potencial, con el valor de la variable predictora elevado al exponente beta (Reiss, 1991). Despejando el logaritmo de la ecuación se obtiene una ecuación logarítmica, lo cual permite linealizar la ecuación potencial y analizar la pendiente beta. El tipo de alometría que presenta el carácter analizado está en función de dicha pendiente. Así, con una pendiente de 1 se obtiene una relación alométrica que se denomina isometría, e indica que la estructura tiene el mismo tamaño proporcional en individuos de diferentes tamaños, o que la estructura y el cuerpo del animal crecen a la misma tasa. Por otro lado, (Eberhard, 2009) una pendiente mayor a 1, muestra alometría positiva, indicando que los individuos de mayor estructura corporal muestran caracteres más grandes comparado con los individuos más pequeños, el carácter crece a una tasa mayor que la estructura corporal. Así mismo, una pendiente menor a la unidad se denomina alometría negativa e indica que la estructura es desproporcionadamente mayor en individuos más pequeños, o que la estructura crece a una tasa menor que el cuerpo. No se debe confundirse este último tipo de alometría, con la alometría inversa, que hace referencia a una pendiente menor a la unidad y con un valor negativo (Reiss, 1991). Los caracteres que sufren selección sexual a menudo muestran una alometría positiva (Petrie, 1988, 1992; Green, 1992; Simmons y Tomkins, 1996; Knell et al., 2004) y muestran diferentes grados de variación fenotípica como resultado de la selección sexual direccional (Pomiankowski y Møller, 1995). Si bien la alometría positiva aparece en caracteres bajo selección sexual direccional, una excepción es la genitalia de insectos en donde frecuentemente se observa alometría negativa (Eberhard et al., 1998;

Hosken y Stockley, 2004). Otras estructuras corporales muestran valores que se aproximan a la unidad (Eberhard, 2009).

Dentro de los caracteres relacionados con la reproducción, los testículos son uno de los más estudiados después de la genitalia masculina. Se ha demostrado que en general los testículos de las diferentes especies varían tanto intra-específicamente como inter-específicamente. Esta variación puede estar ligada a un gran número de explicaciones e hipótesis dentro de las que se encuentran la competencia espermática y la tasa de cópula de los machos como las hipótesis más sugeridas (Vahed y Parker, 2012). Kenagy y Trombulak (1986) realizaron un detallado trabajo recopilando datos de una gran cantidad de mamíferos y analizando la relación alométrica entre la masa testicular y el tamaño del macho. En dicho trabajo, todos los mamíferos analizados juntos, mostraron un valor ligeramente inferior al de isometría y luego este patrón se reflejó nuevamente con diferentes grupos de los datos, exceptuando algunos pocos casos como el de los animales muy grandes.

En lo que respecta, no son comunes los trabajos que hablen del comportamiento alométrico de otros órganos reproductivos como por ejemplo vesículas seminales (u órganos equivalentes), ni tampoco análisis de volúmenes de transferencia de espermatozoides. En su lugar existen análisis de tamaños vesiculares absolutos y relativos y algunos pocos reportes de volumen de transferencia, sobre todo ligado a lo que el macho destina en eyaculado en relación con la estrategia reproductiva que muestre, denominado *sperm allocation*. Por el contrario, Los estudios de este tipo en donde se analizan el peso o el tamaño de los testículos son muy comunes en una gran variedad de organismos desde invertebrados hasta vertebrados.

El presente capítulo presenta un análisis interespecífico, en escorpiones de la familia Bothriuridae. El análisis de los órganos reproductivos masculinos en escorpiones es novedoso y no existen hasta el momento trabajos que muestren valores de estas estructuras. Lamentablemente no se han hecho avances en la descripción del tamaño o peso de los órganos de almacenamiento y transferencia ni de su relación con el tamaño. Para llevar a cabo este análisis se tomaron 8 especies emparentadas de escorpiones y se realizó una descripción de los valores de cada uno de los órganos analizados y luego se hizo un análisis de la relación de estos valores con los valores de tamaño corporal dentro de un marco filogenético.

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Generales

Analizar la producción, almacenamiento y transferencia de forma absoluta y relativa de esperma en sus respectivos órganos, su alometría y también la variabilidad espermática en especies seleccionadas de la familia Bothriuridae dentro de un marco filogenético.

4.2.2 Objetivos específicos

1. Describir los valores testiculares, de la vesícula seminal y de la cápsula del espermátforo en especies seleccionadas de la familia Bothriuridae;
2. Analizar la influencia del tamaño del organismo sobre cada órgano reproductivo y el tipo de crecimiento alométrico en estas especies;
3. Analizar el largo de los espermatozoides y su variabilidad en especies de la familia Bothriuridae;
4. Evaluar la relación entre los valores de cada uno de los órganos estudiados en estas especies de escorpiones.

4.3 MATERIALES Y METODOS

4.3.1 Especies analizadas

Se tomaron machos adultos de ocho especies de la familia Bothriuridae. Esta selección se hizo en base facilidad de colecta, ya que era necesario usar tejidos frescos para los análisis. Adicionalmente, la selección también tuvo en cuenta contar con una base previa de conocimiento de la biología reproductiva de ellas (Peretti, 1993, 2003, 2010); varias de ellas ya fueron utilizadas en estudios volcados en los capítulos anteriores. Los machos utilizados pertenecieron a las siguientes especies, citadas junto al sitio de colecta y al número de individuos analizados entre paréntesis: *Bothriurus bonariensis* Mendiola, Córdoba (N = 11); *Bothriurus cordubensis*, Villa Berna, Córdoba, (N = 6); *Bothriurus rochensis*, Piedras de Afilas, Montevideo, Uruguay, (N = 10); *Brachistosternus ferrugineus*, Reserva Provincial Chancaní, Córdoba, Argentina, Luz ultravioleta (N = 18); *Brachistosternus pentheri*, Reserva Provincial Chancaní, Córdoba, , (N = 6); *Timogenes dorbignyi*, Reserva provincial Chancaní, Córdoba (N=9); *Timogenes elegans*, Reserva Provincial Chancaní, Córdoba, (N = 19); *Urophonius brachycentrus*, Tanti, Córdoba, (N = 9). Todas las especies fueron capturadas en campañas de muestreo entre los años 2009 y 2012. En el laboratorio, los individuos se mantuvieron en recipientes de plástico individuales de 8 cm x 10 cm (Alto x diámetro) conteniendo un algodón húmedo como fuente de agua y se alimentaron con larvas de *Tenebrio molitor* (Insecta, Coleoptera) cada 15 días.

4.3.2 Variables registradas.

Se analizaron un total de siete variables: masa corporal, la masa testicular, el largo del espermatozoide, dos variables de variabilidad del largo del espermatozoide, una fué la variación intra-específica y la otra la variación inter-específica, el volumen de las vesículas seminales, el volumen potencial de la cápsula del espermátforo. Estas medidas serán nuevamente analizadas en el próximo capítulo. Además, se obtuvieron los valores de volumen testicular, peso de la vesícula seminal y peso del volumen de espermatozoides contenido en la cápsula del espermátforo, para así contar con medidas equivalentes en todos sitios del aparato reproductor. Los pesos de los órganos del aparato reproductivo y del volumen de la cápsula del espermátforo se obtuvieron en este capítulo para

poder tener medidas relativas a la masa corporal del macho y no fueron mayormente analizadas en el apartado anterior.

4.3.2.1 Obtención de la masa corporal

Para calcular la masa corporal de los machos, cada individuo fue primero sedado con éter etílico. Posteriormente, una vez inmóviles, los individuos eran pesados en una microbalanza (Ohaus Pioneer PA114) a una precisión de 0,0001 g. Finalmente, los machos fueron expuestos a una sobredosis de éter para sacrificarlos a los fines de extraer los órganos reproductivos.

4.3.2.2 Extracción y medición de los testículos

Para la obtención de la masa testicular y el volumen testicular en las especies analizadas en este capítulo, se siguieron los lineamientos metodológicos utilizados a los mismos fines en el Capítulo 3, apartado 3.3.2.1. Ambas variables están altamente correlacionadas ($R^2 = 0,96$, $F = 7139,28$, $p < 0,001$).

En el presente apartado se obtuvieron también valores relativos (relación masa testicular-corporal) para poder comparar entre especies de escorpiones y otros grupos de artrópodos. Luego de una exhaustiva revisión de la literatura existente, se decidió el uso de relaciones de tamaños expresadas como porcentajes. Básicamente, se utilizó el índice gonadosomático (GSI, por sus siglas en inglés) (Olsson y Madsen 1998). Este índice se obtiene de la siguiente manera y se expresa como porcentaje: $GSI = MG/MC \cdot 100$, en donde MG es la masa del órgano en cuestión y MC es la masa corporal. En el caso del testículo se expresó como índice testículo somático (TSI). Para el volumen testicular solo se obtuvieron valores absolutos y se analizó la relación entre ambas variables de testículo.

4.3.2.3 Extracción y medición de las vesículas seminales

El peso y el volumen de las vesículas seminales se obtuvieron según la metodología mencionada en el Capítulo 3, apartado 3.3.2.2. El volumen y la masa de la vesícula seminal se comportaron de manera muy similar ya que están correlacionadas entre sí ($R^2 = 0,77$, $F = 24,17$, $p = 0,0027$). Tal y como se procedió en el apartado anterior para los testículos. Ya obtenido el peso de la vesícula, se procedió a calcular el Índice Vesículo Somático (VSI) y el volumen vesicular fue tomado de forma absoluta.

4.3.2.4 Obtención y medición de Espermatozoides

4.3.2.4.1 Largo total del espermatozoide

Los paquetes espermáticos se obtuvieron siguiendo la metodología citada en el Capítulo 1, apartado 1.3.2. Luego, los preparados se realizaron, fotografiaron y midieron teniendo en cuenta el apartado 1.3.3. El largo total de los espermatozoides (le) en micrómetros, se midió de forma indirecta como el largo de los paquetes espermáticos. Primero se tomó un valor promedio de largo de paquete espermático por macho ($N = 10$ paquetes espermáticos por individuo analizado) y luego se tomó un valor medio por especie utilizando los valores cada macho analizado por especie. El paquete espermático resultó ser una medida confiable del largo de los espermatozoides y ambas medidas correlacionan entre sí (Peretti, 2010).

4.3.2.4.2 Análisis de variabilidad del largo del espermatozoide

Se realizó un análisis de la variabilidad del largo de los espermatozoides contenidos en el eyaculado de un mismo macho (“intra-individual”) y entre los eyaculados de diferentes machos (“inter-individual”), siguiendo los trabajos de Kleven et al. (2008), Lifjeld et al. (2010), Helfenstein et al. (2008) y Lüpold et al. (2009). Para obtener la variación del largo de espermatozoide intramacho (cvwm), se midieron 10 paquetes espermáticos en 10 individuos por especie. Con cada uno de los 10 valores de largo de paquete espermático se obtuvo un coeficiente de variación de la forma $CV = SD/Media$ del largo total del paquete. Se obtuvieron así 10 valores de coeficiente de variación (CV), uno por cada individuo analizado. El valor de la variabilidad intra-individual (cvwm) se obtuvo calculando un *promedio* de los 10 coeficientes de variación obtenidos a partir de los 10 machos analizados. En cambio, para obtener el valor de la variabilidad inter-individual, se calculó un *coeficiente de variación* con esos 10 valores de coeficiente de variación obtenido de los 10 machos que mencionamos al principio de este apartado.

4.3.2.5 Obtención y medición de la cápsula del espermatóforo

Estos datos se obtuvieron de espermatóforos conservados, en los cuales se tomaron medidas de área y ancho de la cápsula del espermatóforo para poder estimar un volumen de esperma que se almacena. Se tomaron, según disponibilidad, entre uno y tres machos de cada una de las ocho especies analizadas. Se obtuvieron así los pesos de la gota de esperma del espermatóforo mediante experiencias de laboratorio. En primer lugar el espermatóforo en su estado pre-inseminación era pesado, para luego, mediante acción manual (ver

ítem 2.3.2.4 del Capítulo 2), poder extraer el esperma que contenía. Una vez extraído el esperma, se pesaba nuevamente el espermatóforo. Se restaba así el peso antes de usar menos el peso después de usar, valor equivalente al peso del esperma contenido (pe) en aquél. Este valor de masa se utilizó para obtener el Índice Espermato Somático (ESI). Como los datos de espermatóforo frescos no estaban para todos los individuos a analizar como ocurre para *Timogenes*, se accionaron algunos espermatóforos conservados para obtener un estimativo del peso del volumen de esperma contenido.

4.3.3 Influencia del tamaño corporal. Evaluación del efecto alométrico y relaciones entre variables

Para analizar el efecto alométrico de la masa corporal como posible predictor de las masas de los testículos, vesículas seminales y cápsula del espermatóforo, así como del largo de los espermatozoides, todos los valores fueron transformados en \log_{10} para normalizar su distribución (Test de Normalidad de *Shapiro-Wilks*: \log_{10} masa corporal (lpm) $w = 0,9678$, $p = 0,8801$, lpt $w = 0,8888$, $p = 0,2282$, lvv $w = 0,9511$, $p = 0,7224$, lve $w = 0,9285$, $p = 0,5022$, lle $w = 0,8954$, $p = 0,2626$). Las variables correspondientes a los coeficientes de variación eran ya normales sin transformación (cvwm $w = 0,8493$, $p = 0,0936$; cvbm $w = 0,9066$, $p = 0,3304$). Luego se realizó una regresión lineal simple entre la variable respuesta y la masa corporal como predictor, obteniendo la ecuación logarítmica de la forma $\log_{10}(y) = \log_{10}(a) + b * \log_{10}(x)$. De esta ecuación logarítmica se obtuvo la relación alométrica (Harvey y Pagel, 1991), también llamada ecuación alométrica (Reiss, 1991), de la forma $y = a * x^b$, en donde la variable “y” es cualquiera de las cuatro variables respuesta, “a” es la ordenada al origen, “x” es el predictor (en el peso del macho), en tanto que “b” es la pendiente de la ecuación logarítmica y el coeficiente de alometría en la ecuación potencial.

Para evaluar relaciones entre las variables de producción, almacenamiento, y transferencia espermática se utilizó la masa testicular, el volumen vesicular y del espermatóforo. Se exploraron dos modelos: $lvv \sim lpt$, $lve \sim lpt + lvv$.

Teniendo en cuenta un posible efecto del reducido tamaño de la muestra, se utilizaron análisis de modelos lineales con permutaciones para corroborar la significancia de los modelos testeados, y ambos análisis (tanto el modelo lineal con mínimos cuadrados y el modelo lineal con permutaciones) arrojaron los mismos resultados.

4.3.4. Control filogenético

Las especies pueden compartir valores de caracteres como resultado de ancestría común en vez de evolucionar de forma independiente (Felsenstein, 1985; Harvey y Pagel, 1991). Debido a esta falta de independencia, las regresiones se realizaron usando cuadrados mínimos generalizados (GLS) (Kariya y Kurata, 2004) en un marco filogenético (pGLS) (Freckleton et al., 2002). Este método estima un parámetro escalar filogenético λ , que representa la transformación que hace que los datos encajen en un modelo evolutivo de movimiento Browniano. Si el valor de λ está cercano a 0, las variables tienen muchas chances de haber evolucionado independientemente de la filogenia, mientras que si los valores de λ son cercanos a 1 indica una fuerte asociación filogenética de las variables. Como ventaja, GLS permite un grado variable de control filogenético de acuerdo con cada modelo testeado, justificando las diferencias en el nivel de asociación filogenética entre rasgos diferentes. La estimación de los valores de λ y los análisis de GLS se realizaron utilizando un código escrito por R. Freckleton para el paquete de análisis estadístico R v.2.15.1 (R Core Group, 2012) y los valores de máxima verosimilitud de λ se compararon con modelos con $\lambda = 1$ y $\lambda = 0$. Al igual que en el Capítulo 1, la filogenia usada fue construida en base a diferentes hipótesis filogenéticas actuales disponibles para la familia Bothriuridae (Mattoni, 2003; Mattoni y Prendini, 2007), (Fig. 28). Los largos de las ramas se asumieron iguales, contemplando un modelo de evolución puntuado.

Como no se encontró un efecto filogenético en ninguno de los modelos analizados (los valores de λ de los análisis en ningún caso fueron estadísticamente cercanos ni a cero ni a uno), se tomaron los puntos como independientes y los resultados no difieren si son ejecutados con o sin control filogenético.

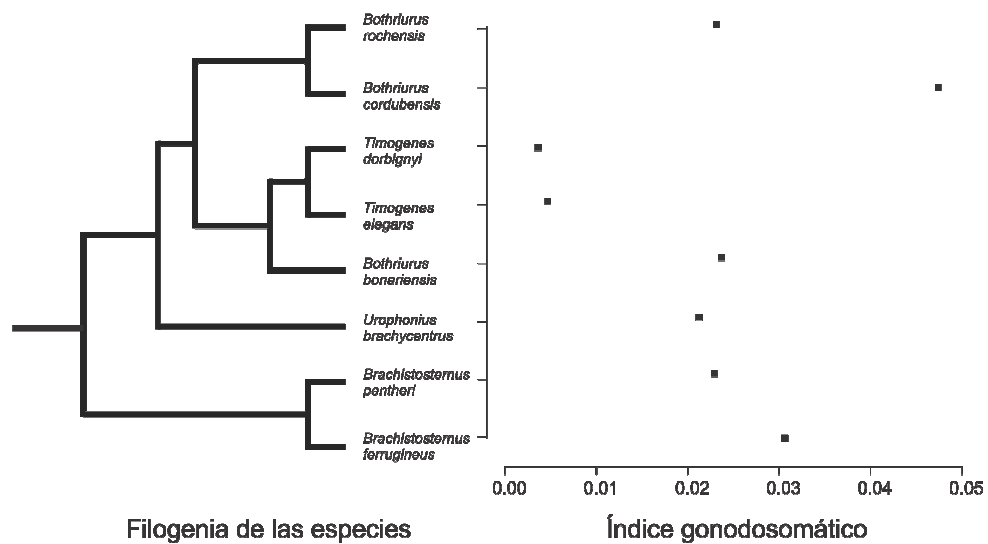


Fig. 28. Valores de índice gonodosomático en cada una de las especies que se encuentran agrupadas según la filogenia.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Análisis descriptivo y efecto alométrico

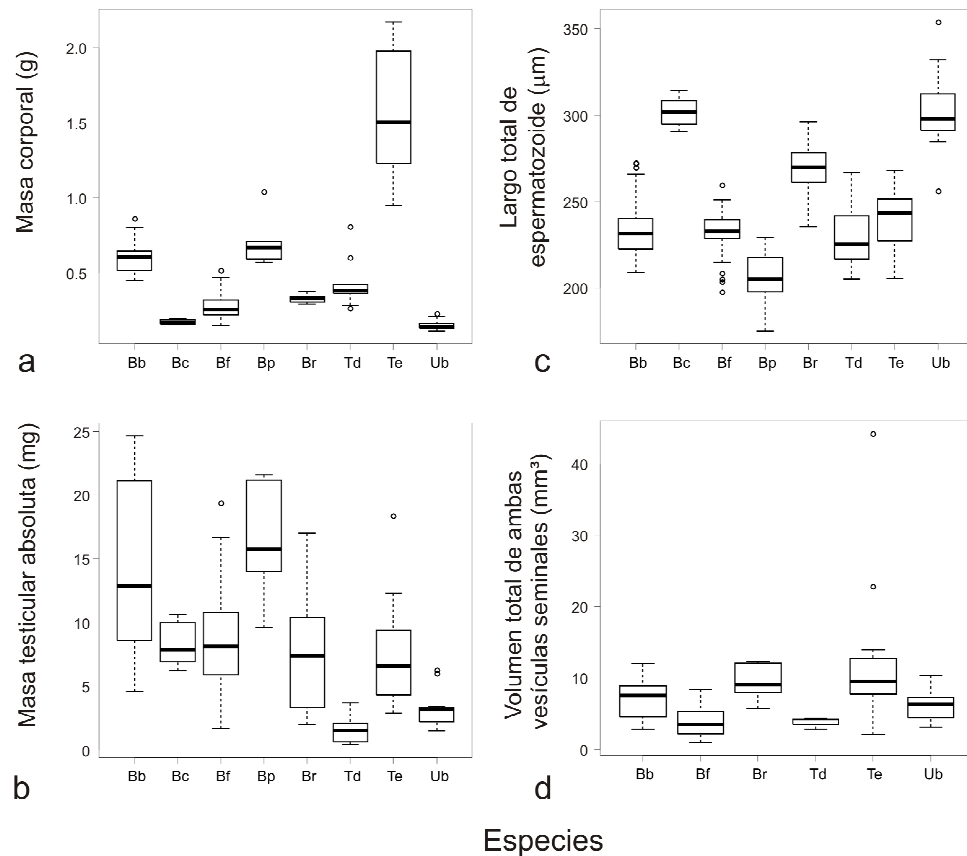
4.4.1.1 Análisis descriptivo de la masa testicular y relación alométrica

Los tamaños corporales de las especies analizadas muestran una gran variación interespecífica. La especie de mayor tamaño es *T. elegans* seguida por *B. bonariensis* y *Br. pantheri*. Las otras cinco especies tienen tamaños aproximadamente similares. Los datos están resumidos en la Fig. 29 a y la Tabla 15.

La masa testicular, tanto absoluta como relativa, varió marcadamente entre las especies (Tabla 15 a. absoluto y b. relativo; Fig. 28 relativo, Fig. 29 b absoluto). Hubo un orden de magnitud de diferencia entre la especie con el menor valor de masa testicular absoluta y la especie con mayor masa testicular absoluta ($1,6 \pm 1,1$ mg en *T. dorbignyi* y $16,30 \pm 4,5$ mg en *Br. pantheri*). El promedio de la masa testicular absoluta en el grupo de las ocho especies analizadas fue de $8,4 \pm 5,0$ mg. Dos de ellas mostraron una baja masa testicular absoluta (*T. dorbignyi* y *T. elegans*) y otras dos mostraron valores altos dentro del set de datos (*Br. pantheri* y *B. bonariensis*). El resto de las especies mostró valores medios. *U. brachycentrus*, la especie con tapón genital copulatorio, mostró una masa testicular de $3,2 \pm 1,4$ mg, el doble del valor de masa testicular encontrada en *T. dorbignyi*. *T. elegans*,

por su parte, tuvo una masa testicular absoluta realmente baja comparada con especies con tamaños corporales grandes como *B. bonariensis* o *Br. pentheri*. Así, tomando el índice testiculosomático, como medida relativa del testículo, se observó que *B. cordubensis* presentó una relación mayor entre la masa testicular y la masa corporal comparado con las otras especies (Fig. 28). Lo contrario sucedió en ambas especies de *Timogenes*, quienes mostraron un porcentaje bajo (Fig. 28, Tabla 15 c).

La relación existente entre la masa testicular y la masa corporal no fue significativa. En efecto, el coeficiente de alometría fue positivo y menor a 1, lo que podría indicar alometría negativa, pero ésta pendiente no difirió significativamente de cero (Fig. 30 a; Tabla 16). Tampoco hubo relación alométrica significativa entre el volumen testicular y la masa corporal ($F = 1,99$, $p = 0,21$).



000

Fig. 29. Valores medios sin transformar y desvíos de las variables analizadas en el análisis comparativo de las 8 especies analizadas en la familia Bothriuridae. a) Masa corporal (g); b) Masa testicular absoluta (g); c) Largo total de los espermatozoides (μm); d) Volumen total de las vesículas seminales (mm³).

Tabla 15 Cuadro general con todas las medidas tomadas para el análisis comparativo por especie en cada una de las 8 especies analizadas. La tabla fue dividida en tres (a-c) para facilitar la lectura y para poder mostrar su totalidad. La tabla a. muestra los valores de masa corporal, de órganos y estructuras junto al largo de los espermatozoides. La tabla b. muestra, similarmente, los valores de volumen. Por último, la tabla c. muestra valores relativos a la masa corporal de testículos, vesículas y del espermatozóforo, junto con los valores de variabilidad intra-macho (cvwm) e inter-macho (cvbm) del largo de los espermatozoides y el grado de poliandria de la especie resultado de un promedio de machos que aceptaron copular con las hembras durante la temporada reproductiva de cada especie. Los valores se muestran como media \pm desvío estándar, para los valores que fueron promediados de valores obtenidos en muchos individuos. El volumen del espermatozóforo en algunos casos fue estimado con un solo ejemplar por lo que solo se pusieron valores medios sin desvío.

Especies	Masa corporal (g)	Masa testicular (mg)	Masa vesicular total (mg)	Masa espermatozóforo (mg)	Largo espermatozoides (μ m)
<i>T. dorbignyi</i>	0,43 \pm 0,17	1,60 \pm 1,10	6,53 \pm 3,26	2,77	229 \pm 12
<i>T. elegans</i>	1,55 \pm 0,40	7,40 \pm 3,70	11,79 \pm 4,33	5,91	241 \pm 16
<i>U. brachycentrus</i>	0,15 \pm 0,03	3,20 \pm 1,40	9,81 \pm 3,77	3,36	301 \pm 9
<i>B. rochensis</i>	0,33 \pm 0,02	7,60 \pm 4,80	14,20 \pm 3,18	4,87	269 \pm 15
<i>B. bonariensis</i>	0,61 \pm 0,13	14,60 \pm 7,00	9,49 \pm 1,85	7,16	233 \pm 13
<i>Br. ferrugineus</i>	0,27 \pm 0,07	8,40 \pm 3,60	7,75 \pm 3,81	5,63	233 \pm 8
<i>Br. pentheri</i>	0,71 \pm 0,17	16,30 \pm 4,50	8,24 \pm 3,36	8,36	208 \pm 15
<i>B. cordubensis</i>	0,17 \pm 0,02	8,20 \pm 1,80	11,11 \pm 4,10	4,73	302 \pm 3

a

Especies	Volumen testicular (mm ³)	Volumen vesícula 1 (mm ³)	Volumen vesícula 2 (mm ³)	Volumen vesicular total (mm ³)	Volumen Espermatozóforo (mm ³)
<i>T. dorbignyi</i>	1,91 \pm 1,06	1,65 \pm 0,30	2,16 \pm 0,54	3,81 \pm 0,79	1,27
<i>T. elegans</i>	7,36 \pm 3,85	5,98 \pm 4,54	5,72 \pm 4,59	11,71 \pm 9,06	4,41
<i>U. brachycentrus</i>	3,42 \pm 1,29	4,24 \pm 2,51	2,36 \pm 1,57	6,17 \pm 2,28	1,86
<i>B. rochensis</i>	7,54 \pm 4,46	4,74 \pm 1,19	4,74 \pm 1,25	9,48 \pm 2,37	3,37
<i>B. bonariensis</i>	14,11 \pm 6,57	3,85 \pm 1,17	3,69 \pm 1,84	7,20 \pm 3,02	5,66
<i>Br. ferrugineus</i>	8,29 \pm 3,37	1,94 \pm 1,04	1,97 \pm 1,01	3,91 \pm 2,02	3,49
<i>Br. pentheri</i>	15,71 \pm 4,26	2,35 \pm 1,79	3,52 \pm 1,81	5,88 \pm 3,60	6,23
<i>B. cordubensis</i>	8,11 \pm 1,68	3,66 \pm 3,45	4,16 \pm 2,42	7,82 \pm 5,87	3,23

b

Especies	Testiculo-somatic index	vesiculo-somatic index	Espermato-somatic index	Cvwm	Cvbm	Poliandria
<i>T. dorbignyi</i>	0,37%	1,51%	0,64%	0,04	0,46	2,0
<i>T. elegans</i>	0,48%	0,76%	0,38%	0,02	0,37	1,5
<i>U. brachycentrus</i>	2,14%	6,55%	2,24%	0,05	0,26	1,0
<i>B. rochensis</i>	2,33%	4,35%	1,49%	0,03	0,07	2,5
<i>B. bonariensis</i>	2,38%	1,55%	1,17%	0,03	0,39	4,0
<i>Br. ferrugineus</i>	3,07%	2,83%	2,06%	0,03	0,36	2,5
<i>Br. pentheri</i>	2,30%	1,16%	1,18%	0,02	0,42	3,0
<i>B. cordubensis</i>	4,75%	6,44%	2,74%	0,02	0,18	2,5

c

4.4.1.2 Largo total de espermatozoides, variación y alometría

El valor del largo de los espermatozoides varió desde $208 \pm 15 \mu\text{m}$ en *Br. pentheri* a $302 \pm 3 \mu\text{m}$ en *B. cordubensis* (Fig. 29 c). *Urophonius brachycentrus* tuvo un valor muy cercano al de *B. cordubensis*; ambas presentaron los valores mayores de largo espermático dentro del set de datos. El resto de las especies mostró valores similares, oscilando entre 233 a 269 μm , aproximadamente.

La ecuación lineal logarítmica que se empleó para describir la relación alométrica entre el largo del espermatozoide y la masa corporal fue $\text{Log}_{10}(\text{le}) = 2,33 - 0,14 * \text{Log}_{10}(\text{pm})$ (Fig. 30 b). El coeficiente de alometría fue negativo, demostrando una alometría de tipo inversa (Tabla 16).

Los valores de variabilidad intra-macho fueron del 2,2% en *T. elegans* y el 4.5% en *U. brachycentrus*. Habiendo muchas de las especies que rondan el 2% (Tabla 15). *T. dorbignyi* mostró una variación ligeramente por debajo de *U. brachycentrus* (3.8%).

Los valores de variabilidad inter-macho, muestran que en *B. rochensis* la variación del largo total entre espermatozoides de diferentes machos es de un 7.2%, muy por debajo del nivel de variación de las demás especies, mientras que en *T. dorbignyi* es de un 46%, casi 7 veces mayor que el primero (Tabla 15). Comparando ambos niveles de variación (intra-macho e inter-macho), la variación entre machos es siempre mayor que dentro de un mismo macho, variando casi siempre en un orden de magnitud con excepción de *B. rochensis* (Tabla 15).

La relación con la masa corporal fue negativa para la variabilidad intra-macho, dando como resultado una alometría inversa (Fig. 30 c Tabla 16). La variabilidad

inter-macho, por su parte, no estuvo influenciada por la masa corporal de la especie (Fig. 30 d Tabla 16).

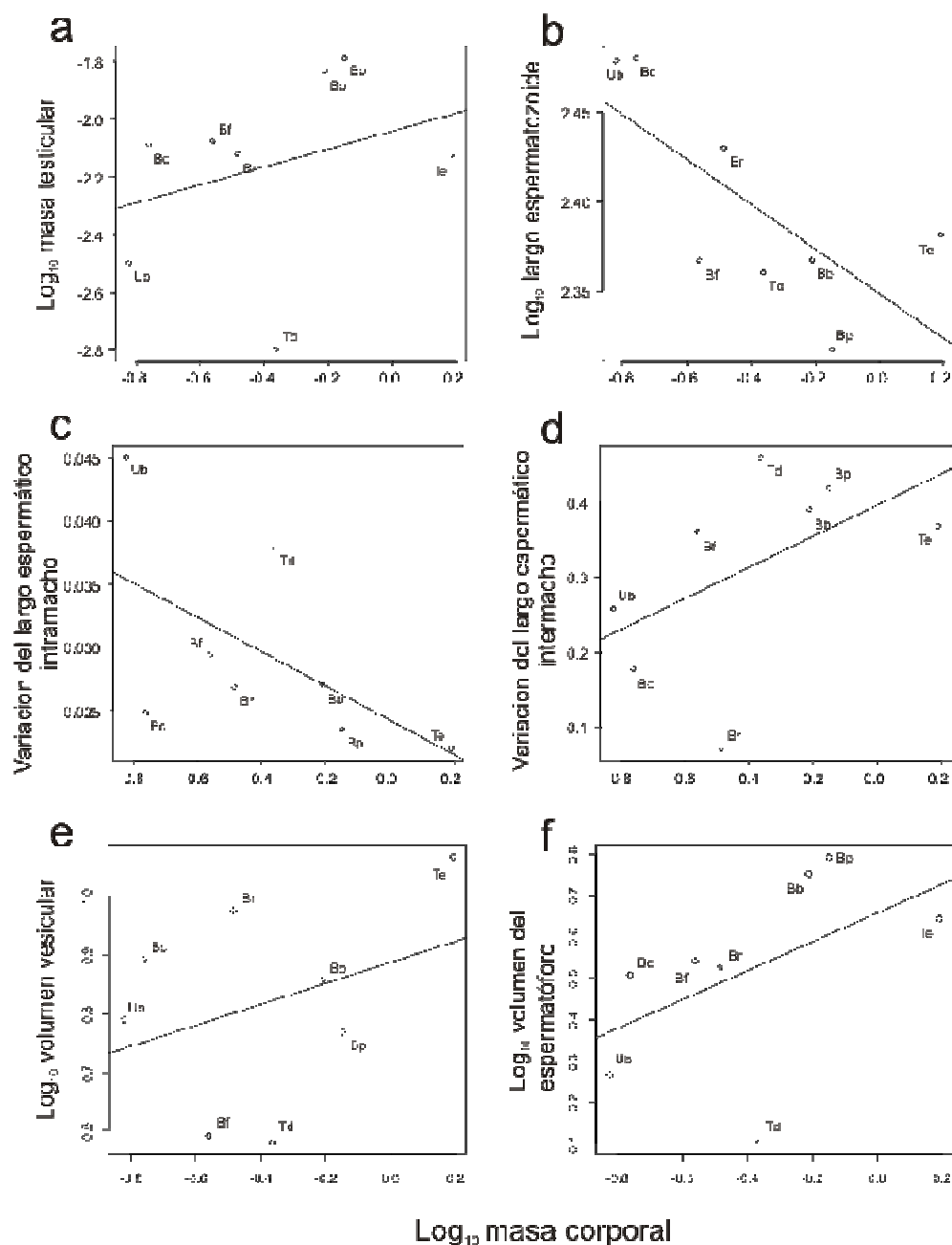


Fig. 30. Influencia de la masa corporal sobre diferentes variables analizadas. a) Log_{10} Masa testicular; b) Log_{10} largo del espermatozoide; c) Variación del largo del espermatozoide intra-macho; d) variación del largo del espermatozoide inter-macho; e) Log_{10} volumen vesicular; f) Log_{10} volumen del espermátforo.

Tabla 16 Análisis de las ecuaciones alométricas con las diferentes variables contempladas en el análisis. Abreviaturas: $\text{lpt} = \log_{10}$ peso testículo; $\text{lpm} = \log_{10}$ peso macho; $\text{lle} = \log_{10}$ largo espermatozoide; $\text{cvbm} =$ variación del largo del espermatozoide entre machos; $\text{cvwm} =$ variación del largo del espermatozoide dentro de los machos; $\text{lvv} = \log_{10}$ volumen vesicular; $\text{lve} = \log_{10}$ volumen espermatóforo.

Modelo	Pendiente	Error estandar	F-Value	λ ($\lambda=0$; $\lambda=1$)	Adj R2	n	p
$\text{lpt} \sim \text{lpm}$	0,4923	0,3484	1,9962	0,0235 xx	0,1246	8	0,2074
$\text{lvv} \sim \text{lpm}$	0,1800	0,1801	0,9993	0,3427 xx	-0,0001	8	0,3561
$\text{lve} \sim \text{lpm}$	0,4518	0,2201	4,2151	0,0001 xx	0,3147	8	0,0859
$\text{lle} \sim \text{lpm}$	-0,1373	0,0465	8,7250	0,5456 xx	0,5246	8	0,0255
$\text{cvwm} \sim \text{lpm}$	-0,0196	0,0073	7,2276	0,9853 xx	0,4708	8	0,0361
$\text{cvbm} \sim \text{lpm}$	0,2066	0,1261	2,6837	0,0001 xx	0,1939	8	0,1525

4.4.2 Volumen vesicular y volumen del espermatóforo: descripción y crecimiento alométrico

4.4.2.1 Volumen vesicular

En todas las especies los volúmenes de ambas vesículas seminales no variaron significativamente (Tabla 15, Fig. 31), como lo muestra el test realizado con las ocho especies (Test de rangos de Wilcoxon $V = 9$, $p = 0,79$). Los valores de volumen absoluto, integrando ambas vesículas, varió notablemente entre las especies. Por ejemplo, de $3,91 \pm 2,02 \text{ mm}^3$ en *B. ferrugineus* a $11,71 \pm 9,06 \text{ mm}^3$ en *T. elegans*, lo que equivale aproximadamente a un incremento de 3 veces. Considerando juntas a todas las especies, el volumen absoluto promedio fue de $10,38 \pm 7,11 \text{ mm}^3$. El valor en *U. brachycentrus* estuvo cercano al de *B. bonariensis* (Fig. 29 d). Los valores relativos muestran que la vesícula seminal de *T. elegans* es comparativamente muy pequeña al resto pero no tan distante de *Br. pentheri*, *T. dorbignyi* y *B. bonariensis* (VSI, Tabla 15). En tanto que los valores mayores se muestran en *U. brachycentrus* y *B. cordubensis*. Estos valores están resumidos en el Tabla 15.

Cuando se analiza la relación alométrica de la vesícula seminal, se obtuvo una pendiente de 0,18, es decir alometría negativa con un exponente menor a uno. Sin embargo, Como ocurrió anteriormente con la ecuación alométrica de la masa testicular, el modelo no fue estadísticamente significativo (Tabla 16).

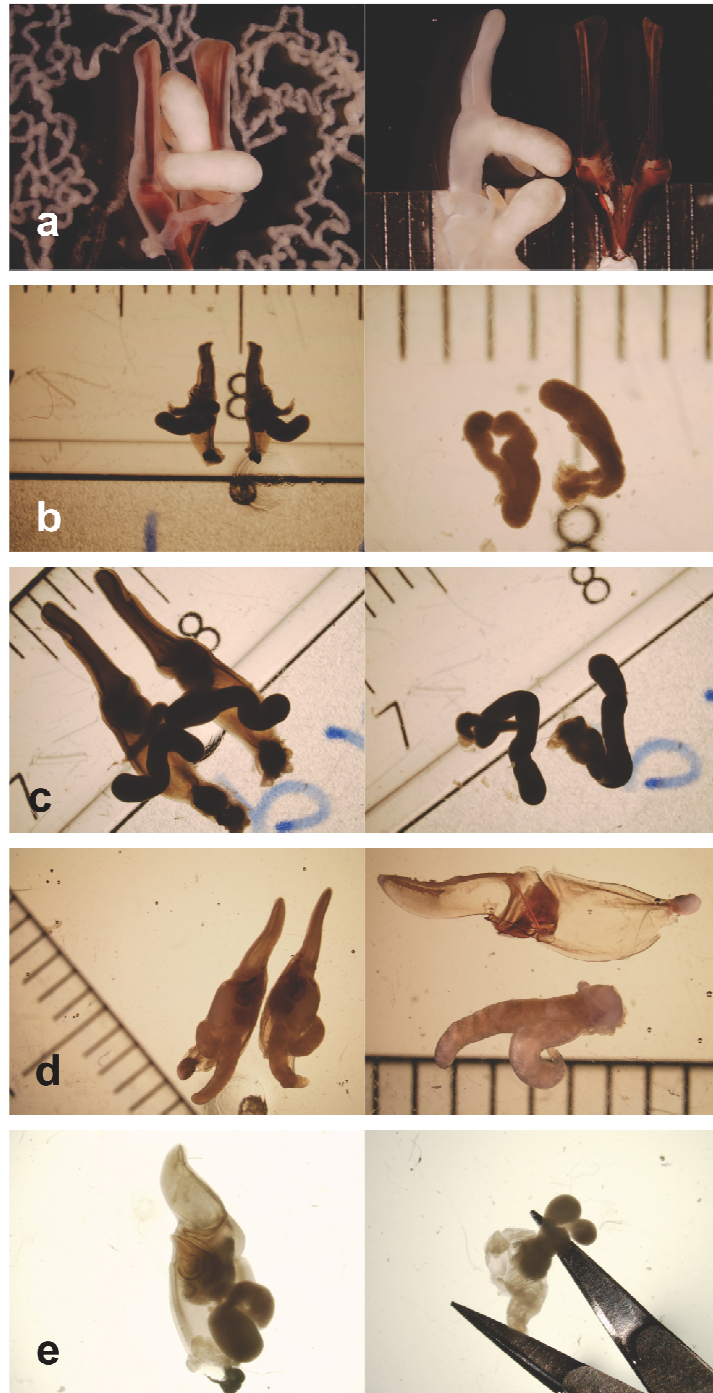


Fig. 31. Muestra de la morfología de las vesículas seminales en algunas de las especies analizadas de la familia Bothriuridae. a) *Bothriurus bonariensis*; b) *Timogenes dorbignyi*; c) *Timogenes elegans*; d) *Brachistosternus ferrugineus*; e) *Urophonius brachycentrus*. Las imágenes de la derecha muestran las vesículas seminales fuera del hermiespermatóforo.

4.4.2.2 Volumen del espermatóforo

La capacidad de almacenamiento volumétrica total del espermatóforo mostró variación entre las especies (Tabla 15). Como vimos en el capítulo anterior, este volumen puede ser tomado como un estimativo del volumen transferido a la hembra. Los valores oscilaron entre 1 y 6 mm³. Los valores mayores se observaron en *T. elegans* y *B. bonariensis*, especies con masas corporales mayores. Por el contrario, los valores pequeños se registraron en *T. dorbignyi* y *U. brachycentrus*, especies con masas corporales menores. Las relaciones se mantuvieron cuando se tomó el valor de volumen relativo al tamaño del cuerpo del macho, la única especie que cambió de posición fue *T. elegans* que pasó a formar parte del lote de las especies que mostraron volúmenes menores de cápsula junto a *T. dorbignyi* y *U. brachycentrus*. La especie que más transfiere, tanto absoluta como relativamente, es *B. bonariensis*, una de las especies más poliándricas del análisis (ver siguiente capítulo). El efecto de la masa corporal sobre el volumen del espermatóforo fue marginalmente no significativo en el modelo usado, con un exponente alométrico de 0,45 (Tabla 16).

4.4.3 Síntesis comparativa de la secuencia integral de producción espermática y relación entre los diferentes sitios ligados a la reproducción

Las figuras Fig. 32 y Fig. 33 resumen la ruta de producción, almacenamiento y transferencia en las especies analizadas de Bothriuridae, destacando la gran heterogeneidad en los patrones observados. En primer término se observan los valores absolutos de volumen (Fig. 32). Aquí se observa que en *Timogenes* y *U. brachycentrus* los volúmenes absolutos de cada sitio son similares a los correspondientes a los respectivos índices relativos (Fig. 32 a). *Bothriurus rochensis* y *B. cordubensis* tienen volúmenes altos de producción y almacenamiento y un volumen bajo de transferencia (Fig. 32 a). Por último, *B. bonariensis*, *Br. ferrugineus* y *Br. pentheri* tienen volúmenes altos de producción y bajos de almacenamiento y transferencia (Fig. 32 a). Comparativamente entre las especies se observa que el volumen testicular es mayor en *B. bonariensis* y *Br. pentheri* y menor en *T. dorbignyi* y *U. brachycentrus* (Fig. 32 b). Así mismo, el volumen de las vesículas seminales es mayor en *T. elegans* comparativamente al resto de las especies y es bajo en *T. dorbignyi* y *Br. ferrugineus* (Fig. 31 b). Por

último, los valores del volumen del espermatóforo fluctúan menos que los dos sitios anteriores pero es mayor en *T. elegans*, *B. bonariensis* y *Br. pentheri*, mientras que el menor valor se encuentra en *T. dorbignyi* seguido de *U. brachycentrus* (Fig. 32 b).

En la Figura Fig. 33 se muestran los valores relativos a la masa corporal del macho de cada una de las tres estructuras. Se observa que en cuanto al valor relativo de las estructuras (Fig. 33 a), ambos *T. dorbignyi*, *B. rochensis*, *B. cordubensis* y *U. brachycentrus*, producen y destinan poco a la transferencia, pero almacenan mucho. *U. brachycentrus* y *T. dorbignyi* poseen valores similares para la producción y transferencia, mientras que en *B. cordubensis* y *B. rochensis* los valores de transferencia son mas bajos que los de producción. *Timogenes elegans*, por su parte, muestra valores porcentuales similares en las tres estructuras, por lo que tanto la producción, el almacenamiento y la transferencia de espermatozoides se destacan como baja para esta especie. Del resto de las especies, *B. bonariensis* y *Br. pentheri* tienen el mismo patrón de producir mucho y almacenar y destinar poco a la transferencia. *Br. ferrugineus*, por su parte, produce y almacena mucho pero destina poco a cada espermatozoides. Realizando el análisis entre especies se observa que el valor relativo del testículo es considerablemente menor en las especies de *Timogenes* y es mayor en *B. bonariensis* (Fig. 33 b). Un patrón similar pero no tan marcado siguen los valores relativos del espermatóforo (Fig. 33 b). Comparativamente las diferencias son mas marcadas en los valores de las vesículas seminales (Fig. 33 b). Los valores fueron notablemente altos en *B. bonariensis* y *U. brachycentrus* y en menor medida en *Br. ferrugineus* (Fig. 33 b). Los valores mas bajos estuvieron nuevamente en las especies de *Timogenes* y *B. cordubensis* y *B. rochensis*. (Fig. 33 b).

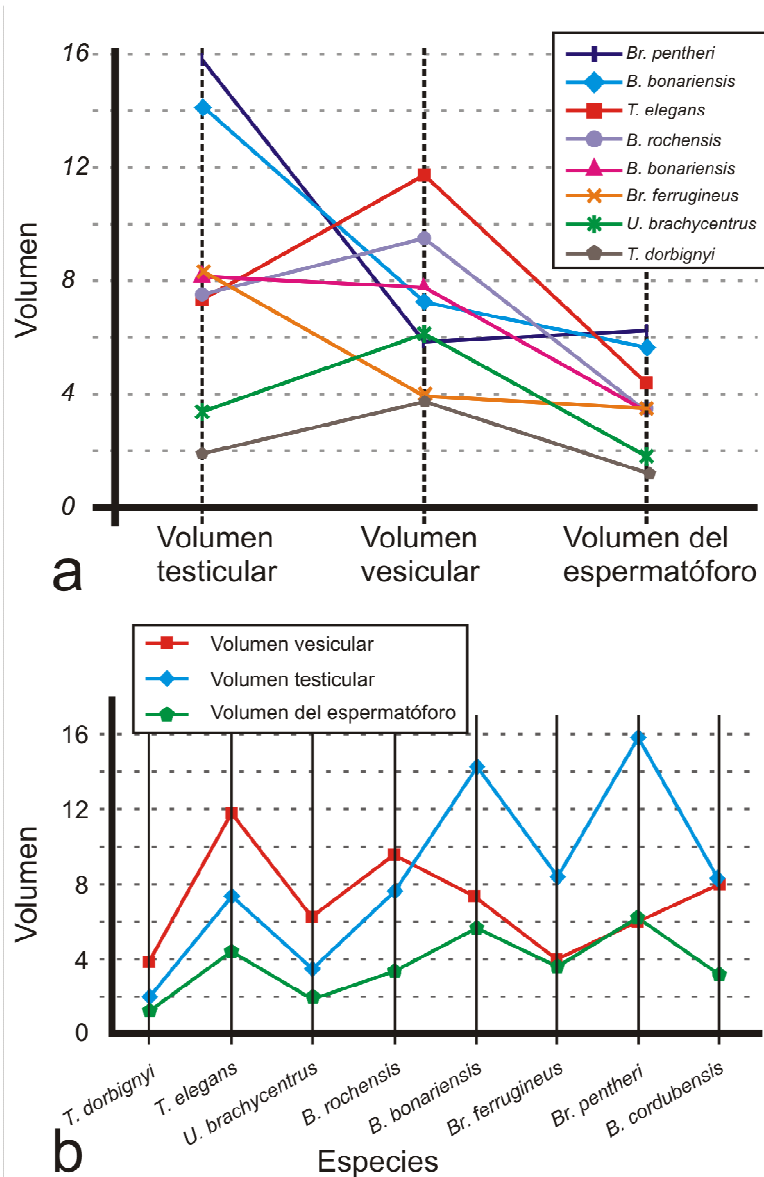


Fig. 32. Comparacion de volúmenes absolutos de los sitios vinculados a la ruta espermatica. a) Comparacion entre la producción almacenamiento y transferencia de esperma dentro de cada una de las especies analizadas. Aquí se observa dos posibles estrategias, una en donde se almacena mucho con valores de producción y transferencia bajos como el caso de *T. elegans*, y otra en donde se produce mucho y los valores de almacen y transferencia están por debajo del de producción. b) comparación de los volúmenes de los testículos las vesículas seminales y el espermátforo entre especies.

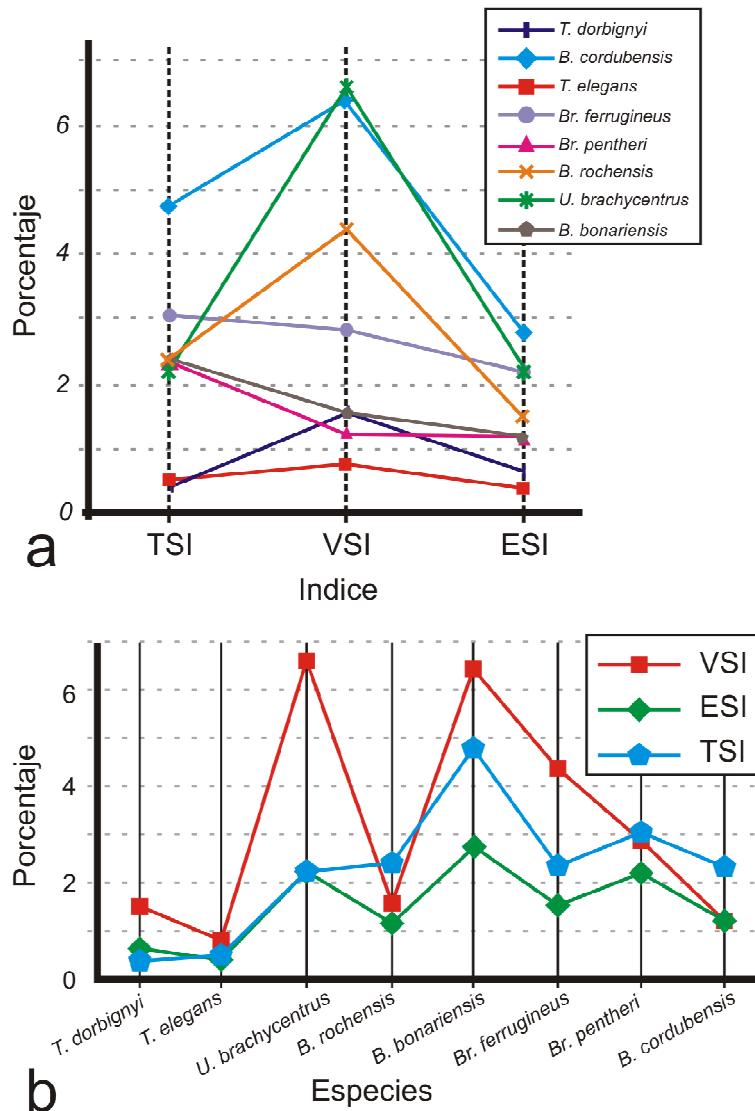


Fig. 33. Comparacion de valores testiculares, vesiculares y del espermatóforo, relativos a la masa corporal. a) Indices relativos en testículo (TSI), vesícula seminal (VSI) y espermatóforo (ESI) en cada una de las especies analizadas. b) Comparacion de los valores de cada índice entre las especies analizadas.

4.4.4 Relación entre órganos reproductivos

Los valores de los parámetros del análisis de relación entre los diferentes sitios destinados a la producción integral de espermatozoides están resumidos en la Tabla 17. Se aprecia que el volumen vesicular no se ve influenciado por el peso testicular. Por el contrario, el volumen del espermatóforo se ve influenciado de manera positiva por la masa testicular pero no existe un efecto del volumen vesicular.

Tabla 17: Evaluación de los diferentes modelos en donde se relacionan la masa testicular, el volumen vesicular y el volumen del espermatóforo. λ estadístico lambda y

probabilidades de ser igual a cero o igual a uno, y los valores de significancia se denotan de la siguiente manera: λ Significativo: (x). Abreviaturas: lpt = \log_{10} peso testículo; lvv = \log_{10} volumen vesicular; lve = \log_{10} volumen espermátforo.

Modelo	Pendiente	Error estandar	F-Value	λ ($\lambda=0$; $\lambda=1$)	Adj R ²	n	p
lvv ~				0,9999 xx	0,5091	8	
lpt	-1,1528	0,8855	6,2903				0,2497
lve ~				0,9999 xx	0,9777	8	
lpt	0,6700	0,0561	306,5151				0,0001
lvv	0,1816	0,1054	2,9691				0,1455

4.5 DISCUSIÓN

Al igual que lo reportado para varios grupos de insectos (Simmons y Siva-Jothy, 1998; Simmons, 2001), los resultados en escorpiones revelan una amplia variabilidad entre las respectivas masas testiculares. Entre los extremos de peso testicular existió una variación de aproximadamente un 10%. Esta magnitud en la variación de la masa testicular ha sido descripta ampliamente en otros artrópodos (resumido en la Tabla 18). Se aprecia que las especies de *Timogenes* se ubican dentro de los organismos con valores relativos bajos (menos del 1% de GSI). Sin embargo, este valor es dos veces mayor al de la especie que presenta menor valor de GSI de la tabla (*Syngnathys typhle*, Vertebrata, Pisces). *Urophonius brachycentrus*, *Br. pentheri*, *B. rochensis*, *B. bonariensis* mostraron GSI de alrededor de 2%, valor similar al de coleópteros del género *Onthophagus* y de algunos murciélagos y peces. *Br. ferrugineus*, en tanto, se localiza en una posición media de la tabla, alrededor del 3%, junto a diferentes especies de insectos. Por último, *B. cordubensis* se posiciona cerca de especies de *Drosophila*, aunque lejos de especies con testículos gigantes (ej. *Platycleis affinis*, Tettigoniidae - casi 3 veces mayor).

Si bien el análisis de alometría testicular arrojó cierta tendencia hacia valores negativos (valores de beta positivos e inferiores a la unidad), estos no resultaron significativos, por lo que se concluye entonces que no hay influencia de la masa corporal sobre la masa gonadal. En otros grupos animales se ha detectado una clara influencia de la masa y/o tamaño corporal sobre la masa testicular. Por ejemplo, en insectos destaca el trabajo de Gage (1994) en Lepidoptera, en donde se ve una clara relación alométrica de tipo positiva. Este mismo tipo de relación entre ambas variables se encontró en especies de *Drosophila* (Pitnick, 1996). Wedell y Hosken (2010), sugieren que esta relación está lejos de ser universal en insectos, y que de hecho a menudo no existe una relación entre ambas variables

(ej. Presgraves et al. 1999; Minder et al. 2005), tal y como se encontró para escorpiones. Un gran número de investigaciones sugieren que en general las pendientes alométricas suelen ser más inclinadas en análisis intra-específicos que en los mismos a nivel inter-específicos (Gould, 1975a; Clutton-Brock y Harvey, 1979; Feldman y McMahon, 1983; Reiss, 1991). En nuestro caso el patrón se observa pero no existiendo relación a nivel inter-específico. Así, la relación fue isométrica, con una pendiente igual a 1 en el análisis intra-específico del Capítulo 3, pero no fueron diferentes de cero en el análisis inter-específico. Reiss (1991) argumenta que este tipo de relación, en donde la pendiente inter-específica es menor a la intra-específica, es posible y cita un ejemplo sobre la cantidad de energía que la hembra destina a la reproducción en función del tamaño corporal en peces. Se puede sugerir que la ausencia de significancia estadística en el análisis alométrico realizado en escorpiones podría estar dada por la poca cantidad de puntos analizados, pero los análisis de permutaciones sugeridos para muestras pequeñas arrojaron los mismos resultados. Así mismo, sería importante a futuro sumar otras especies para reafirmar el patrón visualizado.

Los valores de largo del espermatozoide no varían mucho. Se destacan, en particular, los largos totales en *B. cordubensis* y *U. brachycentrus*. En promedio los valores aquí registrados son similares a los citados para otras especies de escorpiones (Jespersen y Hartwick, 1973; Vignoli et al., 2008; Michalik y Mercati, 2009). Morrow y Gage. (2000) muestran la variación que puede existir entre los dos tipos de espermatozoides que contienen eupyrene 110-12675 μm , apyrene 106-883 μm . Comparativamente, los valores de largo total pueden ser mucho mayores a los aquí observados en escorpiones (también referirse al Capítulo 1 para otras especies de escorpiones). Lo mismo ocurre, incluso de forma más marcada, al comparar con los valores reportados por Pitnick (1996) en especies de *Drosophila*. En efecto, son valores cercanos a los 15000 μm contra las 300 micras observadas en escorpiones. Por el contrario los largo total de espermatozoides de los escorpiones, ligeramente superiores a los registrado en escarabajos, entre 160 y 220 μm (Baer et al. 2003). En vertebrados se observaron valores mucho menores que en escorpiones, por ejemplo en diversas aves (Johnson y Briskie, 1999), serpientes (Tourmente et al., 2009) y en mamíferos (Cummins y Woodall, 1985). Sin embargo, cabe señalar que entre los mamíferos existe una variación muy amplia, la que puede ser de hasta 12 órdenes de magnitud (Gage 1998).

Tabla 18 Cuadro que resume los datos de diferentes fuentes comparando el índice gonadosomático (GSI) en diferentes especies. Los valores son comparados con las especies analizadas en este trabajo y aparecen en negrita.

Organismo	Grupo	GSI
<i>Syngnathys typhle</i>	Vertebrados Peces	0,0015
<i>Epomops buettikoferi</i>	Vertebrados mamíferos murciélagos	0,0019
<i>S murinus</i>	Vertebrados mamíferos musarañas	0,0023
Fam Syngnatidae	Vertebrados Peces	0,0025
<i>C russula</i>	Vertebrados mamíferos musarañas	0,0030
<i>Ictalurus punctatus</i>	Vertebrados Peces	0,0030
<i>Zebra finch</i>	Vertebrados aves	0,0031
<i>Sus scrofa scrofa</i>	Vertebrados mammals	0,0031
T. dorbignyi	Invertebrados arácnidos escorpiones	0,0037
<i>Tilapia zilli</i>	Vertebrados Peces	0,0040
<i>Pteropus tonganus</i>	Vertebrados mamíferos murciélagos	0,0045
<i>Oreochromis niloticus</i>	Vertebrados Peces	0,0045
<i>Symphodus melanocercus</i>	Vertebrados Peces	0,0046
<i>Boa constrictor occidentalis</i>	Vertebrados serpientes	0,0047
<i>Bothrops alternatus</i>	Vertebrados serpientes	0,0047
T. elegans	Invertebrados arácnidos escorpiones	0,0048
<i>Bothrops diporus</i>	Vertebrados serpientes	0,0052
<i>Tridentiger trigonacephalus</i>	Vertebrados Peces	0,0055
<i>Acerodon mackloti</i>	Vertebrados mamíferos murciélagos	0,0063
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Vertebrados Peces	0,0063
<i>Pteropus alecto</i>	Vertebrados mamíferos murciélagos	0,0064
<i>Micropteropus pusillus</i>	Vertebrados mamíferos murciélagos	0,0071
<i>Tracurus mediterraneus</i>	Vertebrados Peces	0,0072
<i>Dobsonia peroni</i>	Vertebrados mamíferos murciélagos	0,0073
<i>Rousettus amplexicaudatus</i>	Vertebrados mamíferos murciélagos	0,0081
<i>Pteropus giganteus</i>	Vertebrados mamíferos murciélagos	0,0082
<i>Gampsocleis glabra</i>	Invertebrados insectos tetigónidos	0,0099
<i>Pteropus poliocephalus</i>	Vertebrados mamíferos murciélagos	0,0100
<i>Liza parsia</i>	Vertebrados Peces	0,0100
<i>Eucalia insonstans</i>	Vertebrados Peces	0,0100
<i>Lepomis marochirus</i>	Vertebrados Peces	0,0100
<i>Cynopterus sphinx</i>	Vertebrados mamíferos murciélagos	0,0103
<i>Ephippiger ephippiger</i>	Invertebrados insectos tetigónidos	0,0106
<i>Epomophorus anurus</i>	Vertebrados mamíferos murciélagos	0,0113
<i>Pteropus oeticus</i>	Vertebrados mamíferos murciélagos	0,0117
<i>Pteropus scapulatus</i>	Vertebrados mamíferos murciélagos	0,0133
<i>Eonucteris spelaea</i>	Vertebrados mamíferos murciélagos	0,0133
<i>Tripterygion delaisi</i>	Vertebrados Peces	0,0134
<i>Macroglossus sobrinus</i>	Vertebrados mamíferos murciélagos	0,0138
<i>Steropleurus stali</i>	Invertebrados insectos tetigónidos	0,0144
<i>N fodiens</i>	Vertebrados mamíferos musarañas	0,0150
<i>Coregonus peled</i>	Vertebrados Peces	0,0150

Organismo	Grupo	GSI
<i>S araneus</i>	Vertebrados mamíferos musarañas	0,0156
<i>Metrioptera roeselii</i>	Invertebrados insectos tetigónidos	0,0157
<i>O sloanei</i>	Invertebrados insectos coleóptera	0,0158
<i>Red billed quelea</i>	Vertebrados aves	0,0158
<i>Symphodus tinca</i>	Vertebrados Peces	0,0169
<i>Eidolon helvum</i>	Vertebrados mamíferos murciélagos	0,0169
<i>Drosophila micromelanica</i>	Invertebrados insectos dípteros	0,0173
<i>Liophis poecilogyus</i>	Vertebrados serpientes	0,0177
<i>Umbra limi</i>	Vertebrados Peces	0,0180
<i>Macroglossus minimus</i>	Vertebrados mamíferos murciélagos	0,0181
<i>Esox lucius</i>	Vertebrados Peces	0,0200
<i>Tilapia galilaea</i>	Vertebrados Peces	0,0200
U. brachycentrus	Invertebrados arácnidos escorpiones	0,0214
<i>O nuchicornis</i>	Invertebrados insectos coleóptera	0,0218
<i>O auruginosis</i>	Invertebrados insectos coleóptera	0,0224
Br.pentheri	Invertebrados arácnidos escorpiones	0,0230
B. rochensis	Invertebrados arácnidos escorpiones	0,0233
B. bonariensis	Invertebrados arácnidos escorpiones	0,0238
<i>Rousettus aegyptiacus</i>	Vertebrados mamíferos murciélagos	0,0246
<i>O nodulifer</i>	Invertebrados insectos coleóptera	0,0247
<i>O haagi</i>	Invertebrados insectos coleóptera	0,0251
<i>Onthophagus alcyonides</i>	Invertebrados insectos coleóptera	0,0253
<i>O binodis</i>	Invertebrados insectos coleóptera	0,0257
<i>Poecilimon veluchianus</i>	Invertebrados insectos tetigónidos	0,0264
<i>O gazella</i>	Invertebrados insectos coleóptera	0,0267
<i>Tripterygion tripteronotus</i>	Vertebrados Peces	0,0267
<i>Oreochromis aureus</i>	Vertebrados Peces	0,0270
<i>O nigriventris</i>	Invertebrados insectos coleóptera	0,0280
<i>O cribripennis</i>	Invertebrados insectos coleóptera	0,0286
<i>O hecate</i>	Invertebrados insectos coleóptera	0,0299
<i>Poecilimon affinis</i>	Invertebrados insectos tetigónidos	0,0300
<i>O australis</i>	Invertebrados insectos coleóptera	0,0302
Br. ferrugineus	Invertebrados arácnidos escorpiones	0,0307
<i>O vermiculatus</i>	Invertebrados insectos coleóptera	0,0307
<i>O taurus</i>	Invertebrados insectos coleóptera	0,0322
<i>Antaxius pedestris</i>	Invertebrados insectos tetigónidos	0,0332
<i>Tettigonia viridissima</i>	Invertebrados insectos tetigónidos	0,0337
<i>Pholidoptera griseoptera</i>	Invertebrados insectos tetigónidos	0,0339
<i>Metrioptera brachyptera</i>	Invertebrados insectos tetigónidos	0,0340
<i>Symphodus roissali</i>	Vertebrados Peces	0,0346
<i>Eupholidoptera chabrieri</i>	Invertebrados insectos tetigónidos	0,0347
<i>O fuliginosus</i>	Invertebrados insectos coleóptera	0,0356
<i>Drosophila melanica</i>	Invertebrados insectos dípteros	0,0356
<i>Drosophila wassermani</i>	Invertebrados insectos dípteros	0,0362
<i>Anonconotus alpinus alpinus</i>	Invertebrados insectos tetigónidos	0,0372

Organismo	Grupo	GSI
<i>O rupicapra</i>	Invertebrados insectos coleóptera	0,0397
<i>Drosophila nanoptera</i>	Invertebrados insectos dípteros	0,0402
<i>Waglerophis merremii</i>	Vertebrados serpientes	0,0409
<i>Decticus verrucivorus</i>	Invertebrados insectos tetigónidos	0,0438
<i>Yersinella raymondi</i>	Invertebrados insectos tetigónidos	0,0446
<i>Haplonycteris fischeri</i>	Vertebrados mamíferos murciélagos	0,0450
<i>Drosophila acanthoptera</i>	Invertebrados insectos dípteros	0,0453
<i>Platycleis albopunctata</i>	Invertebrados insectos tetigónidos	0,0459
<i>B. cordubensis</i>	Invertebrados arácnidos escorpiones	0,0475
<i>Drosophila melanogaster</i>	Invertebrados insectos dípteros	0,0505
<i>Metrioptera saussuriana</i>	Invertebrados insectos tetigónidos	0,0519
<i>Perca flavescens</i>	Vertebrados Peces	0,0560
<i>Drosophila mojavenensis</i>	Invertebrados insectos dípteros	0,0584
<i>Salmo trutta</i>	Vertebrados Peces	0,0600
<i>Menidia beryllina</i>	Vertebrados Peces	0,0610
<i>Anonconotus baracunensis</i>	Invertebrados insectos tetigónidos	0,0649
<i>Anonconotus pusillus</i>	Invertebrados insectos tetigónidos	0,0694
<i>Cyprinus carpio</i>	Vertebrados Peces	0,0700
<i>Anonconotus ghilianii</i>	Invertebrados insectos tetigónidos	0,0792
<i>Drosophila pachea</i>	Invertebrados insectos dípteros	0,0858
<i>Drosophila hydei</i>	Invertebrados insectos dípteros	0,0938
<i>Drosophila eohydei</i>	Invertebrados insectos dípteros	0,0941
<i>Salmo gairdneri</i>	Vertebrados Peces	0,1000
<i>Drosophila bifurca</i>	Invertebrados insectos dípteros	0,1060
<i>Mugil cephalus</i>	Vertebrados Peces	0,1200
<i>Sepiana sepium</i>	Invertebrados insectos tetigónidos	0,1353
<i>Platycleis affinis</i>	Invertebrados insectos tetigónidos	0,1376

Al contrario de lo que ocurrió con la masa testicular, el análisis de la influencia del tamaño corporal sobre el largo total del espermatozoide mostró un efecto negativo y significativo. Esto sugeriría que machos de mayor tamaño tendrían espermatozoides de menor tamaño, en tanto que machos más pequeños presentarían, en términos relativos, espermatozoides más grandes. Cummins (1982) encontró una relación similar en mamíferos pero no dio una explicación satisfactoria al fenómeno. Pitnick (1996) sugiere que sería común en vertebrados que no exista efecto del tamaño corporal sobre el largo del espermatozoide o bien que la relación sea negativa, tal como se observó en escorpiones. En un análisis realizado en un gran cantidad de especies de mamíferos se encontró que la masa corporal no influenció el largo total del espermatozoide y componentes del espermatozoide, debido principalmente a restricciones de las tasas metabólicas (Gomendio et al., 2011; Tourmente et al., 2011). Cummins y Woodall (1985) encontraron un patrón negativo entre el tamaño corporal y el largo del espermatozoide para mamíferos. En serpientes, Tourmente et al. (2009) encontraron también una asociación negativa entre masa corporal y el largo de la pieza media, pero la relación negativa entre la masa corporal y el largo total del espermatozoide no fue significativa en las especies de serpientes analizadas.

En los escorpiones el tamaño del espermatozoide podría estar influenciado directamente por un efecto de volumen, tal como se ha sugerido en mamíferos (Cummins y Woodall, 1985). En otras palabras, los machos más grandes necesitan producir un mayor número espermatozoides y de pequeño tamaño para no sufrir dilución de su concentración en el tracto reproductivo masculino. Alternativamente, esta relación negativa podría estar relacionada con elección femenina preferencial hacia rasgos corporales expresados en mayor tamaño en los machos más grandes. Como resultado, podría acaecer un *trade-off*, viéndose presionados los machos a destinar más recursos a masa muscular y/u otros rasgos corporales, en detrimento de la inversión en el tamaño espermático.

Por otro lado, los datos de variabilidad del largo del espermatozoide en escorpiones mostraron que la variación inter-macho fue mayor que la intra-macho. Estos datos sugieren que la competencia sería comparativamente menor entre las gametas del eyaculado de un mismo individuo (competencia de eyaculado *sensu* Boorman y Parker, 1976), que entre los eyaculados de diferentes machos (competencia espermática *sensu* Parker, 1970). Esta tendencia estaría producida porque la variación en el largo del espermatozoide se genera continuamente por problemas del desarrollo durante la espermatogénesis. La selección sexual poscopulatoria, ejerce una presión selectiva que mejora la eficiencia del sistema

generando menor variación corrigiendo errores (Hunter y Birkhead, 2002). En el próximo capítulo, se evaluarán las implicancias de la poliandria sobre la variación del tamaño del espermatozoide en escorpiones.

En escorpiones la relación entre variabilidad espermática y masa corporal no fue significativo para ninguno de los dos modelos (intra o inter-individual).

Al igual que ocurre con los testículos, la vesícula seminal varía considerablemente entre especies. Las vesículas seminales en los machos son fácilmente visibles, separables y tienen el peso suficiente para poder pesarlas por separado. Estas características no siempre son observadas en los testículos que son estructuras más delicadas que las vesículas seminales. Sin embargo, existen especies en donde se debe ser muy preciso en la extracción de las vesículas seminales porque estas son muy frágiles. Esto es muy notorio en *U.*

brachycentrus, donde muchas veces fue difícil obtener ambas vesículas seminales completas sin que alguna de ellas se rompiera Fig. 31 e. Un hallazgo importante fue la homogeneidad de los volúmenes de vesículas derechas e izquierda. Esto indicaría que ambas vesículas almacenan volúmenes muy similares, y se especula que deben contribuir de manera igual al llenado del espermatóforo.

No existió influencia alométrica en el volumen vesicular. Trabajos en vertebrados sugieren que la relación alométrica entre el epidídimo (equivalente a la vesícula seminal) y la masa corporal es positiva (Lochmiller et al., 1986; Woodall y Johnstone, 1988). También en pecaríes en donde se realizó un análisis alométrico de diferentes órganos.

En la literatura, datos sobre volumen o peso de vesículas seminales no suelen ser tan comunes como los de testículos. En escorpiones, sólo Stockwell (1989) explora en términos generales a las vesículas seminales a nivel supraespecífico, a los fines de encontrar caracteres específicos para incluir en la filogenia. Menciona vesículas “normales” y “grandes”, pero no da detalles de tamaños ni medidas aproximadas. Los diferentes tamaños posiblemente estén asociados a diversas estrategias que los machos podrían recurrir bajo la influencia de los sistemas de apareamiento y el riesgo de competencia espermática. Así cabría esperar que el tamaño de las vesículas seminales estuvieran bajo la influencia de la competencia espermática, aumentando a medida que aumenta el riesgo de competencia espermática. Este patrón será analizado en el siguiente capítulo, sin embargo, las implicancias que tendría la diversidad de tamaños de las vesículas seminales de las diferentes familias es materia pendiente desde la perspectiva de selección sexual sobre caracteres reproductivos en escorpiones.

Los valores del volumen absoluto de la cápsula en el espermatóforo variaron de 1-6 mm³. Los valores son ligeramente superiores a los valores reales de esperma contenido dentro de la cápsula (Capítulo 3). Al igual que ocurrió para la masa testicular y el volumen vesicular, no se encontró tampoco una relación alométrica para el crecimiento de esta estructura. Contrariamente, en otros artrópodos, el volumen del espermatóforo escaló positivamente con el tamaño del macho (Sato et al., 2008). Los espermatóforos están ampliamente distribuidos entre especies de invertebrados. Se sugiere que su aparición y mantenimiento muestra que los organismos no han podido independizarse totalmente del medio acuático, ya que son estructuras que reducen la pérdida de esperma por desecación o consumo por parte de la hembra u otros insectos (Davey, 1960; Schaller, 1971). La estructura elaborada que exhiben la mayoría de los espermatóforos de escorpiones, difiere de otros espermatóforos de insectos en los que se han hecho trabajos sobre selección sexual (Burns, 1968; Simmons, 1988; Wedell, 1993; Vahed et al., 2011) en que, el de los escorpiones, está por lo general muy esclerotizado (Francke, 1979; Hjelle, 1990). Esto implica que tiene un volumen relativamente fijo en su cápsula (Peretti, 2010). Así, el volumen de esperma colocado dentro de la cápsula puede variar pero hasta un máximo establecido. Esto significa que los machos pueden depositar menor cantidad de esperma dentro del espermatóforo pero no mayor volumen que esté por encima del potencial máximo permitido por la cápsula, valor empleado en este estudio. Los machos de escorpiones y otros organismos con espermatóforos similares, tienen entonces una clara limitación en el volumen del eyaculado, un hecho que no sería irrelevante desde una perspectiva de competencia espermática (Peretti, 2010). Esto implica que en cualquier macho, si bien la espermatogénesis no cesa en el estado adulto (Jespersen y Hatwick, 1973; Alberti, 1983), la mayor parte de la producción de espermatozoides difícilmente sea transferida a las hembras en algún momento de la vida reproductiva. Si bien esto no se aleja de lo que podría ocurrir en cualquier organismo, en este grupo esto estaría más condicionado por el modo de transferencia espermática indirecta. Futuros estudios podrían centrarse en un recuento pormenorizado de toda la producción de espermatóforos a lo largo de toda la vida adulta así como de la capacidad de destinar menor contenido.

Resumen

Existe una relación directa entre la producción testicular y la transferencia mediada por el espermátforo. Esto sugiere que mientras más se produce, mayor cantidad de esperma se transferiría a la hembra. No se observó una influencia significativa con la vesícula seminal pero en algunas especies mostraba una relación inversa con las dos primeras variables lo que sugería que si se producía y transfería poco, se almacenaba mucho. Pero otras especies no mostraban tan claramente este patrón. La relación positiva entre producción y transferencia, podría estar sugiriendo que estaría actuando la competencia espermática por medio de la rifa de feria o el *sperm depletion*. Si bien la primera hipótesis tienen fuertes indicios y está fuertemente soportada en otros organismos, no existe evidencia que se pueda lavar eyaculados de machos previos en el tracto femenino como sucede por ejemplo en odonatos (Simmons et al., 2001). Se podría sugerir que especies que transfieren poco eyaculado poseen una estrategia de aumentar la cantidad de cópulas y disminuir el volumen transferido.

Sin embargo si hubo una influencia de tipo negativa entre la masa testicular y el volumen vesicular. Esto sugiere que mientras mayores son los testículos, menor es el volumen de la vesícula seminal y concomitantemente, mientras menor masa tiene los testículos, mayor es el volumen de almacenaje en la vesícula seminal. esto estaría indicando quizás dos tipos de estrategias en los machos, una de producir mucho sin llegar a almacenar gran cantidad y la otra por el contrario infocada en el almacenamiento y en la poca producción de los testículos. Estas estrategias podrían incidir en la tasa de cópulas que los machos presentarían.

5 INFLUENCIA DEL RIESGO DE COMPETENCIA ESPERMÁTICA SOBRE VARIABLES DE PRODUCCIÓN ALMACENAMIENTO Y TRANSFERENCIA DE ESPERMATOZOIDES EN ESCORPIONES DE LA FAMILIA BOTHRIURIDAE

5.1 INTRODUCCIÓN

La selección sexual es una fuerza evolutiva que no sólo influye directamente en el desarrollo de caracteres sexuales secundarios sino también sobre el desarrollo de los primarios, tales como gónadas, glándulas reproductivas accesorias y genitalia (Short 1979; Eberhard, 1985; Leonard y Córdoba-Aguilar, 2010). Dentro de la selección sexual, la competencia espermática se presenta en una gran parte del mundo animal, promoviendo la evolución de diversos rasgos en los machos (Smith 1984; Ginsberg y Huck 1989; Simmons et al., 1993; Birkhead y Møller, 1998). Ésta puede definirse como la competencia entre eyaculados, pertenecientes a dos o más machos diferentes, por el acceso a la fertilización de un determinado set de óvulos (Parker, 1970, 1990).

Entre los órganos masculinos asociados a la reproducción, el testículo es sin lugar a dudas el que ha sido más estudiado en el marco de la competencia espermática (Gage, 1994) [Lepidopteros]; Harcourt et al., 1995 [Primates]; Hosken, 1998 [Murciélagos]; Pyron, 2000 [Aves]; Byrne et al., 2002 [Anuros]; Baer y Boomsma, 2004 [Hormigas]; Demary y Lewis, 2007 [Moscas de fuego]; Katvala et al., 2008 [Escarabajos]; Vahed et al., 2011 [Grillos]). Existen descripciones detalladas de su morfología y tamaño en una amplia variedad de organismos (Hosken y Ward, 2001; Gage et al., 2002; Simmons y García-González, 2008; Soulsbury, 2010). El riesgo de competencia espermática es una medida del número teórico de posibles competidores con el que un macho dado tendría que enfrentar a nivel de sus gametas, siendo particularmente alto en especies con sistemas de apareamiento promiscuos (Simmons, 2001). Análisis comparativos en especies con diferentes niveles de riesgo de competencia espermática, muestran la existencia de una fuerte influencia positiva del nivel de poliandria (cantidad de machos con los que una hembra llega a aparearse durante una temporada reproductiva) sobre el tamaño y/o la masa testicular (Wedell y Hosken, 2010). Esto se traduce en que la presencia de un gran tamaño testicular en una especie nos evidencia, directa o indirectamente, la existencia de un riesgo mayor de

competencia espermática comparado con aquéllas donde los testículos tienden a ser pequeños (Gage y Freckleton, 2003; Vahed et al., 2011). Esta relación se encuentra muy bien soportada por análisis en un gran número de grupos y de hecho se puede tomar al tamaño testicular como un indicador directo del riesgo de competencia espermática (Gage y Freckleton, 2003). Se asume a su vez, que el tamaño testicular tiende a estar relacionado con el número de espermatozoides producidos (Schärer et al., 2004; Simmons, 2001). Ya desde la teoría clásica de la competencia espermática propuesta inicialmente por Parker (1970), se sostiene que testículos más grandes producirían un mayor número de espermatozoides, hecho que le conferiría al macho ventaja en una competencia espermática de tipo numérica (Parker 1982, 1984, 1998). Básicamente, la competencia espermática de tipo numérica plantea que en la competencia entre eyaculados de machos diferentes, el que contenga más espermatozoides tendrá una ventaja estadística sobre los restantes. Así, los espermatozoides son tomados como “números de rifa” y las fertilizaciones como el “premio” (Parker, 1990; Neff y Wahl, 2004). De todos modos, el esperma constituye un recurso apreciable desde el punto de vista energético (Dewsbury, 1982; Nakatsuru y Kramer, 1982). Por tal motivo, los machos deberían de optimizar su inversión en los eyaculados, destinando esperma de una forma estratégica según el riesgo de competencia espermática existente (Parker, 1990; Wedell et al., 2002; Parker y Pizzari, 2010).

Existen sin embargo otras teorías alternativas que tratan de explicar la variación encontrada en el tamaño y/o masa testicular entre los machos (Wedell y Hosken, 2010). Por ejemplo, Pitnick (1996) postuló en *Drosophila* como grupo, que testículos mayores estarían relacionados con la producción de espermatozoides de mayor tamaño. Así, sería necesaria una gran maquinaria espermatogénica para generar espermatozoides de gran tamaño. Sin embargo, este postulado carece de un claro soporte fuera del modelo de *Drosophila*, siendo un grupo de insectos muy particular en lo referido al tamaño de sus espermatozoides. Otra hipótesis, postulada también por Pitnick (1996) plantea que el tamaño testicular está relacionado alométricamente con el tamaño corporal del macho. Esta teoría sugiere que machos con mayor tamaño tendrían mayor capacidad energética para producir testículos de mayor tamaño. Nuevamente, estas observaciones pueden ser robustas en *Drosophila* pero no existen suficientes datos que la apoyen en otras especies, (Presgraves et al., 1999; Minder et al., 2005; Wedell y Hosken, 2010). Si bien el tamaño relativo de los testículos es considerado un índice confiable del riesgo de competencia espermática (Parker y Ball, 2005), el mismo también puede reflejar la tasa de demanda espermática en un macho, es decir el

número de apareamientos que realiza por temporada reproductiva (Short, 1977, 1979; Vahed y Parker, 2012). Entonces, mayores tamaños testiculares incrementarían la tasa de producción espermática en algunas especies a los fines de copular con un mayor número de hembras (Gomendio et al., 1998), en tanto aumentarían el éxito reproductivo bajo competencia espermática en otras (Preston et al., 2003). Sin embargo, ambas opciones, competencia entre eyaculados y tasa copulatoria, no son mutuamente excluyentes (Vahed, 2011).

Las especies cuyos machos almacenan esperma, cuentan en general con reservorios especializados (Moreira et al., 2008). Existen pocos estudios que se refieran a la influencia de la competencia espermática sobre la capacidad de almacenamiento de esperma en los machos, sobre todo en invertebrados. Por ejemplo, los análisis en insectos se enfocan fuertemente en la descripción de la vesícula seminal y su función (Grell, 1942; Matsuda, 1976; Viscuso et al., 1999; Moreira et al., 2008; Xie y Hua, 2010). En vertebrados existen algunos trabajos que muestran la posible relación entre competencia espermática y estructuras para el almacenamiento del esperma. Este aspecto ha sido particularmente analizado en primates (Dixon, 1998) y en peces (Van-den-Hurk et al., 1987). En general, entre los primates el patrón encontrado es muy parecido al de los testículos. Por ejemplo, las especies que presentan mayor riesgo de competencia espermática poseen vesículas seminales comparativamente más grandes que aquéllas sometidas a uno menor. Adicionalmente, la producción de tapones genitales también influenciaría un desarrollo mayor de la vesícula seminal en primates (Dixon, 1998). Por otro lado, peces teleósteos con fecundación externa y que tienen testículos pequeños poseen vesículas seminales mientras que las que presentan un tamaño testicular relativo mayor no tienen un reservorio de este tipo (Chowdhury, 2007). Así, un pequeño tamaño testicular se ve compensado por la presencia de vesícula seminal. Por el contrario, peces con fecundación interna y tendencia monógama carecen de vesícula seminal y/o no evidencian influencia de competencia espermática sobre el tamaño testicular o vesicular (Mazzoldi et al., 2005). En tanto, en algunos insectos se ha detectado coevolución entre el tamaño espermático y el tamaño de los órganos reproductivos masculinos, tanto testículos como vesículas seminales (Morrow y Gage, 2000; Pitnick et al., 1999; Presgraves et al., 1999; Hosken et al., 2001; Joly et al., 2004).

En cuanto a la transferencia de esperma, la asignación del esperma por parte del macho está influenciada por el riesgo de competencia espermática (Andersson, 1994; Parker, 1998; Simmons, 2001; Wedell et al., 2002). Existe una relación positiva y directa entre el riesgo de competencia espermática y el volumen de

eyaculado que es transferido a la hembra (Parker, 1993; Ball y Parker, 1997; Parker et al., 1997). Williams et al. (2005) proponen otra mirada a este fenómeno, en donde el ambiente también influye sobre la asignación de esperma y esto finalmente influye sobre el riesgo de competencia espermática de la población.

El tamaño del espermatozoide, en particular su largo, es otro carácter que puede variar según el riesgo de competencia espermática. Existen reportes en diversos grupos que en general indican que el largo del espermatozoides se incrementa cuando la competencia espermática es muy alta (Gage, 1994 [Lepidoptera]; Morrow y Gage, 2000 [Lepidoptera]; Balshine et al., 2001; Fitzpatrick et al., 2009 [Peces]; Byrne et al., 2003 [Sapos]; Tourmente et al., 2009 [Serpientes]; Briskie y Montgomerie, 1992; Briskie et al., 1997; Johnson y Briskie, 1999 [Aves]; Gomendio y Roldan, 1991; Tourmente et al., 2011a [mamíferos placentarios]; Tourmente et al., 2011b [mamíferos marsupiales]). En otros, aunque en menor medida, se ha detectado que el largo disminuye (Stockley et al., 1997 [Peces]). Se destaca que en general los trabajos se enfocan en la variación del tamaño entre especies, con la premisa de que la variación entre especies será mayor a la que aparece a nivel intraespecífico (Ward, 1998; Morrow y Gage, 2001; Birkhead et al., 2005). En realidad, los patrones de variación de la morfología de los espermatozoides entre machos de una misma especie aún no se han explorado en detalle. Modelos teóricos enfocados a escala intraespecífica muestran que la evolución del tamaño del espermatozoide tendría un óptimo de acuerdo con los niveles de competencia espermática existentes (Calhim et al., 2007). Estos modelos predicen que en una especie, machos bajo un intenso nivel de competencia poscopulatoria, producirían espermatozoides cuya morfología se ajustaría lo más posible a este óptimo. Así, machos sometidos a un mayor riesgo de competencia espermática mostrarían espermatozoides con menores variaciones morfológicas en comparación con machos con un bajo nivel de competencia poscopulatoria (Calhim et al., 2007; Imler, 2008). Por lo tanto, a una escala intraespecífica, un alto nivel de competencia espermática se predice resultaría en una baja variabilidad en los caracteres del espermatozoide.

Entre los artrópodos, la competencia espermática ha sido ampliamente estudiada en insectos (Parker, 1970; Simmons, 2001). La competencia espermática es muy común en insectos porque las hembras muestran tendencia a la poliandria y suelen conservar esperma en sitios de almacenamiento denominados espermatecas o receptáculos seminales (Parker, 1970; Ridley, 1989). Dentro de los arácnidos, las arañas conforman un interesante grupo para el estudio de la competencia espermática (Elgar, 1998; Schneider y Andrade, 2011). Sin embargo,

la atención puesta en estos artrópodos ha sido relativamente menor comparada con los insectos (Eberhard, 2004). Austad (1984) y Thomas y Zeh (1984) aportaron una de las primeras revisiones sobre la influencia de la competencia espermática sobre las estrategias de apareamiento de las arañas y otros arácnidos. En este contexto, los escorpiones se presentan como un grupo particularmente adecuado para estudios de competencia espermática. Presentan dos características importantes para el surgimiento de competencia espermática (Simmons, 2001), como son el hecho que existen especies con diferentes grados de poliandria y presentan fecundación diferida en el tiempo, conservando los eyaculados en un par de receptáculos seminales (Hjelle, 1990). La transferencia de esperma es indirecta y todos los machos depositan un espermatóforo esclerotizado (Polis y Sissom, 1990). Como ya vimos, los espermatozoides son largos y se transfieren en forma de paquetes espermáticos en la gran mayoría de las especies del orden (Michalik y Mercati, 2010; Vrech et al., 2011 Capítulo 1 de este escrito.). Además, los machos de algunas especies pueden depositar un tapón genital que obstruye o dificulta el acceso a la abertura genital femenina (Mattoni y Peretti, 2004; Contreras-Garduño et al., 2006; Althaus et al., 2010). A pesar de que algunas características del apareamiento y de los espermatozoides han sido estudiadas (ej. Peretti, 2003, 2010; Peretti y Battán-Horenstein, 2003; Vignoli et al., 2008, Michalik y Mercati, 2010; Vrech et al., 2011), en general se trata de trabajos descriptivos, no enfocados al análisis cuantitativo de la competencia espermática.

Por tal motivo, no contamos a la fecha con un conocimiento sobre la relación entre el riesgo de competencia espermática y caracteres sexuales primarios en los escorpiones. Como auxilio, para la interpretación de potenciales resultados, se cuenta con descripciones finas del tracto reproductivo masculino y genitalia en algunos grupos (Abd-el-Wahab, 1957; Francke, 1979; Peretti y Battán-Horenstein, 2003; Jacob et al., 2004; Lautie et al., 2008; Michalik y Mercati, 2009), así como descripciones detalladas de apareamientos y cortejo copulatorio en varias especies (Peretti, 1993, 2010)

En este contexto, el presente capítulo busca explorar la posible influencia del nivel de poliandria sobre la masa testicular, el volumen de las vesículas seminales, el volumen de la cápsula del espermatóforo y el largo de los espermatozoides en especies pertenecientes a la familia Bothriuridae. Siguiendo la teoría clásica de la competencia espermática (Parker, 1990; Simmons, 2001), se espera una asociación positiva entre el riesgo de competencia espermática (medida como el nivel de poliandria) y el tamaño de los testículos. Extendiendo

esto a las vesículas seminales, se espera que éstas aumentaran su volumen para poder así almacenar mayor cantidad de esperma. Adicionalmente, si tal como se postula tradicionalmente (Parker, 1998), el tamaño del espermatozoide le confiere al organismo una ventaja desde el punto de vista competitivo, se espera encontrar espermatozoides de mayor tamaño en aquellas especies que exhiban un alto nivel de poliandria. Finalmente, se predice que la variación del largo de los espermatozoides a nivel intraespecífico será mínima en especies con alto grado de poliandria.

5.2 OBJETIVOS

5.2.1 General

Estudiar la influencia que tiene el riesgo de competencia espermática sobre la producción, almacenamiento y transferencia de esperma en especies de escorpiones seleccionadas dentro de la familia Bothriuridae

5.2.2 Específicos

1. Analizar la influencia de la poliandria sobre la masa y volumen testicular, y el volumen de la cápsula del espermatóforo en las ocho especies de Bothriuridae;
2. Examinar la influencia del nivel de poliandria sobre la variabilidad del largo del espermatozoide;
3. Identificar las relaciones de tamaño y volumen entre los diferentes órganos masculinos analizados;
4. Comparar entre las especies el efecto del riesgo de competencia espermática sobre las estructuras reproductivas masculinas, teniendo presente la filogenia del grupo.

5.3 MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.1 Especies Analizadas.

Se analizaron las mismas especies que en el apartado 4.3.1 del Capítulo 4. Las variables analizadas fueron en este caso ocho: Masa testicular, Largo del espermatozoide, Variación intra e interespecífica del largo del espermatozoide, Volumen de la vesícula seminal, Volumen de la cápsula del espermatóforo y Nivel de poliandria. El proceso de obtención de las primeras 7 variables fue detallado en el capítulo anterior en el ítem 4.3.2. El nivel de poliandria se estimó basándose en la literatura disponible sobre frecuencia de apareamientos (número de cópulas) en escorpiones de la familia Bothriuridae (Peretti, 1993, 1996, 2003; Peretti 2010, Peretti y Mattoni, 2004 Toscano-Gadea, 2012), así como en observaciones realizadas en el laboratorio. Estas últimas se realizaron para ambas especies de *Timogenes*, *Bothriurus bonariensis* y *Urophonius brachycentrus*. Para el apareamiento se siguieron los lineamientos del Capítulo 2, apartado 2.3.2.4, pero en esta ocasión se permitió que el macho realice la transferencia de espermatozoides. Se tomaron los registros de 10 hembras por especie. De cada hembra se obtuvo un valor promedio de apareamientos completos por temporada reproductiva. Luego esos diez valores se promediaron para obtener un valor total promedio por especie. Estos datos se promediaron para obtener un valor medio de poliandria por especie y los valores se resumen en la Tabla 15.

5.3.2. Análisis de la influencia de la poliandria sobre variables de producción espermática

Para el análisis de la influencia de la poliandria sobre variables de producción espermática, se siguieron los lineamientos descriptos en el capítulo 3, apartado 3.3.5. Sin embargo aquí se incluyeron modelos con tres parámetros porque algunos modelos tuvieron valores de $\Delta AICc$ (diferencia en el criterio de información de Akaike) (Burnham y Anderson, 2002) menores a dos, a diferencia de lo que ocurría en el capítulo anterior (apartado 3.3.5).

Se utilizaron regresiones lineales múltiples con modelado de cuadrados mínimos generalizados (Kariya et al., 2004). Se utilizaron dos enfoques para evaluar la influencia de la competencia espermática sobre las variables. En primer término los datos se analizaron utilizando selección de modelos. Para testear como las variables predictoras influenciaban las variables de respuesta, se utilizaron todas

las combinaciones posibles de modelos de uno a tres parámetros (de forma general: $y = 1$, $y=a$, e $y = a + b$) (Costa Schmidt y Machado, 2012) a diferencia de lo que ocurrió en el Capítulo anterior (apartado 4.3.3) en donde solo se tuvieron en cuenta modelos de hasta dos parámetros. Nuevamente el modelo con un parámetro ($y = 1$) fue incluido para los casos en que ninguna variable explicaba mejor a la variable respuesta. Los modelos se compararon utilizando el criterio de información de Akaike corregido para muestras pequeñas (AICc), con los mismos criterios que en apartado 3.3.5. Los modelos con 4 parámetros ($y = a * b$) fueron excluidos del análisis ya que su cambio en AICc era siempre mayor a 10 ($\Delta AICc > 10$). El segundo enfoque que se utilizó fue la estadística probabilística clásica. El efecto de la masa corporal, en caso de que hubiese, sobre la variable respuesta de producción espermática se controló incluyendo a la primera como variable en el análisis de regresión múltiple (Tomkins y Simmons 2002). El análisis de regresión múltiple se realizó usando una suma de cuadrados secuencial (Tipo I), en donde las variables predictoras se agregaron al modelo en el siguiente orden: masa corporal, poliandria. Una vez elegidos los modelos con mayores pesos de Akaike, se analizaron los parámetros y valores de probabilidad clásica para ver el sentido de la asociación y corroborar la significancia del modelo. La masa corporal, la masa testicular y el largo del espermatozoide fueron variables transformadas mediante el uso de Log_{10} para así lograr normalizar sus distribuciones (Ver test de normalidad en el Capítulo 4 apartado 4.3.3). Se realizó un control filogenético tal y como fue descrito para el apartado 4.3.3 del Capítulo 4. Los modelos se analizaron con el paquete ape y un código (pglm3.2) (Freckleton et al., 2002) en la plataforma de análisis estadístico R (R core group, 2012).

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Testículo

Para la masa testicular el mejor modelo fue el que tuvo al nivel de poliandria como variable predictora (Tabla 19). El valor del peso de Akaike (wt) muestra que el modelo tiene un 70% de probabilidades de ser el modelo que mejor explica a la variable respuesta, un valor considerado alto. El análisis pGLS filogenéticamente corregido, mostró una influencia positiva del nivel de poliandria sobre la masa testicular como muestra la pendiente de 0,26 (Fig. 34 a). El análisis filogenético mostró que el valor de lambda fue significativamente igual a uno, es decir una fuerte influencia de la filogenia sobre el carácter en el modelo seleccionado.

5.4.2 Largo del espermatozoide y variabilidad del largo en espermatozoides

El análisis de selección de modelos sobre el largo total del espermatozoide mostró que, dejando de lado la influencia negativa ejercida por la masa corporal que vimos en el capítulo anterior, ningún modelo logró explicar satisfactoriamente a dicha variable (Tabla 19; Fig. 34 b). El análisis filogenético mostró que no existió influencia de la filogenia sobre el carácter en el modelo seleccionado (Tabla 19).

La variabilidad “intra-macho” fue claramente influenciada por la masa testicular (Akaike wt = 64%) (Fig. 34 c). La relación entre ambas variables fue negativa y mostró que machos con masa testicular mayor presentaron menos variación en el largo de sus espermatozoides y viceversa. El análisis filogenético no evidenció influencia de la filogenia sobre el carácter en el modelo seleccionado. Por el contrario, No hubo influencia del nivel de poliandria sobre la variabilidad intra-macho (Akaike wt = 11%, $p = 0,05$). Si bien los modelos que contenían a la masa corporal no fueron seleccionados por el método de selección de modelos (Akaike wt < 10%), los valores de probabilidad estadística fueron significativos (Tabla 19)

La variabilidad “inter-macho” no fue influenciada por el nivel de poliandria (Fig. 34 d) ni por ninguna variable predictora, incluía la masa testicular como una medida alternativa del riesgo de competencia espermática. Tampoco se detectó influencia de la filogenia sobre el carácter en el modelo seleccionado (Tabla 19).

5.4.3 Vesícula seminal

El análisis de modelos AIC no mostró que existiera efecto directo del nivel de poliandria sobre el volumen vesicular (Fig. 34 e). Tampoco de ningún otro modelo evaluado. Sin embargo, el modelo aditivo que contenía a la masa corporal y el largo del espermatozoide, presentó un valor de probabilidad significativo para el largo del espermatozoide. Esto representa una relación positiva entre el volumen vesicular y el largo del espermatozoide, controlado por la masa corporal (Tabla 19).

5.4.4 Espermatóforo

No hubo efecto del nivel de poliandria sobre el volumen de la cápsula del espermatóforo (Akaike wt<0,001%, Fig. 34 f). Los modelos que mejor explicaron la variable contenían a la masa testicular como variable predictora. El modelo que mejor explicó a la variable es el modelo aditivo que tiene a la masa testicular junto a la masa corporal del macho (Akaike wt = 66%). El efecto aditivo fue positivo por lo que el aumento de las variables predictoras generó un aumento de la variable respuesta (Tabla 19). El análisis de lambda no mostró influencia de la filogenia sobre los modelos seleccionados.

Tabla 19 Selección de modelos en Análisis comparativo entre las variables analizadas y la poliandria. Lpt = \log_{10} peso testículo; lpm = \log_{10} peso macho; pol = poliandria; le = \log_{10} largo espermatozoide; cvbm = variación del largo del espermatozoide entre machos; cvwm = variación del largo del espermatozoide dentro de los machos; lvv = \log_{10} volumen vesicular; lve = \log_{10} volumen espermatóforo.

Masa Testicular														
Modelo	Pendiente		Error estandar		F-Value	λ ($\lambda=0;\lambda=1$)	Adj R2	n	AICc	Δ AICc		p	Akaike wt	
lpt~pol	0,2654	-	0,0883	-	9,0354	-	6.61E-05 (x*)	0,5344	8	4,2503	0	0,0238	-	70%
lpt~1	-2,1399	-	0,1123	-	-	-	6.61E-05 (xx)	-	8	6,6330	2,3827	<0,001	-	21%
lpt~lpm	0,4912	-	0,3450	-	2,0267	-	0,4671 (xx)	0,1279	8	9,3355	5,0852	0,2044	-	5%
lpt~lpm+pol	0,1822	0,2368	0,2985	0,1044	3,3158	5,1475	6.61E-05 (xx)	0,4800	8	10,7338	6,4835	0,5682	0,0725	3%
Largo espermatozoide														
Modelo	Pendiente		Error estandar		F-Value	λ ($\lambda=0;\lambda=1$)	Adj R2	n	AICc	Δ AICc		p	Akaike wt	
le~lpm	-0,1373	-	0,0465	-	8,7243	-	0,5458 (xx)	0,5245	8	-22,2135	0	0,0255	-	48%
le~1	2,3964	-	0,0347	-	-	-	0,9999 (xx)	-	8	-21,4076	0,8059	<0,001	-	32%
le~pol	-0,0304	-	0,0174	-	3,0620	-	0,9999 (xx)	0,2275	8	-19,7397	2,4738	0,1307	-	14%
le~lpm+pol	-0,1076	-0,0219	0,0460	0,0154	9,4099	2,0207	0,6701 (xx)	0,5740	8	-17,8005	4,4130	0,0666	0,2144	5%
le~lpt	-0,0471	-	0,0546	-	0,7454	-	0,9999 (xx)	-0,0377	8	-17,3780	4,8355	0,4211	-	1%
Variación intermacho														
Modelo	Pendiente		Error estandar		F-Value	λ ($\lambda=0;\lambda=1$)	Adj R2	n	AICc	Δ AICc		p	Akaike wt	
cvbm~1	0,3272	-	0,0682	-	-	-	0,9999 (xx)	-	8	-10,5878	0	0,0020	-	73%
cvbm~lpm	0,2065	-	0,1261	-	2,6830	-	6.61E-05 (xx)	0,1938	8	-6,8578	3,7300	0,1525	-	11%
cvbm~pol	0,0292	-	0,0402	-	0,5289	-	0,9999 (xx)	-0,0721	8	-6,2971	4,2907	0,4944	-	9%
cvbm~lpt	-0,0124	-	0,1150	-	0,0116	-	0,9999 (xx)	-0,1644	8	-5,6366	4,9512	0,9178	-	6%
cvbm~lpm+lpt	0,2301	-0,0918	0,1553	0,1578	1,9191	0,3390	0,3482 (xx)	0,0355	8	-0,1844	10,4034	0,1986	0,5856	0,4%
cvbm~lpm+pol	0,1996	0,0054	0,1544	0,0540	2,2403	0,0099	6.61E-05 (xx)	0,0345	8	0,1848	10,7726	0,2524	0,9245	0,3%
Variación intramacho														
Modelo	Pendiente		Error estandar		F-Value	λ ($\lambda=0;\lambda=1$)	Adj R2	n	AICc	Δ AICc		p	Akaike wt	
cvwm~lpt	-0,0211	-	0,0052	-	16,4204	-	0,9999 (xx)	0,6878	8	-55,1811	0	0,0067	-	64%
cvwm~pol	-0,0065	-	0,0027	-	5,9441	-	6.61E-05 (xx)	0,4139	8	-51,6558	3,5253	0,0506	-	11%
cvwm~1	0,0305	-	0,0030	-	-	-	6.61E-05 (xx)	-	8	-51,1146	4,0665	<0,001	-	8%
cvwm~lpm	-0,0196	-	0,0073	-	7,2279	-	0,9852 (xx)	0,4708	8	-51,0372	4,1439	0,0361	-	8%
cvwm~lpm+lpt	-0,0097	0,0172	0,0065	0,0066	10,1426	6,6197	6.61E-05 (xx)	0,6783	8	-50,8554	4,3257	0,0244	0,0499	7%
cvwm~lpm+pol	-0,0121	-0,0046	0,0076	0,0027	6,9703	2,9855	6.61E-05 (xx)	0,5319	8	-47,8547	7,3264	0,0459	0,1446	2%
Volumen Vesicular														
Modelo	Pendiente		Error estandar		F-Value	λ ($\lambda=0;\lambda=1$)	Adj R2	n	AICc	Δ AICc		p	Akaike wt	
lvv~1	0,6583	-	0,0926	-	-	-	0,5153 (xx)	-	8	-0,1603	0	0,0008	-	78%
lvv~lpm	0,3852	-	0,2572	-	2,2426	-	0,9999 (xx)	0,1990	8	4,8259	4,9862	0,2086	-	6%
lvv~lsl	1,4076	-	1,5676	-	0,8063	-	0,2624 (xx)	-0,0403	8	5,2252	5,3855	0,4199	-	5%
lvv~lpt	0,2395	-	0,2429	-	0,9729	-	0,8845 (xx)	-0,0054	8	5,4660	5,6263	0,3798	-	4%
lvv~pol	-0,0221	-	0,0906	-	0,0594	-	0,5153 (xx)	-0,2317	8	6,0900	6,2503	0,8194	-	3%
lvv~lpm+lsl	0,6485	3,4892	0,1830	0,9612	3,4128	13,1763	6.61E-05 (xx)	0,7447	8	7,1877	7,3480	0,1618	0,0360	0,0%
lvv~lpm+pol	0,4174	-0,0511	0,2847	0,0832	1,8940	0,3782	0,9999 (xx)	0,0516	8	15,8395	15,9998	0,2389	0,5820	0,0%
lvv~lpm+lpt	0,2912	0,1094	0,4193	0,3501	1,7367	0,0976	0,9999 (xx)	-0,0342	8	16,3598	16,5201	0,5373	0,7751	0,0%
Volumen Espermatofofo														
Modelo	Pendiente		Error estandar		F-Value	λ ($\lambda=0;\lambda=1$)	Adj R2	n	AICc	Δ AICc		p	wt	
lve~lpm+lpt	0,1444	0,6279	0,0213	0,0216	596,0778	834,4829	6.61E-05 (xx)	0,9951	8	-37,9632	0	0,0011	<<0,001	66%
lve~lpt	0,7006	-	0,0546	-	164,3239	-	6.61E-05 (xx)	0,9589	8	-20,4603	1,2967	<<0,001	-	34%
lve~1	0,5283	-	0,0806	-	-	-	6.61E-05 (xx)	-	8	1,3407	12,9506	<0,001	-	0,1%
lve~pol	0,1828	-	0,0672	-	7,7211	-	6.61E-05 (x*)	0,4778	8	-0,1236	15,4114	0,0346	-	0,0%
lve~lpm	0,4518	-	0,2200	-	4,2151	-	6.61E-05 (xx)	0,3147	8	2,0503	17,1005	0,0858	-	0,0%
lve~lpm+pol	0,2721	0,1401	0,2015	0,0704	6,2907	3,9544	6.61E-05 (xx)	0,5408	8	4,4472	25,8051	0,2358	0,1034	0,0%

5.5 DISCUSIÓN

5.5.1 Efecto de la competencia espermática sobre variables de producción de espermática

5.5.1.1 Influencia de la poliandria sobre la masa testicular.

El efecto positivo del riesgo de competencia espermática, reflejado por el nivel de poliandria, sobre la masa testicular ha sido observado en diferentes vertebrados e invertebrados (Gage, 1994; Harcourt et al., 1995; Hosken, 1998; Pyron, 2000; Byrne et al., 2002; Baer y Boomsma, 2004; Demary y Lewis, 2007; Katvala et al., 2008; Vahed et al., 2011). Habitualmente se interpreta entonces a la relación entre el riesgo de competencia espermática y el tamaño testicular como de tipo causal, es decir el primero define al segundo. A partir de esto, es que suele entonces tomarse, en un razonamiento que no deja de ser circular, a la masa testicular como predictor “morfológico” confiable que evidencia el riesgo de competencia espermática (Short, 1979; Gage y Freckleton, 2003; Ramm et al., 2005; Gomendio et al., 2006; Parker y Pizzari, 2010). Los resultados del presente capítulo indican que un aumento en el nivel de poliandria se traduce directamente en un aumento de la masa testicular en las especies de escorpiones analizadas, independientemente del efecto de la masa corporal. Con el soporte de la teoría de competencia espermática, los datos obtenidos sugerirían que en escorpiones el esperma competiría de forma numérica, siguiendo el principio de la rifa de feria no cargada (Parker, 1982, 1990, 1993). Adicionalmente, sumando los capítulos previos, se aprecia que el volumen de semen eyaculado estaría directamente relacionado con el del testículo. En este marco, también existiría una relación directa entre el volumen de los órganos reproductivos y los conteos de espermatozoides realizados en estos. Así, se da soporte a la idea de que el esperma efectivamente podría competir de forma “numérica” en el tracto reproductivo femenino, tal como lo sugieren Parker y Pizzari para insectos (2010). Ciertamente futuros estudios en el tracto reproductivo serán necesarios para confirmar esta posibilidad, claramente sesgada en su visión parcial hacia los machos. Cabe destacar que la relación competencia espermática-gónada masculina sería directa en escorpiones porque, como sucede con los insectos, los testículos solo se encargan de producir espermatozoides (Chapman, 1998) y la presión de selección solo incidiría sobre la producción de esperma y no sobre

otras funciones como puede suceder en vertebrados (Setchell, 1978; Harvey y Harcourt, 1984; Kenagy y Trombulak, 1986).

En el presente estudio todas las especies analizadas fueron poliándricas, con excepción de *U. brachycentrus*. Las hembras de esta especie son inseminadas una sola vez debido a que los machos depositan un tapón genital muy eficiente (Mattoni y Peretti, 2004; Peretti, 2010), lo cual reduce la receptividad y atraktividad femenina (Romero-Lebrón, Vrech y Peretti, datos inéditos). Bajo este escenario se hubiera esperado que fuera la especie con la menor masa testicular dentro del set de datos, hecho que no ocurrió. En efecto, desde un punto de vista energético los testículos deberían de ser más bien pequeños si el tapón transferido por el macho fuese eficiente. Datos preliminares confirman la eficacia del tapón genital en esta especie (Costa-Schmidt, Romero-Lebrón, Vrech, Mattoni, y Peretti, datos no publicados). Quizás la presencia de testículos de considerable tamaño en esta especie se deba a que, desde una amplia perspectiva evolutiva, la aparición de tapones genitales de tipo “eficaces” es aún reciente y por lo tanto todavía no se llegó a optimizar de forma acabada la inversión en masa testicular. Futuros estudios centrados en esta problemática en todo el género *Urophonius*, servirían para comprobar esta hipótesis.

En cuanto a las dos especies analizadas de *Timogenes*, ambas mostraron valores más bajos que los esperados para sus niveles de poliandria. En *T. dorbignyi* se ha observado que podría encontrarse bajo una proporción sexual operacional sesgado hacia los machos (Acosta, L., Mattoni, C. I. y Peretti, A. V., datos no publicados), lo que indicaría altas posibilidades de competencia intrasexual, incluida la espermática. Sin embargo, es notable la pequeña masa testicular de esta especie. Esto sugiere entonces baja producción de espermatozoides, al menos en el estado adulto. En algunos arácnidos, como por ejemplo en solífugos (Alberti y Peretti, 2002), la espermatogénesis tiene lugar únicamente en la última etapa del desarrollo juvenil, por lo que los testículos en el estadio adulto son relativamente pequeños. En contraste, sus vesículas seminales son muy grandes, acumulando toda la producción ya finalizada de espermatozoides (Punzo, 2010), y los volúmenes de cada eyaculado son pequeños (posiblemente para dosificar la producción de espermatozoides en la inseminación de un gran número de hembras – Peretti y Willemart, 2007). Podría plantearse entonces que en *T. dorbignyi* los machos producirían poco espermatozoides (o dejarían de hacerlo como adultos) pero, tal como arrojaron los resultados, sí almacenan una apreciable cantidad en las vesículas seminales, aunque destinando un volumen muy limitado a cada transferencia espermática. En

concordancia con esta hipótesis, se destaca que los machos tendrían una capacidad alta de regeneración de los espermátóforos, tal como sugieren los datos de poliandria (Peretti, 1993, 2003). Futuros estudios funcionales en el campo y laboratorio son necesarios para confirmar estos supuestos. En contraste a las especies mencionadas, un caso que se presenta más evidente de riesgo de competencia espermática, es el de *B. bonariensis*. En esta especie los machos producen y transfieren grandes cantidades de espermatozoides mientras que almacenan poco en sus vesículas seminales. En otras palabras, la ruta “producción de espermatozoides -> transferencia espermática” sería relativamente veloz, conservándose por lo tanto poco espermatozoides en los reservorios masculinos. Existen reportes que señalan que la proporción sexual operativa está muy sesgada hacia los machos al inicio y parte media de la temporada reproductiva (Castelvetri y Peretti, 1999; Peretti, 2003, datos no publicados). En este contexto fuerte de competencia intra-sexual, incluida el nivel espermático, la táctica de los machos sería intentar ganarla a nivel numérico (Simmons y Parker, 1992) y/o usar parte del eyaculado para desplazar espermatozoides de machos previos (Simmons, 2001). Hasta el momento, existen indicios fuertes sobre el primer mecanismo para escorpiones (presente Capítulo), pero todavía falta evidencia para afirmar que exista desplazamiento de espermatozoides en estos arácnidos. En este sentido y a partir del presente estudio, *B. bonariensis* surge como un excelente modelo (tanto por el claro patrón espermático, como por facilidad de colecta) para futuros estudios centrados en análisis detallados de competencia espermática.

5.5.1.2 Poliandria y caracteres relacionados con el tamaño del espermatozoide

La influencia del riesgo de competencia espermática sobre el largo de los espermatozoides es a veces contradictoria en algunos organismos, si bien existe un fuerte apoyo a favor de una influencia positiva (Gomendio y Roldan, 1991; Harcourt, 1991; Briskie y Montgomery, 1992; Hosken, 1997; Gay et al., 2009; Gage, 1994; Morrow y Gage, 2000; Johnson y Briskie, 1999; Kleven et al., 2008; Baer et al., 2003; LaMunyon y Ward, 2002; Breed y Taylor, 2000; Stockey et al., 1997). Sin embargo, los resultados encontrados en las especies analizadas de Bothriuridae no muestran relación entre ambas variables. Esta falta de efecto coincide con lo registrado por Harcourt (1991) en primates, Hosken (1997) en murciélagos, Briskie y Montgomery (1992) en aves y Gay et al., (2009), en coleópteros. Según Parker (1998), el tamaño del espermatozoide no

necesariamente aumentaría con un incremento del riesgo de competencia espermática. El autor sostiene que para que el tamaño del espermatozoide sea seleccionado por competencia espermática debe existir alguna clara ventaja en presentar un tamaño mayor (Parker, 1998). Si esto no sucede, el espermatozoide tendería a permanecer dentro de un rango de tamaño mínimo, independientemente de la influencia del riesgo de competencia espermática (Stockey et al., 1997). Algunos estudios han analizado la influencia de la competencia espermática sobre diferentes componentes de los espermatozoides de forma integral, estudiando la cabeza, pieza media y pieza final (Tourmente et al., 2009, 2011). Muchos otros trabajos se han enfocado en el estudio de la pieza media en lugar del largo total (Anderson y Dixon, 2002; Anderson et al., 2006). Tourmente et al. (2011) detectaron una influencia de la competencia espermática en todos los componentes del espermatozoide en mamíferos, con una gran cantidad de especies y una detallada filogenia. En este contexto de posibles explicaciones, se necesitan mayor cantidad de trabajos en escorpiones en los cuales se realice un detallado análisis de cómo la competencia espermática moldea o no los diferentes componentes del espermatozoide. Si bien se han realizado estudios que describen alguno de los componentes de los espermatozoides (ej., Jespersen y Hartwick, 1973; Alberti, 1983; Vignoli et al., 2008; Michalik y Mercati, 2010), aún no contamos con datos más detallados publicados en las especies analizadas en este capítulo. Parte de los datos del capítulo 1 mostraron que existe una tendencia negativa entre el largo de los espermatozoides y el número de los mismos por paquete espermático. Esto sugiere que paquetes más cortos estarían formados por mayor cantidad de espermatozoides mientras que los largos por pocos. Estos resultados podría indicar la existencia de un *trade-off* clásico entre tamaño y número de espermatozoides en los paquetes espermáticos. De todas formas este *trade-off* no es tan simple de interpretar bajo la influencia de la competencia espermática (Parker et al., 2010; Immler et al., 2011).

La influencia de la poliandria sobre la variación del largo del espermatozoide “intra-macho” fue marginalmente no significativa. Se encontró una asociación, en el sentido que predice la teoría de competencia espermática, entre la variación inter-macho (entre espermatozoides de eyaculados de diferentes machos) y la masa testicular. Según Parker y Pizzari (2010), la medida testicular puede tomarse como un estimador fiel del riesgo de competencia. Así, un aumento en el riesgo de competencia espermática presionaría selectivamente sobre el nivel de variación del largo del espermatozoide, generando una disminución en la

variabilidad total dentro del eyaculado de un macho. Este efecto sugeriría que un incremento en el riesgo de competencia espermática llevaría a un tamaño de esperma óptimo (Parker y Begon, 1993) o a producir menor cantidad de errores durante el proceso de producción de espermatozoides (Hunter y Birkhead, 2002). En otras palabras, como la competencia espermática es una fuerza selectiva potente que influencia el largo de los espermatozoides (Kleven et al., 2008), condiciona a los espermatozoides para que mantengan un tamaño óptimo competitivo mediante la acción de selección estabilizadora (Pizzari y Parker, 2009).

5.5.2 Efecto de la competencia espermática sobre variables de almacenamiento y transferencia

5.5.2.1 Efecto de la poliandria sobre la vesícula seminal

Pocos trabajos han discutido la influencia de la competencia espermática sobre el sitio de reserva de esperma en el macho. La mayoría de ellos se han centrado en la descripción detallada de la morfología de los órganos reproductivos (Hung y Vinson, 1975; Sasakawa, 2007; Sinclair, et al., 2007; Fiorillo et al., 2008; Moreira et al., 2008; Winnick et al., 2009; Xie, 2010). Otros se enfocan directamente en los reservorios de esperma en la hembra (ej. Birkhead y Møller, 1993; Pitnick y Markow, 1999). De los pocos trabajos que investigan el efecto de la selección sexual sobre la vesícula seminal podemos destacar el aporte de Dixson (1998) en primates, donde se muestra que la amplia variabilidad en la morfología de las vesículas seminales no puede darse por azar sino que, tal como sucede con el tamaño de los testículos y la morfología peneana, las vesículas seminales y glándulas accesorias podrían también estar bajo la influencia de la competencia espermática. A diferencia del patrón que observamos para escorpiones, los datos en primates sugieren una influencia positiva de la competencia espermática sobre la vesícula seminal y una correlación directa con el tamaño del testículo. Dixson (1998) también discute sobre la disminución en el tamaño de la vesícula seminal. Sugiere que al ser un órgano costoso desde el punto de vista energético, se vería reducido en especies en donde se observa un bajo número de cópulas y, en casos extremos, podrían ser vestigiales o desaparecer. Los datos en escorpiones no muestran esta tendencia, ya que por ejemplo *B. bonariensis* y *Br. pentheri*, dos especies con un alto nivel de poliandria y presentaron un volumen vesicular relativo pequeño y por el contrario, *U. brachycentrus* es una especie monándrica que mostró volúmenes vesiculares relativos altos. El único que se ajustaría a este

patrón propuesto por Dixon en primates (1998) es *T. elegans* que tiene un número de copulas reducidas y el volumen relativo de las vesículas seminales es bajo. Por otro lado, Chowdhury y Joy (2007) destacan el rol de la vesícula seminal en la reproducción de los peces teleósteos. Sugieren la presencia de una compensación de tareas por parte de la vesícula seminal, la que produce líquido seminal para aumentar la tasa de fertilización usando menor cantidad de espermatozoides. La relación entre ambos órganos es negativa, tal como es el patrón general observado para las especies analizadas de escorpiones. Por último, Rinderer et al. (1985) compararon los pesos de las vesículas seminales entre los zánganos de dos grupos de abejas. El estudio evidenció una diferencia entre los grupos, sugiriendo hipótesis particulares sobre como influenciarían las abejas reinas el destino de los espermatozoides.

5.5.2.2 Efecto de la poliandria sobre el volumen del espermatóforo

Como ya adelantamos en el capítulo anterior, el volumen del espermatóforo está directamente relacionado con la masa testicular. Al igual que ocurrió con el nivel de variabilidad intra-macho, tomando nuevamente a la masa testicular como un reflejo directo de la competencia espermática, se evidencia que ésta influye en el moldeado del volumen en los espermatóforos. Como vimos en el capítulo anterior, la relación “testículo-vesícula-cápsula” sugiere que, a grandes rasgos, las especies que tenderían a producir mucho almacenarían poco y transferirían mucho, mientras que las especies con tendencia a producir poco, almacenarían mucho y transferirían poco.

Además de los escorpiones, algunas especies de artrópodos también presentan espermatóforos con partes externas esclerotizadas (Khalifa, 1949 a, b [Cucarachas]; Dudenhausen y Talbot, 1983 [Langosta de mar]). Debido a esta particularidad, se presentan como estructuras muy útiles para detectar indirectamente el riesgo competencia espermática, ya que se pueden visualizar externamente (ej. en escorpiones) o contar dentro del tracto reproductivo de las hembras. Similar a lo mencionado para las vesículas seminales, no existen muchos estudios sobre influencia de la competencia espermática sobre la morfología de los espermatóforos. Uno de los casos más conocidos, es el de los grillos tetigónidos (Vahed et al., 2011). En este grupo, sin embargo, los espermatóforos no están esclerotizados y presentan una composición muy particular (Proctor, 1998) En estos grillos las hembras consumen un producto de las glándulas accesorias que conforma un apéndice del espermatóforo, conocido

como “espermatophylax”, y recién luego ingiere sobrantes de esperma que queden en la “ampulla”, la cual se adhiere a su abertura genital. El consumo de la hembra del espermatophylax evita la remoción prematura de la *ampulla* de gonóporo (Wedell y Arak, 1989; Reinhold y Heller, 1993; Wedell, 1993; Heller y Reinhold, 1994; Simmons, 1995a). En estos casos, la cantidad de esperma que transfiera un macho está en función del tiempo que la *ampulla* está adherida a la hembra y/o al tamaño mismo de la *ampulla* (Simmons y Kvarnemo, 1997). Considerando estos escasos antecedentes, el análisis de eyaculados provenientes de espermátóforos esclerotizados, como los de escorpiones, aporta un nuevo ingrediente al estudio de la selección sexual, ya que nos enfrentamos con un cierto valor teórico del eyaculado debido a la limitación física en la capacidad de transferencia impuesta por la dureza de la estructura. De este modo, los machos podrían destinar un volumen menor de esperma pero no mayor a dicho tope. Estudios adicionales en escorpiones tanto en lo funcional como en lo comparativo serán de gran aporte para el conocimiento de la selección sexual poscopulatoria en artrópodos.

Conclusiones generales y perspectivas futuras

A lo largo de esta tesis se analizaron varios aspectos de la producción espermática en escorpiones.

Los paquetes espermáticos mostraron una morfología muy conservada a niveles taxonómicos altos. Sin embargo la familia Bothriuridae mostró una gran diversidad de formas. La cantidad de espermatozoides contenidos en los paquetes espermáticos varía según la especie. El largo de los paquetes ha sufrido una gran variación a nivel de géneros y familias influenciado en gran medida por el tipo de plegamiento que puede existir. Se observan distintos tipos de agregación que va desde laxo hasta densamente plegado con presencia de membrana. La variación morfológica de grosor presente en las especies analizadas de Bothriuridae respondió en general a una variación normal de la población con alguna influencia de la temporada reproductiva sobre la aparición de ciertas formas teratológicas. No obtuvimos resultados conclusivos para la aparición de distintos grados de plegamientos en algunas especies. *Caraboctonus keyserlingi* luridae mostro fuertes indicios de un verdadero polimorfismo de paquetes espermáticos probablemente ligado a su alto riesgo de competencia espermática.

Los valores de concentración de esperma variaron notablemente y estuvieron en el orden de 10^7 espermatozoides/ml. La concentración es menor en el espermatóforo que en la vesícula seminal y el volumen transferido es menor que el volumen total que es capaz de almacenar el espermatóforo. El volumen de esperma y su concentración estarían relacionados positivamente. En apareamientos sucesivos el conteo de esperma no mostró un patrón claro. La masa testicular influyó de manera positiva al volumen del espermatóforo, sugiriendo que testículos mayores producen mayor volumen de eyaculado y como la concentración estaba relacionada directamente con el volumen se argumenta que mayores testículos producen mayor cantidad de esperma en los escorpiones. La relación positiva entre el nivel de poliandria y el tamaño testicular sumado a la producción de eyaculados mayores da un fuerte argumento en favor de la teoría que la competencia espermática moldea aspectos de la biología reproductiva en escorpiones al igual que lo hace con otras especies de animales.

Las dificultades que aparecieron en el trabajo estuvieron ligadas a la imposibilidad de acceder a material. Por un lado para el análisis de polimorfismo hubo épocas en donde no se obtuvieron organismos por limitaciones en la logística del muestreo al igual que sucedió con algunos datos destinados a conteo de esperma y sobre todo a variables ligadas al apareamiento como es el volumen

de la gota transferida a la hembra. Por otro lado está la limitación en el número de individuos analizados por la imposibilidad de utilizar individuos de colección como sucede por ejemplo en el análisis de masa testicular en vertebrados. También hubo algunos problemas con la colecta de individuos de algunas especies que no aparecieron en el campo.

En el futuro sería interesante sumar datos que refuercen las observaciones hechas en este trabajo para mejorar el entendimiento de los patrones que aquí se encontraron. Por ejemplo, sería interesante analizar la morfología de los paquetes espermáticos tomando a diferentes familias como modelo como ocurrió con Bothriuridae, para corroborar que la diversidad es propia de la familia y no se da por una falta de análisis exhaustivo en las demás familias. Por otro lado creo que es imperativo el agregado de nuevas especies al análisis de los órganos reproductivos así como también de la concentración de esperma en los diferentes sitios. También sería necesario ahondar en el análisis de la influencia de la época reproductiva sobre la variación del ancho de los paquetes espermáticos en *Br. ferrugineus*. Ligado a este análisis sería muy interesante analizar el aparente polimorfismo dentro de *C. keyserlingi*, un luridae que además es bastante interesante desde el punto de vista de la competencia espermática.

Por es muy importante el análisis del destino de los espermatozoides dentro del tracto reproductivo femenino para avanzar en el conocimiento y tener una visión más general para poder entender aún mejor estos patrones propuestos. Dentro de los arácnidos, las arañas han sido bastante exploradas desde el punto de vista de los fenómenos que ocurren en la hembra. Sin embargo hay todavía algunos puntos oscuros que necesitan estudios. El esperma en arañas está encapsulado (Foelix, 1996). En general, el macho insemina a la hembra y de allí los espermatozoides son llevados a los reservorios de esperma (Herberstein et al., 2011). Este transporte es pasivo porque los espermatozoides siguen su encapsulamiento hasta llegar al reservorio espermático (Eberhard, 2004). Se conoce que se activan en la espermateca de la hembra pero no se sabe bien el mecanismo y tampoco se sabe si influye la hembra por separado o influyen ambos sexos a la par (Herberstein et al., 2011). Una vez activados los espermatozoides viajan activamente a través del ducto de fertilización hacia el sitio de fertilización. De nuevo, aquí no hay precisiones sobre cuál es el verdadero lugar de fertilización pero se manejan varias hipótesis (Foelix, 1996; Burger et al., 2006).

En escorpiones ocurriría algo similar, pero todavía hay muchas incógnitas. Luego que los espermatozoides se liberan en el atrio femenino, son almacenados en los receptáculos seminales. Estudios preliminares muestran que, en los paquetes

espermáticos, los espermatozoides muestran dos tipos de movimientos, uno les permite separarse entre ellos y el otro le permitiría trasladarse (Vrech observación personal). El primer movimiento debería de aparecer cuando el paquete se encuentra en el atrio femenino y el segundo sería facilitado quizás por la hembra cuando los espermatozoides son almacenados. En *Brachistosternus ferrugineus* (Bothriuridae) los espermatozoides almacenados se asocian al epitelio glandular del receptáculo seminal, donde se cree recibirían algún tipo de nutrición para mantenerse viables (Peretti y Battán-Horenstein, 2003), tal y como sucede en otros organismos (Ashok, 2007; Han et al., 2008; Baer et al., 2009). Algunos análisis preliminares en escorpiones sugieren que los espermatozoides serían también activados en los sitios de almacenamiento. Luego los espermatozoides pasarían al ovariutero para fertilizar los óvulos que se encuentran dispersos por los túbulos del ovariutero (Farley, 1999). Una característica bastante particular es que luego de la fertilización los embriones tienen un desarrollo vivíparo y la gestación puede durar varios meses hasta más de un año (Polis y Sissom, 1990). Para tener un conocimiento más acabado de lo que sucede en la hembra se necesita conocer cómo se disponen los espermatozoides en las espermatecas de la mayoría de las especies, conocer la viabilidad y motilidad de los espermatozoides que se encuentran almacenados en la espermateca desde el apareamiento hasta la parición y por último ver que recorrido teórico hacen los espermatozoides para fertilizar los diferentes óvulos de la hembra. Este análisis es prioritario a los fines de poder luego adentrarse en aspectos puntuales de selección sexual poscopulatoria, tales como competencia espermática directa y paternidad diferencial entre machos competidores.

BIBLIOGRAFÍA

- Abd-el-Wahab, A (1957) The Male Genital System of the Scorpions, *Buthus quinquestriatus*. Quarterly Journal of Microscopical Science, 3(41): 111–122.
- Alberti, G. (1980): Zur Feinstruktur des Hodenepithels und der Spermien von *Eusimonia mirabilis* Roewer, 1934 (Solifugae, Arachnida). Zool. Anz. 204: 345–352.
- Alberti G (1983) Fine structure of scorpion spermatozoa (*Buthus occitanus*; Buthidae, Scorpiones). Journal of Morphology, 177: 205–212.
- Alberti G (2000) Chelicerata. In Adiyodi KG y Adiyodi RG eds, Reproductive Biology of the Invertebrates. Vol. IX, Part B (progress in male gamete ultrastructure and phylogeny. Oxford y I B H Publis. Co., New Delhi. Pp. 311–388.
- Alberti, G. & Peretti, A. (2002). Fine structure of male genital system and sperm in Solifugae does not support a sister-group relationship with Pseudoscorpiones (Arachnida). Journal of Arachnology. 30: 268-274.
- Althaus S; Jacob A; Graber W; Hofer D; Nentwig W; Kropf, C (2010) A double role of sperm in scorpions: The mating plug of *Euscorpius italicus* (Scorpiones: Euscorpiidae) consists of sperm. Journal of Morphology, 271(4): 383–393.
- Andersson M (1994). The theory of sexual selection. In Krebs JR y Clutton-Brock TH eds, Sexual Selection. Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey. 599 pp.
- Anderson MJ; y Dixon AF (2002) Sperm competition: motility and the midpiece in primates. Nature, 416(6880): 496-496.
- Anderson MJ; Dixon AS y Dixon, AF (2006). Mammalian sperm and oviducts are sexually selected: evidence for co-evolution. Journal of Zoology, 270(4): 682–686.
- André J (1959) Etude au microscope électronique de l'évolution du chondriome pendant la spermatogénèse du scorpion *Euscorpius flavicaudis*. Journal of Ultrastructure Research, 2:288-308.

- André J (1963) Some aspects of specialization in sperm. In Mazia D y Tyler A eds., General physiology of cell specialization. McGraw-Hill New York, London. Pp. 91-115.
- Ashok R; Murphy C; Florane C; Williams K; Park YI y Ingber B (2007) Structure of Spermatheca, Sperm Dynamics, and Associated Bacteria in Formosan Subterranean Termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 100(3):418-424.
- Austad SN (1984) Evolution of Sperm Priority Patterns in Spiders, In Smith RL, Ed., Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems. Academic Press. Pp. 223-249,
- Baer B y Boomsma JJ (2004) Male reproductive investment and queen mating frequency in fungus-growing ants. *Behavioral Ecology*, 15(3): 426–432.
- Baer B; Eubel H; Taylor NL; O'toole N y Millar AH (2009) Insights into female sperm storage from the spermathecal fluid proteome of the honeybee *Apis mellifera*. *Genome Biology*, 10:R67
- Baer B; Schmid-Hempel P; Høeg JT y Boomsma JJ (2003) Sperm length, sperm storage and mating system characteristics in bumblebees. *Insectes Sociaux*, 50(2): 101-108.
- Ball MA y Parker GA (1997) Sperm competition games: inter-and intra-species results of a continuous external fertilization model. *Journal of Theoretical Biology*, 186(4): 459-466.
- Balshine S; Leach BJ; Neat F; Werner NY y Montgomerie R (2001) Sperm size of African cichlids in relation to sperm competition. *Behavioral Ecology*, 12(6): 726-731.
- Bastidas O (2010) Cell counting with neubauer chamber basic hemocytometer usage [online]. Disponible en format pdf en la siguiente página web: <http://www.celeromics.com>.
- Bell G (1978) The evolution of anisogamy. *Journal of theoretical biology*, 73(2): 247-270.
- Bertani G; Scheid I; Irgang R; Barioni Jr. W; Wentz I y Afonso S (2002) Gonadal sperm reserve in purebred Landrace and Large White boars of high average daily gain. *Theriogenology*, 57(2): 859–867.

- Birkhead TR y Møller AP (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(4): 295-311.
- Birkhead TR y Møller AP (1998) Sperm competition and sexual selection. Academic Press.
- Birkhead TR; Hosken DJ; Pitnick S (2009) Sperm biology: an evolutionary perspective. Academic Press.
- Birkhead, TR; Pellatt EJ; Brekke P; Yeates R y Castillo-Juarez H (2005) Genetic effects on sperm design in the zebra finch. *Nature*, 434(7031): 383-387.
- Birkhead TR; Hosken DJ; Pitnick S; Lessells CM y Snook RR (2009) The evolutionary origin and maintenance of sperm: selection for a small, motile gamete mating type. In Birkhead TR; Hosken DJ; Pitnick S eds., *Sperm biology: an evolutionary perspective*. Academic Press. Pp. 43-67.
- Blackburn DG (1999) Viviparity and oviparity: evolution and reproductive strategies. *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press, New York, New York, USA, 994-1003.
- Boorman E; y Parker G (1976) Sperm (ejaculate) competition in *Drosophila melanogaster*, and the reproductive value of females to males in relation to female age and mating status. *Ecological Entomology*, 1(3): 145–155.
- Breed WG; y Taylor J (2000) Body mass, testes mass, and sperm size in murine rodents. *Journal of Mammalogy*, 81(3): 758–768.
- Briskie JV; y Montgomerie R (1992) Sperm size and sperm competition in birds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 247(1319): 89–95.
- Briskie JV; Montgomerie R y Birkhead TR (1997) The evolution of sperm size in birds. *Evolution*, 51(3): 937–945.
- Brody S (1945) *Bioenergetics and growth*. Reinhold publishing corporation, Oxford, England. Pp. xii 1023.
- Bruck T (1978) The structure of the male genital system of *Alagoasa bicolor* (L.)(Coleoptera: Chrysomelidae) with special regard to sperm transportation. M.S. thesis, University of Puerto Rico, Rio Piedras, Puerto Rico.

- Brun B y Rumpler Y (1990) Seasonal variation of sperm morphology in the Mayotte brown lemur (*Eulemur fulvus mayottensis*). *Folia Primatologica*, 55(1): 51-56.
- Buckland-Nicks J (1998) Prosobranch parasperm: sterile germ cells that promote paternity?. *Micron*, 29(4): 267-280.
- Burger M; y Michalik P (2010) The male genital system of goblin spiders: evidence for the monophyly of Oonopidae (Arachnida: Araneae). *American Museum Novitates*, 1-13.
- Burger M; Michalik P; Graber W; Jacob A; Nentwig W; y Kropf C (2006) Complex genital system of a haplogyne spider (Arachnida, Araneae, Tetrablemmidae) indicates internal fertilization and full female control over transferred sperm. *Journal of morphology*, 267(2): 166-186.
- Burnham, KP; y Anderson DR (2002) Model selection and multi-model inference: a practical information-theoretic approach. Springer. Pp. 347.
- Byrne P; Roberts JD; y Simmons LW (2002) Sperm competition selects for increased testes mass in Australian frogs. *Journal of Evolutionary Biology*, 15(3): 347–355.
- Byrne PG; Simmons LW; y Roberts JD (2003) Sperm competition and the evolution of gamete morphology in frogs. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1528): 2079–2086.
- Calder WA III (1996) Size, Function and Life History. Courier Dover Publications, New York. Pp 373.
- Calhim S; Immler S; y Birkhead TR (2007) Postcopulatory sexual selection is associated with reduced variation in sperm morphology. *PLoS One*, 2(5): e413.
- Castelvetri S; y Peretti AV (1999) Observaciones sobre la receptividad sexual y presencia de tapón genital en hembras de *Bothriurus bonarensis* (CL Koch)(Scorpiones, Bothriuridae). *Revue Arachnologique*, 15-23.
- Chapman RF (1998) The insects: structure and function. Cambridge university press. Pp 749.
- Chowdhury I; y Joy K (2007) Seminal vesicle and its role in the reproduction of teleosts. *Fish Physiology and Biochemistry*, 33(4): 383–398.

- Clutton-Brock TH; Harvey PH (1979) Comparison and adaptation. *Proceedings of the Royal Society London B*, 205: 547-65.
- Coddington JA; Giribet G; Harvey MS; Prendini L; Walter DE (2004) Arachnida. In Cracraft J; y Donoghue MJ eds., *Assembling the Tree of Life*. Oxford University Press, New York. Pp. 296-318.
- Cohen J (1967) Correlation between sperm "redundancy" and chiasma frequency. *Nature*, 215: 862-863.
- Contreras-Garduño J; Peretti AV; y Córdoba-Aguilar A (2006) Evidence that mating plug is related to null female mating activity in the scorpion *Vaejovis punctatus*. *Ethology*, 112(2): 152–163.
- Costa-Schmidt L; y Machado G (2012) Reproductive interference between two sibling species of gift-giving spiders. *Animal Behaviour*, 84(5): 1201-1211.
- Cummins J (1982) Sperm size, body mass and reproduction in mammals. *The sperm cell*. Springer. pp. 395–398.
- Cummins J; y Woodall P (1985) On mammalian sperm dimensions. *Journal of Reproduction and Fertility*, 75(1): 153–175.
- Da Cruz-Landim CC; y Ferreira A (1972) Sperm differentiation in the scorpion *Tityus bahiensis* (Perty). *Caryologia*, 25: 125-135.
- Da Cruz-Landim CC; y Ferreira A (1973) The spermatozoa of *Tityus bahiensis* (Perty) scorpion-Buthidae. *Cytologia*, 38(2): 187.
- Damiens D; y Boivin G (2005) Male reproductive strategy in *Trichogramma evanescens*: sperm production and allocation to females. *Physiological Entomology*, 30(3): 241–247.
- Davey KG (1960) The evolution of spermatophores in insects. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series A, General Entomology*, 35: 107–113.
- Davey KG (1985) The male reproductive tract. In Kerkut GA; y Gilbert LI eds., *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology. Volume 1. Embryogenesis and Reproduction*, Pergamon Press, Oxford. pp. 1–14.
- de Wilde J; y de Loof A (1973) Reproduction. In Rockstein E ed., *The Physiology of Insecta*. Academic Press London. pp. 12–95.

- Demary KC; y Lewis SM (2007) Male reproductive allocation in fireflies (*Photinus* spp.). *Invertebrate Biology*, 126(1): 74–80.
- den Boer SP; Boomsma JJ; y Baer B (2008) Seminal fluid enhances sperm viability in the leafcutter ant *Atta colombica*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62(12): 1843-1849.
- Dewsbury DA (1982) Ejaculate cost and male choice. *American Naturalist*, 119(5): 601–610.
- Dias G; Oliveira CM; y Lino-Neto J (2013) Testicular and spermatogenic characteristics of *Lagria villosa* (Tenebrionidae: Lagriinae) with taxonomic inferences. *Tissue and Cell*, 45 (4): 227-230.
- Dixson AF (1998) Sexual selection and evolution of the seminal vesicles in primates. *Folia Primatologica*, 69(5): 300–306.
- Downing AL; y Burns JR (2005) Testis morphology and spermatogenesis formation in three genera of viviparous halfbeaks: *Nomorhamphus*, *Dermogenys*, and *Hemirhamphodon* (Teleostei: Hemiramphidae). *Journal of morphology*, 225(3): 329–343.
- Dudenhause EE; y Talbot P (1983) An ultrastructural comparison of soft and hardened spermatophores from the crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana. *Canadian Journal of Zoology*, 61(1): 182-194.
- Eberhard WG (1985) Sexual selection and animal genitalia. Cambridge, MA: Harvard University Press Cambridge. Pp. 233.
- Eberhard WG (1996) Female control: sexual selection by cryptic female choice. Princeton University Press. Pp. 492.
- Eberhard WG (2004) Why study spider sex: special traits of spiders facilitate studies of sperm competition and cryptic female choice. *Journal of Arachnology*, 32(3): 545-556.
- Eberhard WG (2009) Static allometry and animal genitalia. *Evolution*, 63(1): 48–66.
- Eberhard WG; Huber BA; Rafael-Lucas-Rodriguez S; Briceño RD; Salas I; y Rodriguez V (1998) One size fits all? Relationships between the size and degree of variation in genitalia and other body parts in twenty species of insects and spiders. *Evolution*, 52(2): 415-431.

- Einarsson S; Dalin AM; y Lundeheim N (2009) Sperm production and sperm morphology of Swedish Warmblood stallions. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(1): 33–36.
- Elgar MA (1998) Sperm competition and sexual selection in spiders and other arachnids. In Birkhead TR; y Møller AP eds., *Sperm competition and sexual selection*. Academic Press. Pp. 307-339.
- Engqvist L; y Reinhold K (2007) Sperm competition games: optimal sperm allocation in response to the size of competing ejaculates. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1607): 209–217.
- Farley RD (1999) Scorpiones. In Harrison FW; y Foelix RF eds., *Microscopic anatomy of invertebrates*, Vol. 8A Chelicerate Arthropoda. Wiley-Liss, New-York. Pp. 117-222.
- Farley RD (2001) Structure, reproduction and development. *Scorpion biology and research*, 13-78.
- Farris JS (1970) Methods for computing Wagner trees. *Systematic Biology*, 19(1): 83-92.
- Farris JS (1989) The retention index and the rescaled consistency index. *Cladistics*. 5: 417-419.
- Feldman HA; y McMahon TA (1983) The J mass exponent for energy metabolism is not a statistical artifact. *Respiratory Physiology*, 52: 149-63.
- Felsenstein J (1985) Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist*, 125(1): 1–15.
- Fiorillo B; Lino-Neto J; y Báo S (2008) Structural and ultrastructural characterization of male reproductive tracts and spermatozoa in fig wasps of the genus *Pegoscapus* (Hymenoptera, Chalcidoidea). *Micron*, 39(8): 1271–1280.
- Fitzpatrick JL; Montgomerie R; Desjardins JK; Stiver KA; Kolm N; y Balshine S (2009) Female promiscuity promotes the evolution of faster sperm in cichlid fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(4): 1128–1132.
- Foelix RF (1996) *Biology of Spiders*. Oxford University Press. New York. pp. 419.
- Francke OF (1979) Spermatophores of some North American scorpions (Arachnida, Scorpiones). *Journal of Arachnology*, 7: 19–32.

- Franzén A (1956) On spermiogenesis, morphology of the spermatozoon, and biology of fertilization among invertebrates. *Zoologische Bidragen*, Uppsala, 31: 355–482.
- Freckleton R; Harvey P; y Pagel M (2002) Phylogenetic analysis and comparative data: a test and review of evidence. *The American Naturalist*, 160(6): 712–726.
- Gage MJG (1994) Associations between body size, mating pattern, testis size and sperm lengths across butterflies. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 258(1353): 247–254.
- Gage MJG (1998) Mammalian sperm morphometry. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265(1391): 97–103.
- Gage MJG; y Freckleton RP (2003) Relative testis size and sperm morphometry across mammals: no evidence for an association between sperm competition and sperm length. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1515): 625–632.
- Gage MJG; y Morrow EH (2003) Experimental evidence for the evolution of numerous, tiny sperm via sperm competition. *Current Biology*, 13(9): 754–757.
- Gage MJG; Parker GA; Nylin S; y Wiklund C (2002) Sexual selection and speciation in mammals, butterflies and spiders. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1507): 2309–2316.
- Gay L; Hosken DJ; Vasudev R; Tregenza T; y Eady P (2009) Sperm competition and maternal effects differentially influence testis and sperm size in *Callosobruchus maculatus*. *Journal of evolutionary biology*, 22(5): 1143–1150.
- Ginsberg J; y Huck U (1989) Sperm competition in mammals. *Trends in Ecology and Evolution*, 4(3): 74–79.
- Goldman CA; Snell RR; Thomason JJ; y Brown DB (1990) Principles of allometry. In Goldman CA ed., *Proceedings of the Eleventh Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE)*, Volume 11: Tested studies for laboratory teaching. Pp. 43–72.
- Goloboff PA; Mattoni CI; y Quinteros AS (2006) Continuous characters analyzed as such. *Cladistics*, 22: 589–601.

- Goloboff PA; Farris JS; y Nixon KC (2008) TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24(5): 774-786.
- Gomendio M; y Roldan ERS (1991) Sperm competition influences sperm size in mammals. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 243(1308): 181-185.
- Gomendio M; Harcourt AH; y Roldan ERS (1998) Sperm competition in mammals. In Birkhead TR; y Møller AP eds., *Sperm competition and sexual selection*. Academic Press. Pp. 667-756.
- Gomendio M; Martin-Coello J; Crespo C; Magaña C; y Roldan ERS (2006) Sperm competition enhances functional capacity of mammalian spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(41): 15113-15117.
- Gomendio M; Tourmente M; y Roldan ERS (2011) Why mammalian lineages respond differently to sexual selection: metabolic rate constrains the evolution of sperm size. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1721): 3135-3141.
- Gould SJ (1975) Allometry in primates, with emphasis on scaling and the evolution of the brain. *Contributions to Primatology*, 5: 244-92.
- Green AJ (1992) Positive allometry is likely with mate choice, competitive display and other functions. *Animal Behaviour*, 43(1): 170-172.
- Grell KG (1942) Der Genitalapparat von *Panorpa communis* L. *Zoologisch Jahrbücher. Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere*. 67 (4): 461-588.
- Han X; Zhangli L; Li M; Bao H; Hei N; y Chen Q (2008) Ultrastructure of Anterior Uterus of the Oviduct and the Stored Sperm in Female Soft-Shelled Turtle, *Trionyx sinensis*. *The Anatomical Record*, 291: 335-351.
- Harcourt AH (1991) Sperm competition and the evolution of nonfertilizing sperm in mammals. *Evolution*, 45(2): 314-328.
- Harcourt AH; Purvis A; y Liles L (1995) Sperm competition: mating system, not breeding season, affects testes size of primates. *Functional Ecology*, 9(3): 468-476.
- Harvey PH; y Harcourt AH (1984) Sperm competition, testes size, and breeding systems in primates. In Smith RL ed., *Sperm competition and the evolution of animal mating systems*. Academic Press. Pp. 589-600.

- Harvey PH; y Pagel MD (1991) The comparative method in evolutionary biology. Oxford University press Oxford, England.
- Helfenstein F; Szép T; Nagy Z; Kempenaers B; y Wagner RH (2008) Between-male variation in sperm size, velocity and longevity in sand martins *Riparia riparia*. *Journal of Avian Biology*, 39(6): 647–652.
- Heller KG; y Reinhold K (1994) Mating effort function of the spermatophore in the bushcricket *Poecilimon veluchianus* (Orthoptera, Phaneropteridae): support from a comparison of the mating behaviour of two subspecies. *Biological Journal of the Linnean Society*, 53(2): 153-163.
- Herberstein ME; Schneider JM; Harmer AM; Gaskett AC; Robinson K; Shaddick K; Soetkamp D; Wilson PD; Pekár S; y Elgar MA (2011) Sperm storage and copulation duration in a sexually cannibalistic spider. *Journal of ethology*, 29(1): 9-15.
- Hess RA (1999) Spermatogenesis overview. In Knobil E; Neill JD; Adashi EY eds., *Encyclopedia of reproduction*. Academic press. pp.539-545
- Higginson DM; y Pitnick S (2011) Evolution of intra-ejaculate sperm interactions: do sperm cooperate?. *Biological Reviews*, 86(1): 249-270.
- Hjelle JT (1990) Anatomy and morphology. In Polis GA ed., *The biology of scorpions*. Stanford University Press, Stanford, California. Pp 56-63.
- Holman L; y Snook RR (2006) Spermicide, cryptic female choice and the evolution of sperm form and function. *Journal of evolutionary biology*, 19(5): 1660-1670.
- Hood RD; Watson OF; Deason TR; y Benton Jr CL (1972) Ultrastructure of scorpion spermatozoa with atypical axonemes. *Cytobios*, 5(19): 167-177.
- Hosken DJ (1997) Sperm competition in bats. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 264(1380): 385–392.
- Hosken DJ (1998) Testes mass in megachiropteran bats varies in accordance with sperm competition theory. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 44(3): 169–177.
- Hosken DJ; y Ward PI (2001) Experimental evidence for testis size evolution via sperm competition. *Ecology Letters*, 4(1): 10-13.
- Hosken DJ; Garner T; y Ward P (2001) Sexual conflict selects for male and female reproductive characters. *Current Biology*, 11(7): 489–493.

- Hosken DJ; y Stockley P (2004) Sexual selection and genital evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, 19(2): 87–93.
- Hung ACF; y Vinson SB (1975) Notes on the male reproductive system in ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of the New York Entomological Society*, 83(3): 192–197.
- Hunter FM; y Birkhead TR (2002) Sperm viability and sperm competition in insects. *Current Biology*, 12(2): 121–123.
- Igboeli G; y Rakha A (1971) Gonadal and extragonadal sperm reserves of indigenous Central African bulls. *Journal of reproduction and fertility*, 25(1): 107–109.
- Immler S (2008) Sperm competition and sperm cooperation: the potential role of diploid and haploid expression. *Reproduction*, 135(3): 275–283.
- Immler S; Pitnick S; Parker GA; Durrant KL; Lüpold S; Calhim S; y Birkhead TR (2011) Resolving variation in the reproductive tradeoff between sperm size and number. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(13): 5325–5330.
- Ingleby FC; Lewis Z; y Wedell N (2010) Level of sperm competition promotes evolution of male ejaculate allocation patterns in a moth. *Animal Behaviour*, 80(1): 37–43.
- Jacob A; Gantenbein I; Braunwalder ME; Nentwig W; y Kropf C (2004) Morphology and function of male genitalia (spermatophores) in *Euscorpius italicus* (Euscorpiidae, Scorpiones): Complex spermatophore structures enable safe sperm transfer. *Journal of Morphology*, 260(1): 72–84.
- Jamieson BGM (1987) *The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa*. Cambridge University Press.
- Jespersen Å; y Hartwick R (1973) Fine structure of spermiogenesis in scorpions from the family Vejovidae. *Journal of ultrastructure research*, 45: 366–383.
- Johnson DDP; y Briskie JV (1999) Sperm competition and sperm length in shorebirds. *Condor*, 101(4): 848–854.
- Joly D; y Lachaise D (1994) Polymorphism in the sperm heteromorphic species of the *Drosophila obscura* group. *Journal of Insect Physiology*, 40(11): 933–938.

- Joly D; Korol A; y Nevo E (2004) Sperm size evolution in *Drosophila*: inter-and intraspecific analysis. *Genetica*, 120: 233–244.
- Joly D; Luck N; y Dejonghe B (2008) Adaptation to long sperm in *Drosophila*: correlated development of the sperm roller and sperm packaging. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 310(2): 167–178.
- Joly D; Bressac C; Jaillard D; Lachaise D; y Lemullois M (2003) The sperm roller: a modified testicular duct linked to giant sperm transport within the male reproductive tract. *Journal of structural biology*, 142(3): 348–355.
- Jurečić R (1988) Sperm cell number per bundle in *Gnorimus nobilis* L.(Coleoptera, Scarabaeidae). *Genetica*, 76(1): 27–31.
- Kariya T; y Kurata H (2004) Generalized least squares. *Wiley series in probability and statistics*. Pp. 297
- Katvala M; Rönn J; y Arnqvist G (2008) Correlated evolution between male ejaculate allocation and female remating behaviour in seed beetles (Bruchidae). *Journal of evolutionary biology*, 21(2): 471–479.
- Keller L; y Reeve HK (1995) Why do females mate with multiple males? The sexually selected sperm hypothesis. *Advances in the Study of Behavior*, 24: 291-315.
- Kenagy GJ; y Trombulak SC (1986) Size and function of mammalian testes in relation to body size. *Journal of Mammalogy*, 67(1): 1-22.
- Khalifa A (1949a) Spermatophore production in Trichoptera and some other insects. *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, 100(16): 449-471.
- Khalifa A (1949b) The mechanism of insemination and the mode of action of the spermatophore in *Gryllus domesticus*. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 3(11): 281-292.
- Kleven O; Laskemoen T; Fossøy F; Robertson RJ; y Lifjeld JT (2008) Intraspecific variation in sperm length is negatively related to sperm competition in passerine birds. *Evolution*, 62(2): 494–499.
- Kluge AG; y Farris JS (1969) Quantitative phyletics and evolution of anurans. *Systematic Biology*, 18(1): 1-32.

- Knell RJ; Pomfret JC; y Tomkins JL (2004) The limits of elaboration: curved allometries reveal the constraints on mandible size in stag beetles. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271(1538): 523-528.
- Kura T; y Nakashima Y (2000) Conditions for the evolution of soldier sperm classes. *Evolution*, 54(1): 72-80.
- Lacoume S; Bressac C; y Chevrier C (2007) Sperm production and mating potential of males after a cold shock on pupae of the parasitoid wasp *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal of insect physiology*, 53(10): 1008–1015.
- LaMunyon CW; y Ward S (2002). Evolution of larger sperm in response to experimentally increased sperm competition in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1496): 1125–1128.
- Lautié N; Soranzo L; Lajarille MC; y Stockmann R (2008) Paraxial organ of a scorpion: structural and ultrastructural studies of *Euscorpius tergestinus* paraxial organ (Scorpiones, Euscorpiidae). *Invertebrate Reproduction y Development*, 51(2): 77-90.
- Leonard J; Córdoba-Aguilar A (2010) The evolution of primary sexual characters in animals. Oxford University Press, USA.
- Lifjeld JT; Laskemoen T; Kleven O; Albrecht T; y Robertson RJ (2010) Sperm length variation as a predictor of extrapair paternity in passerine birds. *PloS one*, 5(10): e13456.
- Lochmiller RL; Hellgren EC; y Grant WE (1985) Absolute and allometric relationships between internal morphology and body mass in the adult collared peccary, *Tayassu tajacu* (Tayassuidae). *Growth*, 50(3): 296-316.
- Lombardo MP; Forman AN; Czarnowski MR; y Thorpe PA (2002) Individual, temporal, and seasonal variation in sperm concentration in tree swallows. *The Condor*, 104(4): 803–810.
- Lombardo MP; Green M; Thorpe P; Czarnowski M; y Power H (2004) Repeated sampling affects Tree Swallow semen characteristics. *Journal of Field Ornithology*, 75(4): 394–403.

- Lunstra D; Ford J; Echternkamp S (1978) Puberty in beef bulls: hormone concentrations, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. *Journal of Animal Science*, 46(4): 1054–1062.
- Lüpold S; Calhim S; Immler S; y Birkhead TR (2009) Sperm morphology and sperm velocity in passerine birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1659): 1175–1181.
- Mackie JB; y Walker MH (1974) A study of the conjugate sperm of the dytiscid water beetles *Dytiscus marginalis* and *Colymbetes fuscus*. *Cell and Tissue Research*, 148(4): 505-519.
- Maddison WP y Maddison DR (2011) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.375. Disponible en <http://mesquiteproject.org>
- Maiorova AS; y Adrianov AV (2005) Ultrastructure of tentacles in the sipunculid worm *Thysanocardia nigra* Ikeda, 1904 (Sipuncula). *Russian Journal of Marine Biology*, 31(1): 21-27.
- Malo AF; Gomendio M; Garde J; Lang-Lenton B; Soler AJ; y Roldan ERS (2006) Sperm design and sperm function. *Biology Letters*, 2(2): 246–249.
- Martin PA; y Dziuk PJ (1977) Assessment of relative fertility of males (cockerels and boars) by competitive mating. *Journal of reproduction and fertility*, 49(2): 323-329.
- Martin PA; Reimers TJ; Lodge JR; y Dziuk PJ (1974) The effect of ratios and numbers of spermatozoa mixed from two males on proportions of offspring. *Journal of Reproduction and Fertility*, 39(2): 251-258.
- Matsuda R (1976) *Morphology and evolution of the insect abdomen*. Oxford, Pergamon Press.
- Mattoni CI (2003) *Patrones evolutivos en el género Bothriurus (Scorpiones, Bothriuridae): análisis filogenético*. i-vii + 249 pp., Tesis Doctoral, Facultad Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Mattoni CI; y L Prendini (2007) Phylogeny and biogeography of the family bothriuridae (Scorpiones). *Darwiniana*, 45: 55-141.

- Mattoni CI; y Peretti AV (2004) The giant and complex genital plug of the asper group of *Bothriurus* (Scorpiones, Bothriuridae): morphology and comparison with other genital plugs in scorpions. *Zoologischer Anzeiger* 243(1): 75–84.
- Mazzoldi C; Petersen C; y Rasotto M (2005) The influence of mating system on seminal vesicle variability among gobies (Teleostei, Gobiidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 43(4): 307–314.
- Michalik P; y Mercati D (2010) First investigation of the spermatozoa of a species of the superfamily Scorpionoidea (*Opisthophthalmus penrithorum*, Scorpionidae) with a revision of the evolutionary and phylogenetic implications of sperm structures in scorpions (Chelicerata, Scorpiones). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 48(2): 89-101.
- Michalik P; y Rittschof CC (2011) A comparative analysis of the morphology and evolution of permanent sperm depletion in spiders. *PloS one*, 6(1): e16014.
- Michalik P; y Lipke E (2013) Male Reproductive System of Spiders. In *Spider Ecophysiology*. Springer Berlin Heidelberg. pp. 173-187.
- Minder AM; Hosken DJ; y Ward PI (2005) Co-evolution of male and female reproductive characters across the Scathophagidae (Diptera). *Journal of evolutionary biology*, 18(1): 60-69.
- Modanu M; Michalik P; y Andrade MCB (2013) Mating system does not predict permanent sperm depletion in black widow spiders. *Evolution & Development*, 15(3): 205-212
- Mojica JM; y Bruck DL (1996) Sperm bundle coiling: Transporting long sperm bundles in *Drosophila dunni dunni*. *Journal of insect physiology*, 42(4): 303-307.
- Mojica JM; y Bruck DL (2003) The sperm bundle transport in *Drosophila*: A different type of sperm bundle gyre in *Scaptodrosophila* species. *Invertebrate reproduction y development*, 43(3): 173-179.
- Møller AP (1988) Female choice selects for male sexual tail ornaments in the monogamous swallow. *Nature*, 332(6165): 640-642.
- Møller AP (1991) Sperm competition, sperm depletion, paternal care, and relative testis size in birds. *American Naturalist*, 137(6): 882–906.

- Møller AP y Briskie J (1995) Extra-pair paternity, sperm competition and the evolution of testis size in birds. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 36(5): 357–365.
- Moreira PA; Araújo VA; Zama U; y Lino-Neto J (2008) Morphology of male reproductive system in three species of Trypoxylon (Trypargilum) Richards (Hymenoptera: Crabronidae). *Neotropical Entomology*, 37(4): 429–435.
- Morrow EH (2004). How the sperm lost its tail: the evolution of aflagellate sperm. *Biological Reviews*, 79(4): 795-814.
- Morrow EH; y Gage MJG (2000) The evolution of sperm length in moths. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267(1440): 307-313.
- Moya J; Mancini K; Machado G; y Dolder H (2007) Sperm morphology of the neotropical harvestman Iporangaia pustulosa (Arachnida: Opiliones): Comparative morphology and functional aspects. *Arthropod Structure and Development*, 36: 53–62.
- Nakatsuru K; y Kramer DL (1982) Is sperm cheap? Limited male fertility and female choice in the lemon tetra (Pisces, Characidae). *Science*, 216(4547): 753-754.
- Neff BD; y Wahl LM (2004) Mechanisms of sperm competition: testing the fair raffle. *Evolution*, 58(8): 1846–1851.
- Nur U (2005) Sperms, sperm bundles and fertilization in a mealy bug, *Pseudococcus obscurus* Essig. (Homoptera: Coccoidea). *Journal of Morphology*, 111(2), 173–199.
- Ojanguren-Affilastro AA (2005) Estudio monográfico de los escorpiones de la República Argentina. *Revista ibérica de aracnología*, (11): 75-247.
- Olsson RM; Madsen T (1998) Sexual selection and sperm competition in reptiles. In Birkhead TR; y Møller AP eds., *Sperm Competition and Sexual Selection*. Academic Press. Pp. 503-577
- Olsson RM; Madsen T; y Shine R (1997) Is sperm really so cheap? Costs of reproduction in male adders, *Vipera berus*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 264(1380), 455–459.

- Oppliger A; Hosken DJ; y Ribi G (1998) Snail sperm production characteristics vary with sperm competition risk. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265(1405): 1527–1534.
- Parapanov R; Nusslé S; Crausaz M; Senn A; Hausser J; y Vogel P (2009) Testis size, sperm characteristics and testosterone concentrations in four species of shrews (Mammalia, Soricidae). *Animal reproduction science*, 114(1): 269–278.
- Parker GA (1970) Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews*, 45(4): 525–567.
- Parker GA (1982) Why are there so many tiny sperm? Sperm competition and the maintenance of two sexes. *Journal of Theoretical Biology*, 96(2): 281–294.
- Parker GA (1984) Sperm competition and the evolution of animal mating strategies. In Smith RL ed., *Sperm competition and the evolution of animal mating systems*. Academic Press. Pp. 1-60.
- Parker GA (1990) Sperm competition games: raffles and roles. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 242(1304): 120–126.
- Parker GA (1993). Sperm competition games: sperm size and sperm number under adult control. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 253(1338): 245-254.
- Parker GA (1998). Sperm competition and the evolution of ejaculates: towards a theory base. In Birkhead TR; y Møller AP eds., *Sperm competition and sexual selection*. Academic Press. Pp.1-54.
- Parker GA; y Begon ME (1993). Sperm competition games: sperm size and number under gametic control. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 253(1338): 255-262.
- Parker GA; y Ball M (2005) Sperm competition, mating rate and the evolution of testis and ejaculate sizes: a population model. *Biology letters*, 1(2): 235–238.
- Parker GA; y Pizzari T (2010) Sperm competition and ejaculate economics. *Biological Reviews*, 85(4): 897–934.

- Parker GA; Ball MA; Stockley P; y Gage MJG (1997) Sperm competition games: a prospective analysis of risk assessment. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 264(1389): 1793-1802.
- Parker GA; Immler S; Pitnick S; y Birkhead TR (2010) Sperm competition games: Sperm size (mass) and number under raffle and displacement, and the evolution of P2. *Journal of Theoretical Biology*, 264(3): 1003–1023.
- Peirce E; y Breed WG (2001) A comparative study of sperm production in two species of Australian arid zone rodents (*Pseudomys australis*, *Notomys alexis*) with marked differences in testis size. *Reproduction*, 121(2): 239–247.
- Peretti, A.V., 1993. Estudio de la biología reproductiva en escorpiones Argentinos (Arachnida, Scorpiones): un enfoque etológico. i–ix+307 pp., Doctoral Thesis, Fac. Cien. Exactas, Físicas y Nat., Univ. Nac. Córdoba, Argentina
- Peretti AV (2003) Functional morphology of spermatophores and female genitalia in bothriurid scorpions: genital courtship, coercion and other possible mechanisms. *Journal of Zoology*, 261(2): 135-153.
- Peretti AV (2010) An ancient indirect sex model: single and mixed patterns in the evolution of scorpion genitalia. In Leonard JL; y Córdoba-Aguilar A eds., *The Evolution of Primary Sexual Characters in Animals*. Oxford, UK: Oxford University Press. Pp. 218-248.
- Peretti AV; y Battán-Horenstein M (2003) Comparative analysis of the male reproductive system in Bothriuridae scorpions: structures associated with the paraxial organs and the presence of sperm packages (Chelicerata, Scorpiones). *Zoologischer Anzeiger*, 242(1): 21-31.
- Peretti AV; y Carrera P (2005) Female control of mating sequences in the mountain scorpion *Zabius fuscus*: males do not use coercion as a response to unreceptive females, *Animal Behaviour*, 69(2): 453-462.
- Peretti AV; y Willemart RH (2007) Sexual coercion does not exclude luring behavior in the climbing camel-spider *Oltacola chacoensis* (Arachnida, Solifugae, Ammotrechidae). *Journal of ethology*, 25(1): 29-39.
- Peters RH (1983) *The Ecological Implications of Body Size*. Cambridge University Press, Cambridge. Pp. 333.

- Petrie M (1988) Intraspecific variation in structures that display competitive ability: large animals invest relatively more. *Animal Behaviour*, 36(4): 1174-1179.
- Petrie M (1992) Are all secondary sexual display structures positively allometric and, if so, why?. *Animal Behaviour*, 43(1): 173-175.
- Phillips DM (1970) Insect sperm: their structure and morphogenesis. *The Journal of cell biology*, 44(2): 243.
- Phillips DM (1974) Nuclear shaping in the absence of microtubules in scorpion spermatids. *Journal of cell biology*, 62: 911-917.
- Pitnick SS (1996) Investment in testes and the cost of making long sperm in *Drosophila*. *American Naturalist*, 148(1): 57-80.
- Pitnick SS; Hosken DJ; y Birkhead TR (2008) Sperm morphological diversity. In Birkhead TR; Hosken DJ; y Pitnick SS eds., *Sperm biology: an evolutionary perspective*. Academic Press. pp. 69-150.
- Pizzari T (2002) Sperm allocation, the Coolidge effect and female polyandry. *Trends in ecology and evolution*, 17(10): 456.
- Pizzari T; y Birkhead TR (2002) The sexually-selected sperm hypothesis: sex-biased inheritance and sexual antagonism. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 77(02): 183-209.
- Pizzari T; y Foster KR (2008) Sperm sociality: cooperation, altruism, and spite. *PLoS biology*, 6(5): e130.
- Pizzari T; y Parker GA (2009) Sperm competition and sperm phenotype. In Birkhead TR; Hosken DJ; y Pitnick SS eds., *Sperm biology: an evolutionary perspective*. Academic Press. pp. 207-245.
- Polis GA; y Sissom WD (1990) Life history. In Polis GA ed., *The biology of scorpions*, Stanford University Press, California. Pp. 161-223.
- Pomiankowski A; y Møller AP (1995) A resolution of the lek paradox. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 260(1357): 21-29.
- Prendini L (2000) Phylogeny and classification of the superfamily Scorpionoidea Latreille 1802 (Chelicerata, Scorpiones): an exemplar approach. *Cladistics*, 16(1): 1-78.

- Prendini L (2003) A new genus and species of bothriurid scorpion from the Brandberg Massif, Namibia, with a reanalysis of bothriurid phylogeny and a discussion of the phylogenetic position of *Lisposoma* Lawrence. *Systematic Entomology*, 28(2): 149-172.
- Prendini L; y Wheeler WC (2005) Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomic anarchy, and standards for peer review in online publishing. *Cladistics*, 21(5): 446-494.
- Prendini L; Volschenk ES; Maaliki S; y Gromov AV 2006 A 'living fossil' from Central Asia: The morphology of *Pseudochactas ovchinnikovi* Gromov, 1998 (Scorpiones: Pseudochactidae), with comments on its phylogenetic position. *Zoologischer Anzeiger*, 245: 211–248.
- Presgraves DC; Baker RH; y Wilkinson GS (1999) Coevolution of sperm and female reproductive tract morphology in stalk-eyed flies. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 266(1423): 1041–1047.
- Preston B; Stevenson I; Pemberton J; Coltman D; y 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 Sciences*, 270(1515): 633–640.
- Proctor HC (1998) Indirect sperm transfer in arthropods: behavioral and evolutionary trends. *Annual review of entomology*, 43(1): 153-174.
- Punzo, F. (1998). *The biology of camel-spiders (Arachnida, Solifugae)*. Kluwer Academic.
- Pyron M (2000) Testes mass and reproductive mode of minnows. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 48(2): 132–136.
- Quartuccio M; Marino G; Zanghì A; Garufi G; y Cristarella S (2011) Testicular Volume and Daily Sperm Output in Ragusano Donkeys. *Journal of Equine Veterinary Science*, 31(3): 143–146.
- Queiroz G; y Cardoso F (1987) Testicular and epididymal sperm reserves of Brazilian hairy rams. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 34(1-10): 657–660.
- R Core Team (2012) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

- Ramm SA; Parker GA; y Stockley P (2005) Sperm competition and the evolution of male reproductive anatomy in rodents. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1566): 949–955.
- Reinhold K; y Heller KG (1993) The ultimate function of nuptial feeding in the bushcricket *Poecilimon veluchianus* (Orthoptera: Tettigoniidae: Phaneropterinae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 32(1): 55-60.
- Reiss, M. J. (1991). *The allometry of growth and reproduction*. Cambridge University Press. Pp. 177.
- Ridley M (1989) The incidence of sperm displacement in insects: four conjectures, one corroboration. *Biological Journal of the Linnean Society*, 38: 349–367.
- Rinderer TE; Collins AM; Pesante D; Daniel R; Lancaster V; y Baxter J (1985) A comparison of Africanized and European drones: weights, mucus gland and seminal vesicle weights, and counts of spermatozoa. *Apidologie*, 16(4), 407–412.
- Ritar A; Mendoza G; Salamon S; y White I (1992) Frequent semen collection and sperm reserves of the male Angora goat (*Capra hircus*). *Journal of reproduction and fertility*, 95(1): 97–102.
- Robison WG (1966) Microtubules in relation to the motility of a sperm syncytium in an armored scale insect. *The Journal of cell biology*, 29(2): 251–265.
- Ross J; y Robison WG (1969) Unusual microtubular patterns and three-dimensional movement of mealybug sperm and sperm bundles. *The Journal of cell biology*, 40(2): 426–445.
- Sasakawa K (2007) Sperm bundle and reproductive organs of carabid beetles tribe Pterostichini (Coleoptera: Carabidae). *Naturwissenschaften*, 94(5), 384–391.
- Sasakawa K (2009) Marked sperm dimorphism in the ground beetle *Scarites terricola*: a novel type of insect sperm polymorphism. *Physiological Entomology* 34: 387–390.
- Sato T; Ashidate M; Wada S; y Goshima S (2005) Effects of male mating frequency and male size on ejaculate size and reproductive success of female spiny king crab *Paralithodes brevipes*. *Marine ecology. Progress series*, 296: 251–262.

- Schaller F (1971) Indirect sperm transfer by soil arthropods. *Annual Review of Entomology*, 16: 407–446.
- Schärer L; Ladurner P; y Rieger RM (2004) Bigger testes do work more: experimental evidence that testis size reflects testicular cell proliferation activity in the marine invertebrate, the free-living flatworm *Macrostomum* sp. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 56(5): 420–425.
- Schiff N; Flemming AJ; y Quicke DLJ (2001) Spermatodesmata of the sawflies (Hymenoptera: Symphyta): Evidence for multiple increases in sperm bundle size. *Journal of Hymenoptera Research*, 10(2): 119-125.
- Schluns H; Schluns E; Van-Praagh J; y Moritz RFA (2003) Sperm numbers in drone honeybees (*Apis mellifera*) depend on body size. *Apidologie*, 34(6): 577–584.
- Schmidt-Nielsen K (1984) Problems of size and scale. In Schmidt-Nielsen K ed., *Scaling: why is animal size so important?* Cambridge University Press. Pp. 7-32.
- Schneider JM; y Andrade MCB (2011) Mating behaviour y sexual selection. In Herberstein M ed., *Spider Behaviour: Flexibility and Versatility*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 215-274.
- Setchell BP (1978) *The mammalian testis*. Paul Elek, London. Pp. 450.
- Short, RV. (1977). Sexual selection and the descent of man. In *Proceedings of the Canberra symposium on reproduction and evolution*. pp. 3-19.
- Short RV (1979) Sexual selection and its component parts, somatic and genital selection, as illustrated by man and the great apes. In Slater PJB; Rosenblatt JS; Snowdon CT; y Milinski M eds., *Advances in the Study of Behavior*, vol 9. Academic Press. Pp. 131- 158.
- Short RV (1981) Sexual selection in man and the great apes. In Graham CE ed., *Reproductive Biology of the Great Apes*. Academic Press, New York. pp. 319-341.
- Silberglied RE; Shepherd JG; y Dickinson JL (1984) Eunuchs: the role of apyrene sperm in *Lepidoptera*?. *American Naturalist*, 123(2): 255-265.
- Simmons LW (1995) Correlates of male quality in the field cricket, *Gryllus campestris* L.: age, size, and symmetry determine pairing success in field populations. *Behavioral Ecology*, 6(4): 376-381.

- Simmons LW (2001) Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Princeton University Press. Pp. 388.
- Simmons, L. W., y Parker, G. A. (1992). Individual variation in sperm competition success of yellow dung flies, *Scatophaga stercoraria*. *Evolution*, 366-375.
- Simmons LW; y Tomkins JL (1996) Sexual selection and the allometry of earwig forceps. *Evolutionary Ecology*, 10(1): 97-104.
- Simmons LW; y Kvarnemo C (1997) Ejaculate expenditure by male bush crickets decreases with sperm competition intensity. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 264(1385): 1203-1208.
- Simmons LW; y Siva-Jothy MT (1998) Sperm competition in insects: mechanisms and the potential for selection. In Birkhead TR; y Møller AP eds., *Sperm Competition and Sexual Selection*. Academic Press, London. (pp. 341-432).
- Simmons LW; y García-González F (2008) Evolutionary reduction in testes size and competitive fertilization success in response to the experimental removal of sexual selection in dung beetles. *Evolution*, 62(10): 2580-2591.
- Simmons LW; Craig M; Llorens T; Schinzig M; y Hosken DJ (1993) Bushcricket spermatophores vary in accord with sperm competition and parental investment theory. *Proceedings: Biological Sciences*, 251: 183–186.
- Simmons LW; Firman RC; Rhodes G; y Peters M (2004) Human sperm competition: testis size, sperm production and rates of extrapair copulations. *Animal Behaviour*, 68(2): 297-302.
- Sinclair BJ; Borkent A; y Wood DM (2007) The male genital tract and aedeagal components of the Diptera with a discussion of their phylogenetic significance. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 150(4): 711–742.
- Sissom, W. D. (1990). Systematics, biogeography and paleontology. In Polis GA ed., *The biology of scorpions*. Stanford University Press. Pp. 64-160.
- Sivinski J (1980) Sexual selection and insect sperm. *The Florida Entomologist*, 63(1): 99-111.
- Sivinski J (1984) Sperm in competition. In Smith RL Ed., *Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems*. Academic Press., Pp. 85-115.
- Snook RR (1998) The risk of sperm competition and the evolution of sperm heteromorphism. *Animal behavior*, 56: 1497–1507.

- Snook RR. (2005) Sperm in competition: not playing by the numbers. *Trends in Ecology y Evolution*, 20(1): 46-53.
- Soleglad ME; y Sissom WD (2001) Phylogeny of the family Euscorpiidae Laurie, 1896: a major revision. *Scorpions*. Pp. 25-111.
- Soleglad ME y Fet V (2003) High-level systematics and phylogeny of the extant scorpions (Scorpiones, Orthostemi). *Euscorpius* 11: 1-175.
- Soulsbury CD (2010) Genetic patterns of paternity and testes size in mammals. *PLoS One*, 5(3): e9581.
- Soulsbury CD; y lossa G (2010) The impact of ovulation mode on sperm quantity and quality in mammals. *Evolutionary Ecology*, 24(4): 879–889.
- Stockley P; Gage MJG; Parker GA; y Møller AP (1997) Sperm competition in fishes: the evolution of testis size and ejaculate characteristics. *American Naturalist*, 149(5): 933–954.
- Stockwell SA (1989) Revision of the phylogeny and higher classification of scorpions (Chelicerata). Ph. D. Thesis. University of California, Berkeley.
- Suwanpugdee A; Kornkeawrat K; Saikhun K; Siriaroonrat B; Tipkantha W; Doungsa-Ard K; Sa-Ardrit M; (2009) Semen characteristics and sperm morphology of serow *Capricornis sumatraensis*. *Theriogenology*, 71(4): 576–585.
- Swallow JG; y Wilkinson GS (2002) The long and short of sperm polymorphisms in insects. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 77(02): 153-182.
- Swierstra E (1971) Sperm production of boars as measured from epididymal sperm reserves and quantitative testicular histology. *Journal of Reproduction and Fertility*, 27(1): 91–99.
- Takami Y; y Sota T (2007) Sperm competition promotes diversity of sperm bundles in Ohomopterus ground beetles. *Naturwissenschaften*, 94: 543–550.
- Thomas RH y Zeh DW (1984) Sperm Transfer and Utilization Strategies in Arachnids: Ecological and Morphological constraints. In Smith RL ed., *Sperm competition and the evolution of animal mating systems*. Academic Press. pp. 180-216.

- Tourmente M; Gomendio M; y Roldan ERS (2011a) Mass-specific metabolic rate and sperm competition determine sperm size in marsupial mammals. *PloS one*, 6(6): e21244.
- Tourmente M; Gomendio M; y Roldan ERS (2011b) Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. *BMC evolutionary biology*, 11(1): 12.
- Tourmente M; Gomendio M; y Roldan ERS Giojalas LC; y Chiaraviglio M (2009) Sperm competition and reproductive mode influence sperm dimensions and structure among snakes. *Evolution*, 63(10): 2513–2524.
- Vahed K; Parker DJ; y Gilbert JDJ (2011). Larger testes are associated with a higher level of polyandry, but a smaller ejaculate volume, across bushcricket species (Tettigoniidae). *Biology Letters*, 7(2): 261–264.
- Vahed K; y Gilbert FS (1996) Differences across taxa in nuptial gift size correlate with differences in sperm number and ejaculate volume in bushcrickets (Orthoptera: Tettigoniidae). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 263(1374): 1257–1265.
- Vahed K; y Parker DJ (2012) The Evolution of Large Testes: Sperm Competition or Male Mating Rate? *Ethology*, 118(2): 107-117.
- Van-den-Hurk R; Resink J; y Peute J (1987) The seminal vesicle of the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Cell and tissue research*, 247(3): 573–582.
- Vignoli V; Klann AE; y Michalik P (2008) Spermatozoa and sperm packages of the European troglodyphous scorpion *Belisarius xambeui* Simon, 1879 (Troglotayosicidae, Scorpiones). *Tissue and Cell*, 40(6): 411-416.
- Virkki N (1969) Sperm bundles and phylogenesis. *Cell and Tissue Research*, 101(1): 13–27.
- Virkki N y Bruck T (1994) Unusually large sperm cells in Alticinae: Their formation and transportation in the male genital system, and their evolution. In Jolivet PH; Cox ML; y Petitpierre E eds., *Novel aspects of the biology of Chrysomelidae*. Pluwer Academic publishers. pp. 371-381.
- Viscuso R; Narcisi L; y Sottile L (1999) Structure and function of seminal vesicles of Orthoptera Tettigonioidae. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 28(3): 169–178.

- Volschenk ES; Mattoni CI; y Prendini L (2008) Comparative anatomy of the mesosomal organs of scorpions (Chelicerata, Scorpiones), with implications for the phylogeny of the order. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 154(4): 651-675.
- Vom-Saal FS; Cooke PS; Buchanan DL; Palanza P; Thayer KA; Nagel SC; y Parmigiani S (1998) A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicology and Industrial Health*, 14(1-2): 239–260.
- Vrech DE; Peretti AV; y Mattoni CI (2011) Sperm package morphology in scorpions and its relation to phylogeny. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 161(3): 463-483.
- Ward PI (1998) Intraspecific variation in sperm size characters. *Heredity*, 80(6): 655–659.
- Ward PI; y Simmons LW (1991) Copula duration and testes size in the yellow dung fly, *Scathophaga stercoraria* (L.): the effects of diet, body size, and mating history. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 29(2): 77–85.
- Wedell N (1993) Spermatophore size in bushcrickets: comparative evidence for nuptial gifts as a sperm protection device. *Evolution*, 47(4): 1203–1212.
- Wedell N; y Arak A (1989) The wartbiter spermatophore and its effect on female reproductive output (Orthoptera: Tettigoniidae, *Decticus verrucivorus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 24(2): 117-125.
- Wedell N; y Hosken DJ (2010) The evolution of male and female internal reproductive organs in insects. In Leonard JL; y Córdoba-Aguilar A eds., *The evolution of primary sexual characters in animals*. Oxford University Press, New York. pp. 307-331.
- Wedell N; Gage MJG; y Parker GA (2002). Sperm competition, male prudence and sperm-limited females. *Trends in Ecology and Evolution*, 17(7): 313–320.
- Werner M; y Simmons LW (2008) Insect sperm motility. *Biological Reviews*, 83(2): 191–208.
- White M (1955) Patterns of spermatogenesis in grasshoppers. *Australian journal of Zoology*, 3(2): 222–226.

- White-Cooper H; Doggett K; y Ellis RE (2008) The evolution of spermatogenesis. In Birkhead TR; Hosken DR; y Pitnick SS eds., *Sperm Biology: An Evolutionary Perspective*. Academic Press. Pp. 151-184.
- Wigby S; Chapman T (2004) Sperm competition (Primer). *Current Biology* 14: 100–103.
- Williams PD; Day T; y Cameron E (2005) The evolution of sperm-allocation strategies and the degree of sperm competition. *Evolution*, 59(3): 492–499.
- Winnick CG; Holwell GI; y Herberstein ME (2009) Internal reproductive anatomy of the praying mantid *Ciulfina klassi* (Mantodea: Liturgusidae). *Arthropod structure \y development*, 38(1): 60–69.
- Woodall P; y Johnstone I (1988) Dimensions and allometry of testes, epididymides and spermatozoa in the domestic dog (*Canis familiaris*). *Journal of reproduction and fertility*, 82(2): 603–609.
- Xie S; Hua B (2010) Ultrastructure of the seminal vesicle and sperm storage in *Panorpidae* (Insecta: Mecoptera). *Micron*, 41: 760–768.