

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**COMPORTAMIENTO DE CORTEJO DURANTE LA COPULA DE LOS MACHOS
DE ALGUNAS ESPECIES DE *Drosophila* (Drosophilidae) Y SU EFECTO EN LA
ELECCIÓN CRIPTICA POR LA HEMBRA**

**Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de
Posgrado en Biología para optar por el grado de Magíster Scientiae**

NATALIA RAMIREZ ALBAN

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

Costa Rica

2004

Dedicatoria

A mis dos queridos Rodrigos, esposo e hijo.

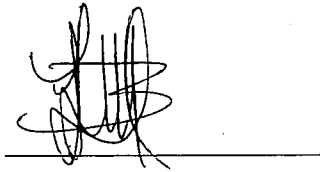
Agradecimientos

Agradezco a todos los profesores de la Escuela de Biología por su enseñanza, amistad y apoyo. A Paul Hanson y Carolina Godoy por su gran bondad y motivación en la entomología en todos estos años. A William Eberhard por transmitir la pasión por el estudio del comportamiento animal, por su paciencia y excelentes críticas. A Federico Bolaños a quien admiro como padre de familia agradezco su valiosa enseñanza en mi formación como biólogo; a Daniel Briceño por su gran ayuda en el uso de programas, equipos y críticas; a Gilbert Barrantes por sus sabios consejos y por la oportunidad de enseñarme el hermoso mundo de las aves; Mónica Springer por su amistad y consejos, Gerardo Avalos por su gran motivación en la vida profesional y personal; a Hernán Camacho por el préstamo de equipo para trabajar en Santa Rosa; a Virginia Solís por su gran preocupación por los estudiantes. A Jorge Lobo por ser el primero en impulsar mi inclinación hacia el estudio del comportamiento animal en el curso de Golfito. A David Grimaldi por la identificación de los especímenes de mi estudio. A mis compañeros del Laboratorio de Entomología de la 170: Ximena Miranda por la gran ayuda en especial con críticas y amistad; a Patricia Ortiz por su alegría y ayuda en el área de videos, a Vivian Méndez por sus críticas, buen humor y recuerdos, a Ju Lin Weng por su gran apoyo y compartir su dedicación en la investigación; a Martha Baena⁷ por las consultas a larga distancia; a Leonora Rodríguez por su ejemplo en orden, disciplina y enseñanza de programas estadísticos; a Onanchí por su ser panameña contagioso y amistad; a Kenji Nishida por su enseñanza de un mundo que sin fotos sería difícil de imaginar y a James sus consejos. A los asistentes Gerardo y Eddie por su colaboración. A Tatiana Robles, Caty Frenkel, Eric Fuchs, Eduardo Toral por complementar mi formación con enseñanzas en diversas áreas de la biología. Al personal del Área de Conservación Guanacaste, Roger Blanco, María Martha Chavarría y Daniel Janzen por aprobar y apoyar mi investigación en el Parque Nacional Santa Rosa.

A mis padres, Jorge E. Ramírez, Rosa Albán y mis hermanas, Monserrath e Ivania por ser testigos de la gran pasión que he tenido hacia la biología todos estos años. A mi esposo su amor, paciencia y apoyo en estos años de estudio de la maestría.

"Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar el grado de Magíster Scientiae".

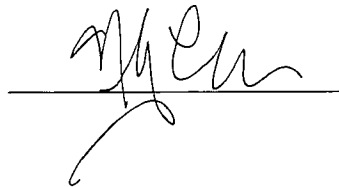
Dr. Gilbert Barrantes Montero
REPRESENTANTE DEL DECANO
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO



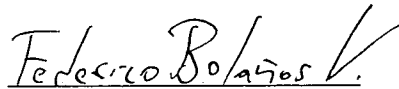
Dr. Paul Hanson Snortum
DIRECTOR DE TESIS



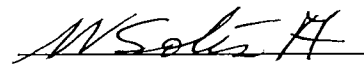
Dr. William G. Eberhard Crabtree
ASESOR



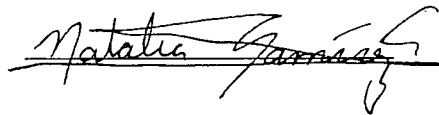
M. Sc. Federico Bolaños Vives
ASESOR



Dra. Ma. Virginia Solís Alvarado
DIRECTORA
PROGRAMA DE ESTUDIOS
POSGRADO EN BIOLOGIA



Natalia Ramírez Albán
CANDIDATA



INDICE	Página
Dedicatoria y agradecimientos.....	ii
Aprobación firmada.....	iii
Resumen en español.....	v
Lista de cuadros.....	vii
Lista de figuras.....	viii
Revisión bibliográfica.....	1
Metodología.....	4
Resultados.....	9
Conclusiones.....	15
Bibliografía.....	17
Artículo 1: Cortejo durante la cópula de los machos de <i>Drosophila malerkotliana</i> , <i>D. melanogaster</i> , <i>D. saltans</i> y <i>D. willistoni</i> (Drosophilidae).....	36
Artículo 2: The effect of male copulatory courtship on <i>Drosophila melanogaster</i> female (Diptera: Drosophilidae).....	67
Short communication: Flexibility of the copulatory courtship behavior in males of <i>Drosophila melanogaster</i> (Diptera: Drosophilidae).....	77

RESUMEN

Ramírez Albán, Natalia

Comportamiento de cortejo durante la copula de los machos de algunas especies de *Drosophila* (Drosophilidae) y su efecto en la elección críptica por la hembra. Tesis de Maestría en Biología.-San José, C.R. : N. Ramírez A. 2004. 90h.:11. – 27 refs.

Se propone comparar el cortejo copulatorio de los machos en cuatro especies cercanamente relacionadas de la mosca del género *Drosophila*, y se espera encontrar diferencias si este se encuentra bajo la influencia de la selección sexual por elección críptica de la hembra. También se propone analizar el efecto de las variaciones del cortejo copulatorio en distintos aspectos reproductivos de la hembra.

Se colectaron tres especies de moscas en el Parque Nacional Santa Rosa *Drosophila malerkotliana*, *D. saltans* y *D. willistoni*. *D. melanogaster* fue suministrada por Carolina Biological Supply. Se filmó con una cámara de video unida a un estereoscopio treinta parejas de moscas por especie para analizar el cortejo y comparar entre las especies. Se realizó las variaciones del cortejo en *D. melanogaster* con el fenotipo silvestre y sepia. Se analizó el efecto del los machos con o sin tarsos y cómo varió su comportamiento y el de la hembra.

Se describe el comportamiento durante la cópula del macho y la hembra de *Drosophila malerkotliana*, *D. melanogaster*, *D. saltans* y *D. willistoni*. En las tres primeras especies los machos utilizaron las patas para cortejar, *D. willistoni* no presentó ningún comportamiento externo. Todos presentaron el comportamiento de pulsar con la pata delantera el ala de la hembra, pero varió la duración, el patrón de ocurrencia, y la frecuencia de individuos. En *D. saltans* dieron frotos con el tercer par de patas al ovipositor de la hembra; en *D. malerkotliana* y *D. melanogaster* dieron golpecitos con el segundo y tercer par de patas al abdomen, tórax y ojos de la hembra, pero la coordinación entre los pares de patas, la ocurrencia, y la duración variaron entre estas dos especies. El macho de *D. willistoni* sólo realizó movimientos rítmicos de contracción y extensión de la genitalia dentro de la hembra, un movimiento que también ocurrió en las otras especies. Las variaciones del cortejo copulatorio de los machos aún en especies más cercanamente relacionadas concuerda con la idea de que este comportamiento se encuentre bajo

selección sexual por elección críptica de la hembra. Además, se observó que las hembras que copularon con machos modificados recopularon en menor tiempo, produjeron menos progenie, y tuvieron menos pseudocópulas. La procedencia espermática no fue afectada por la modificación del macho. El comportamiento de la hembra durante la cópula no varió cuando el macho era modificado. Estos experimentos muestran que la modificación en el cortejo copulatorio del macho puede afectar aspectos de la elección críptica de la hembra que no se relacionan con efectos directos sobre el esperma. También se modificó el segundo par de patas cortando los tarsos del macho durante la primera cópula. Los machos modificados realizaron un ajuste con las patas terceras en los comportamientos lo que podría sugerir que los golpecitos dados en sitios específicos podrían ser importantes para el macho, influyendo en la decisión de la hembra de engendrar con sus gametos.

Comportamiento, cortejo copulatorio; *Drosophila*; elección críptica de la hembra, selección sexual.

N.R.

Escuela de Biología

LISTA DE CUADROS

Página

- Cuadro 1. Frecuencia de los machos que realizaron los comportamientos copulatorios, promedios \pm desviación estándar, mediana y ámbito de la duración de las cópulas entre paréntesis ámbito. Tasas promedios de los comportamientos (duración de los movimientos entre la duración total de la cópula ms/ms).....20
- Cuadro 2. Proporción de hembras dedicada a diferentes comportamientos durante la cópula en 30 parejas. Promedios \pm desviación estándar y ámbito entre paréntesis del tiempo que dedicaron en cada comportamiento.....21
- Cuadro 3. Comparación entre las cuatro especies de los promedios, desviación estándar y ámbito (entre paréntesis) de las tasas de duración (segundos por minuto) o de frecuencias de cada comportamiento según la duración total de cada tercio de la cópula (minutos).....22
- Cuadro 4. Comparación entre las primeras cópulas con machos silvestres intactos y con machos silvestres sin los tarsos del primer par de patas.....23
- Cuadro 5. Comparación entre las primeras cópulas con machos silvestres intactos y con machos sin los tarsos del segundo par de patas.....24

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Pulsada del macho <i>D. melanogaster</i>	25
Figura 2. Golpecitos del macho de <i>D. melanogaster</i> , vista ventral.....	26
Figura 3. Golpecitos del macho de <i>D. malerkotliana</i> , vista ventral.....	27
Figura 4. Comportamientos de <i>D. saltans</i> durante la cópula.....	28
Fig. 5. Ejemplo de vibraciones producidas por la hembra de <i>D. saltans</i> cuando realiza una sacudida al macho durante el final de la cópula.....	29
Fig. 6. El patrón temporal de ocurrencia de los comportamientos del macho y la hembra en un ejemplo de una cópula de cada una de las cuatro especies de <i>Drosophila</i>	30
Fig. 7. Porcentaje del tiempo que realizó comportamientos la hembra durante los 10 segundos iniciales.....	31
Fig. 8. Porcentajes del total de comportamientos en 30 cópulas en <i>D. melanogaster</i> , clasificados en tres períodos.....	32
Fig. 9. Porcentajes del total de comportamientos en 30 cópulas en <i>D. malerkotliana</i> , clasificados en tres períodos.....	33
Fig. 10. Fotos extraídas de videos de cópulas de <i>Drosophila melanogaster</i> . A-) Vista lateral de un macho con protarsos intactos. B-) Vista lateral de un macho sin protarsos. La flecha señala las patas delanteras.....	34
Fig. 11. Fotos extraídas de videos de cópulas de <i>Drosophila melanogaster</i> . A-) Vista ventral, el macho con el meso tarso derecho tocó el ojo mientras el meta tarso tocó el tórax de la hembra, las flechas señalan estos sitios. B-) Vista dorsal, la pata izquierda del macho sin meso tarso se dirige a tocar el tórax y el meta tarso izquierdo toca el ojo de la hembra.....	35

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Introducción

Las moscas del género *Drosophila* han sido criadas y utilizadas para estudios de laboratorio desde 1901 por W. E. Castle quien fue el primer entomólogo interesado en aprender sobre su corto ciclo de vida y sus medios de cultivo (Oliver 1976). Luego se comenzó a utilizar *Drosophila* para estudios genéticos en la Universidad de Columbia, debido a la rápida reproducción en el laboratorio pudieron obtener un gran número de mutaciones espontáneas en poco tiempo y probar la herencia Mendeliana. Morgan, Muller, Bridges y otros genetistas realizaron grandes descubrimientos gracias a la crianza de estas pequeñas moscas y a su rápido desarrollo (Oliver 1976). Fueron los genetistas quienes realizaron las primeras observaciones del comportamiento de apareamiento de *Drosophila* con el objetivo de resolver problemas evolutivos (Ashburner y Wright 1978). Ellos determinaron que era importante examinar el papel del cortejo en la Selección sexual y el aislamiento reproductivo.

En 1915 Sturtevant fue el primero en describir el cortejo de *D. melanogaster* e intentó identificar el estímulo involucrado; describió el cortejo de 22 especies dentro de *Drosophila* y géneros relacionados (Sturtevant 1921 en Ewing 1983). Spieth en 1952 describió el comportamiento sexual de 101 especies (Ewing 1983) y también describió el comportamiento de cortejo precopulatorio de algunas especies endémicas de *Drosophila* en Hawai, utilizando moscas adultas del campo (Spieth 1974). Algunos etólogos realizaron investigaciones con *Drosophila* acerca de la evolución del comportamiento y su base genética. Estudiaron aspectos del comportamiento principalmente el cortejo previo a la cópula (Bastock y Manning 1955 en Ewing 1984). Otros como Grossfield (1978) estuvieron interesados en estudiar el comportamiento no sexual y sus bases genéticas. Estudios más recientes analizan cómo contribuyen los genes involucrados en comportamientos como forrajeo, ritmos circadianos, cortejo, aprendizaje y memoria con sus comportamientos respectivos en *Drosophila* (Sokolowski 2001)

Se le ha dado mucha atención al comportamiento de cortejo precopulatorio del macho en moscas drosofilidas (Fowler 1973; Spieth 1974; Bennet-Clark *et al.* 1980; Hall 1994) pero relativamente muy poco al cortejo que ocurre durante y después de la cópula

(Eberhard 1997). El cortejo copulatorio del macho es un fenómeno común en insectos y arañas (Thornhill 1983; Eberhard 1992; Eberhard 1994; Edvardsson y Arnqvist 2000; Tallamy *et al.* 2002). Este además de presentarse en artrópodos se ha observado en otros grupos en un rango desde nemátodos hasta mamíferos (Eberhard 1996). El comportamiento del macho de cortejar a la hembra antes, durante o después de la cópula puede componerse de vibraciones, mordiscos, frotos, patadas, golpecitos, cantos, etc. (Eberhard 1994). El macho invierte energía en elaborar esta variedad de comportamientos y podría deberse a su influencia en la elección críptica que realiza la hembra (Eberhard 1994). Este comportamiento de cortejo del macho previo a la cópula no le garantiza que va a ser el padre de la futura progenie, sólo en aquellas especies en las cuales la hembra siempre copule una vez. Cuando la cópula comienza ocurren varios procesos que son siempre o la mayoría de las veces controlados directamente por la hembra y que pueden influenciar la oportunidad de que el esperma de cierto macho fertilice los huevos de la hembra (Eberhard 1994). Al uso selectivo de estos mecanismos que realiza la hembra antes, durante y después de la cópula que sesga la paternidad entre los machos que han copulado con ella se le conoce como elección críptica (Thornhill 1983). Esta elección puede llevar a una fuerte selección sexual (Thornhill 1983).

En *Drosophilidae*, una familia grande de aprox. 3000 spp. descritas y quizás 5000 spp. en total (Grimaldi 1990), el comportamiento de cortejo antes de la cópula se conoce bien (Bennet-Clark *et al.* 1980, Fowler 1973, Gromko *et al.* 1984, Hall 1994) pero no el comportamiento durante la cópula (Ehrman 1978). Existen muy pocos estudios detallados sobre el comportamiento de cortejo copulatorio. Algunos de estos estudios se han realizado en *D. melanogaster*, *D. mauritiana* y *D. simulans* (grupo *melanogaster*; Robertson 1982); *D. emarginata* (grupo *saltans*; Eberhard 1994); *D. birchii* y *D. serrata* (grupo *melanogaster*; Hoikkala y Crossley 2000, Hoikkala *et al.* 2000); el complejo *auraria* (grupo *melanogaster*; Tomaru y Oguma 1994), en *D. phalerata* (grupo *quinaria*; Neems *et al.* 1997); y en especies del género cercano *Zaprionus* (Bennet-Clark *et al.* 1980). Estos han reportado que los machos vibran las alas produciendo sonidos ó frotan partes del cuerpo de la hembra durante la cópula. Por lo tanto, es desde 1982 cuando Robertson describe comportamientos de los machos que utilizan las patas. Su estudio describió que los machos de tres especies *D. mauritiana*, *D. melanogaster*, *D. simulans* repetidamente extendían las

patas meso y meta torácicas y frotaban vigorosamente el cuerpo de la hembra. Este reporte brinda la perspectiva de analizar con más detalle el comportamiento de la actividad del macho durante la cópula en una especie y comparar el cortejo copulatorio entre especies cercanamente relacionadas. Una de las preguntas cuyo objetivo es responder con el siguiente estudio es ¿si el cortejo durante la cópula es diferente entre especies del mismo género? Si el cortejo copulatorio difiere entre las especies este probablemente se deba a que se encuentra bajo la selección sexual por elección críptica de la hembra (Eberhard 1997).

En principio, las hembras de una especie podrían seleccionar a los machos antes, durante, y después de aparearse. En la selección previa a la cópula la hembra puede no responder a ciertos machos o rechazarlos. También durante la cópula la hembra puede interrumpirla antes de la inseminación o antes de que la inseminación se complete (Thornhill, 1983). Podría así afectar no solo la transferencia de esperma sino de otros productos que acompañan el semen, los cuales podrían inhibir las cópulas posteriores de la hembra con otros machos (Eberhard, 1996). La selección post cópula podría ocurrir si ellas únicamente utilizan esperma de cópulas que prefirieron para fertilizar sus huevos, si ellas directamente cuidan cigotos fertilizados por apareamientos superiores, y si reducen o eliminan completamente la fertilización por esperma eyaculado de otras cópulas inferiores (Thornhill 1983, Eberhard 1996). Un ejemplo es la mosca *Dryomiza anilis* en donde las hembras descartaron el esperma del macho durante o inmediatamente después de la cópula. Existió asociación en el tiempo que dio el macho golpecitos a la hembra y el porcentaje de huevos fertilizados. Machos más grandes que dieron golpecitos durante un mayor tiempo a la genitalia externa de la hembra, tuvieron más huevos fertilizados (Otronen y Siva-Jothy 1991).

En otros organismos existe una relación entre el comportamiento del cortejo que realiza el macho durante la cópula y su éxito en la fertilización de los huevos de la hembra. En *Tribolium castaneum* (Tenebrionidae) Edvardsson y Arnqvist (2000) manipularon la percepción en la hembra del cortejo copulatorio del macho (frotar con patas). Determinaron que el cortejo copulatorio de un macho aumenta la probabilidad de que el fertilizara los huevos de la hembra. Otro ejemplo es *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Coleoptera: Chrysomelidae), cuyas hembras discriminaron entre los machos según la velocidad de los

movimientos que ellos realizaron con las antenas a la hembra (Tallamy *et al.* 2002). Las hembras prefirieron machos que daban toqueteos con las antenas más rápido. Otro ejemplo es el del escarabajo de la harina *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), donde se relacionó el cortejo copulatorio del macho y la hembra con la procedencia del esperma. Entre más tiempo duró la hembra quieta en la cópula mayor número de esperma fue transferido a la hembra, pero el número de frotos con las patas del macho a la hembra no estuvo relacionado con la procedencia de esperma (Bloch Qazi, 2003). Otro posible ejemplo es la mosca *Ptilosphen viriolatus* (Micropezidae), en la cual las gotas de líquido desechadas al final de la cópula contienen menos esperma si el macho había realizado más alimentaciones a la hembra durante la cópula. Pero en este estudio no se determinó si el esperma era del mismo macho o de otro.

En *Drosophila*, las recóputas son comunes en las poblaciones naturales de algunas especies y así es posible que se diera la elección críptica o la competencia espermática. Los resultados de la fertilización en estudios con hembras con doble apareamiento son variables (Gromko *et al.* 1984). Otros estudios de *Drosophila* han estudiado la procedencia de esperma en múltiples cópulas sin tomar en cuenta el comportamiento durante las cópulas (Fowler 1973, Gromko *et al.* 1984). En *Drosophila melanogaster* ha sido reportado el cortejo copulatorio (Robertson 1982).

En *Drosophila* existen mutantes que facilitan experimentar y analizar la progenie producto de cópulas seguidas y así, determinar la preferencia de esperma de un macho u otro con relación al cortejo copulatorio que realiza el macho. El segundo objetivo de este estudio analiza los posibles efectos de una manipulación del cortejo copulatorio de pulsadas con las patas delanteras del macho sobre varios aspectos reproductivos de la hembra. La hipótesis a probar es que las hembras responden en maneras que aumenta la paternidad de los machos que realicen el cortejo copulatorio de forma normal es decir, sin variaciones causados por falta de alguna extremidad.

METODOLOGÍA

Organismos de estudio y su crianza

Se estudiaron cuatro especies del subgénero *Sophophora*: *D. malerkotliana* Parshad y Paika, *D. melanogaster* Meigen, *D. saltans* Sturtevant y *D. willistoni* Sturtevant. *D.*

malerkotliana (subgrupo *ananassae*) y *D. melanogaster* (subgrupo *melanogaster*) están en el grupo *melanogaster*. *D. saltans* pertenece al grupo *saltans*, y *D. willistoni* al grupo *willistoni*.

La especie *Drosophila melanogaster* fue suministrada por Carolina Biological Supply Company y establecida en el Laboratorio de Entomología de la Universidad de Costa Rica desde el 5 de diciembre del 2000 bajo una temperatura promedio de 24 ° C. Las otras tres especies se colectaron con cebos de banano en descomposición en el Parque Nacional Santa Rosa localizado en la provincia de Guanacaste el 10 de junio del 2000 y se criaron en el laboratorio del Parque a una temperatura promedio de 25 ° C y 80 % de humedad. Estas moscas fueron identificadas por el Dr. David Grimaldi del Museo Americano de Historia Natural de Nueva York.

Cada cultivo contenía una mezcla con aproximadamente 10 g de fécula de maíz (maicena), 20 ml de postre de frutas (Gerber), 30 ml de agua y 3 ml de ácido acético diluido (vinagre). Se colocaba 60 ml de la mezcla en cada frasco de vidrio (capacidad máxima de 200 ml) y se esterilizaban en autoclave. En el caso de los cultivos de *D. melanogaster* que se utilizaron para los experimentos de manipulación del cortejo se agregó 5 ml de banano maduro licuado (para evitar que el cultivo se endurezca rápidamente).

Estudio en el Laboratorio

Se separaron los sexos bajo un estereoscopio sin anestesia durante las 8 horas después de la eclosión (Flagg 1988) y se colocaban machos y hembras en diferentes frascos con medios de cultivo durante aproximadamente 6-7 días.

Para las observaciones se introdujo un macho y una hembra vírgenes en una caja de petri de plástico transparente de 4 cm de diámetro. Se filmaron con una cámara de video marca Sanyo VCC-3912 conectada a un estereoscopio binocular, desde cuando el macho montó sobre la hembra. Se iluminó con una lámpara de fibra óptica. Se filmó entre las 7:30 a.m. hasta las 2:00 p.m. a temperaturas ambientales (aproximadamente 25 ° C). Cada pareja se observaba durante un período de tres horas o hasta que finalizara la cópula. Cada mosca fue utilizada sólo una vez y después de finalizada la cópula fueron conservadas en alcohol al 70 %. Se filmaron 30 cópulas de cada especie, y la muestra para todos los datos que se presentan a continuación a menos de que se indique de otra forma fue 30.

Análisis de videos

Para discriminar cuáles de los comportamientos durante la cópula podrían ser cortejos, se utilizó los criterios de Eberhard (1994):

- comportamientos repetidos durante una cópula dada y presentes en diferentes cópulas,
- apropiados para estimular a la hembra,
- mecánicamente irrelevantes a los problemas del macho de mantenerse acoplado sobre la hembra,
- específicos y no realizados en otros contextos para cumplir otras funciones como por ejemplo para la limpieza.

Se utilizó el programa “J watcher” del Laboratorio de Comportamiento Animal de Macquarie University de Australia. Los datos que se obtuvieron fueron: duración total de la cópula, duración de los comportamientos en serie (el lapso desde cuando inicia y hasta cuando finalizan esos movimientos en milisegundos), frecuencia de algunos de los comportamientos individuales y el tiempo en que ocurrían durante la cópula.

Se analizó la cópula en tercios en todas las 30 parejas con el objetivo de determinar cambios en las frecuencias generales de cada comportamiento. Se presentaron las fracciones promedio de tiempo de los comportamientos en cada tercio junto con la desviación estándar, y se utilizó la prueba Kruskal-Wallis para comparar entre éstos.

También se analizó en forma más detallada los comportamientos observando algunos de los videos cuadro por cuadro (0.03 segundos). Todos los dibujos fueron calcados de imágenes de videos impresas. Se omitieron estructuras que estaban fuera de foco.

Para averiguar si se daban asociaciones entre los comportamientos del macho y la hembra en cada especie, para cada tipo de comportamiento del macho se averiguó el comportamiento de la hembra en tres períodos: Antes: frecuencias de las actividades de la hembra durante los 5 segundos antes de que empezó la actividad del macho, Durante: la actividad de la hembra durante los primeros 5 segundos desde el inicio de la acción del macho, y Después: actividad de la hembra durante los 5 segundos después del final de la acción del macho. El mismo tipo de análisis se realizó para las actividades del macho antes, durante y después de cada comportamiento de la hembra.

Análisis de sonidos

Se utilizó un micrófono Sennheiser, System MZK80ZU para captar los sonidos de los comportamientos durante algunas cópulas (dos cópulas por especie excepto para *D. saltans* se grabó tres), las cuales se grabaron con una cámara de video Sony CCD Video Hi8 equipada con +6 lentes de aproximación. Se analizó un comportamiento que produjo sonidos como ejemplo en *D. saltans* con el programa Cool edit pro 1.0 y se digitalizaron los sonidos a 44.1 Khz, con una tarjeta de sonido Creative Dolby 5.1 y se crearon figuras con Syrinx 2.2 b.

Diseño experimental

I- Experimentos con machos sin los primeros tarsos

El estudio se realizó con moscas *Drosophila melanogaster* silvestre y sepia fueron suministradas por Carolina Biological Supply Company de Estados Unidos. Las moscas silvestres son homocigotas dominantes (++) y las sepia son homocigotas recesivas (*se*). Las primeras tienen los ojos rojos mientras las segundas tienen los ojos cafés-sepia. Estos alelos del color de ojos sirven como marcadores fenotípicos para identificar la paternidad.

El cortejo copulatorio se varió cortando los tarsos del primer par de patas. El corte de los tarsos se realizó en los machos silvestres sin anestesia durante el segundo día de edad. Se utilizó una tijera de disección para cortar los tarsos bajo el estereoscopio, con la mosca dentro de una bolsa plástica transparente en donde se inmovilizó al prensarla con la bolsa. Con los machos control se simuló el mismo proceso de cortar los tarsos.

Se utilizó hembras sepias y machos silvestres vírgenes de una semana de edad para todas las primeras cópulas, y machos sepias vírgenes en todas las segundas cópulas. En el tratamiento control, la hembra copuló primero con un macho intacto, mientras en el tratamiento experimental la hembra copuló con un macho sin tarsos de las patas primeras. La pareja estaba en una caja petri de plástico transparente de 4 cm de diámetro. Una vez que terminó la cópula, se colectó el macho en alcohol de 70 % y la hembra se depositó en un frasco con cultivo fresco. A las 24 horas después de la primera cópula se colocó la hembra con el segundo macho. Se mantuvieron durante una hora; si no copulaban se separaban y la hembra se colocaba en una botella con cultivo y el macho se desechaba. Después se repetía esto a intervalos de tres días hasta que la hembra copulara. Cuando la

hembra copuló por segunda vez se dejó que ovipositar hasta que muera. Una vez muerta, se colectó en alcohol al 70 %. Las hembras se cambiaron a un cultivo fresco cada 3 días ya sea que hayan recopilado o no. Los cultivos se revisaron diariamente tres veces al día hasta cuando no aparecieron más adultos. La progenie recién eclosionada (0 a 8 hrs) se trasladaba a una bolsa plástica transparente y se contó la progenie del primer y del segundo padre basándose en el color de los ojos bajo un estereoscopio.

Se registró en grabaciones verbales 40 cópulas y sus recómulas (20 con machos intactos y 20 con machos modificados). Se registró la duración de la cópula, y la duración de cada comportamiento de la hembra y del macho con el programa Jwatcher (Universidad Macquarie, Australia).

Además se filmó una muestra de 10 hembras sepia con machos silvestres intactos y modificados para describir en detalle los comportamientos durante la cópula.

II-Experimentos con machos sin los tarsos segundos

Se cortaron los tarsos segundos de los machos durante el segundo día de edad sin utilizar anestesia con una tijera de disección bajo el estereoscopio dentro de una bolsa plástica transparente. Con los machos control ("intactos") se simuló el mismo proceso de cortar los tarsos.

Se colocó una hembra con un macho vírgen en una caja petri de plástico transparente de 4 cm de diámetro. Una vez que finalizó la cópula el macho se colectó en alcohol al 70 % y la hembra se colocaba en una botella con cultivo fresco para que ovipositar durante un semana. Después de una semana se colectó en alcohol al 70 %. La progenie se contó en una bolsa plástica transparente bajo un estereoscopio hasta que no eclosionará ningún adulto.

Se filmó 50 cópulas (25 control y 25 tratamiento) con una cámara de micro video (Sanyo) conectada a un estereoscopio e iluminada con una lámpara de fibra óptica. Las filmaciones se realizaron entre las 7:30 a.m. hasta las 4:00 p.m. a temperaturas ambientales (aproximadas a 25 °C). Cada pareja se observó durante un período de una hora o hasta que finalizara la cópula. Las filmaciones fueron registradas para analizar las duraciones de la cópula y la frecuencia de cada comportamiento con el programa Jwatcher (Macquarie University, Australia).

RESULTADOS

Descripción de los comportamientos de cortejo copulatorio del macho

1-) Pulsar el ala con una pata delantera (*D. malerkotliana*, *D. melanogaster* y *D. saltans*). Este comportamiento se asemejó al movimiento de jalar una cuerda de una guitarra con el dedo. El segmento pretarsal de la pata delantera del macho pulsó el margen anterior del ala de la hembra (Figs. 1B, 1C). La duración promedio de cada pulsada fue similar entre las especies (Cuadro 1). En *D. melanogaster* todos los machos realizaron pulsadas, en *D. saltans* un 67% y en *D. malerkotliana* solamente el 20 % (Cuadro 1). Al comparar las medianas de las pulsadas por minuto, el número de pulsadas en cada serie, y las series por cópula también difirieron entre las especies (Cuadro 1).

2-) Golpecitos con el segundo y tercer par de patas al abdomen, tórax y ojos de la hembra (*D. melanogaster* y *D. malerkotliana*).

2a-) Series de golpecitos alternos con el segundo y tercer par de patas *D. melanogaster*. El macho extendió simultáneamente hacia adelante el segundo y tercer par de patas (Figs. 2B, 2C), y dio golpecitos con el tercer par de patas, las cuales en reposo se encontraban apoyadas en el suelo (Figs. 2C, 2D). Con los tarsos del segundo par de patas tocó alternadamente varias partes anteriores del cuerpo de la hembra: el tórax, las caderas (Figs. 2C, 2D), fémures del primer y segundo par de patas hasta los ojos. Este movimiento con el segundo par de patas fue similar en *D. malerkotliana* (Fig. 3B). Con las patas terceras tocó los segmentos anteriores del abdomen, caderas, fémures de las patas segundas y terceras, y el tórax principalmente (Figs. 2C, 2D). Se coordinaban las dos patas de cada par de forma que cuando la una daba un golpecito la otra se extendía (ver patas segundas en Fig. 2D). No hubo coordinación aparente entre las patas segundas y terceras.

2b-) Golpecitos extendidos alternos con el segundo par y no extendidos con el tercer par de patas (*D. malerkotliana*). El movimiento de alternar los golpecitos con el segundo par de patas fue similar que *D. melanogaster* (Figs. 2C y 2D) pero los movimientos con el tercer par de patas fueron diferentes (Fig. 3A, 3B). El macho extendió parcialmente las dos patas

terceras (Fig. 3A), y golpeaba con los segmentos tarsales a la vez los esternitos del abdomen de la hembra cercanos al ovipositor (Fig.3B).

3-) Frote al ovipositor con patas terceras (*D. saltans*). Todos los machos frotaron el ovipositor de la hembra simultáneamente con los ápices de las dos tibias trasera (Cuadro 1). Cada frote fue desde la base del ovipositor (Fig. 4A y 4B) hacia el extremo del ovipositor (Fig. 4C). Los ápices de las tibias luego se separaron y regresaron (Fig. 4C) al punto de inicio para dar otro frote.

En una pareja se filmó en posición ventral un acercamiento que permitió observar un movimiento rítmico del epandrium genitálico del macho. Este movimiento consistió en una serie de deslizamientos del epandrium sobre el ovipositor de la hembra, se movía en dirección hacia el ápice del ovipositor y regresaba a su posición inicial (Fig. 4D y 4E). Esto ocurrió 103 veces durante 3 min y 49 s, y luego el epandrium apretó el ovipositor y se observó el movimiento de contracción y extensión de genitalia que se menciona a continuación.

4-) Contracción y extensión de la genitalia (todas las especies). Se dio un movimiento de contracción y extensión rítmica de los tres últimos tergitos del abdomen del macho. La duración aproximada de cada movimiento fue 0.03 s, pero no se cuantificó la duración total debido a la dificultad de observarlo.

Comportamientos de las hembras

1-) Caminar (todas las especies). Las hembras caminaron durante la cópula y el número de hembras que lo hicieron fue similar entre las especies (Cuadro 2). Tampoco difirió entre las especies la fracción de la duración total de tiempo de la cópula dedicada a dar caminatas (Prueba Kruskal-Wallis: $K = 6.3$, $p = 0.2$, $gl = 3$; Cuadro 2).

2-) Patadas con empujones con las patas traseras (todas las especies). Las hembras patearon y empujaron con los ápices de las tibias la genitalia del macho, tanto en forma alternada como también con las dos patas a la vez. La cantidad de hembras que patearon fue similar en las cuatro especies (Cuadro 2). En *D. saltans* la fracción de la duración total

de la cópula dedicada a dar patadas fue menor que las otras tres especies (Prueba Kruskal-Wallis: $K = 23.4$, $p < 0.001$, $gl = 3$; Cuadro 2).

3-) Sacudidas con empujones (*D. saltans* y *D. willistoni*). Las sacudidas consistían en mover el cuerpo de lado a lado. Este movimiento podía ser fuerte o leve y a menudo lo combinaban con empujones de las patas traseras. En *D. saltans* un 43 % de las hembras produjeron sacudidas (Cuadro 2), y solamente las realizaron hacia el final de la cópula (Cuadro 3). Las hembras de *D. saltans* invirtieron menor tiempo en sacudidas según la duración total de la cópula que *D. willistoni* quienes sacudieron a lo largo de toda la cópula ($U = 18$, $N = 21$ y $N = 11$; $p < 0.001$). Las sacudidas grabadas de *D. saltans* ($n = 3$) y de *D. willistoni* ($n = 2$) produjeron sonidos. Un ejemplo de 5 pulsos de sonido durante una sacudida de *D. saltans* presentó una frecuencia principal promedio de 351.1 Hz (Fig.5).

Patrones en el tiempo de los comportamientos de la hembra y el macho

D. willistoni

La hembra presentó caminatas, patadas y sacudidas, mientras que el macho siempre estuvo inactivo. Hacia el fin de la cópula caminó menos y sacudió más (Cuadro 3). La hembra pateó una duración similar a lo largo de la cópula (Cuadro 3). En las otras especies tanto el macho como la hembra fueron activos (Cuadro 1 y Cuadro 2; Fig.6).

D. saltans

El macho frotó únicamente al inicio de la cópula (primer tercio) y no al final (Cuadro 3). Durante los períodos en los cuales el macho frotó la hembra permaneció quieta (Cuadro 3, ver también, Fig.6). No varió la cantidad de pulsadas por minuto del macho ni la fracción de tiempo dedicada a caminatas de la hembra a lo largo de la cópula (Cuadro 3). Pero, la hembra pateó y sacudió más hacia el final de la cópula cuando el macho estuvo quieto (Cuadro 3).

D. melanogaster

El macho realizó golpecitos y pulsadas durante toda la cópula (Cuadro 3, ver Fig. 6). La fracción del tiempo dedicada a dar pulsadas y golpecitos por el macho fue similar a lo largo de la cópula (Cuadro 3). Los golpecitos y pulsadas se asociaron a una mayor inactividad de la hembra durante éstos (Figs. 7A-D). En forma semejante, la fracción del tiempo dedicada a dar caminatas y patadas no difirió a lo largo de la cópula (Cuadro 3). También, las caminatas y patadas de la hembra se asociaron a una mayor inactividad del macho durante éstos (Figs. 7F-H).

D. malerkotliana

El macho dio más golpecitos al final de la cópula que al inicio (Cuadro 3). Los golpecitos y pulsadas se asociaron a una cantidad menor de patadas (Figs. 8A y 8C); y durante los golpecitos la hembra caminó menos (Fig. 8B). La fracción de tiempo de dar patadas de la hembra fue similar a lo largo de la cópula, pero ésta dio más caminatas al inicio que hacia el final (Cuadro 3). Las patadas y caminatas de las hembras se asociaron a una menor cantidad de golpecitos de los machos. (Figs. 8F y 8H).

Desmonta de los machos

En todas las especies la actividad de la hembra se incrementó hacia el final de la cópula. Al comparar la proporción del tiempo que duró cada comportamiento durante los primeros 10 s del tercer tercio de la cópula con los últimos 10 s de éste, la hembra estuvo quieta menos tiempo los últimos segundos (Fig. 9). En todas las especies los machos nunca se desmontaron durante una caminata, patada ó sacudida, sino sólo cuando estuvo quieta segundos después de que la hembra finalizara una de estas actividades. En *D. willistoni* y *D. saltans* la proporción de tiempo que la hembra dedicó a dar sacudidas y patadas aumentó en los últimos 10 s de la cópula (en *D. saltans* sólo hubo sacudidas al final). En ambas especies disminuyó el tiempo que la hembra dio caminatas y estuvo quieta (Fig.9). En *D. malerkotliana* y *D. melanogaster* las hembras dedicaron más tiempo a dar patadas y disminuyó el tiempo que la hembra estuvo quieta. Además en *D. melanogaster* la hembra incrementó las caminatas en los últimos 10 s de la cópula (Fig.9).

El porcentaje de hembras ($n = 30$) de cada especie que realizaron una actividad anterior a la desmonta (lapso menor de 10 s) del macho fue variable. En *D. willistoni* un 60 % de las hembras dio sacudidas 1.3 ± 1.8 segundos antes (ámbito: 0.03 a 6 s) que los machos bajaron; el 26 % dio patadas y las hembras restantes estuvieron quietas. En *D. saltans* el 47 % de las hembras dio sacudidas 4 ± 3.7 s (ámbito: 0.9 a 9 s), y el 30 % dio patadas antes de 3 ± 2.4 s (ámbito: 0.03 a 8.2 s) de que el macho bajó, solamente una hembra dio caminatas 4.1 s antes de la desmonta. En *D. melanogaster* un 54 % de las hembras dio patadas 0.5 ± 0.8 s antes que los machos bajaron (ámbito de 0.03 a 2.2 s); y un 33 % dio caminatas 2.15 ± 1.8 s antes de la desmonta del macho. En *D. malerkotliana* un 60 % de hembras patearon 0.7 ± 1.1 s (ámbito de 0.03 a 4 s) y sólo una hembra caminó antes de que bajó el macho.

Manipulación del cortejo copulatorio

Comparación entre los machos con y sin protarsos

Durante la cópula los machos intactos tocaron las alas de la hembra con los protarsos (Figs. 1 y 10A) y con una pata a la vez dieron pulsadas, jalando el ala hacia arriba con cada pulsada. Nunca soltaron las dos patas a la vez, ya que además necesitaron sostenerse de las alas para dar los golpecitos en la parte anterior de la hembra. Los machos sin protarsos no dieron pulsadas, además el cuerpo del macho estuvo en un ángulo aproximado de 90° con respecto al cuerpo de la hembra (Fig. 10B). Ellos movieron las patas delanteras como intento de dar las pulsadas, pero nunca alcanzaron el ala (Fig. 10B). Los machos modificados dieron golpecitos a la hembra con las patas segundas y terceras; pero sin el apoyo de las patas primeras en las alas de la hembra, sus patas segundas solamente lograban alcanzar los últimos segmentos del abdomen y alas de ella. A estos movimientos se les llamó "intentos de golpecitos".

Las cópulas de machos intactos y machos modificados con hembras vírgenes no difirieron en la duración (Cuadro 4), ni en el tiempo que la hembra caminó ó pateó (Cuadro 4). Pero sí difirieron en los días que la hembra duró en recopular. Las hembras que copularon por primera vez con un macho intacto duraron más tiempo, 10 ± 2.04 días y las que copularon con machos sin tarsos duraron menos tiempo 8 ± 1.9 días (Cuadro 4).

En todas las cópulas de machos modificados produjeron hijos y por lo tanto en todas hubo transferencia de esperma. Las hembras que copularon con un macho intacto tuvieron mayor progenie (153 ± 42.4 hijos) que las que copularon con un macho modificado (111 ± 50.9 hijos; Cuadro 4). La proporción de progenie engendrados por el primer macho fue similar con machos intactos (45 %) y modificados (40 %), sin incluir los machos cuya segunda vez pseudocopularon (Cuadro 4).

Siete hembras (18 %) copularon por segunda vez pero no produjeron progenie del segundo padre. A estas cópulas se les llamó pseudocópulas tuvieron una duración promedio de 5.1 ± 0.8 min; ámbito: 4.1 - 6.2 min. Las pseudocópulas fueron más comunes en hembras que copularon por primera vez con machos intactos (N = 5) que en las hembras que copularon con machos modificados (N = 2) (Chi-cuadrado: $X^2 = 4.5$, gl =1, P = 0.03). Entre las hembras que recopularon después de una cópula con un macho intacto, las que tuvieron pseudocópulas recopularon en menos días (promedio: 8.5 ± 2.7 días; ámbito: 4 - 13 días) que las que recopularon después exitosamente (promedio: 12.1 ± 5 días; ámbito: 7 - 28 días), (U = 14.5, N1=15 y N2 = 5, P = 0.02). Las dos hembras que copularon primero con machos modificados y después como segunda cópula tuvieron pseudocópulas recopularon a los 7 días ambas y no difirieron de las otras hembras que recopularon y produjeron progenie a los 8 ± 1.9 días; ámbito: 7-28 días (U = 12, N1=18 y N2 = 2, P = 0.4). En general, las primeras cópulas duraron más tiempo que las segundas cópulas, tanto en la muestra control (Prueba Wilcoxon: T = -2.04, N = 15, P = 0.04); como en la tratamiento (Prueba Wilcoxon: T = -3.03, N = 18, P = 0.002).

Comparación entre los machos con y sin los segundos tarsos

Tanto los machos intactos como los modificados dieron pulsadas a las alas de la hembra. El promedio de las pulsadas por minuto no difirió entre los machos, fue 6 ± 5.4 para los machos intactos y 4.8 ± 3 para los machos modificados (U = 310, N1 = N2 = 25, P = 0.96; Cuadro 5). Tampoco, hubo diferencias en la duración de las cópulas de hembras que copularon con machos intactos y modificados (U = 338, N1 = N2 = 25, P = 0.6; Cuadro 5); ni en los comportamientos de las hembras de dar caminatas (U = 248, N1 = N2 = 25, P = 0.2; Cuadro 5) y patadas durante la cópula (U = 322, N1 = N2 = 25, P = 0.8; Cuadro 5).

Además, la cantidad de progenie fue similar ($U = 274.5$, $N1 = N2 = 25$, $P = 0.74$; Cuadro 5).

El comportamiento de golpecitos difirió entre los machos intactos y modificados. El macho intacto sostiene con los tarsos protorácicos las alas de la hembra mientras con el segundo y tercer par de tarsos golpea abdomen, tórax y cabeza de la hembra; con el segundo par de tarsos tocan los ojos y tórax de la hembra, y con el tercer par el tórax y el abdomen (Figs. 2 y 11A). En los machos modificados se invirtieron los movimientos con las patas. El segundo par de patas nunca alcanzó a golpear los ojos, y en cambio, golpearon el tórax ó abdomen con la parte distal de la tibia. Por el contrario, las patas terceras dieron golpecitos en la parte anterior del tórax y tocaron los ojos (Fig. 11B). La duración de golpecitos entre la duración total de la cópula promedio (s/s) de los machos intactos fue mayor 0.03 ± 0.01 que de los machos modificados 0.01 ± 0.008 ($U = 112$, $N1 = N2 = 25$, $p < 0.001$; Cuadro 5).

CONCLUSIONES

- Por primera vez un estudio describe de forma detallada el cortejo copulatorio en especies de *Drosophila*, y el efecto del cortejo copulatorio en la elección críptica de la hembra de *D. melanogaster*.
- Tres especies *D. malerkotliana*, *D. melanogaster* y *D. saltans* presentaron comportamientos externos elaborados con las patas considerados como cortejo copulatorio.
- Se encontró diferencias entre el género como se predijo, lo que indica que el cortejo se encuentra bajo la influencia de la selección sexual por elección críptica de la hembra.

- Los movimientos de la genitalia podrían considerarse como cortejo copulatorio.
- Las hembras de las cuatro especies realizaron comportamientos durante la cópula.
- La hembra se mantuvo quieta cuando el macho realizó algunos comportamientos y viceversa (*D. saltans*, *D. malerkotliana* y *D. melanogaster*).
- La hembra podría comunicar al macho su disposición de finalizar la cópula.
- Este estudio es el primero que describe el efecto del cortejo copulatorio en la elección críptica de la hembra de *D. melanogaster*.
- La eliminación de las pulsadas y modificación de los golpecitos afectó aspectos de la elección críptica de la hembra como la cantidad de progenie y el tiempo en recopular.
- Las pseudocópulas son comunes en *Drosophila* y podrían estar afectadas por el cortejo copulatorio.
- Falta todavía estudiar el comportamiento externo y su relación con la morfología interna.
- El ajuste con las patas terceras podría sugerir que los golpecitos en sitios específicos de la hembra podrían ser importantes para el macho, e influir en la decisión de la hembra de engendrar con sus gametos.

BIBLIOGRAFÍA

- Ashburner, M. y Wright, T.R.F (eds.). 1978. The Genetics and Biology of *Drosophila*. Academic Press Inc., London. Vol. 2a.
- Bennet-Clark, H.C., Leroy, Y. y Tsacas, L. 1980. Species and sex-specific songs and courtship behaviour in the genus *Zaprionus* (Diptera-Drosophilidae). *Anim. Behav.* 28: 230-255.
- Bloch Qazi, M. C. 2003. A potential mechanism for cryptic female choice in a flour beetle. *J. Evol. Biol.* 16: 170- 176.
- Eberhard, W.G. 1992. Copulatory courtship and notes on the natural history of *Ochtera occidentalis* Clausen (Diptera:Ephydriidae). *Pan-Pacific Entomologist* 68 (4): 261-267.
- Eberhard, W.G. 1994. Copulatory courtship in 131 species of insects and spiders, and consequences for cryptic female choice. *Evolution* 48: 711-733.
- Eberhard, W.G. 1996. Female Control: Sexual Selection by Cryptic Female Choice. Princeton: Princeton University Press.
- Eberhard, W.G. 1997. Sexual selection by cryptic female choice in insects and arachnids. In The Evolution of Mating Systems in Insects and Arachnids. J.C. Choe, and B.J. Crespi, eds., pp.32-57. Cambridge University Press.
- Edvardsson, M. and Arnqvist, G. 2000. Copulatory courtship and cryptic female choice in red flour beetles *Tribolium castaneum*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 267:559-563.
- Ehrman, L. 1978. Sexual Behavior. En: M. Ashburner and E. Novitski (eds.). The Genetics and Biology of *Drosophila*. Academic Press, Londrés. Pp. 127-167.
- Ewing, A.E. 1983. Functional aspects of *Drosophila* courtship. *Biol. Rev.* 58: 275-292.

- Flagg, R.O. 1988. Carolina *Drosophila* Manual. Carolina Biological Supply Company. USA. Pp. 31.
- Fowler, G.L. 1973. Some aspects of the reproductive biology of *Drosophila*: sperm transfer, sperm storage, and sperm utilization. *Adv. Genet.* 17: 293-360.
- Grimaldi, D. 1990. Guía básica para los géneros de las moscas drosophilidos (Familia Drosophilidae) en Costa Rica. Museo Americano de Historia Natural, Nueva York.(manuscrito no publ.)
- Gromko, M.H., Gilbert, D.G. y Richmond, R.C. 1984. Sperm transfer and use in the multiple mating system of *Drosophila*. En: R.L. Smith (ed.). *Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems*. Academic Press. Pp.371-426.
- Grossfield, J. 1978. Non-Sexual Behavior. En: M. Ashburner and E. Novitski (eds.). *The Genetics and Biology of Drosophila*. Academic Press, Londres. Pp. 2-125.
- Hall, J.C. 1994. The Mating of a Fly. *Science* 264:1702-1714.
- Hoikkala, A. y Crossley, S. 2000. Copulatory courtship in *Drosophila*: behavior and songs of *D. birchii* and *D. serrata*. *Journal of Insect Behavior*, 13: 71-86.
- Hoikkala, A., Crossley, S. y Castillo-Melendez C. 2000. Copulatory courtship in *Drosophila birchii* and *D. serrata*, species recognition and sexual selection. *Journal of Insect Behavior*, 13: 361-373.
- Neems, R.M., Doohar, K., Butlin, R., y Shorrocks, B. 1997. Differences in male courtship song among the species of the *quinaria* group of *Drosophila*. *J. Insect. Behav.* 10: 237-246.

- Oliver, P.C. 1976. Historical Introduction. En: M. Ashburner and E. Novitski (eds.). The Genetics and Biology of *Drosophila*. Academic Press, Londrés. Pp. 3-23.
- Otronen, M. 1990. Mating behavior and sperm competition in the fly, *Dryomiza anilis*. Behav. Ecol. Sociobiol. 26:349-356.
- Robertson, H.M. 1982. Male activity during *Drosophila* copulation. *Drosophila* Information Service 58: 129.
- Sokolowski, M.B. 2001. *Drosophila*: genetics of behaviour. Nature 2: 879-890. <http://www.nature/reviews/genetics>
- Spieth, H.T. 1974. Courtship behaviors of the Hawaiian Picture-Winged *Drosophila*. University of California Publications in Entomology. EEUU. Vol. 103. 92 p.
- Tallamy, D. W. Powell, B.E. y McClafferty, J. A. 2002. Male traits under cryptic female choice in the spotted cucumber beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). Behav. Ecol. 13, 511-518.
- Thornhill, R. 1983. Cryptic female choice and its implication in the scorpionfly *Harpovittacus nigriceps*. American Naturalist 122: 765-788.
- Tomaru, M. Y Oguma. Y. 1994. Differences in courtship songs in the species of the *Drosophila auraria* complex. Anim. Behav. 47: 133-140.

Cuadro 1. Frecuencia de los machos que realizaron los comportamientos copulatorios, promedios \pm desviación estándar de la duración de las cópulas, el ámbito entre parentésis y tasas promedios de los comportamientos (duración de los movimientos entre la duración total de la cópula ms/ms). Las medianas entre paréntesis cuadrados se analizaron con la Prueba Kruskal-Wallis. Se representan con una letra la especie significativamente diferente ($P < 0.001$) según la Prueba Dunn. El N fue 30, excepto que se especifique lo contrario.

COMPORTAMIENTOS DEL MACHO	<i>D. malerkotliana</i> A	<i>D. melanogaster</i> b	<i>D. saltans</i> c	<i>D. willistoni</i> d	Prueba, probabilidad y grados de libertad
DURACIÓN DE LA CÓPULA	4.8 \pm 1 (3.1- 7.2) [4.9] b, c, d	12.2 \pm 2.7 (7.1 – 18.3) [11.7] a, d	11.8 \pm 3.8 (4 –20.6 [12] a, d	8.1 \pm 2.01 (4.3 –12.9) [4.3] a, b, c	K = 77.69, P<0.001; 3 g.l. Dunn
1-) PULSAR EL ALA					
-Número de individuos	5	30	18	Ausente	X ² = 41,3 P<0.01 ; 2 g.l.
- Pulsadas/min. (N = ver número de individuos por especie)	3.8 \pm 3.1 (0.3 – 8.5) [6.3]	5.8 \pm 4.8 (0.7 – 17.7) [7.4]c	1.2 \pm 0.7 (0.4 - 2.6) [0.9]b		K= 25.25, P<0.001; 2 g.l. -Dunn
-Pulsadas por serie	3.8 \pm 2.2 (2-7) [3]b	8.0 \pm 4 (2-18) [11]a, c	4.4 \pm 2.3 (2-12) [3.4]b		K= 16,8 P<0.001; 2 g.l. -Dunn
-Número de series de pulsadas por cópula	5.2 \pm 3.5 (1-10) [6]	8.5 \pm 5 (2-25) [9.3] c	3.55 \pm 2.25 (1-8) [6.5]b		K= 16,5 P<0.001; 2 g.l. -Dunn
-Duración de pulsada (s) (N = 15 excepto ■ N = 5)	0.1 \pm 0.01 ■ (0.1- 0.12)	0.1 \pm 0.01 (0.1 - 0.15)	0.1 \pm 0.01 (0.1- 0.13)		F _{2,32} = 1.18, P = 0.3.
2-) GOLPECITOS ALTERNOS					
-Número de individuos	Ausente	30	Ausente	Ausente	
-Duración promedio (s) de las series de golpecitos		1.6 \pm 0.8 (0.5 – 3.9)			
-Número promedio de series/cópula		10 \pm 3.9 (2-19)			
3-) GOLPECITOS SIMULTANEOS					
-Número de individuos	30	Ausente	Ausente	Ausente	
-Duración promedio (s) de las series de golpecitos	6 \pm 5.4 (0.44 - 20)				
-Número promedio de series/cópula	14 \pm 9.3 (4-32)				
5-) FROTES AL OVIPOSITOR					
-Número de individuos	Ausente	Ausente	30	Ausente	
-Promedio de frotas/mín.			6,6 \pm 2.8 (2.0 - 17.6)		
-Duración de cada frote (s) (N = 15)			0.79 \pm 0.07 (0.5 – 1.25)		

Cuadro 2. Proporción de hembras dedicada a diferentes comportamientos durante la cópula en 30 parejas. Promedios \pm desviación estándar y ámbito entre paréntesis del tiempo que dedicaron en cada comportamiento (duración de los movimientos entre la duración total de la cópula ms/ms); el N = el número de individuos que realizaron cada comportamiento. Las medianas entre paréntesis cuadrados se analizaron con la Prueba Kruskal-Wallis y U Mann-Whitney. Las especies significativamente diferentes entre sí según la Prueba Dunn se les asigna una misma letra ($p < 0.01$).

COMPORTAMIENTO DE LA HEMBRA	<i>D. malerkotliana</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>D. saltans</i>	<i>D. willistoni</i>	Prueba, probabilidad y grados de libertad
1-) CAMINAR -Número individuos	29	30	18	29	$\chi^2 = 3.5$, $P = 0.3$; 3 g.l.
-Promedio de duración total de caminar/duración total de la cópula (ms/ms).	0.18 ± 0.15 (0.01 - 0.50) [0.1]	0.19 ± 0.11 (0.03 - 0.50) [0.3]	0.14 ± 0.17 (0.001 - 0.52) [0.14]	0.15 ± 0.12 (0.01 - 0.40) [0.1]	$K = 6.3$, $P = 0.2$; 3 g.l.
2-) PATEAR -Número de individuos	21	30	21	29	$\chi^2 = 1.8$, $P = 0.6$; 3 g.l.
-Promedio de duración total de las series de patadas/ duración total de la cópula (ms/ms)	0.15 ± 0.10 (0.01 - 0.35) [0.14]c	0.11 ± 0.11 (0.01 - 0.21) [0.13]c	0.04 ± 0.04 (0.002 - 0.13) [0.02]a, b, d	0.14 ± 0.12 (0.01 - 0.47) [0.3]c	$K = 23.4$, $P < 0.01$; 3 g.l. -Dunn
3-) SACUDIR Y EMPUJAR -Número de individuos	Ausente	Ausente	11	21	$\chi^2 = 11.56$, $P < 0.001$; 1 g.l.
- Promedio de duración total de las series de sacudidas y patadas/ duración total de la cópula (ms/ms)	-	-	0.04 ± 0.03 (0.008 - 0.09) [0.03]d	0.34 ± 0.25 (- 0.85) [0.2]c	$U = 18$, $P < 0.001$ 11,

Cuadro 3. Comparación entre las cuatro especies de los promedios, desviación estándar y ámbito (entre paréntesis) de las tasas de duración (segundos por minuto) o de frecuencias de cada comportamiento según la duración total de cada tercio de la cópula (minutos). El N fue de 30 parejas para cada comportamiento. Las medianas entre los paréntesis cuadrados se analizan con la prueba Kruskal-Wallis. La Prueba Dunn se representa con una letra ($p < 0.05$).

Comportamientos	I tercio	II tercio	III tercio	Prueba Kruskal Wallis (2 g.l.)
<i>D. melanogaster</i>				
- Duración (min)	4.08 ± 0.9 (2.4-6.1)	4.08 ± 0.9 (2.4-6.1)	4.08 ± 0.9 (2.4-6.1)	
♂ Golpecitos (s/min.)	1.4 ± 1.09 (0-5.3) [1.15]	1.2 ± 1.05 (0-3.5) [1.1]	1.1 ± 1.44 (0-7.6) [0.8]	K = 3.3; P = 0.2
♂ Pulsadas/minuto	7.13 ± 13.23 (0-72) [0.004]	5.1 ± 6.97 (0-36) [0.003]	6.2 ± 5.9 (0-20) [0.003]	K = 0.8; P = 0.6
♀ Caminar (s/min.)	14.8 ± 12.0 a (0-46) [9.82]	10.3 ± 9.5 (0.1-40) [9.6]	8.49 ± 5.49 a (0-20) [8.3]	K = 3.6; P = 0.2
♀ Patear (s/min.)	7.06 ± 9.0 (0-41.6) [4.86]	6.37 ± 7.4 (0-39.5) [4.4]	5.75 ± 6.1 (0-22) [3.8]	K = 1.6; P = 0.9
<i>D. malar kotliaa</i>				
- Duración (min)	1.56 ± 0.35 (1-2.4)	1.56 ± 0.35 (1-2.4)	1.56 ± 0.35 (1-2.4)	
♂ Golpecitos (s/min.)	7.58 ± 9.28 c (0-34.2) [4.7]	10.8 ± 12.7 (0-48) [5.3]	16.4 ± 12.14 a (1.4-40.3) [11.03]	K = 12.2; P = 0.002
♂ Pulsadas/minuto	0.001 ± 0.01 (0-0.01) [0]	0.01 ± 0.3 (0-0.4) [0]	0.001 ± 0.01 (0-0.02) [0]	K = 0.06; P = 0.9
♀ Caminar (s/min.)	17.03 ± 14.7 c (0-47) [11.3]	8.8 ± 12.4 (0-45) [2.6]	4.1 ± 7.4 a (0-33) [0.8]	K = 18.9; P < 0.001
♀ Patear (s/min.)	6.2 ± 6.6 (0-23)[3.3]	6.5 ± 11.8 (0-51)[0.9]	7.14 ± 9.6 (0-34)[2.2]	K = 1.1; P = 0.6
<i>D. saltans</i>				
- Duración (min)	3.9 ± 1.13 (1.3-6.8)	3.9 ± 1.13 (1.3-6.8)	3.9 ± 1.13 (1.3-6.8)	
♂ Frotos/minuto	18.3 ± 5.7 a, b (5-30)[18.8]	1.8 ± 6.2 a, c (0-33)[0]	0 b, c [0]	K = 69.7; P < 0.001
♂ Pulsadas/minuto	0.5 ± 1.1 (0-4.9)[0]	0.3 ± 0.9 (0-3.4)[0]	1.1 ± 2 (0-7.3)[0]	K = 5.5; P = 0.1
♀ Caminar (s/min.)	3.2 ± 6.1 (0-21)[0]	4.9 ± 12.3 (0-53)	5.8 ± 25.5 (0-48)[0]	K = 1.3; P = 0.5
♀ Patear (s/min.)	0 [0]	0 [0]	6.08 ± 9.2 (0-41)[0]	K = 53.7; p < 0.001
♀ Sacudir (s/min.)	0 [0]	0 [0]	2.55 ± 4.7 (0-16)[0]	K = 24.6; p < 0.001
<i>D. willistoni</i>				
- Duración (min)	2.7 ± 0.67 (1.4-4.3)[6]	2.7 ± 0.67 (1.4-4.3)[0.3]	2.7 ± 0.67 (1.4-4.3)[0.8]	
♀ Caminar (s/min.)	7.28 ± 6.7 b, c (0-24)[0.3]	2.67 ± 4.16 a (0-14)[0.7]	3.4 ± 5.11 a (0-20)[0.6]	K = 13.4; p = 0.001
♀ Patear (s/min.)	3.3 ± 6.0 (0-22)[0]	5.6 ± 9.9 (0-39)[0]	5.4 ± 10.8 (0-57)[4.4]	K = 0.6; P = 0.7
♀ Sacudir (s/min.)	5.05 ± 10.7 c (0-43)[3.03]	8.16 ± 17.9 (0-53)[0.11]	11.7 ± 16.9 a (0-59)[0.41]	K = 8.4; p = 0.015

Cuadro 4. Comparación entre las primeras cópulas con machos silvestres intactos y con machos silvestres sin los tarsos del primer par de patas. El N fue de 20 para cada tratamiento, excepto en la proporción de la progenie que no se incluyó las hembras que pseudocopularon. Entre los paréntesis redondos se encuentra el ámbito de los promedios. Las medianas entre los paréntesis cuadrados se analizan con la prueba U Mann-Whitney.

	<i>I cópula Intacto N = 20</i>	<i>I cópula Sin tarsos I N = 20</i>	<i>Diferencia</i>
-Duración de la cópula (min)	15.6 ± 2.6 (10 - 21) [16]	14.7 ± 2.02 (8.1 - 18) [15]	U = 155.5; p = 0.2
-Días hasta la recópula	10 ± 2.04 (7 - 28) [10]	8 ± 1.9 (4 - 28) [7]	U = 112; p = 0.01
-Número de individuos de la progenie	152.7 ± 42.4 (62 - 225) [144]	110.8 ± 50.9 (51 - 202) [105.5]	U = 100, p = 0.007
-Proporción de la progenie engendrada por el primer macho. (N = 15 y N = 18 respectivamente.)	0.45 ± 0.045 (0.4 - 0.56) [0.4]	0.4 ± 0.07 (0.26 - 0.5) [0.4]	U = 81, p = 0.5.
-Número pseudocópulas en la II cópula	5	2	X ² = 4.5, p = 0.03, gl = 1
-Duración promedio de golpecitos por el ♂/duración de la cópula (s/min)	1.6 ± 0.8 (0.4 - 3.2) [1.5]	-	U = 0, p < 0.001
-Duración promedio de intentar dar golpecitos por el ♂/duración de la cópula (s/min)	-	0.4 ± 0.2 (0.1 - 0.8) [0.4]	U = 0, p < 0.001
-Pulsadas por minuto	6.8 ± 0.1 (2.5 - 26.6) [6.5]	-	U = 0, p < 0.001
-Duración promedio de caminar por la ♀/duración de la cópula (s/min)	8.1 ± 4.5 (0.5 - 19.2) [7.6]	12.1 ± 8 (4.1 - 22.3) [10.7]	U = 265.5, p = 0.2
-Duración promedio de patear por la ♀/duración de la cópula (s/min)	13 ± 5.7 (5.2 - 27) [14]	12.3 ± 8 (2.7 - 31.6) [11]	U = 162.5, p = 0.5

Cuadro 5. Comparación entre las primeras cópulas con machos silvestres intactos y con machos sin los tarsos del segundo par de patas. El N fue de 25 para cada muestra. Se realizó la prueba U Mann-Whitney para comparar entre las parejas. N.S. = no significativo estadísticamente $p > 0.05$. Símbolos: ♀ = hembra, ♂ = macho.

	<i>Machos intactos</i>	<i>Machos sin tarsos II</i>	<i>Diferencia</i>
Duración de la cópula (min)	12.9 ± 3.2	13.2 ± 2.5	N.S
Progenie	57.05 ± 26.9	60.6 ± 26.8	N.S.
Duración promedio de golpecitos por el ♂/la duración total de la cópula (s/s)	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.008	P < 0.001
Pulsadas promedio del ♂ por min.	6 ± 5.4	4.8 ± 3	N.S
Duración promedio de caminatas por la ♀/la duración total de la cópula (s/s)	0.1 ± 0.07	0.1 ± 0.08	N.S
Duración promedio de patadas por la ♀/la duración total de la cópula (s/s)	0.17 ± 0.1	0.2 ± 0.2	N.S

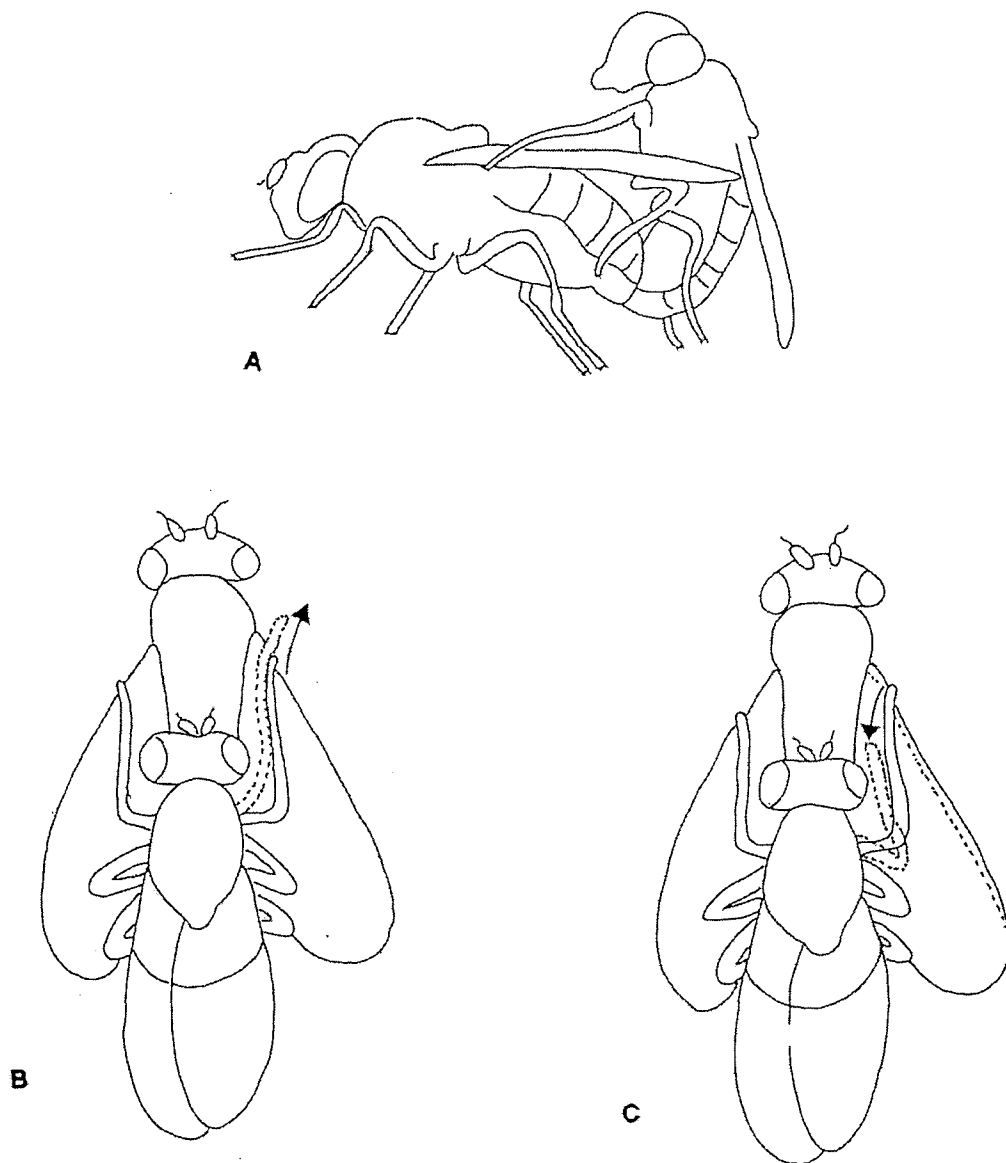


Figura 1. Pulsada del macho *D. melanogaster*. A-) Vista lateral de la posición de la pata protorácica del macho durante la cópula. En reposo, las uñas pretarsales sostienen la base del ala de la hembra. B-) Vista dorsal, el macho soltó el ala con la pata derecha y la extendió hacia delante (línea punteada). C-) Vista dorsal, el macho tocó otra vez la base del ala y flexionó la pata (línea punteada), jalando el ala con la uña y levantó levemente el ala (línea punteada). La pata vuelve a la posición de reposo. Entre cada posición hay 0.03 s.

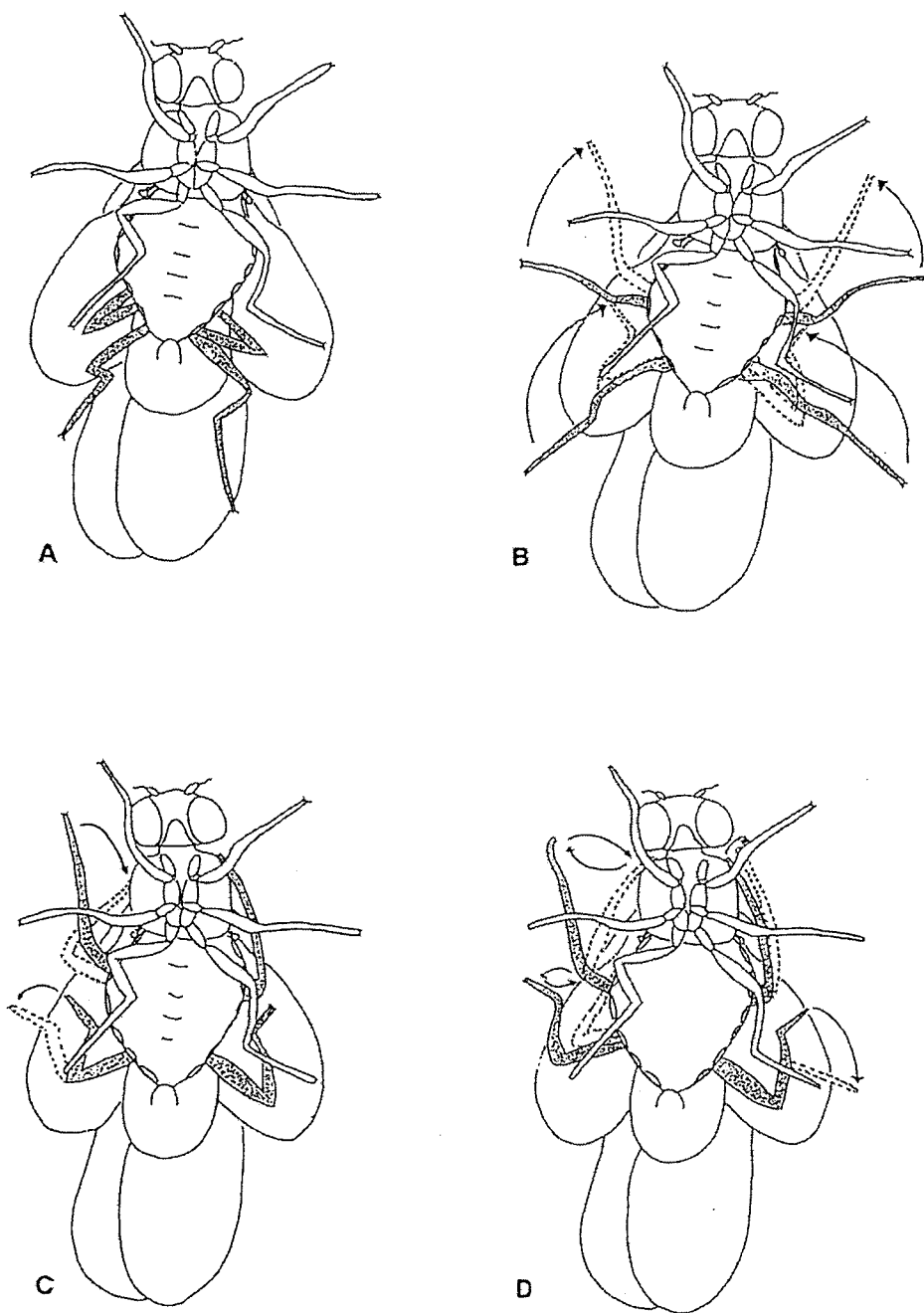


Figura 2. Golpecitos del macho de *D. melanogaster*, vista ventral. Las patas de la hembra se representan siempre con líneas continuas, las patas del macho se representan con relleno o con línea punteada. **A-**) Al inicio, el macho tiene las patas meso torácicas flexionadas y las meta torácicas apoyadas en el suelo. **B-**) Desde la posición inicial, 0.03 s después el macho extendió las patas, y 0.03 s más tarde las dirigió hacia delante (líneas punteadas). **C-**) 0.03 s él tocó con el segundo tarso izquierdo el tórax de la hembra y con los ápices de las terceras tibias izquierdas tocó las patas traseras de la hembra. La segunda pata derecha no tiene contacto con la hembra. Otros 0.03 s después golpeó el lado del tórax de la hembra con el tarso derecho y extendió a la vez la tercera pata derecha (línea punteada). **D-**) 0.03 s después mantuvo contacto con el tórax de la hembra con el meso tarso izquierdo y 0.03 s después, golpeó con todas las patas excepto la pata meta torácica izquierda (líneas punteadas).

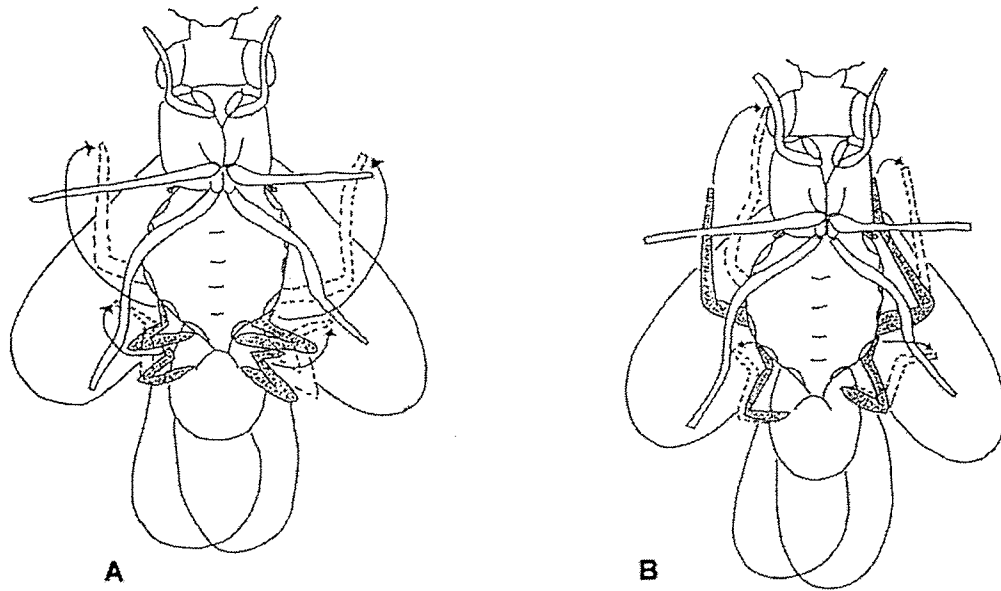


Figura 3. Golpecitos del macho de *D. malerkotliana*, vista ventral. Las patas de la hembra se representan siempre con líneas continuas, las patas del macho con relleno o con líneas punteadas. **A-**) El macho inició con las patas meta y meso torácicas flexionadas, y duró 0.03 s para extender las patas hacia delante (líneas punteadas). **B-**) Después de 0.03 s dio un golpecito con ambos tarsos de las patas traseras y otro con el meso tarso izquierdo. Dio otro golpecito con el meso tarso derecho 0.03 s después al ojo de la hembra y al mismo tiempo aparta la pata meso torácica izquierda y las dos patas traseras a la vez (líneas punteadas).

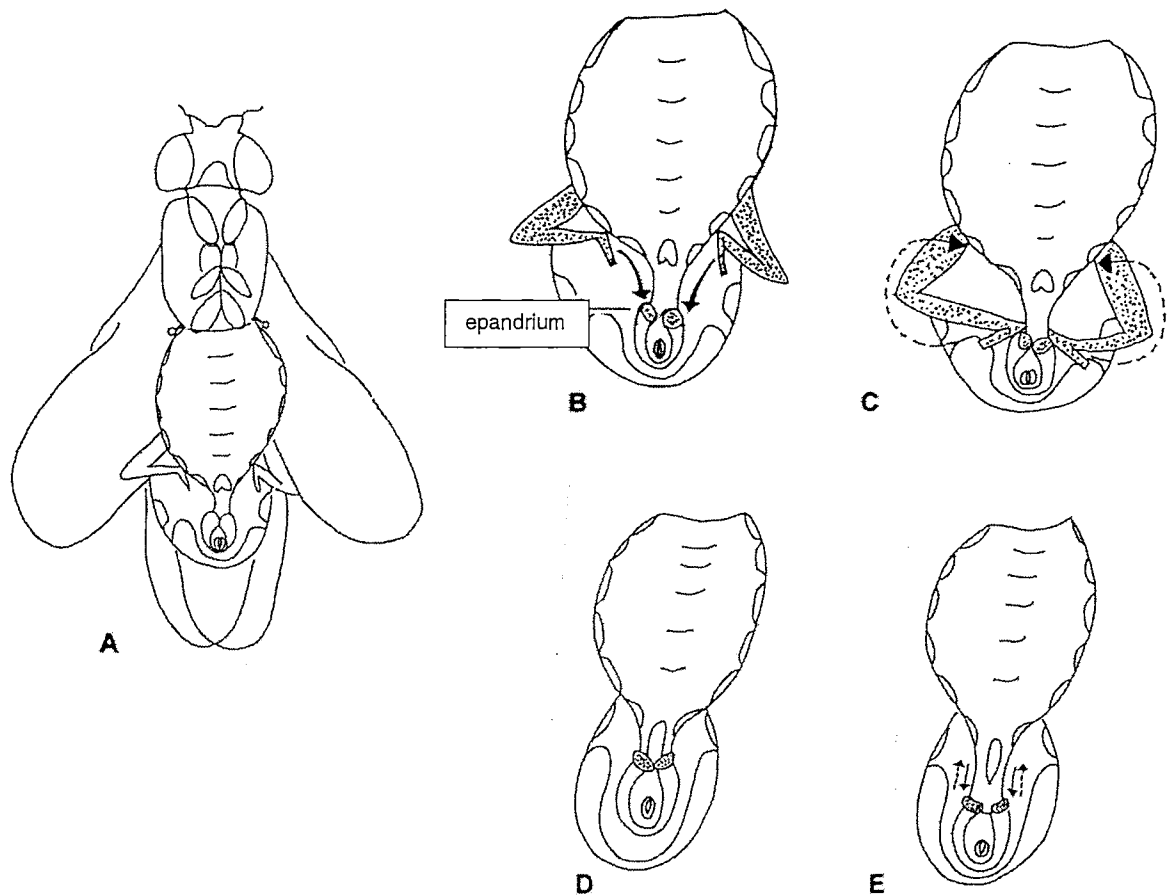


Figura 4. Comportamientos de *D. saltans* durante la cópula. Frote con las patas traseras (B y C) y movimiento del epandrium (D y E). A-) Vista ventral de la hembra (sin las patas dibujadas), de la genitalia y patas meta torácicas del macho antes de frotar. B-) El macho inició el frote con los ápices de las tibias meta torácicas desde la base del ovipositor. C-) Él mantuvo las tibias en contacto con el ovipositor durante 0.45 s hasta cuando tocó el epandrium de su genitalia, él levantó las patas y 0.1 s después volvió a la posición original. D-) El movimiento con el epandrium comenzó cuando está cerrado en el último esternito del abdomen. E-) El epandrium se abrió y se mantuvo en contacto con el ovipositor, se deslizó hacia el extremo de éste y luego regresó al punto inicial, duró 0.57 s.

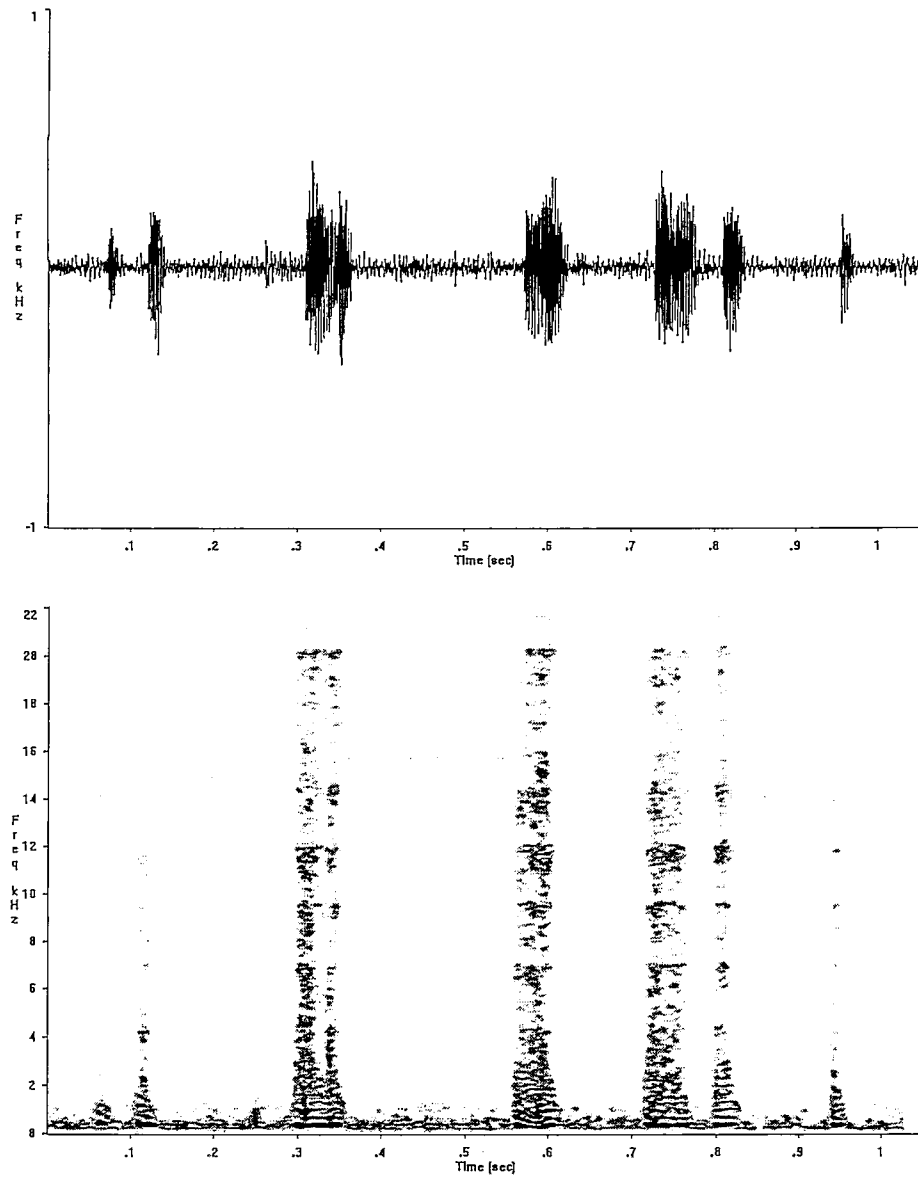


Figura. 5. Ejemplo de vibraciones producidas por la hembra de *D. saltans* cuando realiza una sacudida al macho durante el final de la cópula.

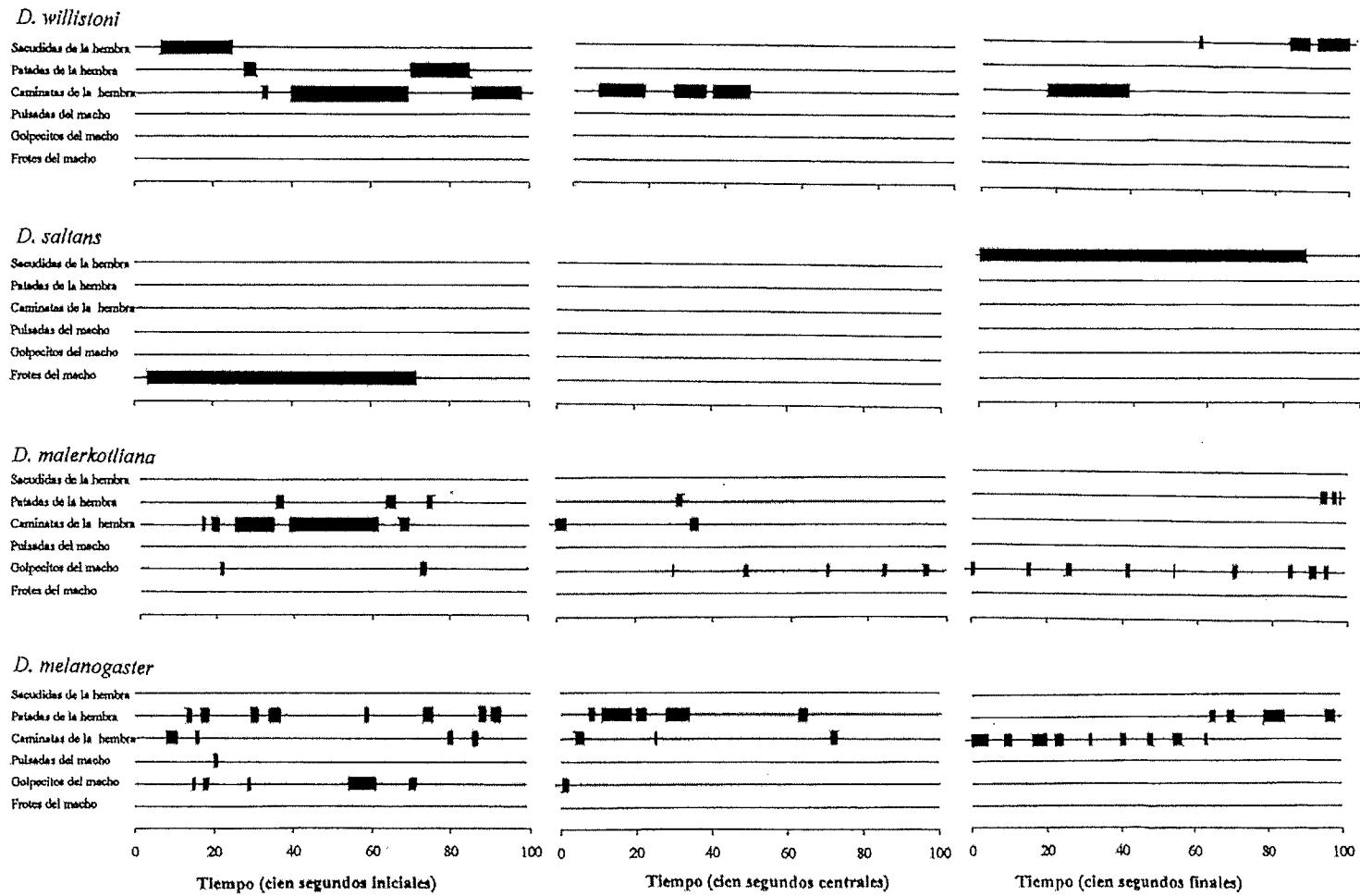


Fig. 6. El patrón temporal de ocurrencia de los comportamientos del macho y la hembra en un ejemplo de una cópula de cada una de las cuatro especies de *Drosophila*. Las barras representan el momento en que ocurrieron desde que inició hasta que terminó el movimiento en los 100 segundos iniciales, centrales y finales.

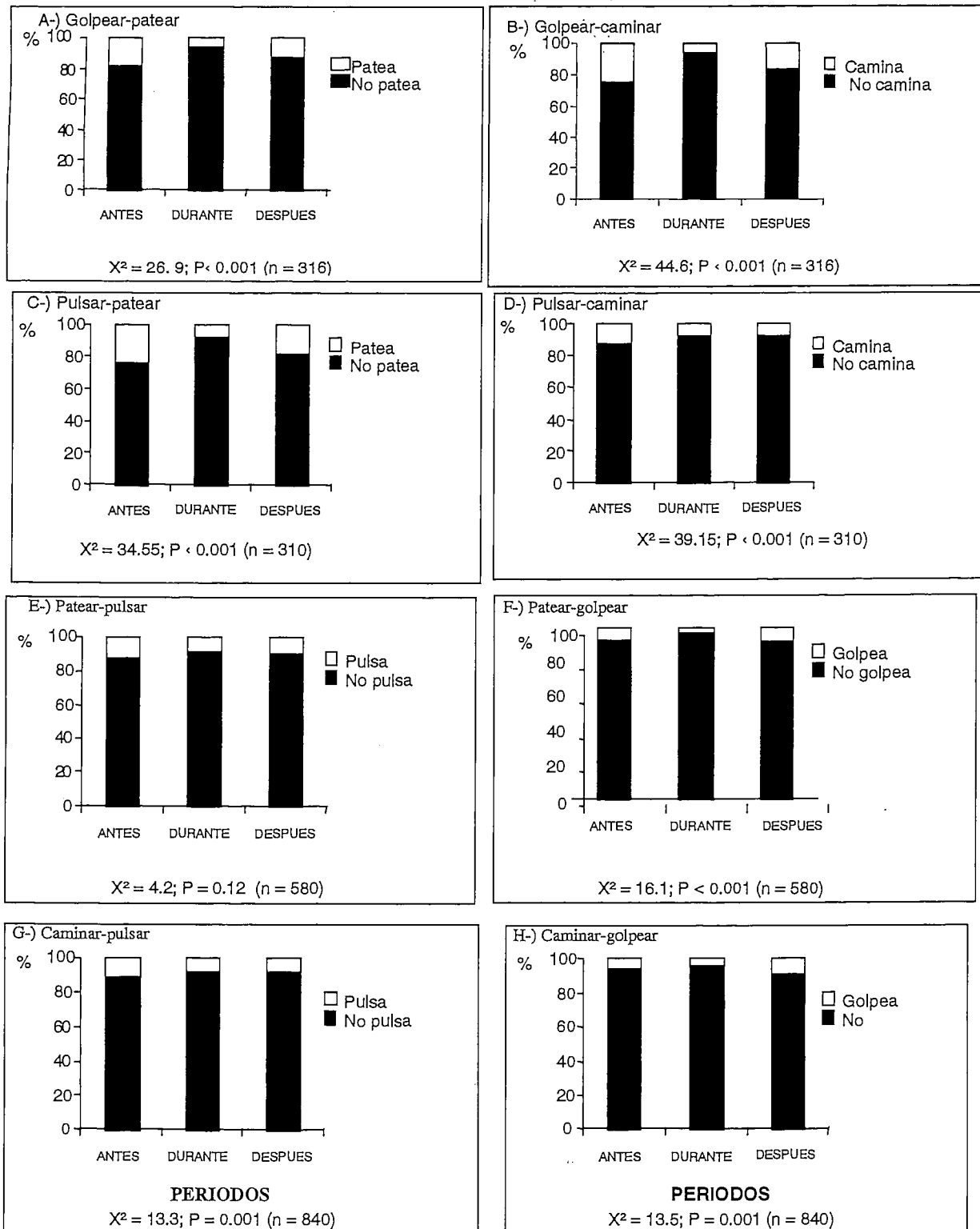


Figura 7. Porcentajes del total de comportamientos en 30 cópulas de *D. melanogaster*, clasificados en tres períodos: ANTES: acción del sexo opuesto 5 segundos previos del inicio del comportamiento; DURANTE: acción del sexo opuesto 5 segundos desde el inicio del comportamiento; y DESPUÉS: acción del sexo opuesto 5 segundos después de finalizado el comportamiento. El n es igual para los tres períodos. Prueba Chi-cuadrado con 2 grados de libertad en todos los casos. Las figuras de la A-D describen porcentajes de los comportamientos del macho y de la E-H comportamientos de la hembra.

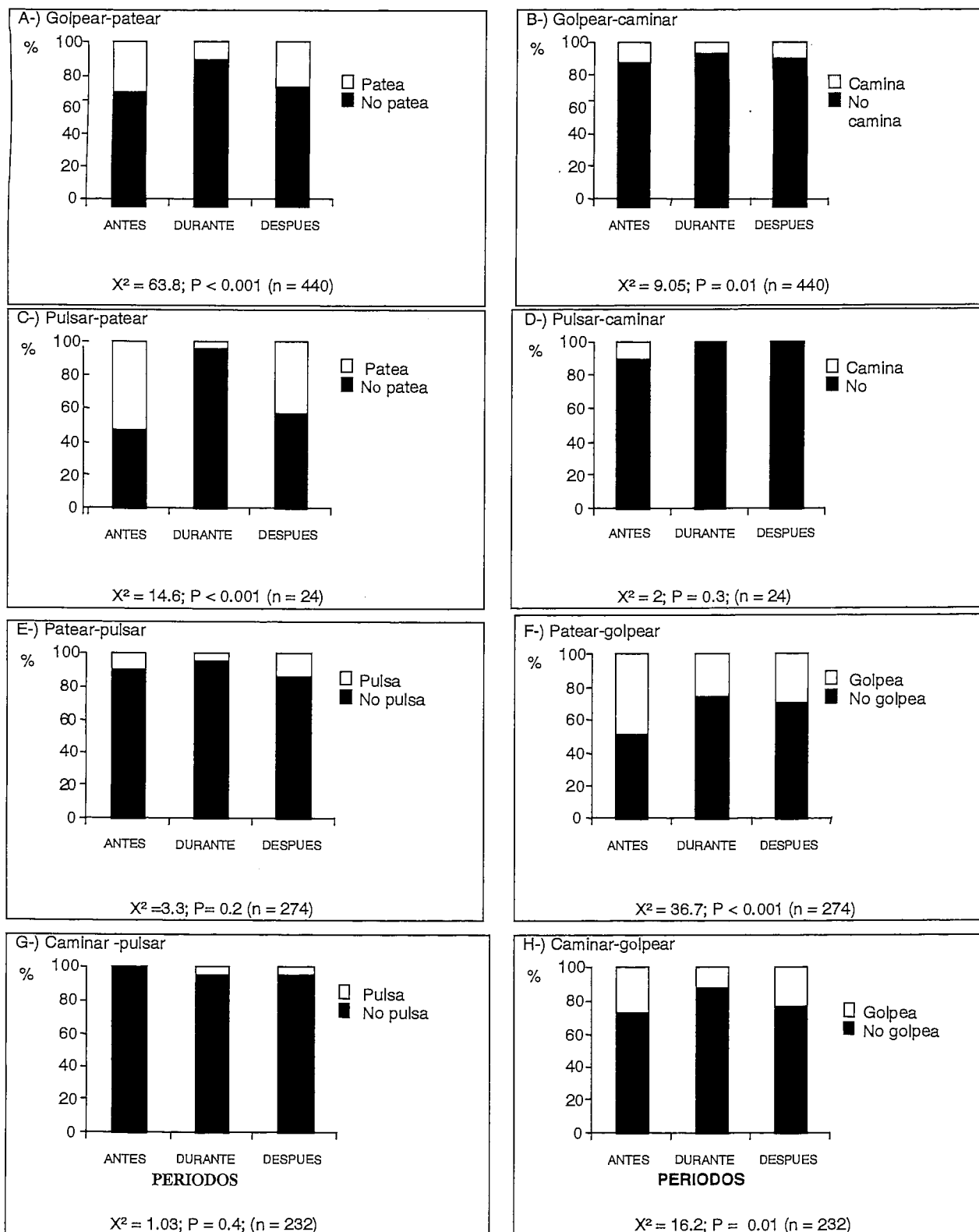


Figura. 8. Porcentajes del total de comportamientos en 30 cópulas del macho y la hembra en *D. malerkotliana*, clasificados en tres periodos: ANTES: acción del sexo opuesto 5 segundos previos del inicio del comportamiento; DURANTE: acción del sexo opuesto 5 segundos desde el inicio del comportamiento; y DESPUÉS: acción del sexo opuesto 5 segundos después de finalizado el comportamiento. El n es igual para cada período. Prueba Chi-cuadrado con 2 grados de libertad en cada caso. Las figuras de la A-D describen porcentajes de los comportamientos del macho y de la E-H comportamientos de la hembra.

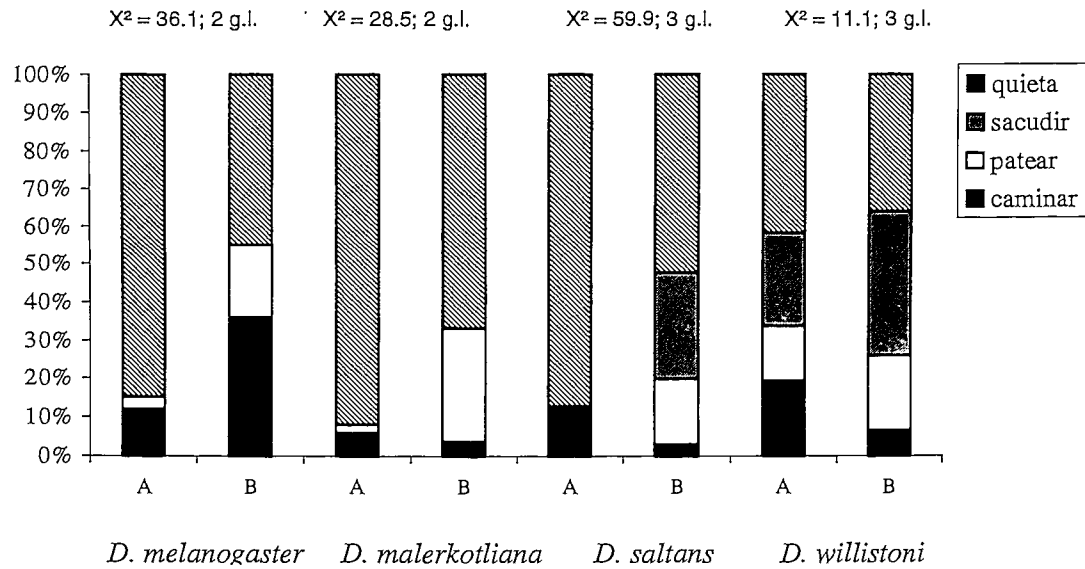
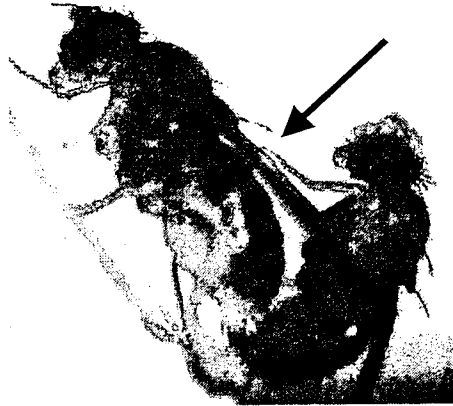


Figura. 9. Porcentaje del tiempo que realizó comportamientos la hembra durante los 10 segundos iniciales (Columna A) y 10 s finales (Columna B) del último tercio de la cópula antes de que bajó el macho. El N fue de 30 parejas para cada especie de *Drosophila*. Se comparó cada par de columnas por especie con la prueba Chi cuadrado y en todas las especies fueron significativamente diferentes ($p < 0.01$).

A-)



B-)

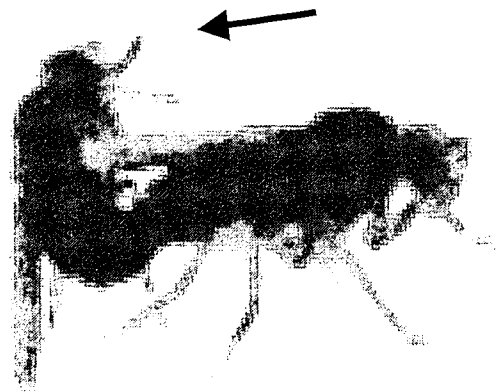


Fig. 10. Fotos extraídas de videos de cópulas de *Drosophila melanogaster*. **A-)** Vista lateral de un macho con protarsos intactos. **B-)** Vista lateral de un macho sin protarsos. La flecha señala las patas delanteras.

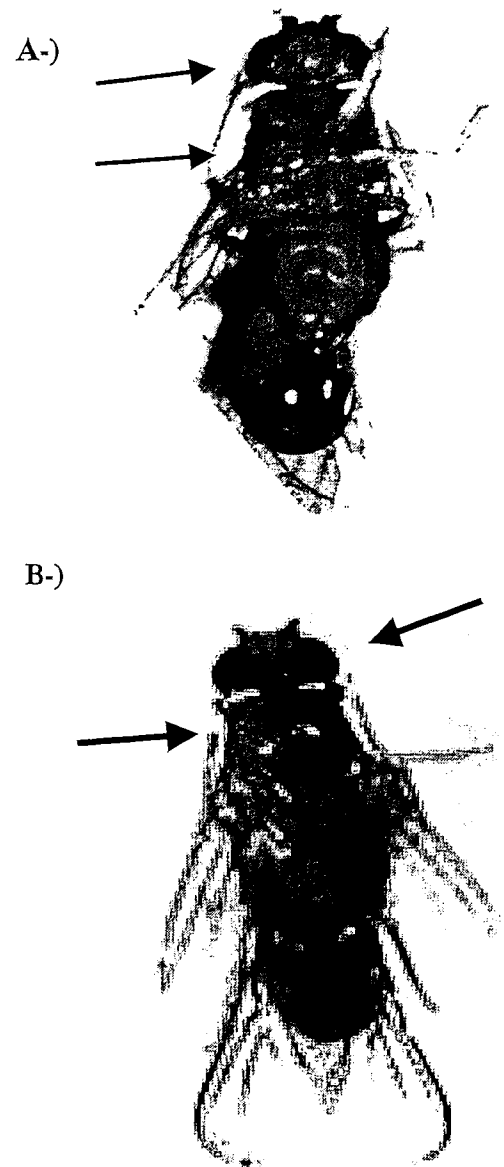


Figura 11. Fotos extraídas de videos de cópulas de *Drosophila melanogaster*. **A-)** Vista ventral, el macho con el meso tarso derecho tocó el ojo mientras el meta tarso tocó el tórax de la hembra, las flechas señalan estos sitios. **B-)** Vista dorsal, la pata izquierda del macho sin meso tarso se dirige a tocar el tórax y el meta tarso izquierdo toca el ojo de la hembra, las flechas señalan estos sitios.

Journal of Insect Behavior

Natalia Ramírez Albán

Biología, U.C.R. Universidad de Costa Rica

Ciudad Universitaria, Costa Rica

Phone (506) 2242662

Phone and Fax: (506)

Email: nataliaramirez@wildmail.com

Cortejo durante la cópula de los machos de *Drosophila malerkotliana*,
D. melanogaster, *D. saltans* y *D. willistoni* (Drosophilidae)

NATALIA RAMÍREZ ALBÁN

Escuela de Biología, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Universidad de Costa Rica.

Resumen. Los machos de *Drosophila malerkotliana*, *D. melanogaster* y *D. saltans* utilizaron las patas para cortejar durante la cópula. Todos presentaron el comportamiento de pulsar con la pata delantera el ala de la hembra, pero la duración de cada pulsada, el patrón de ocurrencia durante la cópula, y la frecuencia de individuos que pulsaron fueron diferentes. Otros comportamientos fueron característicos para cada especie: *D. saltans* frotó con el tercer par de patas al ovipositor de la hembra; *D. malerkotliana* y *D. melanogaster* dieron golpecitos con el segundo y tercer par de patas al abdomen, tórax, hasta los ojos de la hembra. La ocurrencia durante la cópula y la duración de los movimientos variaron entre estas dos especies. El macho de *D. willistoni* estuvo inmóvil durante la cópula, menos por los movimientos rítmicos de contracción y extensión de la genitalia dentro de la hembra, un movimiento que también ocurrió en las otras especies. Las hembras de todas las especies presentaron caminatas y patadas a la genitalia de los machos, y además sacudidas en *D. saltans* y *D. willistoni*. Hubo algunas indicaciones de comunicación entre los sexos en *D. malerkotliana* y *D. melanogaster*, ya que las hembras caminaron y patearon menos durante los golpecitos de los machos que antes o después. Cuando la hembra caminaba o pateaba, el macho dio menos golpecitos y pulsadas. También, las hembras incrementaron la actividad hacia el final de la cópula lo que podría indicar al macho su disposición de finalizarla. Las variaciones del cortejo copulatorio de los machos aún en especies más cercanamente relacionadas (*D. malerkotliana* y *D. melanogaster*) concuerda con la idea de que este comportamiento se encuentre bajo selección sexual por elección críptica de la hembra.

Palabras clave: Cópula, cortejo copulatorio, *Drosophila malerkotliana*, *Drosophila melanogaster*, *Drosophila saltans*, *Drosophila willistoni*, elección críptica, selección sexual

INTRODUCCIÓN

El comportamiento de cortejo que realiza el macho previo a la cópula no le garantiza que va a ser el padre de la futura progenie, lo cual sólo ocurre en las especies en las cuales la hembra sólo copula una vez. Cuando la cópula comienza ocurren varios procesos que son siempre o la mayoría de las veces controlados directamente por la hembra y que pueden influenciar la oportunidad de que el esperma de cierto macho fertilice los

huevos de la hembra (Eberhard 1994). Al uso selectivo de estos mecanismos que realiza la hembra antes, durante y después de la cópula que sesga la paternidad entre los machos que han copulado con ella, se le conoce como elección críptica (Thornhill 1983). Esta elección puede llevar a una fuerte selección sexual (Thornhill 1983).

El cortejo copulatorio del macho es un fenómeno común en insectos y arañas (Thornhill 1983, Eberhard 1992, Eberhard 1994, Edvardsson y Arnqvist 2000, Tallamy *et al.* 2002). Este además de presentarse en artrópodos se ha observado en otros grupos en un rango desde nemátodos hasta mamíferos (Eberhard 1996). El comportamiento del macho de cortejar a la hembra antes, durante o después de la cópula puede componerse de vibraciones, mordiscos, frotos, patadas, golpecitos, cantos, etc. (Eberhard 1994). El macho invierte energía en elaborar esta variedad de comportamientos y podría deberse a su influencia en la elección críptica que realiza la hembra (Eberhard 1994).

Se le ha dado mucha atención al comportamiento de cortejo pre copulatorio del macho en moscas drosophilidas (Fowler 1973, Spieth 1974, Bennet-Clark *et al.* 1980, Hall 1994) pero relativamente muy poco al cortejo que ocurre durante y después de la cópula (Eberhard 1997). En Drosophilidae, una familia grande de aprox. 3000 spp. descritas y quizás 5000 spp. en total (Grimaldi 1990), hay muy pocos estudios detallados sobre el comportamiento de cortejo copulatorio. Algunos estudios se han realizado en *D. melanogaster*, *D. mauritiana* y *D. simulans* (grupo *melanogaster*; Robertson 1982); *D. emarginata* (grupo *saltans*; Eberhard 1994); *D. birchii* y *D. serrata* (grupo *melanogaster*; Hoikkala y Crossley 2000; Hoikkala *et al.*, 2000); el complejo *auraria* (grupo *melanogaster*; Tomaru y Oguma, 1994), en *D. phalerata* (grupo *quinaria*; Neems *et al.*, 1997); y en especies del género cercano *Zaprionus* (Bennet-Clark *et al.*, 1980). Estos han reportado que los machos vibran las alas produciendo sonidos o frotan partes del cuerpo de la hembra durante la cópula.

Si el comportamiento de cortejo copulatorio se encuentra bajo selección sexual se espera que difiera entre las especies cercanamente relacionadas (Eberhard 1997). En este capítulo se describe el comportamiento durante la cópula del macho y la hembra en cuatro especies del género *Drosophila*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio de Laboratorio

Se estudiaron cuatro especies del subgénero *Sophophora*: *D. malerkotliana* Parshad y Paika, *D. melanogaster* Meigen, *D. saltans* Sturtevant y *D. willistoni* Sturtevant. *D. malerkotliana* (subgrupo *ananassae*) y *D. melanogaster* (subgrupo *melanogaster*) están en el grupo *melanogaster*. *D. saltans* pertenece al grupo *saltans*, y *D. willistoni* al grupo *willistoni*.

La especie *Drosophila melanogaster* fue suministrada por Carolina Biological Supply Company y establecida en el Laboratorio de Entomología de la Universidad de Costa Rica desde el 5 de diciembre del 2000 bajo una temperatura promedio de 24 ° C. Las otras tres especies se colectaron con cebos de banano en descomposición en el Parque Nacional Santa Rosa localizado en la provincia de Guanacaste el 10 de junio del 2000 y se criaron en el laboratorio del Parque a una temperatura promedio de 25 ° C y 80 % de humedad. Estas moscas fueron identificadas por el Dr. David Grimaldi del Museo Americano de Historia Natural de Nueva York.

Cada cultivo contenía una mezcla con aproximadamente 10 g de fécula de maíz (maicena), 20 ml de postre de frutas (Gerber), 30 ml de agua y 3 ml de ácido acético diluido (vinagre). Se colocaba 60 ml de la mezcla en cada frasco de vidrio (capacidad máxima de 200 ml) y se esterilizaban en autoclave. Se separaron los sexos bajo un estereoscopio sin anestesia durante las 8 horas después de la eclosión y se colocaban machos y hembras en diferentes frascos con medios de cultivo durante aproximadamente 6-7 días.

Para las observaciones se introdujo un macho y una hembra vírgenes en una caja de petri de plástico transparente de 4 cm de diámetro. Se filmaron con una cámara de video marca Sanyo VCC-3912 conectada a un estereoscopio binocular, desde cuando el macho montó sobre la hembra. Se iluminó con una lámpara de fibra óptica. Se filmó entre las 7:30 a.m. hasta las 2:00 p.m. a temperaturas ambientales (aproximadamente 25 ° C). Cada pareja se observaba durante un período de tres horas o hasta que finalizara la cópula. Cada mosca fue utilizada sólo una vez y después de finalizada la cópula fueron conservadas en alcohol

al 70 %. Se filmaron 30 cópulas de cada especie, y la muestra para todos los datos que se presentan a continuación a menos de que se indique de otra forma fue 30.

Análisis de videos

Para discriminar cuáles de los comportamientos durante la cópula podrían ser cortejos, se utilizó los criterios de Eberhard (1994):

- comportamientos repetidos durante una cópula dada y presentes en diferentes cópulas,
- apropiados para estimular a la hembra,
- mecánicamente irrelevantes a los problemas del macho de mantenerse acoplado sobre la hembra,
- específicos y no realizados en otros contextos para cumplir otras funciones como por ejemplo para la limpieza.

Se utilizó el programa “J watcher” del Laboratorio de Comportamiento Animal de Macquarie University de Australia. Los datos que se obtuvieron fueron: duración total de la cópula, duración de los comportamientos en serie (el lapso desde cuando inicia y hasta cuando finalizan esos movimientos en milisegundos), frecuencia de algunos de los comportamientos individuales y el tiempo en que ocurrían durante la cópula.

Se analizó la cópula en tercios en todas las 30 parejas con el objetivo de determinar cambios en las frecuencias generales de cada comportamiento. Se presentaron las fracciones promedio de tiempo de los comportamientos en cada tercio junto con la desviación estándar, y se utilizó la prueba Kruskal-Wallis para comparar entre éstos.

También se analizó en forma más detallada los comportamientos observando algunos de los videos cuadro por cuadro (0.03 segundos). Todos los dibujos fueron calcados de imágenes de videos impresas. Se omitieron estructuras que estaban fuera de foco.

Para averiguar si se daban asociaciones entre los comportamientos del macho y la hembra en cada especie, para cada tipo de comportamiento del macho se averiguó el comportamiento de la hembra en tres períodos: Antes: frecuencias de las actividades de la hembra durante los 5 segundos antes de que empezó la actividad del macho, Durante: la actividad de la hembra durante los primeros 5 segundos desde el inicio de la acción del

macho, y Después: actividad de la hembra durante los 5 segundos después del final de la acción del macho. El mismo tipo de análisis se realizó para las actividades del macho antes, durante y después de cada comportamiento de la hembra.

Se utilizó un micrófono Sennheiser, System MZK80ZU para captar los sonidos de los comportamientos durante algunas cópulas (dos cópulas por especie excepto para *D. saltans* se grabó tres), las cuales se grabaron con una cámara de video Sony CCD Video Hi8 equipada con +6 lentes de aproximación. Se analizó un comportamiento que produjo sonidos como ejemplo en *D. saltans* con el programa Cool edit pro 1.0 y se digitalizaron los sonidos a 44.1 Khz, con una tarjeta de sonido Creative Dolby 5.1 y se crearon figuras con Syrinx 2.2 b.

RESULTADOS

Las duraciones de las cópulas fueron diferentes entre las especies excepto entre *D. melanogaster* y *D. saltans* (Prueba Kruskal-Wallis: $K = 77.69$, $p < 0.001$, $gl = 3$; Cuadro 1). Las dos especies más relacionadas tuvieron las duraciones más diferentes (Cuadro 1). Los promedios fueron 12.2 ± 2.7 min. en *D. melanogaster*, y 4.8 ± 1 min. en *D. malerkotliana*.

I- Comportamientos de cortejo copulatorio de los machos

1-) Pulsar el ala con una pata delantera (*D. malerkotliana*, *D. melanogaster* y *D. saltans*). Este comportamiento se asemejó al movimiento de jalar una cuerda de una guitarra con el dedo. El segmento pretarsal de la pata delantera del macho pulsó el margen anterior del ala de la hembra (Figs. 1B, 1C). La duración promedio de cada pulsada fue similar entre las especies (Cuadro 1). En *D. melanogaster* todos los machos realizaron pulsadas, en *D. saltans* un 67% y en *D. malerkotliana* solamente el 20 % (Cuadro 1). Al comparar las medianas de las pulsadas por minuto, el número de pulsadas en cada serie, y las series por cópula también fueron distintas entre las especies (Cuadro 1).

2-) Golpecitos con el segundo y tercer par de patas al abdomen, tórax y ojos de la hembra (*D. melanogaster* y *D. malerkotliana*).

2a-) Series de golpecitos alternos con el segundo y tercer par de patas *D. melanogaster*. El macho extendió simultáneamente hacia adelante el segundo y tercer par de patas (Figs. 2B, 2C), y dio golpecitos con el tercer par de patas, las cuales en reposo se encontraban apoyadas en el suelo (Figs. 2C, 2D). Con los tarsos del segundo par de patas tocó alternadamente varias partes anteriores del cuerpo de la hembra: el tórax, las caderas (Figs. 2C, 2D), fémures del primer y segundo par de patas hasta los ojos. Este movimiento con el segundo par de patas fue similar en *D. malerkotliana* (Fig. 3B). Con las patas terceras tocó los segmentos anteriores del abdomen, caderas, fémures de las patas segundas y terceras, y el tórax principalmente (Figs. 2C, 2D). Se coordinaban las dos patas de cada par de forma que cuando la una daba un golpecito la otra se extendía (ver patas segundas en Fig. 2D). No hubo coordinación aparente entre las patas segundas y terceras.

2b-) Golpecitos extendidos alternos con el segundo par y no extendidos con el tercer par de patas (*D. malerkotliana*). El movimiento de alternar los golpecitos con el segundo par de patas fue similar que *D. melanogaster* (Figs. 2C y 2D) pero los movimientos con el tercer par de patas fueron diferentes (Fig. 3A, 3B). El macho extendió parcialmente las dos patas terceras (Fig. 3A), y golpeaba con los segmentos tarsales a la vez los esternitos del abdomen de la hembra cercanos al ovipositor (Fig. 3B).

3-) Frote al ovipositor con patas terceras (*D. saltans*). Todos los machos frotaron el ovipositor de la hembra simultáneamente con los ápices de las dos tibias trasera (Cuadro 1). Cada frote fue desde la base del ovipositor (Fig. 4A y 4B) hacia el extremo del ovipositor (Fig. 4C). Los ápices de las tibias luego se separaron y regresaron (Fig. 4C) al punto de inicio para dar otro frote.

En una pareja se filmó en posición ventral un acercamiento que permitió observar un movimiento rítmico del epandrium genitálico del macho. Este movimiento consistió en una serie de deslizamientos del epandrium sobre el ovipositor de la hembra, se movía en dirección hacia el ápice del ovipositor y regresaba a su posición inicial (Fig. 4D y 4E). Esto ocurrió 103 veces durante 3 min y 49 s, y luego el epandrium apretó el ovipositor y se observó el movimiento de contracción y extensión de genitalia que se menciona a continuación.

4-) Contracción y extensión de la genitalia (todas las especies). Se dio un movimiento de contracción y extensión rítmica de los tres últimos tergitos del abdomen del macho. La duración aproximada de cada movimiento fue 0.03 s, pero no se cuantificó la duración total debido a la dificultad de observarlo.

II- Comportamientos de las hembras

1-) Caminar (todas las especies). Las hembras caminaron durante la cópula y el número de hembras que lo hicieron fue similar entre las especies (Cuadro 2). Tampoco difirió entre las especies la fracción de la duración total de tiempo de la cópula dedicada a dar caminatas (Prueba Kruskal-Wallis: $K = 6.3$, $p = 0.2$, $gl = 3$; Cuadro 2).

2-) Patadas con empujones con las patas traseras (todas las especies). Las hembras patearon y empujaron con los ápices de las tibias la genitalia del macho, tanto en forma alternada como también con las dos patas a la vez. La cantidad de hembras que patearon fue similar en las cuatro especies (Cuadro 2). En *D. saltans* la fracción de la duración total de la cópula dedicada a dar patadas fue menor que las otras tres especies (Prueba Kruskal-Wallis: $K = 23.4$, $p < 0.001$, $gl = 3$; Cuadro 2).

3-) Sacudidas con empujones (*D. saltans* y *D. willistoni*). Las sacudidas consistían en mover el cuerpo de lado a lado. Este movimiento podía ser fuerte o leve y a menudo lo combinaban con empujones de las patas traseras. En *D. saltans* un 43 % de las hembras produjeron sacudidas (Cuadro 2), y solamente las realizaron hacia el final de la cópula (Cuadro 3). Las hembras de *D. saltans* invirtieron menor tiempo en sacudidas según la duración total de la cópula que *D. willistoni* quienes sacudieron a lo largo de toda la cópula ($U = 18$, $N = 21$ y $N = 11$; $p < 0.001$). Las sacudidas grabadas de *D. saltans* ($n = 3$) y de *D. willistoni* ($n = 2$) produjeron sonidos. Un ejemplo de 5 pulsos de sonido durante una sacudida de *D. saltans* presentó una frecuencia principal promedio de 351.1 Hz (Fig.5).

III- Patrones en el tiempo de los comportamientos de la hembra y el macho

D. willistoni

La hembra presentó caminatas, patadas y sacudidas, mientras que el macho siempre estuvo inactivo. Hacia el fin de la cópula caminó menos y sacudió más (Cuadro 3). La hembra pateó una duración similar a lo largo de la cópula (Cuadro 3). En las otras especies tanto el macho como la hembra fueron activos (Cuadro 1 y Cuadro 2; Fig.6).

D. saltans

El macho frotó únicamente al inicio de la cópula (primer tercio) y no al final (Cuadro 3). Durante los períodos en los cuales el macho frotó la hembra permaneció quieta (Cuadro 3, ver también, Fig.6). No varió la cantidad promedio de pulsadas por minuto del macho ni la fracción de tiempo dedicada a caminatas de la hembra a lo largo de la cópula (Cuadro 3). Pero, la hembra pateó y sacudió más hacia el final de la cópula cuando el macho estuvo quieto (Cuadro 3).

D. melanogaster

El macho realizó golpecitos y pulsadas durante toda la cópula (Cuadro 3, ver Fig. 6). La fracción del tiempo dedicada a dar pulsadas y golpecitos por el macho fue similar a lo largo de la cópula (Cuadro 3). Los golpecitos y pulsadas se asociaron a una mayor inactividad de la hembra durante éstos (Figs. 7A-D). En forma semejante, la fracción del tiempo dedicada a dar caminatas y patadas por la hembra no difirió a lo largo de la cópula (Cuadro 3). También, las caminatas y patadas de la hembra se asociaron a una mayor inactividad del macho durante éstos (Figs. 7F-H).

D. malerkotliana

El macho dio más golpecitos al final de la cópula que al inicio (Cuadro 3). Los golpecitos y pulsadas se asociaron a una cantidad menor de patadas (Figs. 8A y 8C); y durante los golpecitos la hembra caminó menos (Fig. 8B). La fracción de tiempo de dar patadas de la hembra fue similar a lo largo de la cópula, pero ésta dio más caminatas al

inicio que *hacia el final* (Cuadro 3). Las patadas y caminatas de las hembras se asociaron a una menor cantidad de golpecitos de los machos. (Figs. 8F y 8H).

Desmonta de los machos

En todas las especies la actividad de la hembra se incrementó hacia el final de la cópula. Al comparar la proporción del tiempo que duró cada comportamiento durante los primeros 10 s del tercer tercio de la cópula con los últimos 10 s de éste, la hembra estuvo quieta menos tiempo los últimos segundos (Fig. 9). En todas las especies los machos nunca se desmontaron durante una caminata, patada ó sacudida, sino sólo cuando estuvo quieta segundos después de que la hembra finalizara una de estas actividades. En *D. willistoni* y *D. saltans* la proporción de tiempo que la hembra dedicó a dar sacudidas y patadas aumentó en los últimos 10 s de la cópula (en *D. saltans* sólo hubo sacudidas al final). En ambas especies disminuyó el tiempo que la hembra dio caminatas y estuvo quieta (Fig.9). En *D. malerkotliana* y *D. melanogaster* las hembras dedicaron más tiempo a dar patadas y disminuyó el tiempo que la hembra estuvo quieta. Además en *D. melanogaster* la hembra incrementó las caminatas en los últimos 10 s de la cópula (Fig.9).

El porcentaje de hembras (n = 30) de cada especie que realizaron una actividad anterior a la desmonta (lapso menor de 10 s) del macho fue variable. En *D. willistoni* un 60 % de las hembras dio sacudidas 1.3 ± 1.8 segundos antes (ámbito: 0.03 a 6 s) que los machos bajaron; el 26 % dio patadas y las hembras restantes estuvieron quietas. En *D. saltans* el 47 % de las hembras dio sacudidas 4 ± 3.7 s (ámbito: 0.9 a 9 s), y el 30 % dio patadas antes de 3 ± 2.4 s (ámbito: 0.03 a 8.2 s) de que el macho bajó, solamente una hembra dio caminatas 4.1 s antes de la desmonta. En *D. melanogaster* un 54 % de las hembras dio patadas 0.5 ± 0.8 s antes que los machos bajaron (ámbito de 0.03 a 2.2 s); y un 33 % dio caminatas 2.15 ± 1.8 s antes de la desmonta del macho. En *D. malerkotliana* un 60 % de hembras patearon 0.7 ± 1.1 s (ámbito de 0.03 a 4 s) y sólo una hembra caminó antes de que bajó el macho.

DISCUSIÓN

Este estudio describe los comportamientos durante la cópula de los machos y las hembras en cuatro especies de *Drosophila*. El cortejo copulatorio de los machos difirió entre las especies. *D. malerkotliana*, *D. melanogaster* y *D. saltans* presentaron cada uno un comportamiento de cortejo copulatorio distinto y fue frecuente en todos los individuos (Cuadro 1). Solamente *D. willistoni* no presentó ningún comportamiento externo, pero al igual que las otras especies estudiadas presentaron contracciones y extensiones de la genitalia. En todos los comportamientos externos los machos utilizaron las patas. El uso de las patas para cortejar a la hembra durante la cópula se ha reportado anteriormente para *D. melanogaster*, *D. mauritiana*, *D. simulans* del grupo *melanogaster* (Robertson 1982) y para *D. emarginata* del grupo *saltans* (Eberhard 1994). El uso de las patas para cortejar a la hembra ha resultado bastante común en otros dípteros. Por ejemplo el macho *Glyphidops* sp. de la familia Neridae que frota con los tarsos primeros el ojo de la hembra ó el protórax; mientras el macho de *Plocoscelus arthriticus* (Micropezidae) da golpecitos en estos mismos sitios; *Ochtotherus occidentalis* (Ephyrididae) frota con el tercer par de patas las alas de la hembra y otros como *Neodexiopsis* sp.(Muscidae) y *Merosargus* sp. (Stratiomyidae) frotran con ese par de patas el abdomen de la hembra (Eberhard 1994).

Hasta cierto punto las observaciones que se reportaron aquí concuerdan con las de Robertson (1982), quién observó que los machos de *D. melanogaster* (tipo Canton-S) (y también *D. mauritiana* y *D. simulans*, pertenecientes al subgrupo *melanogaster*), extendieron y frotaron vigorosamente las patas meso y meta torácicas contra los lados del tórax y patas de la hembra repetidas veces. El menciona además que los machos frotaron principalmente el tórax y alcanzaban los ojos de la hembra con el mesotarso. Robertson (1982) no mencionó diferencias en los comportamientos entre las especies, pero sus descripciones no son detalladas. El no describió las pulsadas, muy frecuentes en *D. melanogaster* en este estudio (Cuadro 1, Fig. 1). Esta diferencia podría deberse a la diferencia entre las cepas ó a la falta de detalle de las observaciones. El presente estudio señala diferencias claras entre especies de *Drosophila* (Cuadro 1, Cuadro 3, Fig. 6) en cuanto a los comportamientos, las duraciones de cada comportamiento, la coordinación de los movimientos, frecuencias con las cuales se realizan. Aún al comparar entre las dos

especies del mismo grupo *melanogaster*, *D. melanogaster* y *D. malerkotliana*, hubo varias diferencias:

- 1) La coordinación de las series de golpecitos fue diferente con el tercer par de patas (Figs. 2 y 3).
- 2) Los sitios del cuerpo de la hembra que recibieron los golpecitos con el tercer par de patas difirieron (Figs. 2 y 3).
- 3) Los machos de *D. malerkotliana* dieron series de golpecitos más largas que en *D. melanogaster* (Cuadro 1).
- 4) Los machos de *D. malerkotliana* invirtieron una fracción mayor del tiempo de la cópula en dar golpecitos que los machos de *D. melanogaster* (Cuadro 1).
- 5) El tiempo invertido durante la cópula en dar golpecitos fue similar en los tres tercios de *D. melanogaster* (Cuadro 3), mientras que en *D. malerkotliana* dedicaron más tiempo golpecitos hacia el final de la cópula y menos al inicio (Cuadro 3).
- 6) Todos los machos dieron pulsadas durante la cópula en *D. melanogaster*, pero fue poco frecuente en *D. malerkotliana* (Cuadro 1).

Con respecto a los frotos de los machos de *D. saltans*, Eberhard (1994) describió el cortejo copulatorio para *D. emarginata* del mismo subgrupo. Ambos estudios coinciden en que los frotos los realizó el macho con el tercer par de patas. *D. emarginata* frotó el abdomen de la hembra y *D. saltans* más específicamente el ovipositor.

Los machos de *D. birchii*, *D. serrata* (Hoikkala y Crossley, 2000), complejo *auraria* (Tomaru y Oguma 1994) todas pertenecientes al subgrupo *montium* (grupo *melanogaster*) y especies del grupo *quinaria* (Neems *et al.* 1997) vibraron las alas y produjeron sonidos durante la cópula. En ninguna de las cuatro especies del presente estudio los machos produjeron sonidos, sino que fueron las hembras en *D. saltans* y *D. willistoni*.

Otra variación se presentó entre las duraciones de las cópulas, las especies más cercanas *D. melanogaster* y *D. malerkotliana* presentaron los valores extremos (Cuadro 1). Anteriormente se había reportado que la duración de la cópula en el género *Drosophila* varía enormemente, de 30 seg. (ej. *D. mulleri*) a más de 1.50 hora (ej. *D. acanthoptera*) (Gromko *et al.* 1984).

Estas múltiples variaciones entre las especies están de acuerdo con que el cortejo copulatorio se encuentra bajo selección sexual por elección críptica de la hembra, la cual

suele producir rápidas divergencias (Eberhard 1994, 1996). Otros estudios de diferentes especies del mismo género también mencionan diferencias entre el cortejo copulatorio (Rodríguez y Eberhard 1994; Eberhard 1996; Rodríguez 1996; Hoikkala y Crossley 2000; Hoikkala *et al.* 2000).

Algunos datos sugieren que los machos utilizan el cortejo copulatorio como una forma de apaciguamiento de la hembra. En *D. saltans* durante el frote del macho al inicio de la cópula la hembra permaneció quieta (Fig. 6; Cuadro 3). En *D. melanogaster* y *D. malerkotliana* hubo asociación entre los golpecitos del macho y la disminución en la actividad de las patadas y caminatas de la hembra (Figs. 8 y 9).

En otras moscas como el micropézido *Ptilosphen viriolatus* los machos realizan una vibración de las alas que aparentemente tienen el efecto de apaciguar a la hembra o evitar resistencia de ella (Ortiz 2002). Otro caso es del escarabajo *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Chrysomelidae) los machos que dieron golpes rápidos con sus antenas a los ojos, antena y patas delanteras de las hembras fueron aceptados ya que ellas relajaron los músculos del ducto vaginal permitiendo el acceso a su bursa copulatrix (Tallamy *et al.* 2002). Estudios como este sugieren analizar el comportamiento interno tanto de machos como de hembras durante la cópula.

No existió un comportamiento de la hembra único para cada especie como fue el caso de los machos. Las hembras dieron caminatas y patadas en las cuatro especies (Cuadro 3); y sacudidas únicamente en *D. willistoni* y *D. saltans*. Los comportamientos de las hembras parecen asociarse con la resistencia de los machos. Pero, ellas no obligaron (a la fuerza) al macho a bajar y finalizar la cópula. Ellas al final de la cópula incrementaron la fracción de tiempo de un comportamiento como las sacudidas, patadas y caminatas (Fig. 7) y estos podrían indicar al macho su disposición de finalizar la cópula. En *D. willistoni* la hembra sacudió durante toda la cópula pero más hacia el final de ésta (Cuadro 3). Por otro lado, en *D. saltans* la hembra sólo sacudió al final de la cópula cuando aparentemente intentaron la desmonta del macho (Cuadro 3, Fig. 7). Estas sacudidas que tanto en *D. willistoni* como en *D. saltans* produjeron sonidos (Fig.5), podrían comunicar al macho que finalice la cópula. En algunas especies adicionales *D. birchii* y *D. serrata* (grupo *melanogaster*, subgrupo *montium*) las hembras vibraron las alas produciendo sonidos hacia el final de la cópula. También al final, las hembras de *D. birchii* dieron caminatas y las de *D. serrata* dieron

sacudidas junto a la vibración de alas (Hoikkala y Crossley, 2000). Las frecuencias de los cantos fueron variables, en cada especie no hubo un patrón regular (*D. birchii*: 220-520 Hz y *D. serrata*: 160-320 Hz). Las hembras de especies de *Zaprionus* también producen sonidos hacia el final de la cópula y también de frecuencias variables (Bennet-Clark *et al.* 1980).

En otros casos, según Baena (2002) las sacudidas en las moscas *Archiseopsis diversiformes* (Sepsidae) antes de la cópula podrían ser una forma de comunicación sobre su disposición de copular, y para el caso de *Drosophila* durante la cópula, podría ser una forma de comunicar e indicar la finalización de la cópula ya que incrementó hacia el final de ella (Cuadro 3; Fig.7).

Las hembras de los chinches *Ozophora* tienen comportamientos durante la cópula que podrían considerarse como cortejo y difieren entre las especies (Rodríguez 1996). En *O. baranowskii* la hembra realiza empujones que tienden a concentrarse hacia el final de la cópula (Rodríguez 1996). En *O. fasciatus* (Oler y Gordon 1968 en Rodríguez 1996) la hembra mueve el abdomen de lado a lado en diferentes momentos y al final de la cópula pareciera ser un intento de quitarse al macho.

En otros casos, como el de la mosca *Ptilosphen viriolatus* las sacudidas que realizan las hembras inducen al macho a brindar una gota de líquido regurgitado a la hembra. Podría además evaluar la resistencia del macho; pero en esta especie como en las de este estudio no tiene la función de desmontar directamente al macho, ya que el 70 % de los desacoples de parejas no estaban precedidos por sacudidas de la hembra (Ortiz 2002).

BIBLIOGRAFIA

- Baena, M. L. 2002. Comportamiento de resistencia de la hembra y efecto de la cópula y el tamaño del macho sobre la oviposición en *Archiseopsis diversiformis* (Diptera: Sepsidae). Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica.
- Bennet-Clark, H.C., Leroy, Y. and Tsacas, L. 1980. Species and sex-specific songs and courtship behaviour in the genus *Zaprionus* (Diptera-Drosophilidae). Anim. Behav. 28: 230-255.

- Eberhard, W.G. 1992. Copulatory courtship and notes on the natural history of *Ochtera occidentalis* Clausen (Diptera:Ephydriidae). Pan-Pacific Entomologist 68 (4): 261-267.
- Eberhard, W.G. 1994. Copulatory courtship in 131 species of insects and spiders, and consequences for cryptic female choice. Evolution 48: 711-733.
- Eberhard, W.G. 1996. Female Control: Sexual Selection by Cryptic Female Choice. Princeton: Princeton University Press.
- Eberhard, W.G. 1997. Sexual selection by cryptic female choice in insects and arachnids. In The Evolution of Mating Systems in Insects and Arachnids. J.C. Choe, and B.J. Crespi, eds., pp.32-57. Cambridge University Press.
- Edvardsson, M. and Arnqvist, G. 2000. Copulatory courtship and cryptic female choice in red flour beetles *Tribolium castaneum*. Proc. R. Soc. Lond. B. 267:559-563.
- Fowler, G. L. 1973. Some aspects of the reproductive biology of *Drosophila*: sperm transfer, sperm storage, and sperm utilization. Adv. Genet. 17: 293-360.
- Grimaldi, D. 1990. Guía básica para los géneros de las moscas drosophilidos (Familia Drosophilidae) en Costa Rica. Museo Americano de Historia Natural, Nueva York.(manuscrito no publ.)
- Gromko, M.H., Gilbert, D.G. y Richmond, R.C. 1984. Sperm transfer and use in the multiple mating system of *Drosophila*. En: R.L. Smith (ed.). Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems. Academic Press. Pp.371-426.
- Hall, J.C. 1994. The Mating of a Fly. Science 264:1702-1714.

- Hoikkala, A. y Crossley, S. 2000. Copulatory courtship in *Drosophila*: behavior and songs of *D. birchii* and *D. serrata*. *J. Insect Behav.* 13: 71-86.
- Hoikkala, A., Crossley, S. y Castillo-Melendez C. 2000. Copulatory courtship in *Drosophila birchii* and *D. serrata*, species recognition and sexual selection. *J. Insect Behav.* 13: 361-373.
- Neems, R.M., Doohar, K., Butlin, R., y Shorrocks, B. 1997. Differences in male courtship song among the species of the *quinaria* group of *Drosophila*. *J. Insect. Behav.* 10: 237-246.
- Ortiz, P.G. 2002. Historia natural, sitios de apareamiento, comportamiento sexual y posible función de la alimentación nupcial en *Ptilosphen viriolatus* (Diptera: Micropezidae). Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica.
- Robertson, H.M. 1982. Male activity during *Drosophila* copulation. *Drosophila Information Service* 58: 129.
- Rodríguez. R.L. 1996. Biología sexual de dos abejones (Coleoptera:Cicindelidae) y tres chinches (Heteroptera: Lygaeidae). Tesis de Maestría. Universidad de Costa Rica.
- Rodríguez, R. L. 1998. Posible female choice during copulation in *Ozonhorax baranowskii* (Heteroptera: Lygaeidae): female behavior, multiple copulations, and sperm transfer. *J. Insect. Behav.* 11: 725-741.
- Spieth, H. T. 1974. Courtship Behaviors of the Hawaiian Picture-Winged *Drosophila*. University of California Publications in Entomology. EEUU. Vol. 103. 92 p.

- Tallamy, D. W. Powell, B.E. y McClafferty, J. A. 2002. Male traits under cryptic female choice in the spotted cucumber beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Behav. Ecol.* 13: 511-518.
- Thornhill, R. 1983. Cryptic female choice and its implication in the scorpionfly *Harpovittacus nigriceps*. *American Naturalist* 122: 765-788.
- Tomaru, M. Y Oguma. Y. 1994. Differences in courtship songs in the species of the *Drosophila auraria* complex. *Anim. Behav.* 47:133-140.

Cuadro 1. Frecuencia de los machos que realizaron los comportamientos copulatorios, promedios \pm desviación estándar de la duración de las cópulas, el ámbito entre parentésis y tasas promedios de los comportamientos (duración de los movimientos entre la duración total de la cópula ms/ms). Las medianas entre paréntesis cuadrados se analizaron con la Prueba Kruskal-Wallis. Se representan con una letra la especie significativamente diferente ($P < 0.001$) según la Prueba Dunn. El N fue 30, excepto que se especifique lo contrario.

COMPORTAMIENTOS DEL MACHO	<i>D. malerkotiana</i> a	<i>D. melanogaster</i> b	<i>D. saltans</i> c	<i>D. willistoni</i> d	Prueba, probabilidad y grados de libertad
DURACIÓN DE LA CÓPULA	4.8 \pm 1 (3.1-7.2) [4.9] b, c, d	12.2 \pm 2.7 (7.1-18.3) [11.7] a, d	11.8 \pm 3.8 (4-20.6) [12] a, d	8.1 \pm 2.01 (4.3-12.9) [4.3] a, b, c	K = 77.69, P < 0.001; 3 g.l. Dunn
1-) PULSAR EL ALA -Número de individuos	5	30	18	Ausente	$\chi^2 = 41,3$ P < 0.01; 2 g.l.
- Pulsadas/min. (N = ver número de individuos por especie)	3.8 \pm 3.1 (0.3-8.5) [6.3]	5.8 \pm 4.8 (0.7-17.7) [7.4] c	1.2 \pm 0.7 (0.4-2.6) [0.9] b		K = 25.25, P < 0.001; 2 g.l. -Dunn
-Pulsadas por serie	3.8 \pm 2.2 (2-7) [3] b	8.0 \pm 4 (2-18) [11] a, c	4.4 \pm 2.3 (2-12) [3.4] b		K = 16,8 P < 0.001; 2 g.l. -Dunn
-Número de series de pulsadas por cópula	5.2 \pm 3.5 (1-10) [6]	8.5 \pm 5 (2-25) [9.3] c	3.55 \pm 2.25 (1-8) [6.5] b		K = 16,5 P < 0.001; 2 g.l. -Dunn
-Duración de pulsada (s) (N = 15 excepto ■ N = 5)	0.1 \pm 0.01 ■ (0.1-0.12)	0.1 \pm 0.01 (0.1-0.15)	0.1 \pm 0.01 (0.1-0.13)		F _{2,33} = 1.18, P = 0.3.
2-) GOLPECITOS ALTERNOS -Número de individuos	Ausente	30	Ausente	Ausente	
-Duración promedio (s) de las series de golpecitos		1.6 \pm 0.8 (0.5-3.9)			
-Número promedio de series/cópula		10 \pm 3.9 (2-19)			
3-) GOLPECITOS SIMULTANEOS -Número de individuos	30	Ausente	Ausente	Ausente	
-Duración promedio (s) de las series de golpecitos	6 \pm 5.4 (0.44-20)				
-Número promedio de series/cópula	14 \pm 9.3 (4-32)				
5-) FROTES AL OVIPOSITOR -Número de individuos	Ausente	Ausente	30	Ausente	
-Promedio de frotos/min.			6.6 \pm 2.8 (2.0-17.6)		
-Duración de cada frote (s) (N = 15)			0.79 \pm 0.07 (0.5-1.25)		

Cuadro 2. Proporción de hembras dedicada a diferentes comportamientos durante la cópula en 30 parejas. Promedios \pm desviación estándar y ámbito entre paréntesis del tiempo que dedicaron en cada comportamiento (duración de los movimientos entre la duración total de la cópula ms/ms); el N = el número de individuos que realizaron cada comportamiento. Las medianas entre paréntesis cuadrados se analizaron con la Prueba Kruskal-Wallis y U Mann-Whitney. Las especies significativamente diferentes entre sí según la Prueba Dunn se les asigna una misma letra ($p < 0.01$).

COMPORTAMIENTO DE LA HEMBRA	<i>D. malerkotliana</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>D. saltans</i>	<i>D. willistoni</i>	Prueba, probabilidad y grados de libertad
1-) CAMINAR -Número individuos -Promedio de duración total de caminar/duración total de la cópula (ms/ms).	29 0.18 \pm 0.15 (0.01 - 0.50) [0.1]	30 0.19 \pm 0.11 (0.03 - 0.50) [0.3]	18 0.14 \pm 0.17 (0.001 - 0.52) [0.14]	29 0.15 \pm 0.12 (0.01 - 0.40) [0.1]	$\chi^2 = 3.5$, $P = 0.3$; 3 g.l. $K = 6.3$, $P = 0.2$; 3 g.l.
2-) PATEAR -Número de individuos -Promedio de duración total de las series de patadas/ duración total de la cópula (ms/ms)	21 0.15 \pm 0.10 (0.01 - 0.35) [0.14]c	30 0.11 \pm 0.11 (0.01 - 0.21) [0.13]c	21 0.04 \pm 0.04 (0.002 - 0.13) [0.02]a, b, d	29 0.14 \pm 0.12 (0.01 - 0.47) [0.3]c	$\chi^2 = 1.8$, $P = 0.6$; 3 g.l. $K = 23.4$, $P < 0.01$; 3 g.l. -Dunn
3-) SACUDIR Y EMPUJAR -Número de individuos - Promedio de duración total de las series de sacudidas y patadas/ duración total de la cópula (ms/ms)	Ausente -	Ausente -	11 0.04 \pm 0.03 (0.008 - 0.09) [0.03]d	21 0.34 \pm 0.25 (- 0.85) [0.2]c	$\chi^2 = 11.56$, $P < 0.001$; 1 g.l. $U = 18$, $P < 0.001$; 11, 21 g.l.

Cuadro 3. Comparación entre las cuatro especies de los promedios, desviación estándar y ámbito (entre paréntesis) de las tasas de duración (segundos por minuto) o de frecuencias de cada comportamiento según la duración total de cada tercio de la cópula (minutos). El N fue de 30 parejas para cada comportamiento. Las medianas entre los paréntesis cuadrados se analizan con la prueba Kruskal-Wallis. La Prueba Dunn se representa con una letra ($p < 0.05$).

Comportamientos	I tercio	II tercio	III tercio	Prueba Kruskal Wallis (2 g.l.)
<i>D. melanogaster</i>				
- Duración (min)	4.08 ± 0.9 (2.4-6.1)	4.08 ± 0.9 (2.4-6.1)	4.08 ± 0.9 (2.4-6.1)	
♂ Golpecitos (s/min.)	1.4 ± 1.09 (0-5.3) [1.15]	1.2 ± 1.05 (0-3.5) [1.1]	1.1 ± 1.44 (0-7.6) [0.8]	K = 3.3; P = 0.2
♂ Pulsadas/minuto	7.13 ± 13.23 (0-72) [0.004]	5.1 ± 6.97 (0-36) [0.003]	6.2 ± 5.9 (0-20) [0.003]	K = 0.8; P = 0.6
♀ Caminar (s/min.)	14.8 ± 12.0 a (0-46) [9.82]	10.3 ± 9.5 (0.1-40) [9.6]	8.49 ± 5.49 a (0-20) [8.3]	K = 3.6; P = 0.2
♀ Patear (s/min.)	7.06 ± 9.0 (0-41.6) [4.86]	6.37 ± 7.4 (0-39.5) [4.4]	5.75 ± 6.1 (0-22) [3.8]	K = 1.6; P = 0.9
<i>D. malerkotliia</i>				
- Duración (min)	1.56 ± 0.35 (1 -2.4)	1.56 ± 0.35 (1 -2.4)	1.56 ± 0.35 (1 -2.4)	
♂ Golpecitos (s/min.)	7.58 ± 9.28 c (0-34.2) [4.7]	10.8 ± 12.7 (0-48) [5.3]	16.4 ± 12.14 a (1.4-40.3) [11.03]	K = 12.2; P = 0.002
♂ Pulsadas/minuto	0.001 ± 0.01 (0-0.01) [0]	0.01 ± 0.3 (0-0.4) [0]	0.001 ± 0.01 (0-0.02) [0]	K = 0.06; P = 0.9
♀ Caminar (s/min.)	17.03 ± 14.7 c (0-47) [11.3]	8.8 ± 12.4 (0-45) [2.6]	4.1 ± 7.4 a (0-33) [0.8]	K = 18.9; P < 0.001
♀ Patear (s/min.)	6.2 ± 6.6 (0-23)[3.3]	6.5 ± 11.8 (0-51) [0.9]	7.14 ± 9.6 (0-34) [2.2]	K = 1.1; P = 0.6
<i>D. saltans</i>				
- Duración (min)	3.9 ± 1.13 (1.3-6.8)	3.9 ± 1.13 (1.3-6.8)	3.9 ± 1.13 (1.3-6.8)	
♂ Frotos/minuto	18.3 ± 5.7 a, b (5-30) [18.8]	1.8 ± 6.2 a, c (0-33) [0]	0 b, c [0]	K = 69.7; P < 0.001
♂ Pulsadas/minuto	0.5 ± 1.1 (0-4.9) [0]	0.3 ± 0.9 (0-3.4) [0]	1.1 ± 2 (0-7.3) [0]	K = 5.5; P = 0.1
♀ Caminar (s/min.)	3.2 ± 6.1 (0-21) [0]	4.9 ± 12.3 (0-53)	5.8 ± 25.5 (0-48) [0]	K = 1.3; P = 0.5
♀ Patear (s/min.)	0 [0]	0 [0]	6.08 ± 9.2 (0-41)[0]	K = 53.7; p < 0.001
♀ Sacudir (s/min.)	0 [0]	0 [0]	2.55 ± 4.7 (0-16) [0]	K = 24.6; p < 0.001
<i>D. willistoni</i>				
- Duración (min)	2.7 ± 0.67 (1.4-4.3) [6]	2.7 ± 0.67 (1.4-4.3) [0.3]	2.7 ± 0.67 (1.4-4.3) [0.8]	
♀ Caminar (s/min.)	7.28 ± 6.7 b, c (0-24) [0.3]	2.67 ± 4.16 a (0-14)[0.7]	3.4 ± 5.11 a (0-20) [0.6]	K = 13.4; p = 0.001
♀ Patear (s/min.)	3.3 ± 6.0 (0-22)[0]	5.6 ± 9.9 (0-39)[0]	5.4 ± 10.8 (0-57) [4.4]	K = 0.6; P = 0.7
♀ Sacudir (s/min.)	5.05 ± 10.7 c (0-43) [3.03]	8.16 ± 17.9 (0-53) [0.1]	11.7 ± 16.9 a (0-59) [0.4]	K = 8.4; p = 0.015

Cuadro 4. Comparación entre las primeras cópulas con machos silvestres intactos y con machos silvestres sin los tarsos del primer par de patas. El N fue de 20 para cada tratamiento, excepto en la proporción de la progenie que no se incluyó las hembras que pseudocopularon. Entre los paréntesis redondos se encuentra el ámbito de los promedios. Las medianas entre los paréntesis cuadrados se analizan con la prueba U Mann-Whitney.

	<i>I cópula Intacto N = 20</i>	<i>I cópula Sin tarsos I N = 20</i>	<i>Diferencia</i>
-Duración de la cópula (min)	15.6 ± 2.6 (10 - 21) [16]	14.7 ± 2.02 (8.1 - 18) [15]	U = 155.5; p = 0.2
-Días hasta la recópula	10 ± 2.04 (7 - 28) [10]	8 ± 1.9 (4 - 28) [7]	U = 112; p = 0.01
-Número de individuos de la progenie	152.7 ± 42.4 (62 - 225) [144]	110.8 ± 50.9 (51 - 202) [105.5]	U = 100, p = 0.007
-Proporción de la progenie engendrada por el primer macho. (N = 15 y N = 18 respectivamente.)	0.45 ± 0.045 (0.4 - 0.56) [0.4]	0.4 ± 0.07 (0.26 - 0.5) [0.4]	U = 81, p = 0.5.
-Número pseudocópulas en la II cópula	5	2	X ² = 4.5, p = 0.03, gl = 1
-Duración promedio de golpecitos por el ♂/duración de la cópula (s/min)	1.6 ± 0.8 (0.4 - 3.2) [1.5]	-	U = 0, p < 0.001
-Duración promedio de intentar dar golpecitos por el ♂/duración de la cópula (s/min)	-	0.4 ± 0.2 (0.1 - 0.8) [0.4]	U = 0, p < 0.001
-Pulsadas por minuto	6.8 ± 0.1 (2.5 - 26.6) [6.5]	-	U = 0, p < 0.001
-Duración promedio de caminar por la ♀/duración de la cópula (s/min)	8.1 ± 4.5 (0.5 - 19.2) [7.6]	12.2 ± 8 (4.1 - 22.3) [10.7]	U = 265.5, p = 0.2
-Duración promedio de patear por la ♀/duración de la cópula (s/min)	13 ± 5.7 (5.2 - 27) [14]	12.3 ± 8 (2.7 - 31.6) [11]	U = 162.5, p = 0.5

Cuadro 5. Comparación entre las primeras cópulas con machos silvestres intactos y con machos sin los tarsos del segundo par de patas. El N fue de 25 para cada muestra. Se realizó la prueba U Mann-Whitney para comparar entre las parejas. N.S. = no significativo estadísticamente $p > 0.05$. Símbolos: ♀ = hembra, ♂ = macho.

	<i>Machos intactos</i>	<i>Machos sin tarsos II</i>	<i>Diferencia</i>
Duración de la cópula (min)	12.9 ± 3.2	13.2 ± 2.5	N.S
Progenie	57.05 ± 26.9	60.6 ± 26.8	N.S.
Duración promedio de golpecitos por el ♂/la duración total de la cópula (s/s)	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.008	P < 0.001
Pulsadas promedio del ♂ por min.	6 ± 5.4	4.8 ± 3	N.S
Duración promedio de caminatas por la ♀/la duración total de la cópula (s/s)	0.1 ± 0.07	0.1 ± 0.08	N.S
Duración promedio de patadas por la ♀/la duración total de la cópula (s/s)	0.17 ± 0.1	0.2 ± 0.2	N.S

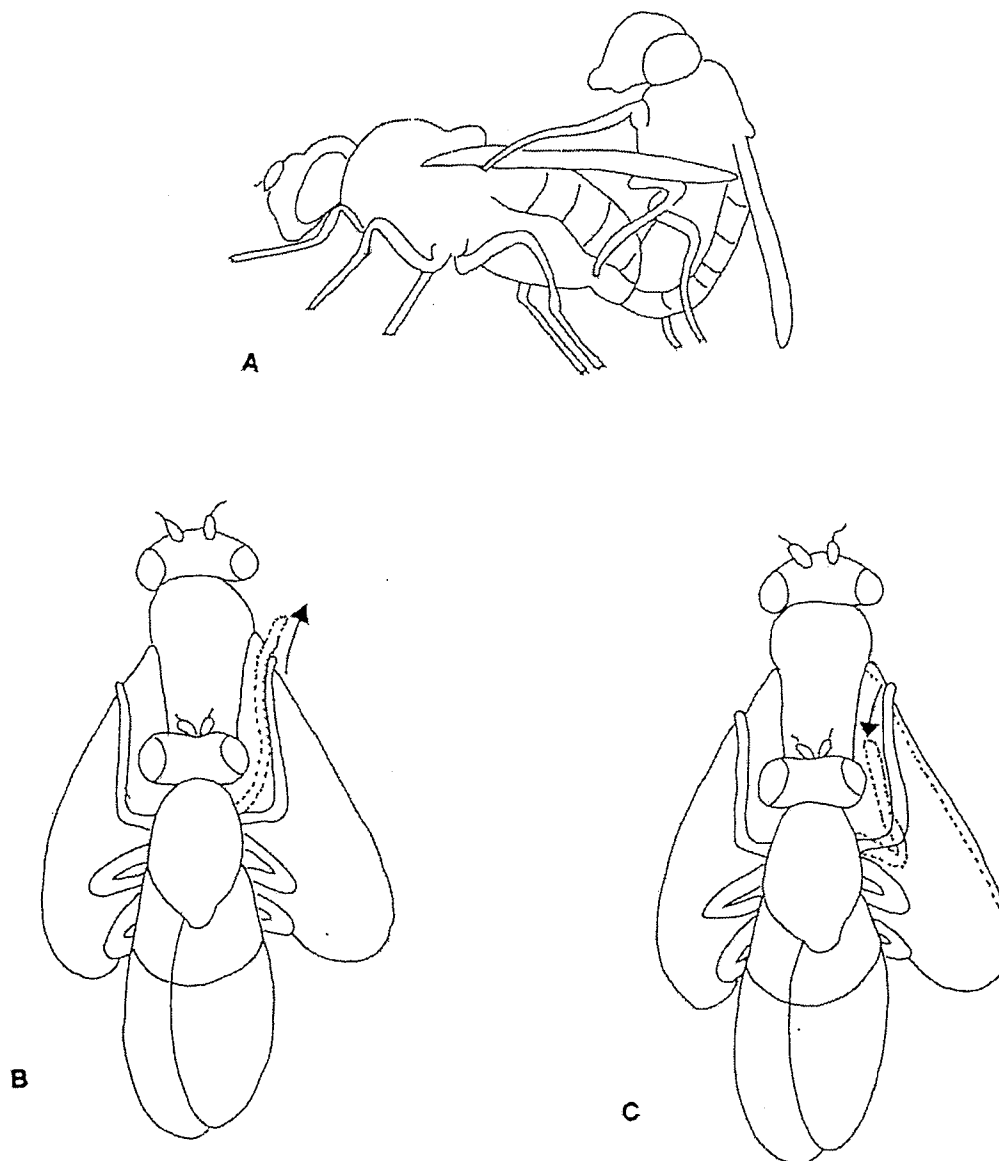


Figura 1. Pulsada del macho *D. melanogaster*. A-) Vista lateral de la posición de la pata protorácica del macho durante la cópula. En reposo, las uñas pretarsales sostienen la base del ala de la hembra. B-) Vista dorsal, el macho soltó el ala con la pata derecha y la extendió hacia delante (línea punteada). C-) Vista dorsal, el macho tocó otra vez la base del ala y flexionó la pata (línea punteada), jalando el ala con la uña y levantó levemente el ala (línea punteada). La pata vuelve a la posición de reposo. Entre cada posición hay 0.03 s.

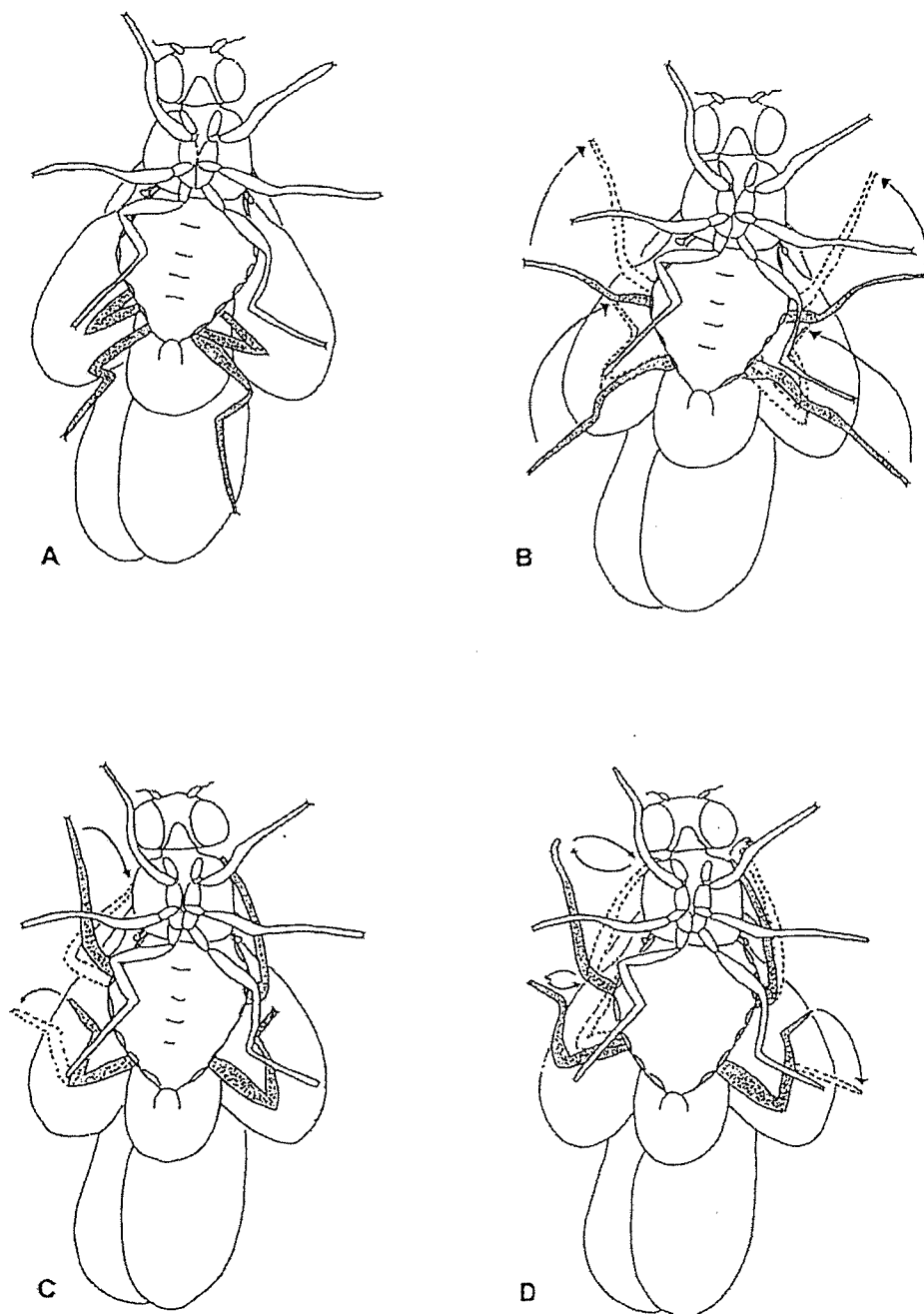


Figura 2. Golpecitos del macho de *D. melanogaster*, vista ventral. Las patas de la hembra se representan siempre con líneas continuas, las patas del macho se representan con relleno o con línea punteada. **A-**) Al inicio, el macho tiene las patas meso torácicas flexionadas y las meta torácicas apoyadas en el suelo. **B-**) Desde la posición inicial, 0.03 s después el macho extendió las patas, y 0.03 s más tarde las dirigió hacia delante (líneas punteadas). **C-**) 0.03 s él tocó con el segundo tarso izquierdo el tórax de la hembra y con los ápices de las terceras tibias izquierdas tocó las patas traseras de la hembra. La segunda pata derecha no tiene contacto con la hembra. Otros 0.03 s después golpeó el lado del tórax de la hembra con el tarso derecho y extendió a la vez la tercera pata derecha (línea punteada). **D-**) 0.03 s después mantuvo contacto con el tórax de la hembra con el meso tarso izquierdo y 0.03 s después, golpeó con todas las patas excepto la pata meta torácica izquierda (líneas punteadas).

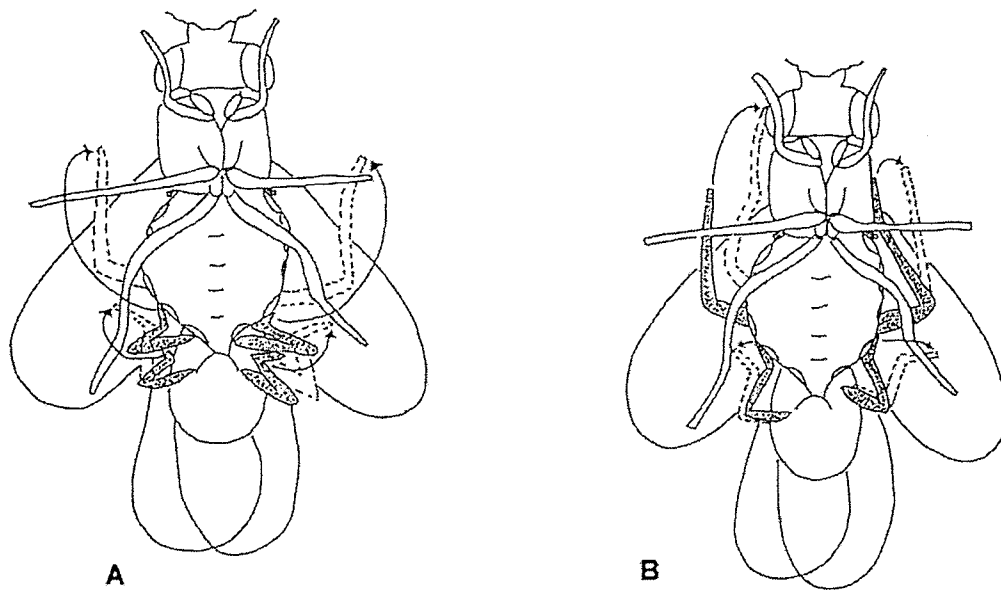


Figura 3. Golpecitos del macho de *D. malerkotliana*, vista ventral. Las patas de la hembra se representan siempre con líneas continuas, las patas del macho con relleno o con líneas punteadas. **A-**) El macho inició con las patas meta y meso torácicas flexionadas, y duró 0.03 s para extender las patas hacia delante (líneas punteadas). **B-**) Después de 0.03 s dio un golpecito con ambos tarsos de las patas traseras y otro con el meso tarso izquierdo. Dio otro golpecito con el meso tarso derecho 0.03 s después al ojo de la hembra y al mismo tiempo aparta la pata meso torácica izquierda y las dos patas traseras a la vez (líneas punteadas).

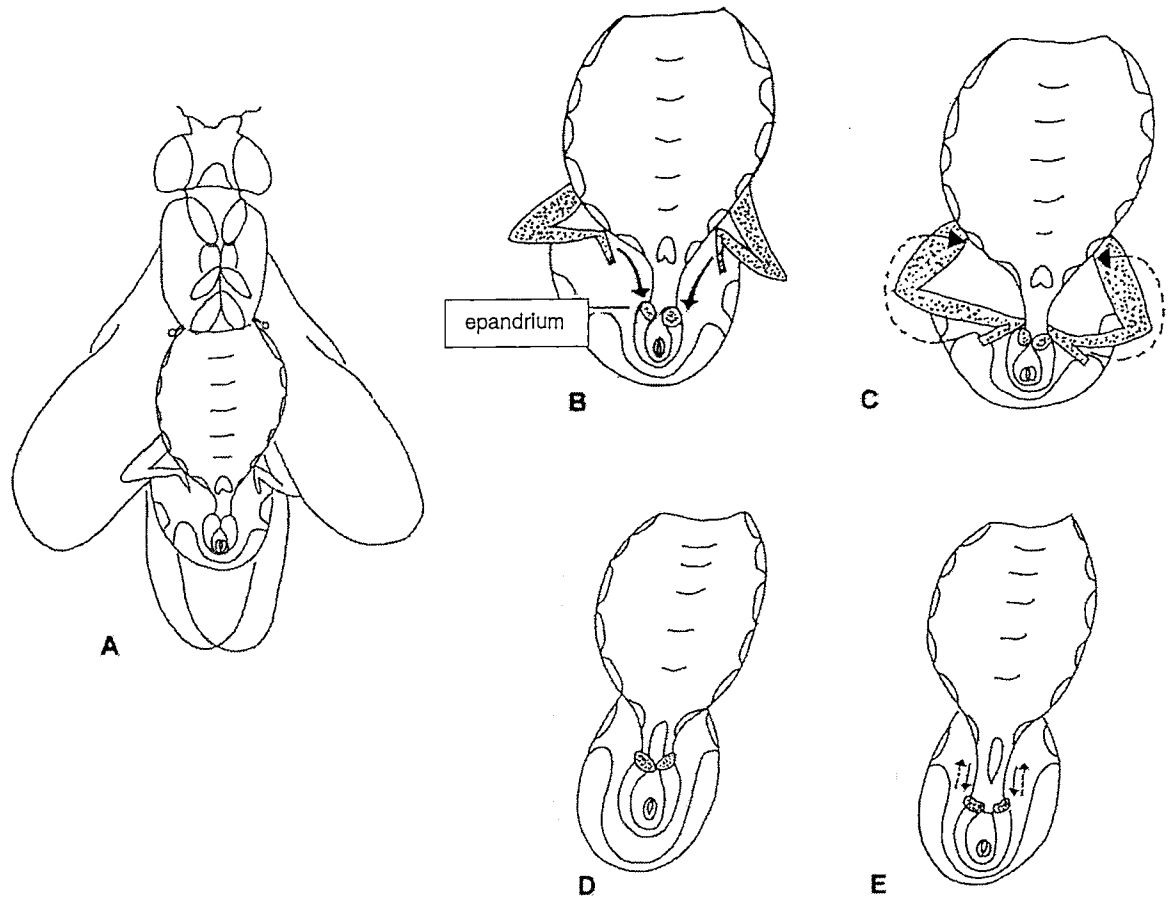


Figura 4. Comportamientos de *D. saltans* durante la cópula. Frote con las patas traseras (B y C) y movimiento del epandrium (D y E). A-) Vista ventral de la hembra (sin las patas dibujadas), de la genitalia y patas meta torácicas del macho antes de frotar. B-) El macho inició el frote con los ápices de las tibiae meta torácicas desde la base del ovipositor. C-) Él mantuvo las tibiae en contacto con el ovipositor durante 0.45 s hasta cuando tocó el epandrium de su genitalia, él levantó las patas y 0.1 s después volvió a la posición original. D-) El movimiento con el epandrium comenzó cuando está cerrado en el último esternito del abdomen. E-) El epandrium se abrió y se mantuvo en contacto con el ovipositor, se deslizó hacia el extremo de éste y luego regresó al punto inicial, duró 0.57 s.

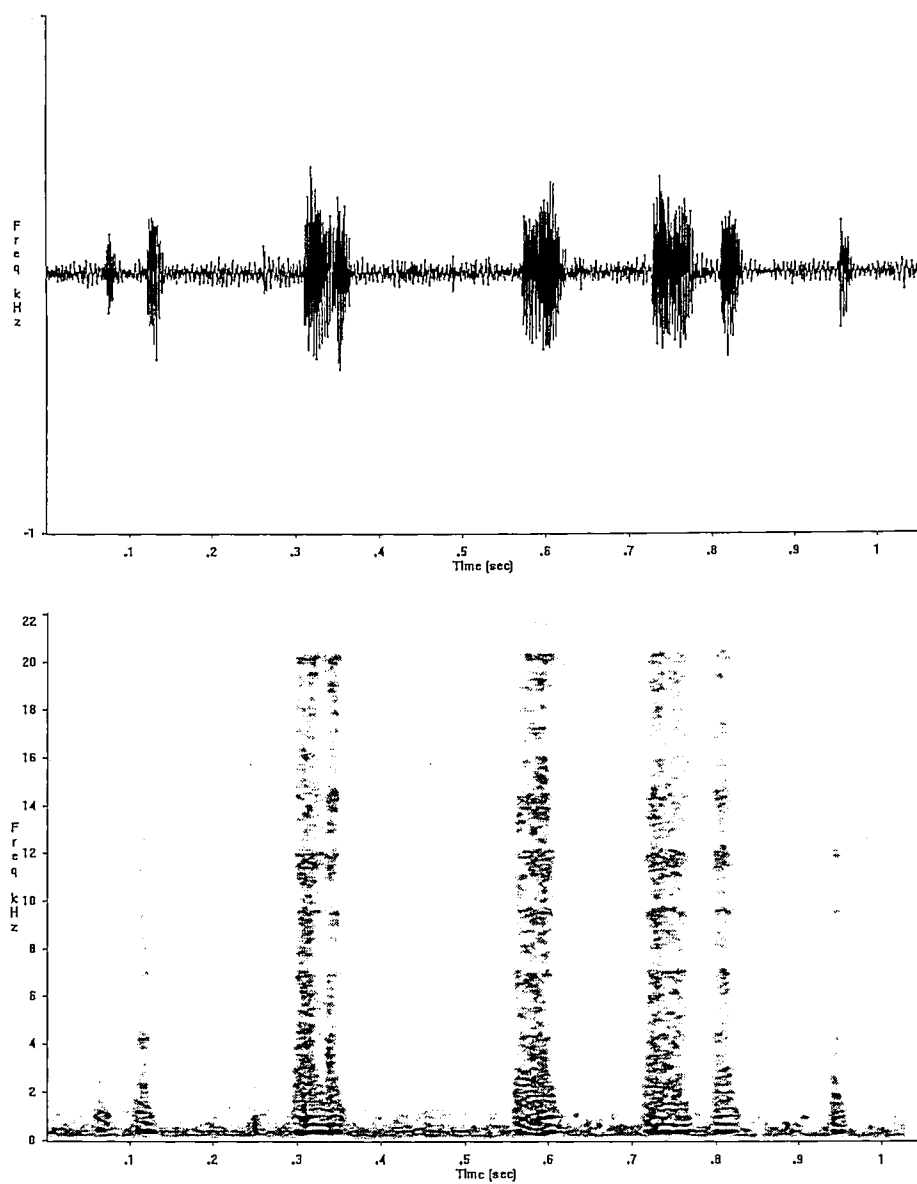


Figura. 5. Ejemplo de vibraciones producidas por la hembra de *D. saltans* cuando realiza una sacudida al macho durante el final de la cópula.

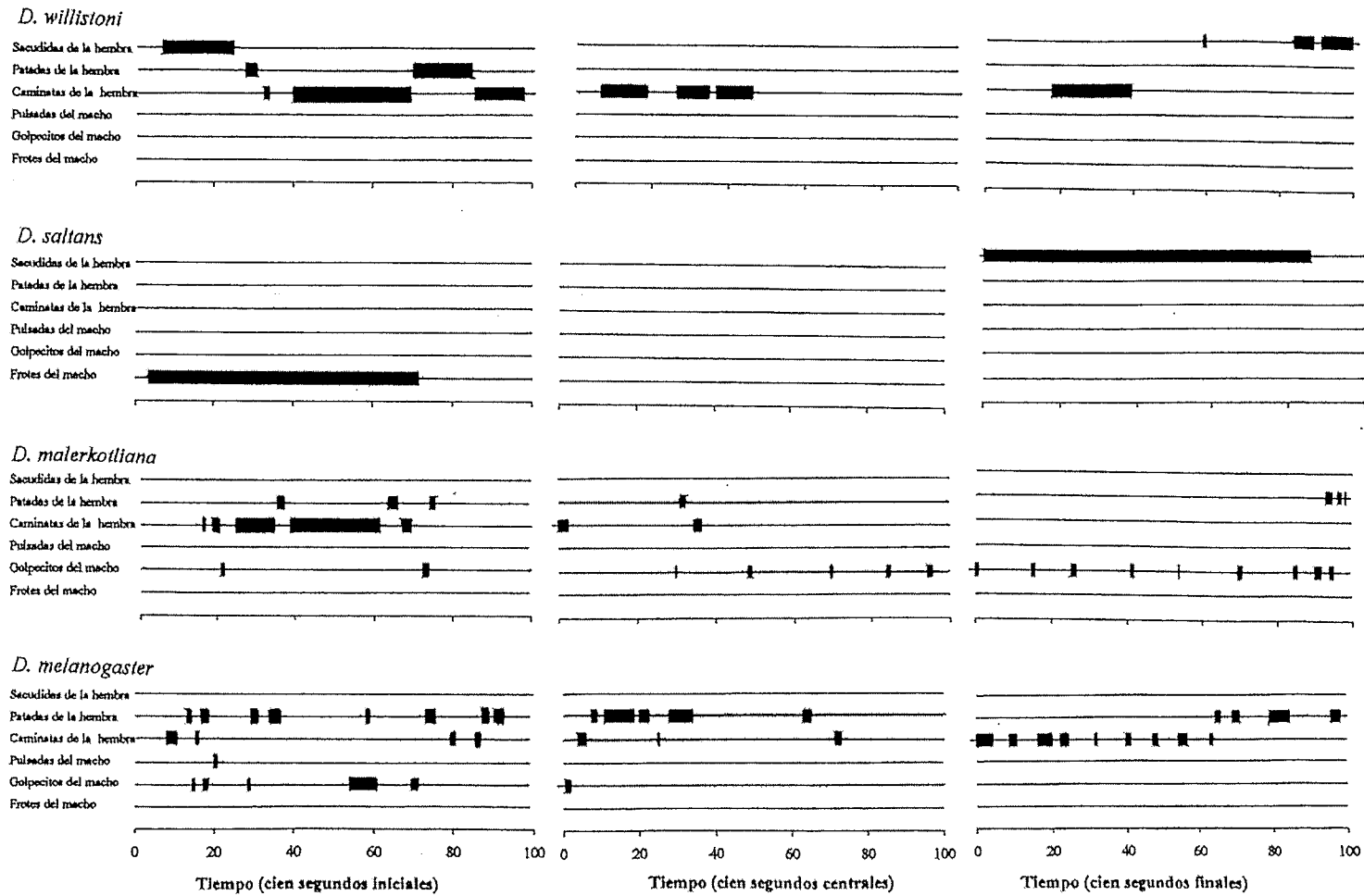


Fig. 6. El patrón temporal de ocurrencia de los comportamientos del macho y la hembra en un ejemplo de una cópula de cada una de las cuatro especies de *Drosophila*. Las barras representan el momento en que ocurrieron desde que inició hasta que terminó el movimiento en los 100 segundos iniciales, centrales y finales.

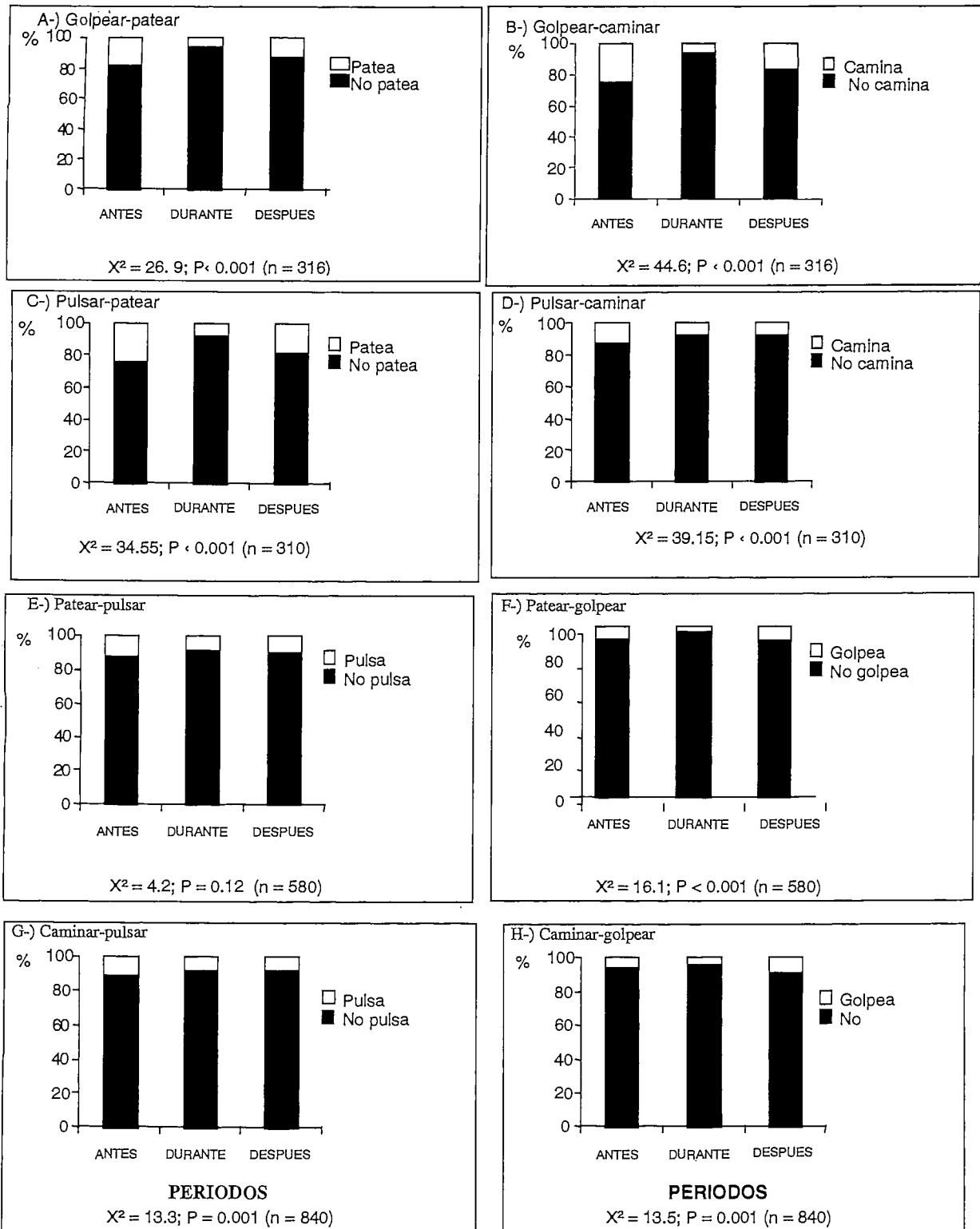


Figura 7. Porcentajes del total de comportamientos en 30 cópulas de *D. melanogaster*, clasificados en tres períodos: ANTES: acción del sexo opuesto 5 segundos previos del inicio del comportamiento; DURANTE: acción del sexo opuesto 5 segundos desde el inicio del comportamiento; y DESPUÉS: acción del sexo opuesto 5 segundos después de finalizado el comportamiento. El n es igual para los tres períodos. Prueba Chi-cuadrado con 2 grados de libertad en todos los casos. Las figuras de la A-D describen porcentajes de los comportamientos del macho y de la E-H comportamientos de la hembra.

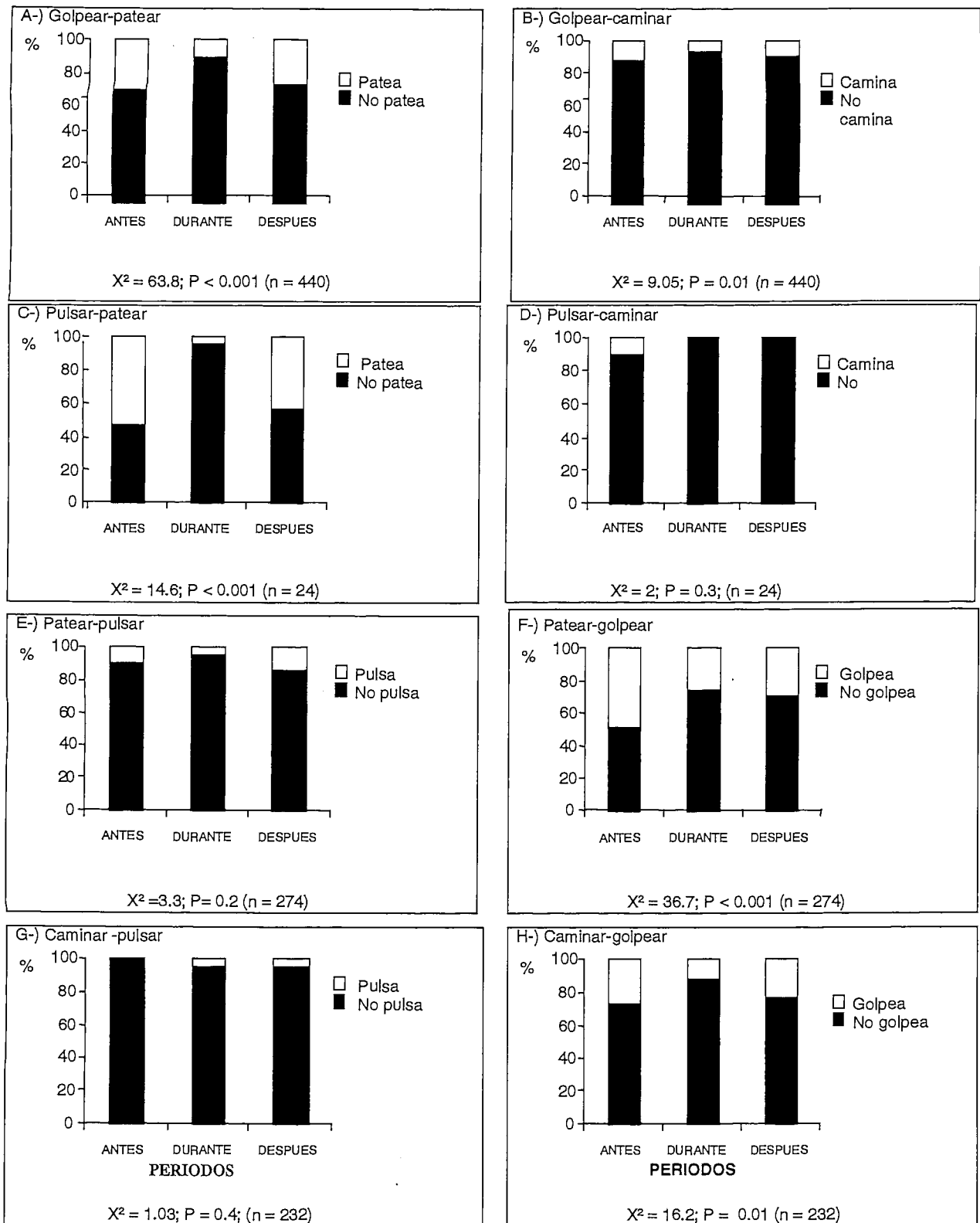


Figura. 8. Porcentajes del total de comportamientos en 30 cópulas del macho y la hembra en *D. malerkotliana*, clasificados en tres períodos: ANTES: acción del sexo opuesto 5 segundos previos del inicio del comportamiento; DURANTE: acción del sexo opuesto 5 segundos desde el inicio del comportamiento; y DESPUÉS: acción del sexo opuesto 5 segundos después de finalizado el comportamiento. El n es igual para cada período. Prueba Chi-cuadrado con 2 grados de libertad en cada caso. Las figuras de la A-D describen porcentajes de los comportamientos del macho y de la E-H comportamientos de la hembra.

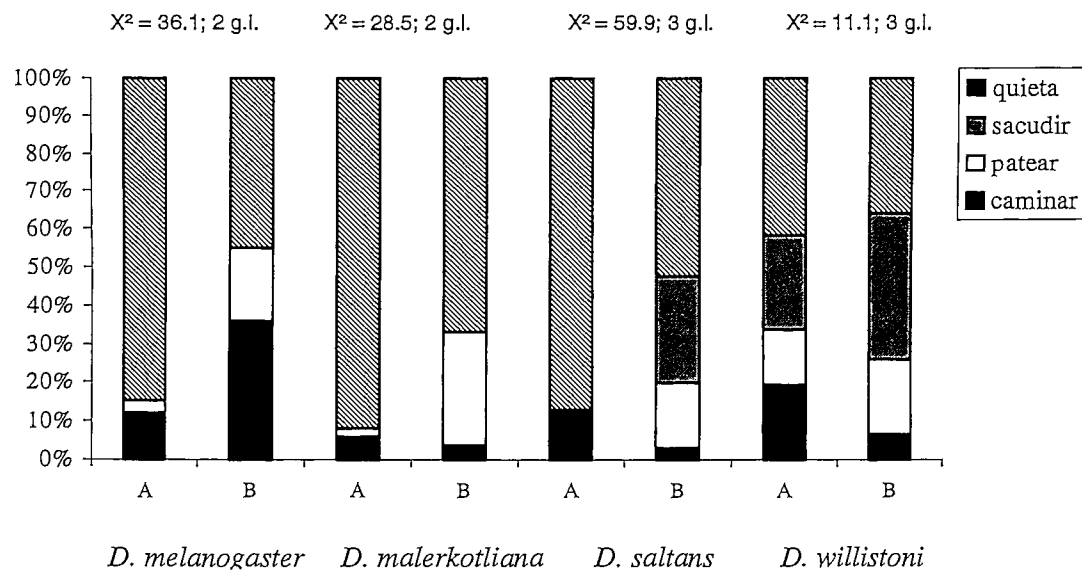


Figura. 9. Porcentaje del tiempo que realizó comportamientos la hembra durante los 10 segundos iniciales (Columna A) y 10 s finales (Columna B) del último tercio de la cópula antes de que bajó el macho. El N fue de 30 parejas para cada especie de *Drosophila*. Se comparó cada par de columnas por especie con la prueba Chi cuadrado y en todas las especies fueron significativamente diferentes ($p < 0.01$).

The Royal Society

Proc. R. Soc.Lond. B

Natalia Ramírez Albán

Biología, U.C.R., Universidad de Costa Rica

Ciudad Universitaria, Costa Rica

Phone (506) 2242662, (506) 3534852

Phone and Fax: (506) 24942221

Email: nataliaramirez@wildmail.com

Short title:

Copulatory courtship in *Drosophila melanogaster*

The effect of male copulatory courtship on *Drosophila melanogaster* female (Diptera:
Drosophilidae)

NATALIA RAMÍREZ ALBÁN

Escuela de Biología, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Universidad de Costa Rica.

nataliaramirez@wildmail.com

Abstract. In species with multiple copulations, male behaviors during copulation could influence paternity. This study analyzed the effect of experimental modification of male copulatory courtship in *Drosophila melanogaster* on the cryptic female choice. By amputating the tarsi of the first legs, courtship pluckings on the female wing was eliminated, and tapping by the second and third legs was modified. Females that copulated with amputated males remated in less time, produced fewer progeny, and had fewer “pseudocopulations” (copulations without insemination when remating) than females which copulated with intact males. Sperm precedence was not affected by the male modification. These experiments showed that modified male copulatory courtship could affect aspects of cryptic female choice that are not directly related to sperm.

Key words: copulatory courtship, *Drosophila melanogaster*, cryptic female choice, sexual selection.

1. INTRODUCTION

Females can choose males as sires for their offspring before, during, and after mating. During and following copulation the female can influence sperm usage by altering the numbers of sperm she stores from each mate, or by biasing her use of stored sperm (Thornhill 1983, Eberhard 1996). These types of mechanism have been involved in most demonstrations of the reproductive effects of male copulatory courtship to date (Otronen & Siva-Jothy 1991, Edvardsson & Arnqvist 2000, Tallamy *et al.* 2002, Ortiz 2002, Bloch Qazi 2003). Direct manipulation of sperm is not the only mechanism by which females can exercise cryptic choice and that male copulatory courtship might be designed to influence.

In *Drosophila*, female remating is common in natural populations of some species and cryptic female choice or sperm competition may occur. In *Drosophila melanogaster* the male copulatory occurs (Robertson 1982; Eberhard 1994; Ramírez 2004); but previous studies of sperm precedence in *Drosophila* did not include behavior during the copulation (Fowler 1973; Gromko *et al.* 1984). Males perform movements with all three pair of legs during the copulation. They pluck the female's wing with the front legs (Ramírez 2004),

and tap or rub the female's eyes and sides with the second and third pair legs (Robertson 1982; Ramírez 2004). Females also performed behavior during copulation walking and kicking or remaining quiet (Ramírez, 2004). During the tapping and plucking, the females tend to remain quiet, and when they were active the males tended to remained quiet (Ramírez 2004). This study documents the effects of copulatory courtship on two additional female responses that can affect male paternity: production of eggs, and receptivity to further mating.

2. METHODS

Wild and sepia strains of *Drosophila melanogaster* flies from Carolina Biological Supply Company of the United State were used. The wild type flies are dominant homozygotes (red eyes) and the sepia are homozygotes recessives (dark brown-sepia eyes). The eye color was used as a phenotypic marker to determine paternity.

Unanaesthetized flies were separated by sex under a dissecting microscope during the first 8 hours following eclosion and were placed in glass food vials for seven days. Each 200 ml food vial contained a mixture of 10 g of corn starch (Maizena), 20 ml of baby food (fruit dessert by Gerber), 30 ml of water and 3 ml of diluted acetic acid (white vinegar), and was sterilized in an autoclave.

Two days after the males had emerged, both front tarsi were cut from unanaesthetized males with a fine iridectomy scissors inside a transparent plastic bag under a dissecting microscope. Only wild type males had their legs amputated. Control wild type males were subjected to the same procedure but without cutting their tarsi.

One virgin sepia female and a virgin wild male one week old were placed in a plastic petri dish (diameter: 4 cm) for all the first copulations. In control treatments, the female first copulated with an intact wild male, and in experimental treatments the female first copulated with an amputated wild male. In both treatments for second mating virgin sepia males were used. The first male was collected in 70% alcohol at the end of the copulation and the female was placed in a fresh food vial so that she could lay eggs. One day later each female was placed with a second sepia male, in a petri dish during one hour or until the end of copulation. The female was then placed in a new fresh food vial; if the

second male had copulated he was collected in 70% alcohol. Each female was placed with a male in a petri dish for an hour every 3 days until she remated. After her second mating the female was placed in a fresh food vials to lay eggs every three days until she died. When the female died she was collected in 70 % alcohol. The females were provided with fresh food vials every 3 days regardless of whether she had remated. The food vials were checked three times each day for progeny until no more adults emerged.

Verbal accounts of forty copulations (20 control and 20 experimental males) were recorded with a tape recorder, and ten copulations (5 control and 5 experimental) were filmed with a Sanyo VCC-3912 camera (Sanyo) connected to a dissecting microscope, using light from an fiber optic lamp. The videos were filmed from 7:30 a.m. to 4:00 p.m. under environmental conditions (approximately 25°C). The recordings were analyzed with the JWatcher program (Macquarie University, Australia) to quantify the frequency and duration of each behavior.

3. RESULTS

During copulation the intact males held the females wings with the first tarsi when they were resting (Fig.1A). These males were courting the females with one of their legs by plucking the female wing, pulling up the wing. They never released both legs at the same time because they need one to hold the wings to do tappings against the front part of the female body. The modified males that maintained their body at a 90 degree angle in relation to the female were unable to pluck the female's wings (Fig. 1B). They moved the front pair of legs in an attempt to pluck, but never reached the female's wings. They also attempted to do tappings with the second and third pair of legs, but without the support of the first pair of legs, they could only tap the wings, the last segments of the abdomen or any female body site. These movements were called "tapping attempts".

The copulations of intact males and modified males with virgin females did not differ in duration (Table 1), or in the time that the female dedicated to walking, or to kicking (Table 1). However, they did differ in the number of days required for remating by the female (Table 1). The females that first mated with intact males required more time than the females which first mated with modified males (Table 1).

All copulations with modified males produced progeny, because sperm transfer occurred. Experimental females produced an average lifetime total progeny of 253 ± 82.6 , which is less than that of control females that first mated with intact males, 332.2 ± 96.1 ($U = 73.5$, $N_1 = 18$ y $N_2 = 15$, $P = 0.03$). The same tendency also occurred between the first copulation of the control and treatment samples. The females that first mated with modified males produced fewer progeny (105) than the females that mated with intact males (144 offspring; Table 1). But the proportion of the progeny produced by the first male was similar between the intact (44 %) and modified males (40 %) (excluding the second matings that did not produce progeny) (Table 1).

Seven females (18 %) did not produce progeny of sepia males after the second mating. Their second copulations (pseudocopulations) were of shorter duration (5.1 ± 0.8 min.; range: 4.1 – 6.2 min.) than the second copulations that produced progeny (13.6 ± 4.1 min. range: 4 – 23 min) (U-Mann Whitney = 6, $N_1 = 7$, $N_2 = 33$, $P < 0.001$). Pseudocopulations were more common in females that first mated with intact males ($N = 5$) than females that first mated with modified males ($N = 2$) (Table 1). In control females, the pseudocopulations occurred sooner (average: 8.5 ± 2.7 days; range: 4 – 13 days) than rematings that produced progeny (average: 12.1 ± 5 days; range: 7 – 28 days), ($U = 14.5$, $N_1 = 15$ y $N_2 = 5$, $P = 0.02$). The two experimental females whose second matings were pseudocopulations, both remated at 7 days. They did not differ from the other experimental females whose rematings produced progeny (7 days; range: 7-28 days, $U = 12$, $N_1 = 18$ y $N_2 = 2$, $P = 0.4$) and they produced progeny. In general, the first copulations were longer than the second copulations, both in control (Wilcoxon Test: $T = -2.04$, $N = 15$, $P = 0.04$) and experimental females (Wilcoxon Test: $T = -3.03$, $N = 18$, $P = 0.002$).

4. DISCUSSION

This study shows that male copulatory courtship behavior can influence cryptic female choice in *Drosophila melanogaster*, even when it has no apparent effect on sperm transfer or the use of the transferred sperm. Copulatory courtship behavior was greatly modified when the tarsi were amputated. Pluckings was totally eliminated, and the site on the female that the male tapped were different. This variation in copulatory courtship did not affect the duration of the copulation, sperm precedence, or the proportion of time that

the female walked or kicked. However, it did produce changes that can reduce the number of progeny of the modified males. Females that first mated with modified males remated sooner than females that mated with intact males, and the rematings were more frequently fertile. The total number of progeny produced during the entire female lifetime was greater when she first mated with an intact males. Previous studies of the female disposition to remate (Gromko *et al.* 1984) did not consider the possible effects of copulatory courtship behaviors.

Rematings that did not producing progeny, “pseudocopulation” occurred sooner after the first matings than the fertile rematings. The pseudocopulations were shorter than fertile copulations, which could prevent sperm transfer from these males. According to Gromko *et al.* (1984) sperm transfer occurred at approximately 10 minutes from the beginning of the copulation, although this varied. The average duration of the pseudocopulation was 5.1 ± 0.8 minutes in our study. The percentage of pseudocopulations in our study was 18 % and in other studies, according to Snook and Hosken (2004), approximately 20 % and 40 % in a sample studied did not produce progeny after remating. They suggested that this result is caused by the female dumping sperm. They also suggested that female sperm dumping is a result of copulation and that the male could mate for a longer period of time to prevent the female from dumping more sperm. In other species of *Drosophila* a high number of matings that produce no progeny has also been reported; Bundgaard and Barker (2000) reported in *D. buzzatii* that 40 % of the copulations were sterile, and the mean duration of infertile copulation was shorter (122 s) than that of fertile matings (140 s).

This study documents the effects of copulatory courtship behavior in cryptic female choice of *D. melanogaster*, but the relation between the external behavior and internal morphology are events remain unknown. The possibility that the female eliminated sperm or seminal products before storage was not tested. Future studies may provide better understanding of the function of copulatory courtship behavior, and of the high variation in paternity that is commonly associated with studies of sperm precedence.

ACKNOWLEDGEMENTS

My special gratitude to William Eberhard and Paul Hanson for their advice and useful comments during this work. For general discussion, support, analysis of data and revisions of the manuscript I thank Ximena Miranda, Daniel Briceño, Federico Bolaños and Gilbert Barrantes.

REFERENCES

- Bloch Qazi, M. C. 2003. A potential mechanism for cryptic female choice in a flour beetle. *J. Evol. Biol.* 16, 170- 176.
- Bundgaard, J. & Barker, J.S.F. 2000. Remating, sperm transfer, and sperm displacement in the cactophilic species *Drosophila buzzatii* Patterson & Wheeler (Diptera: Drosophilidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 71, 145- 164.
- Córdoba, A. 1999. Male copulatory sensory stimulation induces female ejection of rival sperm in a damselfly. *Proc.R. Soc. Lond. B.* 266, 779-784.
- Eberhard, W.G. 1996. *Female Control: Sexual Selection by Cryptic Female Choice*. Princeton: Princeton University Press.
- Eberhard, W.G. 1994. Copulatory courtship in 131 species of insects and spiders, and consequences for cryptic female choice. *Evolution* 48, 711-733.
- Edvardsson, M. & Arnqvist, G. 2000. Copulatory courtship and cryptic female choice in red flour beetles *Tribolium castaneum*. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 267, 559-563.
- Fowler, G.L. 1973. Some aspects of the reproductive biology of *Drosophila*: sperm transfer, sperm storage, and sperm utilization. *Adv. Genet.* 17, 293-360.
- Gromko, M.H., Gilbert, D.G. & Richmond, R.C. 1984. Sperm transfer and use in the multiple mating system of *Drosophila*. In Sperm competition and the

evolution of animal mating systems (ed. R.L. Smith), pp 371-426. New York: Academic Press.

- Hoikkala, A., Crossley, S. & Castillo-Melendez C. 2000. Copulatory courtship in *Drosophila birchii* and *D. serrata*, species recognition and sexual selection. *Journal of Insect Behavior* 13, 361-373.
- Ortiz, P.G. 2002. Historia natural, sitios de apareamiento, comportamiento sexual y posible función de la alimentación nupcial en *Ptilosphen viriolatus* (Diptera: Micropezidae). Master thesis, Universidad de Costa Rica.
- Otronen, M. & Siva-Jothy, M.T.1991. The effects of postcopulatory male behavior on ejaculate distribution within the female sperm storage organs of the fly *Dryomiza anilis* (Diptera: Dryomizidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 29, 33-37.
- Ramírez, N. 2004. Cortejo durante la cópula de los machos de *Drosophila malerkotliana*, *D. melanogaster*, *D. saltans* y *D. willistoni* (Drosophilidae). Master thesis. Universidad de Costa Rica.
- Robertson, H.M. 1982. Male activity during *Drosophila* copulation. *Drosophila Information Service* 58, 129.
- Snook, R.R & Hosken, D. J. 2004. Sperm death and dumping in *Drosophila*. *Nature* 2455, 1-3.
- Tallamy, D. W. Powell, B.E. & McClafferty, J.A. 2002. Male traits under cryptic female choice in the spotted cucumber beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Behav. Ecol.* 13, 511-518.
- Thornhill, R. 1983. Cryptic female choice and its implication in the scorpionfly *Harporhynchus nigriceps*. *American Naturalist* 122, 765-788.

Table 1. Comparison between the first matings of females with intact males and with modified males. The analysis used U Mann-Whitney and Chi-square tests. Ranges are given in parenthesis. Medians and their ranges are given in parenthesis.

	I Male Intact n = 20	I Male Modified n = 20	Difference
-Copulation duration (min)	16.1 (10 - 21)	14.9 (8.1 - 18)	U = 155.5; p = 0.2
-Days since remate	10 (7 - 28)	7 (4 - 28)	U = 112; p = 0.01
-Duration of tappings by the ♂/total copulation duration (s/min)	1.5 (0.4 - 3.2)	-	U = 0, p < 0.001
-Duration of tappings attempts by the ♂/total copulation duration(s/min)	-	0.4 (0.1 - 0.8)	U = 0, p < 0.001
-Pluckings per minute	6.5 (2.5 - 26.6)	-	U = 0, p < 0.001
-Duration of walk by the ♀/total copulation duration (s/min)	7.6 (0.5- 19.2)	10.7 (4.1 - 22.3)	U = 265.5, p = 0.2
-Duration of kick by the ♀/total duration copulation (s/min)	14 (5.2- 27)	11.4 (2.7 - 31.6)	U = 162.5, p = 0.5
-Number of progeny	152.7 ± 42.4 (62 - 225)	110.8 ± 50.9 (51- 202)	U = 100, p = 0.007
-Progeny proportion by the first male (n = 15 and n = 18 respectively).	0.44 (0.4 - 0.56)	0.4 (0.26 - 0.5)	U = 81, p = 0.5.
-Number of pseudocopulations	5	2	X ² = 4.5, p = 0.03, gl = 1

♀ = FEMALE, ♂ = MALE.

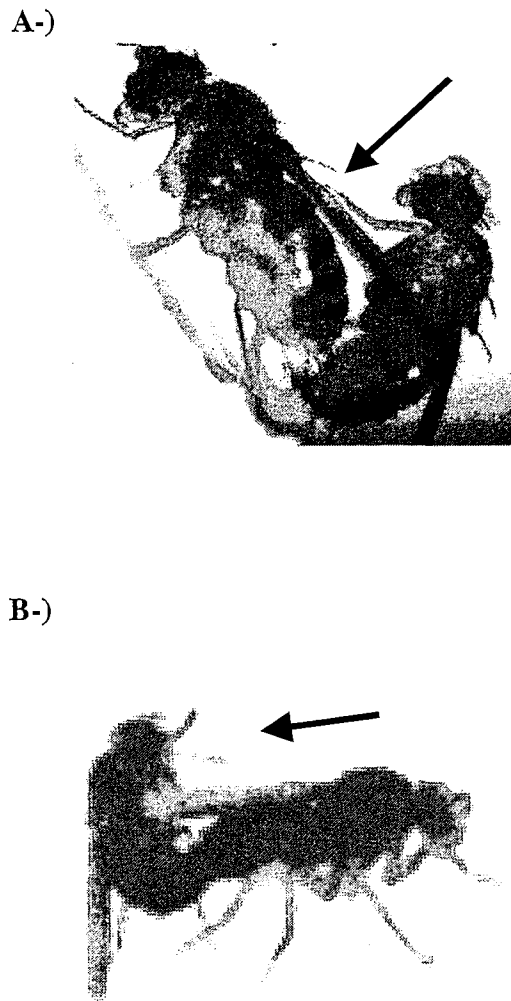


Figure 1. Pictures from videos of *Drosophila melanogaster* copulations. **A-**) Lateral view, a male with protarsi. **B-**) Lateral view, a male without protarsi. The arrows indicate the first legs..

Short communication:

**Flexibility of the copulatory courtship behavior in males of *Drosophila melanogaster*
(Diptera: Drosophilidae)**

Key words: copulatory courtship behavior, cryptic female choice, *Drosophila melanogaster*, progeny, sexual selection.

The males of *Drosophila melanogaster* show courtship behaviour during the copula (Robertson 1982, Ramírez 2004), which includes plucking the female's wings with the first pair of legs, and also tapping of her abdomen, thorax and head with the second pair of legs. According to Eberhard (1996), observations of male courtship behavior could indicate the frequency of cryptic female choice during or after copulation. In this study, male tapping was modified by cutting the tarsi of the second pair of legs, and the effect of this modification in the male behavior was observed.

Drosophila melanogaster flies ("wild strain", Carolina Biological Supply Company, United States) were separated by sex under a dissection microscope during the next 8 hours after eclosion and were placed in food vials for seven days. Flies were unanaesthetized to do the separation. Each food vial contained a mix of 10 g of corn starch (Maizena), 20 ml of baby food (fruit dessert by Gerber), 30 ml of water and 3 ml of diluted acetic acid (white vinegar). The food mix (60 ml) was placed in each glass vial (maximum capacity 200 ml) and sterilized in an "autoclave".

Two days after males emerged, both tarsi of the second pair of legs were cut from unanaesthetized males with a fine iridectomy scissors. This was done inside a transparent plastic bag under a dissecting microscope. Control males were subjected to the same procedure but without cutting their tarsi.

One virgin female and a male were placed in a plastic petri dish (diameter: 4 cm), both of one week old. The male was collected in 70% alcohol after the end of the copula and the female was placed in a fresh food vial for a week so that she could lay eggs. One week later the female was collected in 70% alcohol. The progeny was counted in a plastic transparent bag under a dissecting microscope. Fifty copulations were filmed (25 control

and 25 experimental males) with a Sanyo VCC-3912 camera (Sanyo) connected to a dissecting microscope, using light from an optic fiber lamp. The videos were filmed from 7:30 a.m. to 4:00 p.m. under environmental conditions (approximately 25°C). Each pair was observed during a one hour period or until the end of copulation. The videos were analyzed with the JWatcher program (Macquarie University, Australia) to quantify the duration of copulation and the frequency of each behavior.

A similar number of control and experimental males showed plucking of the female wings as Ramírez (2004) had described. The mean pluckings per minute of control males was 6 ± 5.4 and, and a mean 4.8 ± 3 was observed in experimental males ($U = 310$, $N_1 = N_2 = 25$, $P = 0.96$; Table 1). There was no difference either in the duration of copulation of control and experimental males ($U = 338$, $N_1 = N_2 = 25$, $P = 0.6$; Table 1), nor in female walking ($U = 248$, $N_1 = N_2 = 25$, $P = 0.2$; Table 1) and female kicking during copulation ($U = 322$, $N_1 = N_2 = 25$, $P = 0.8$; Table 1). The number of progeny was also similar ($U = 274.5$, $N_1 = N_2 = 25$, $P = 0.74$; Table 1).

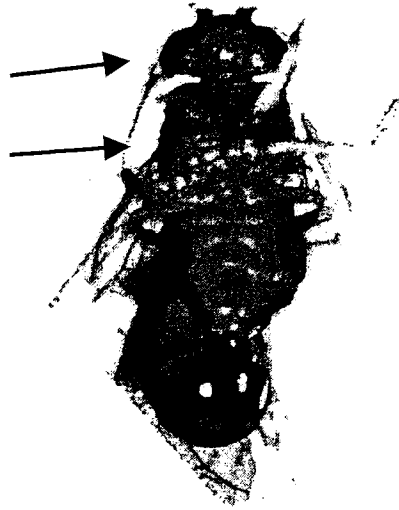
The tapping behavior differed between control and experimental males. Control males held the female wings with the protarsi while the second and third pair of tarsi tapped the female abdomen, thorax and head (Ramírez 2004); the second pair of tarsi touched the female eyes and thorax, and the third pair of tarsi touched the thorax (Fig.1A) or abdomen. Experimental males inverted the leg movements. The second pair of legs never reached the eyes, but tapped against the thorax or abdomen with the distal part of the tibia. Otherwise, the third pair of legs tapped the sides of the female's thorax and eyes (Fig. 1B). The duration of bouts of tappings divided by the mean duration of copulation (s/s) of control males was greater (0.03 ± 0.01) than that of experimental males (0.01 ± 0.008 ; $U = 112$, $N_1 = N_2 = 25$, $p < 0.001$; Table 1). In general, the average total number of tappings per copulation in the intact males was 41 ± 28.1 ($n = 11$) and in amputated males 51 ± 53.5 ($n = 20$). In males intact copulations the percentage average of tappings with the second pair of legs against the eyes was 44 ± 38 %, against the thorax 48 ± 35 % and against the abdomen 7 ± 17 % ($n = 11$ males); while in the amputated males copulations the average of tappings with the third pair of legs against the eyes was 17 ± 22 %, 38 ± 24 % against the thorax and 9 ± 21 % against the abdomen ($n = 20$ males).

Robertson (1982) did a similar experiment amputating the male mesotarsi and obtained similar results. The modification did not differ in the number of progeny nor in duration of copulation, and the amputated legs reached the female's abdomen. But Robertson (1982) did not mention that the amputated males tapped the female's thorax and eyes with the third pair of legs. This movement substitution with the legs was surprising and suggests that the male behavior is guided by feedback of his second pair of legs (he noticed what happened when they were amputated). Also the arrangement that he did with the third pair of legs suggests that tapping of specific parts of the female body could be important for the male, supposedly to influence the female decision to fertilize her eggs with his gametes. In another study with *Drosophila melanogaster* (Ramírez, in preparation) when the tarsi of the first pair of legs were amputated, pluckings behavior was eliminated and the sites and duration of tappings differed, resulting in a decreased number of progeny from these males.

REFERENCES

- Eberhard, W. G. 1996. Female Control: Sexual selection by cryptic female choice. Princeton: Princeton University Press.
- Ramírez, N. 2004. Comportamiento de cortejo durante la cópula de los machos de algunas especies de *Drosophila* (Drosophilidae) y su efecto en la elección críptica por la hembra. Tesis de Maestría. Universidad de Costa Rica.
- Robertson, H.M. 1982. Male activity during *Drosophila* copulation. *Drosophila* Information Service 58: 129.

A-)



B-)

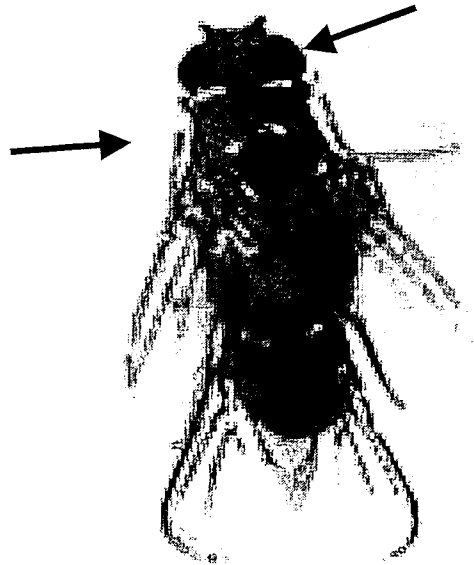


Figure 1. Pictures from videos of *Drosophila melanogaster* copulations. **A-)** Ventral view, the male touched the eye with the right second tarsus, and the female thorax with the third tarsus; arrows indicate the sites. **B-)** Dorsal view, the left second leg without meso tarsus before touched the female thorax and the left metatarsus tapped the female eye; arrows indicate the sites.

Table 1. Comparison between the first copulations of intact males and amputated males. N is 25 for each sample, mean \pm standard deviation. The U Mann-Whitney test was used to compare between the samples.

	<i>Control males (Tarsi intact)</i>	<i>Amputated males (Tarsi removed)</i>	<i>Test statistic</i>
Copulation duration (min)	12.9 \pm 3.2	13.2 \pm 2.5	N.S
Number of progeny	57.05 \pm 26.9	60.6 \pm 26.8	N.S.
Mean of duration of tappings /total copulation duration (s/s)	0.03 \pm 0.01	0.01 \pm 0.008	P < 0.001
Mean of pluckings per min.	6 \pm 5.4	4.8 \pm 3	N.S
Mean of duration of walkings /total copulation duration (s/s)	0.1 \pm 0.07	0.1 \pm 0.08	N.S
Mean of duration of kickings / total copulation duration (s/s)	0.17 \pm 0.1	0.2 \pm 0.2	N.S