

**TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Reconocimiento de la dominancia  
mediante señales químicas en los  
peces anuales *Austrolebias reicherti***

Manuelita Méndez

**Orientadora:**

Dra. Bettina Tassino

**Co-orientador:**

Mag. Federico Reyes

Sección Etología, Facultad de Ciencias, UdelaR.

**Octubre 2022**

# CONTENIDO

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>3</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>4</b>
<i>Selección sexual</i> .....	<b>4</b>
<i>Papel de la señalización química en elección de pareja</i> .....	<b>5</b>
<i>Peces anuales como modelo de estudio</i> .....	<b>7</b>
<b>Objetivo</b> .....	<b>13</b>
<b>Hipótesis de trabajo</b> .....	<b>13</b>
<b>Metodología</b> .....	<b>14</b>
<i>Recolección, cría y mantenimiento de ejemplares de experimentación</i> .....	<b>14</b>
<i>Establecimiento de dominancia entre machos</i> .....	<b>14</b>
<i>Preferencia de las hembras</i> .....	<b>15</b>
<i>Variables y análisis de datos</i> .....	<b>18</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>21</b>
<i>Preferencia de las hembras en función del estatus de dominancia a lo largo de la estación reproductiva</i> .....	<b>22</b>
<i>Asociación entre la preferencia de las hembras y variables morfométricas y conductuales a lo largo de la estación reproductiva</i> .....	<b>27</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>29</b>
<b>Contribuciones</b> .....	<b>38</b>
<b>Referencias bibliográficas</b> .....	<b>38</b>

# AGRADECIMIENTOS

A mis padres, sostén y paciencia desde el día uno, cuando les expresé que había decidido elegir esta carrera tan complicada y de la cual ninguno de nosotros teníamos conocimiento hasta el momento. Por acompañarme y hasta incluso soportarme en esos momentos donde las cosas no salían del todo bien.

A mis amigos, refugio y apoyo día a día. Gracias por transitar este camino conmigo, tanto fuera como dentro de la facultad. Todo es más fácil con ustedes a mi lado.

A Fede, por abrirme las puertas ese invierno de 2018, cuando confió en que un grupo de gurises de tercer año podía darle una mano con los peces de su preciada maestría. Por enseñarme este mundo tan lindo y complicado, y por estar a pie de cañón. A Betta, sabiduría infinita, por siempre tener la palabra justa para calmar las aguas, y por demostrarme cada día que sin mujeres no hay ciencia. A ambos, por su orientación durante este trabajo; por saber entender los tiempos justos donde necesitaba ayuda y donde era necesario agarrarme la mano.

A la sección Etología, por sus palabras de apoyo constantes y por el espacio.

A Daniella y Laura, por su perspicacia a la hora de corregir el trabajo y por sus comentarios inconmensurablemente útiles.

Y a los *Austrolebias*, peces caprichosos y únicos que me enseñaron a darme contra la pared, caer y seguir remando para comprender qué hay detrás de la biología. En definitiva lo que es, inevitablemente, la Ciencia.

# INTRODUCCIÓN

## **1. Selección sexual**

La selección sexual como mecanismo de cambio evolutivo se basa en las diferencias en el éxito reproductivo de los individuos, causadas por la competencia por la obtención de pareja (Darwin, 1859). Pueden distinguirse dos componentes: por un lado, la competencia entre los machos por el acceso a las hembras y por otro, la elección de las hembras sobre las potenciales parejas. La selección sexual es, además, una poderosa fuerza que moldea la evolución de los caracteres sexuales secundarios vinculados al dimorfismo sexual (Andersson, 1994).

Usualmente los caracteres implicados tanto en la competencia entre los machos como en la elección de pareja de las hembras actúan en consonancia, en el sentido en que el mismo rasgo favorece ambos componentes de la selección sexual. En muchos taxa, el tamaño corporal es un carácter altamente dimórfico y constituye un factor determinante en el éxito reproductivo de los individuos: por ejemplo, los machos de mayor tamaño presentan mayor probabilidad de ganar una contienda diádica y esta dominancia les otorga mayor acceso a las hembras o recursos, lo que se traduce en un mayor éxito reproductivo (Haley *et al.*, 1994; Zedrosser *et al.*, 2007; Castillo & Arce, 2021). Por otro lado, la presencia y mantenimiento de caracteres sexuales secundarios considerados costosos, como plumajes, coloraciones vistosas u ornamentos es relacionado con un mayor bienestar físico y por lo tanto se percibe como un indicador de buena calidad genética de los individuos, calidad que será transmitida a la descendencia (Zahavi, 1975). Estos

caracteres se consideran “señales honestas” sobre los que las hembras también basan la evaluación de las potenciales parejas y la obtención de beneficios genéticos indirectos, es decir, una mejor calidad genética para las crías. De todos modos, hay situaciones particulares en las que la elección de caracteres que favorecen un mayor éxito en la competencia entre los machos y los caracteres preferidos por el sexo opuesto se encuentran en contraposición (Forsgren, 1997; Andersson *et al.*, 2002; Kingston *et al.*, 2003), forzando el establecimiento de un delicado equilibrio entre ambos.

## **2. La señalización química en elección de pareja**

La comunicación animal es un complejo sistema que se desarrolla a través de diferentes vías vinculadas entre sí, tejiendo una extensa trama de información con importantes consecuencias para la vida de los organismos. Según Ruxton y Schaefer (2011), la comunicación ocurre cuando los rasgos del organismo informador estimulan los sistemas sensoriales del organismo receptor, provocando un cambio en el patrón de comportamiento de este último.

Las señales químicas comprenden la forma más ancestral de comunicación, interviniendo en diferentes actividades biológicas y en particular mediando interacciones inter e intraespecíficas (Takken & Dicke, 2006). A nivel intraespecífico, juegan un rol central en la elección de pareja, tanto en el reconocimiento como en la evaluación de individuos homoespecíficos. La comunicación química ha sido ampliamente documentada en muy diversos grupos de organismos, como insectos (Akino *et al.*, 2004; Richard & Hunt, 2013; Snellings *et al.*, 2018), mamíferos

(Müller-Schwarze, 1971; Swaisgood, Lindburg & Zhang, 2002; Ferkin, 2019), aves (Amo *et al.*, 2015; Amo, Tomás & López-García, 2017), peces (Giaquinto & Volpato, 1997; Gonçalves-de-Freitas *et al.*, 2008; Keller-Costa *et al.*, 2016) y reptiles (Moreira *et al.*, 2006; Martin & Lopez, 2010; Campos *et al.*, 2017). Proporciona información sobre la identidad de la especie, el sexo e inclusive sobre el estado de dominancia de potenciales parejas (Drickamer, 1992; Giaquinto & Volpato, 1997; Kortet & Hedrick, 2005), al mismo tiempo que obra sobre los mismos niveles en relación a la detección y discriminación de individuos heteroespecíficos y/o potenciales predadores (Wong *et al.*, 2005; Castorani & Hovel, 2015; Coppock *et al.*, 2016; Weissburg *et al.*, 2016). Los compuestos químicos utilizados en la elección de pareja pueden ser tanto subproductos de vías metabólicas liberados pasivamente por los machos, como señales desplegadas activamente cuya estructura y liberación han estado sujetas a selección (Wyatt, 2003; Sorensen & Stacey, 2004).

En particular, en los teleósteos la comunicación química media un gran abanico de respuestas: antipredatorias, aquellas relacionadas con la identificación y reconocimiento de homoespecíficos y principalmente, las vinculadas con la reproducción, tanto en la coordinación de las actividades reproductivas entre los sexos, como en la evaluación de potenciales parejas (Smith, 1992; Chivers *et al.*, 1996; Sorensen & Stacey, 2004). El tipo y la composición de las pistas químicas emitidas por los machos tienen importancia fundamental en la elección de pareja de las hembras. Al habitar ambientes acuáticos donde las señales químicas se encuentran disueltas, la capacidad de utilizarlas para detectar rápida y efectivamente potenciales parejas es un rasgo evolutivo de enorme relevancia y por lo tanto ampliamente extendido dentro de este grupo. Por ejemplo, las hembras de

*guppies* (*Poecilia reticulata*) son capaces de diferenciar hembras homoespecíficas de individuos heteroespecíficos, así como el sexo de homoespecíficos, únicamente en base a pistas químicas (Shohet & Watt, 2004). En la etapa de reconocimiento y evaluación, en algunas especies la comunicación química entre machos y hembras es fundamental para preparar la fisiología reproductiva y coordinar la liberación de gametos durante el cortejo y desove. Por ejemplo, en *Carassius auratus* (goldfish) los individuos son capaces de sincronizar tanto el comportamiento sexual como la maduración y liberación de gametos durante el desove mediante el uso de pistas químicas (Kobayashi *et al.*, 2002; Stacey & Sorensen, 2002; Stacey, 2003). Además, juegan un rol central en la señalización del estatus social y, por consiguiente, de la aptitud física (Giaquinto *et al.*, 2010; Maruska & Fernald, 2012). También ha sido demostrado que las pistas químicas modulan los niveles de agresión (Giaquinto *et al.*, 1997, Keller-Costa *et al.*, 2016) y se ha documentado la presencia de feromonas en la orina de machos dominantes que estimulan el sistema reproductivo de las hembras a través de la hormona inductora de la maduración de oocitos (Hubbard *et al.*, 2014; Keller-Costa *et al.*, 2014).

### **3. Peces anuales como modelo de estudio**

Los peces anuales del género *Austrolebias* (Rivulidae, Cyprinodontiformes) comprenden 49 especies distribuidas a lo largo de la cuenca baja de Plata-Paraná y el sistema Patos-Merín (Alonso *et al.*, 2018). Habitan charcos temporales que se forman al comienzo del invierno y luego se secan paulatinamente hacia el verano, a medida que aumenta la temperatura (Costa, 2006; Loureiro *et al.*, 2011) (Fig. 1). Una vez que los juveniles alcanzan la madurez sexual se reproducen de manera

continua y mediante fecundación externa se generan huevos resistentes a la desecación que son enterrados en el sustrato. Éstos permanecen en estado de diapausa embrionaria una vez el charco se seca y la población adulta muere, y su desarrollo es reanudado en la siguiente temporada, cuando los charcos comienzan a formarse nuevamente. Debido a ello, el género presenta generaciones no superpuestas y un período reproductivo que abarca la totalidad de su vida adulta. Hembras y machos de diferentes especies que lo conforman presentan un dimorfismo sexual marcado que abarca la morfología y los patrones comportamentales, siendo las diferencias en los patrones de coloración corporal el rasgo morfológico distintivo (Berois *et al.*, 2016).



**Fig 1.** Charco temporal al inicio de la estación reproductiva. Departamento de Treinta y Tres, Uruguay (Foto: Manuelita Méndez).

En particular, la especie *Austrolebias reicherti* es endémica de las tierras bajas del Sistema de drenaje Patos-Merín, ubicado en la zona noreste del país (Loureiro & García, 2004). Al igual que en el resto del género, presenta un marcado dimorfismo sexual en caracteres morfológicos y comportamentales: los machos presentan un mayor tamaño corporal, con pigmentación en las aletas dorsales y un patrón de bandas oscuras, delgadas y paralelas que recorren el flanco corporal sobre un fondo claro. En contraposición, las hembras son más pequeñas y presentan un aspecto menos conspicuo, con coloración en tonos marrones y sin pigmentación en las aletas (Loureiro & García, 2008) (Fig. 2). La selección sexual impacta en la dinámica reproductiva tanto a nivel de la elección de pareja por parte de la hembra, como a nivel de la competencia entre machos. Estos últimos son altamente agresivos, desarrollando encuentros agonísticos entre pares por el acceso a las hembras que resultan en el establecimiento de una jerarquía social, donde los machos dominantes accederán a más eventos reproductivos. Luego de una contienda, los machos subordinados repliegan sus aletas y apagan su coloración (Reyes *et al.*, 2021). El tamaño es un factor relevante en la determinación de la dominancia entre machos, siendo usualmente los de mayor tamaño socialmente dominantes. A su vez, los machos de mayor tamaño son preferidos por las hembras (Passos *et al.*, 2013a). En este modelo de estudio, el estado de dominancia se asocia también a mayores niveles circulantes del andrógeno 11-ketotetosterona, un metabolito de la testosterona y el principal andrógeno en muchos peces, al igual que sucede en otros teleósteos, viéndose estos niveles significativamente reducidos en machos subordinados (Reyes *et al.*, 2021).



**Fig. 2.** Hembra (derecha) y macho (izquierda) adultos de *A. reicherti* (Fotos: Federico Reyes).

*A. reicherti* se encuentra sujeta a una gran variabilidad ambiental a lo largo de la estación reproductiva. Una vez que el charco temporal se ha formado y a medida que avanza la estación, las condiciones del mismo cambian drásticamente. Por un lado, disminuye la profundidad de la columna de agua, la cual comienza a presentar una mayor turbidez, debido tanto a la disminución en el volumen como al aumento en la vegetación. Además, la concentración de oxígeno disuelto también disminuye. Este cambio en las condiciones abióticas de los charcos temporales generan también un cambio en las variables demográficas: la proporción sexual operacional (OSR por su sigla en inglés) presenta un sesgo hacia el número de hembras al final de la estación. Este cambio en la OSR provoca plasticidad en la preferencia de las hembras en base a señales visuales, siendo más laxa al final de la misma, cuando el número de machos reproductivos disminuye y los beneficios de ser selectivas son menores (Passos *et al.*, 2014).

En relación a esto, las condiciones de vida excepcionales que experimenta la especie junto con la nula posibilidad de reproducción futura generan un escenario en el cual el estrés (medido en nivel de cortisol en sangre) promueve la reproducción, en contraposición a lo que sucede habitualmente en la mayoría de los vertebrados. Los machos presentan un aumento de los niveles de cortisol a medida que la estación reproductiva avanza y las condiciones del charco se ven deterioradas, acompañado de un descenso en el índice hepatosomático y peso corporal, mientras que las hembras aumentan su índice hepato y gonadosomático. Por otra parte, el aumento en los niveles de cortisol de los machos también se asoció a una mayor intensidad de la coloración de cortejo y a mayor frecuencia y duración de los mismos (Passos *et al.*, 2021).

Respecto a la elección de pareja por parte de la hembra, durante el cortejo el macho performa diferentes señales (como vibraciones de las aletas, ondulaciones del cuerpo y despliegues visuales) dirigidas hacia la hembra, la cual toma un rol principalmente evaluador (García *et al.*, 2008). Existe evidencia de que las pistas químicas intervienen en la reproducción, siendo detectadas por parte de las hembras en ausencia de otros canales de información (Passos *et al.*, 2013b). Además, las hembras pueden discriminar machos homoespecíficos de heteroespecíficos en base únicamente a señales químicas (Passos *et al.*, 2013b, Reyes *et al.*, 2018) y en general los individuos de mayor tamaño son los preferidos (Passos *et al.*, 2013a).

En conclusión, las pistas químicas comprenden un canal de comunicación de importancia fundamental en los peces teleósteos, debido a que permite discriminar

individuos heteroespecíficos, reconocer a los homoespecíficos y evaluar la aptitud de los mismos como pareja sexual. En particular, *A. reicherti* presenta condiciones de vida altamente variables y plasticidad reproductiva en base a señales visuales a lo largo de la estación. Debido a ello, la comunicación por pistas químicas puede cobrar una importancia fundamental hacia el final de la estación reproductiva, cuando las condiciones lumínicas del charco temporal donde habitan se tornan muy precarias y la comunicación por medio de la vía visual se hace más difícil. Es posible que las pistas químicas se encuentren proveyendo información sobre el estado de dominancia de los homoespecíficos, información que puede incidir en las preferencias sexuales de las hembras. Además, estas preferencias pueden tener un carácter plástico a lo largo de la estación reproductiva, al igual que las relacionadas con la información visual.

Tanto los antecedentes expuestos como las condiciones de vida excepcionales que experimenta este grupo lo convierte en un modelo de estudio adecuado para analizar, bajo un contexto reproductivo, la importancia de las señales químicas en la identificación del estatus de dominancia por parte de las hembras y su variación a lo largo de la estación reproductiva.

## OBJETIVO

Evaluar la capacidad de las hembras de *A. reicherti* de discriminar el estatus social de machos homoespecíficos a través de señales químicas y su variación a lo largo de la estación reproductiva.

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

**H1:** Las hembras de *A. reicherti* son capaces de discriminar el estatus social de machos homoespecíficos mediante señales químicas, prefiriendo interactuar con los machos dominantes.

**Predicción:** Las hembras presentarán un mayor tiempo de permanencia en la zona de elección correspondiente al macho dominante, así como una mayor interacción con el mismo.

**H2:** La capacidad de las hembras de discriminar el estatus social de machos homoespecíficos a través de la comunicación química será más intensa al inicio de la estación reproductiva, viéndose diluida hacia el final, cuando la selectividad de pareja disminuye.

**Predicción:** La preferencia de apareamiento por el macho dominante será mayor al inicio de la estación reproductiva que al final. Además, las fuerzas de preferencia y de interacción por el macho dominante también serán mayores al inicio de la estación.

# METODOLOGÍA

## **1. Recolección, cría y mantenimiento de ejemplares de experimentación**

Se colectaron 70 ejemplares de *A. reicherti* en los alrededores de la localidad de Vergara, departamento de Treinta y Tres, durante 2020, en dos instancias: al comienzo (6-8 de agosto) y al final (14-15 de noviembre) de la estación reproductiva. Los ejemplares fueron colectados utilizando redes de mano y, en el momento de la captura, acondicionados para su traslado a Facultad de Ciencias, en grupos reducidos de ejemplares por cada contenedor utilizado. Fueron alojados en el acuario institucional, utilizando peceras comunales de 6 individuos cada una para las hembras, e individuales para los machos, durante un período de aclimatación de 17 días, bajo temperatura constante de 19°C y fotoperíodo natural. La alimentación fue de tipo *ad libitum* utilizando *Tubifex tubifex*, y se realizaron cambios de agua a intervalos regulares de 48 hs. Las condiciones mencionadas fueron iguales en ambas instancias de colecta.

## **2. Establecimiento de dominancia entre machos**

Se realizaron encuentros diádicos entre machos adultos con una asimetría de peso corporal  $\leq 30\%$  en ambos momentos de la estación reproductiva. Los enfrentamientos diádicos se realizaron en acuarios de dimensiones 40 x 12 x 20 cm divididos por una compuerta opaca removible. Los machos fueron colocados en simultáneo, uno en cada compartimiento, por un período de aclimatación inicial de 10 min. Pasado este tiempo, se removió la compuerta y se inició el encuentro

agonístico. Luego de 24 hs en que los machos permanecieron juntos, se identificó la resolución del conflicto a partir de las características físicas y comportamentales de los oponentes: los machos subordinados repliegan sus aletas, pierden la coloración, huyen y quedan reclusos en los bordes del acuario, mientras que el macho dominante despliega las aletas, intensifica la coloración y ataca al macho subordinado (Passos *et al.*, 2013a, Reyes *et al.*, 2021). Se descartaron de los ensayos las díadas en las que no se estableció una relación de dominancia clara entre los individuos.

Luego de establecida la relación de dominancia, cada individuo fue asociado en una nueva díada con un individuo con similar tamaño corporal (asimetría de peso  $\leq 10\%$ , calculada como  $[(P_{\text{machogrande}} - P_{\text{machochico}}) / P_{\text{machogrande}}]$ ) y estatus de dominancia opuesto, con el objetivo de descartar posibles influencias del tamaño corporal en la elección de la hembra. Dicho par fue colocado en el sistema de elección dual a modo de estímulo para la prueba de preferencia de una hembra focal. El tiempo de manipulación de los individuos involucrado en este proceso fue de una hora aproximadamente.

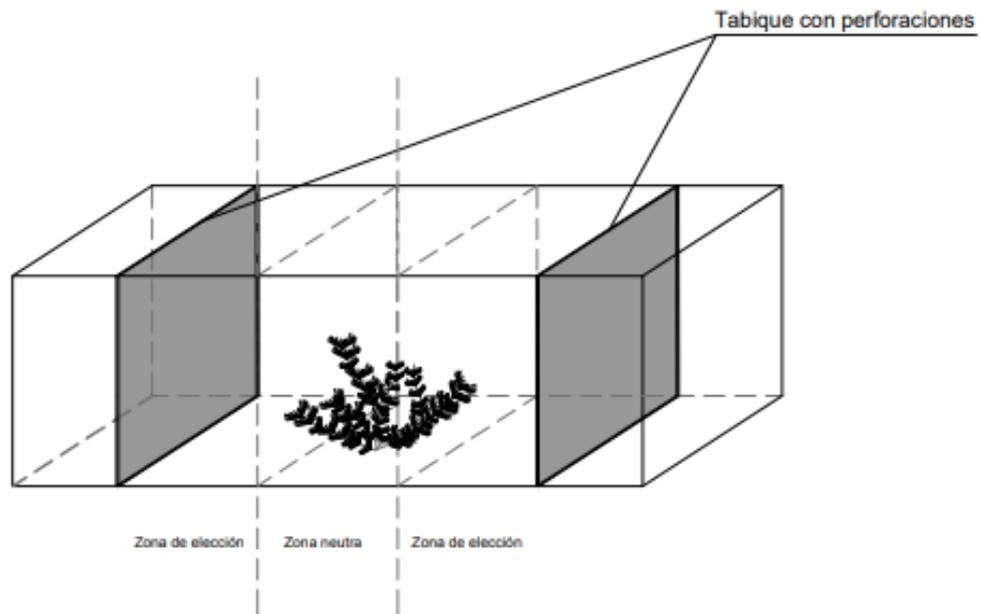
### **3. Preferencia de las hembras**

Los ensayos conductuales fueron realizados entre las 08:00 y 14:00. Se realizaron pruebas de elección simultánea asignando al azar una hembra focal a una díada de machos formada en base al tamaño corporal. Para las pruebas de elección fue utilizada una pecera (60 × 19 × 20,5 cm) dividida en 3 compartimentos: uno central de 40 cm de largo y dos laterales de 10 cm de largo cada uno. Para separar estas

áreas se utilizaron divisores de plexiglás opacos con orificios, que permiten un intercambio constante de agua pero impiden la comunicación visual (Fig. 3). Dentro del compartimento central se marcó de forma externa con líneas un área neutral (en el centro) y dos áreas de preferencia (más cercanas a los compartimentos donde fueron situados los machos), de 14 y 13 cm de largo cada una respectivamente, de acuerdo a Reyes *et al.* (2019). La zona inmediata a cada tabique divisor fue considerada como la zona de interacción directa con el macho.

En primer lugar se introdujo a la hembra en el compartimento central de la pecera, permitiendo su libre movimiento por un período de aclimatación de 10 min. Luego, la hembra fue aislada dentro de una caja de aclimatación opaca (10 × 10 × 18 cm) en el área neutral de su compartimento, mientras que los machos fueron introducidos en cada compartimento lateral y se les habilitó un período de aclimatación de 10 min. Pasado este período, la hembra fue liberada de su caja de aclimatación en el compartimento central y comenzó el registro de la prueba de preferencia.

La duración de cada ensayo fue de 50 min en total, considerando el período de aclimatación de la hembra focal y el de ambos machos. Se videoregistró la interacción de la hembra con los machos durante 30 min. Solo las hembras que visitaron ambas zonas de elección activamente fueron incluidas en el análisis.



**Fig. 3.** Configuración experimental utilizada en las pruebas de preferencia. La arena se encuentra compuesta por un compartimento central (hembra) y dos compartimentos laterales (machos), separados entre sí por divisores de plexiglás opacos con un orificio en forma de cruz, que permiten el intercambio de señales químicas pero no visuales. Las líneas punteadas en las paredes del compartimento central ilustran la delimitación de las zonas de elección y la zona neutra (adaptado de Reyes *et al.*, 2019).

Al finalizar cada prueba, las peceras experimentales y las cajas de aclimatación fueron higienizadas utilizando agua destilada y secadas al aire. Al culminar la totalidad de las pruebas las hembras fueron fotografiadas bajo condiciones estables y reincorporadas al bioterio como parte del stock reproductivo. Los machos fueron fotografiados antes del inicio de cada prueba de elección y al finalizar se procedió a su eutanasia.

Tanto las pruebas de elección como los encuentros agonísticos de establecimiento de dominancia fueron llevados a cabo en el laboratorio de la Sección Etología de la Facultad de Ciencias (Universidad de la República), bajo condiciones de temperatura constante (19 °C) y fotoperiodo natural. Todas las actividades

realizadas durante el proyecto de investigación se ejecutaron de acuerdo al protocolo de experimentación animal aprobado por el Comité de Ética en el Uso de Animales de la Facultad de Ciencias (expediente N° 240011-000361-20).

Para analizar variaciones en las preferencias reproductivas de las hembras en ambos momentos del ciclo de vida, se realizaron ensayos experimentales de elección al inicio y al final de la estación reproductiva ( $n_{\text{inicio}} = 12$ ,  $n_{\text{final}} = 12$ ).

#### **4. Variables y análisis de datos**

Los registros en video fueron analizados utilizando el software J-Watcher V1.0, siguiendo los procedimientos usuales en estudios de comportamiento (Martin & Bateson, 1993; Lehner, 1998). Para las hembras se consideraron las siguientes variables: a) tiempo de permanencia en cada zona de elección (TZE), b) tiempo de permanencia en la zona neutral (TZN), c) tiempo de interacción con cada macho (TI, evaluado como el tiempo de interacción frente al tabique divisor), d) número de entradas a cada zona de elección (Entradas ZE) y e) número de interacciones con cada macho (N°I). Se consideró el tiempo de asociación de la hembra con cada uno de los machos como indicador de sus preferencias, en base a Passos *et al.* (2013a).

Con el objetivo de evaluar el grado de selectividad en cada momento de la estación reproductiva, se estableció un criterio de elección de la hembra respecto al macho dominante, definido como:  $[TZE_{\text{dom}} / (TZE_{\text{dom}} + TZE_{\text{sub}})] \times 100$ . En los ensayos con un índice de preferencia  $\geq 60\%$ , se consideró preferencia por el macho dominante. En los ensayos con un índice  $\leq 40\%$  se consideró preferencia por el subordinado. Por

último, cuando el índice de preferencia presentó valores entre el 40% y 60%, se consideró que la hembra no consolidó su preferencia durante la duración del ensayo.

Por otro lado, se definió el macho preferido como aquel que presentó mayor tiempo de visita por parte de la hembra en su zona de elección asociada, considerando el tiempo total de visita a ambas zonas de elección dentro de la duración de la prueba. Se calculó la fuerza de preferencia y de interacción en función del TZE y el TI respectivamente. La fuerza de preferencia por el macho dominante (FPD) fue calculada como:  $TZE_{dom} - TZE_{sub}$ , y la fuerza de preferencia por el macho preferido (FPP) como  $TZE_{preferido} - TZE_{nopreferido}$ . Además, se calculó la fuerza de la interacción por el macho dominante (FID) como  $TI_{dom} - TI_{sub}$ , y la fuerza de la interacción por el macho preferido (FIP) como  $TI_{preferido} - TI_{nopreferido}$ .

Se registró el tiempo de actividad/inactividad de cada macho, y el período en cual no fue visible (en relación al ángulo de ubicación de las cámaras durante el ensayo, el macho pudo quedar parcial o totalmente oculto detrás de los tabiques divisores), considerando como actividad cualquier movimiento fluido dentro de la pecera, incluyendo tanto desplazamientos como despliegues conductuales característicos. En base a dicha actividad, se calculó la tasa de actividad como  $[\text{Tiempo de actividad} / (\text{Tiempo de actividad} + \text{Tiempo de inactividad} + \text{Tiempo no visible})] \times 100$ . La diferencia de actividad (DA) entre ambos machos estímulo fue calculada en base a la tasa de actividad de cada uno, como la diferencia entre la tasa de actividad del macho más activo y la del menos activo. Por último, el largo estándar de los individuos fue extraído a partir de las fotografías utilizando el programa ImageJ y la

asimetría de largo entre ambos individuos fue calculada como  $[(L_{\text{machogrande}} - L_{\text{machochico)}) / L_{\text{machogrande}}]$ .

Los datos obtenidos producto del procesamiento de los registros en video fueron analizados utilizando el software RStudio. Para analizar los parámetros definidos dentro de un mismo momento de la estación reproductiva se utilizó la prueba de t-Student y Wilcoxon para muestras pareadas. Para comparar los parámetros entre inicio y final de la estación reproductiva se utilizaron las pruebas de t-Student, Mann-Whitney y Chi cuadrado para muestras independientes. En todos los casos se consideró un valor de  $p \leq 0,05$  como umbral de significancia estadística.

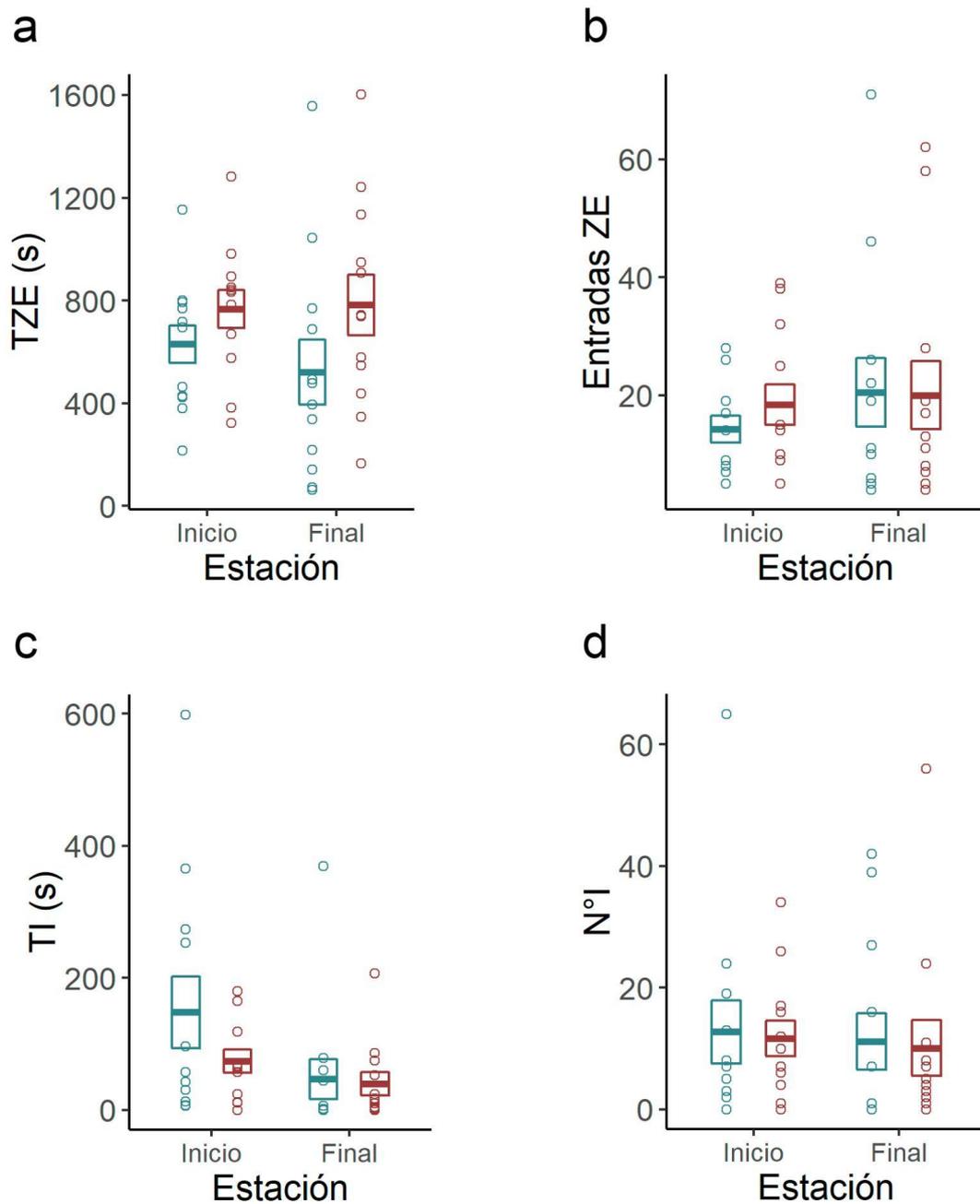
## RESULTADOS

La totalidad de las hembras focales utilizadas en los ensayos conductuales visitaron activamente a ambos machos estímulo en los dos momentos de la estación reproductiva y permanecieron alrededor el 80% del tiempo total de los ensayos en las zonas de elección, sin diferencias entre el inicio y el final de la estación (inicio:  $1618,93 \pm 243,56$  s; final:  $1391,52 \pm 455,35$  s;  $p = 0,146$ ). En consonancia, el tiempo de permanencia de la hembra focal en la zona neutra (TZN) tampoco fue diferente en ambos momentos de la estación reproductiva (inicio:  $407,68 \pm 140,64$  s; final:  $445,25 \pm 372,66$  s;  $p = 1$ ). Respecto al peso corporal las hembras, al inicio de la estación reproductiva fueron de menor peso que al final (inicio:  $0,27 \pm 0,07$  g; final:  $0,34 \pm 0,07$  g;  $p = 0,008$ ).

Los estímulos presentados a las hembras fueron homogéneos en variables morfométricas y comportamentales. El peso de los machos no presentó diferencias entre ambos momentos de la estación (inicio:  $0,59 \pm 0,14$  g; final:  $0,63 \pm 0,21$  g;  $p = 0,287$ ). La tasa de actividad de los machos dominantes y subordinados no presentó diferencias ni al inicio (dom:  $40,70 \pm 20,75\%$ ; sub:  $29,73 \pm 19,31\%$ ;  $p = 0,1608$ ) ni al final (dom:  $36,44 \pm 17,23\%$ ; sub:  $25,35 \pm 15,18\%$ ;  $p = 0,109$ ) de la estación reproductiva. Considerados en conjunto, los machos exhibieron similares tasas de actividad al inicio y al final de la estación ( $p = 0,428$ ) y esta paridad se mantiene al considerar a los machos de cada estatus por separado (dom:  $p = 0,5843$ ; sub:  $p = 0,543$ ).

1. *Preferencia de las hembras en función del estatus de dominancia a lo largo de la estación reproductiva*

Al evaluar el comportamiento de las hembras durante las pruebas de elección simultánea dentro de cada momento de la estación, el cual refleja la preferencia de las mismas, no se observaron diferencias en la elección por machos dominantes o subordinados en ninguno de los parámetros considerados (Fig. 4, Tabla 1): TZE (inicio:  $p = 0,355$ ; final:  $p = 0,249$ ; Fig. 4a), número de entradas a la ZE (inicio:  $p = 0,091$ ; final:  $p = 0,803$ ; Fig. 4b), TI con cada macho estímulo (inicio:  $p = 0,213$ ; final:  $p = 0,410$ ; Fig. 4c) y número de interacciones con cada macho estímulo (inicio:  $p = 1$ ; final:  $p = 0,813$ ; Fig. 4d). A su vez, la preferencia de las hembras no mostró diferencias significativas entre inicio y final de la estación reproductiva (Tabla 1, Fig. 4).

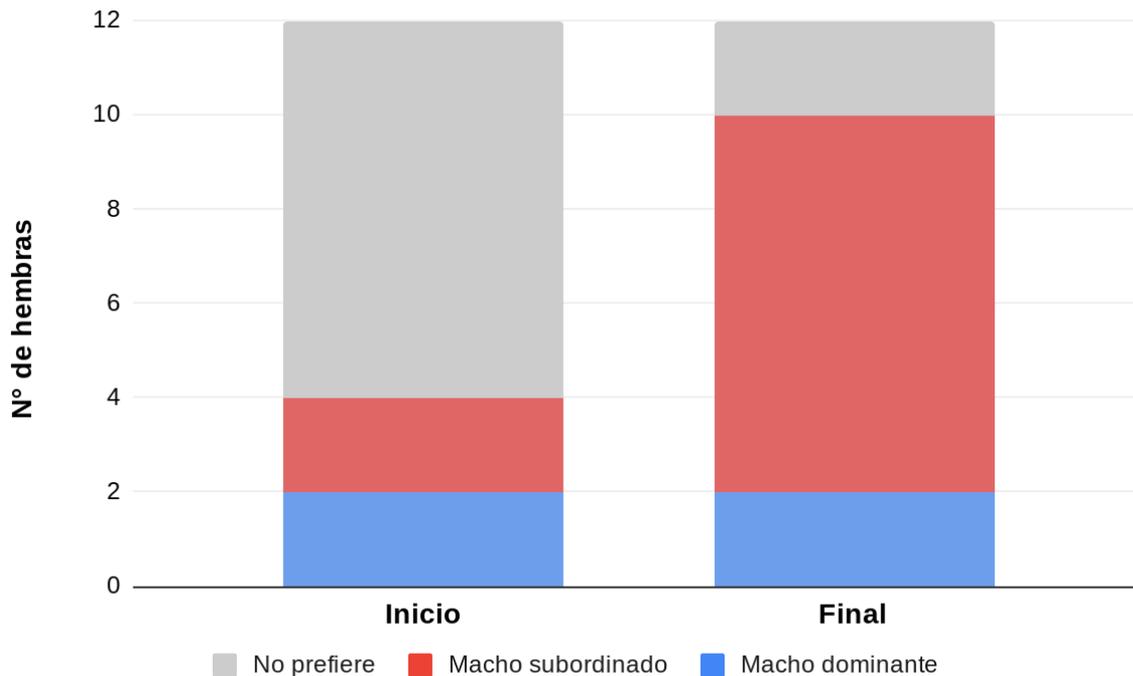


**Fig. 4.** Elección de las hembras en el sistema de elección dual frente a machos dominantes (azul) y subordinados (rojo) al inicio y al final de la estación reproductiva, evaluada en a) tiempo de permanencia en cada zona de elección (TZE), b) número de entradas a cada zona de elección (Entradas ZE), c) tiempo en interacción con cada individuo (TI) y d) número de interacciones con cada individuo (N°I). Se presenta la Media  $\pm$  SE.

**Tabla 1.** Comparación de las preferencias de las hembras entre los dos momentos de la estación reproductiva para cada estatus de dominancia: tiempo de permanencia en la zona de elección (TZE), número de entradas a la zona de elección (Entradas ZE), tiempo de interacción con cada macho (TI) y número de interacciones con cada macho (N°I). Pruebas de t-Student y Wilcoxon para muestras no pareadas.

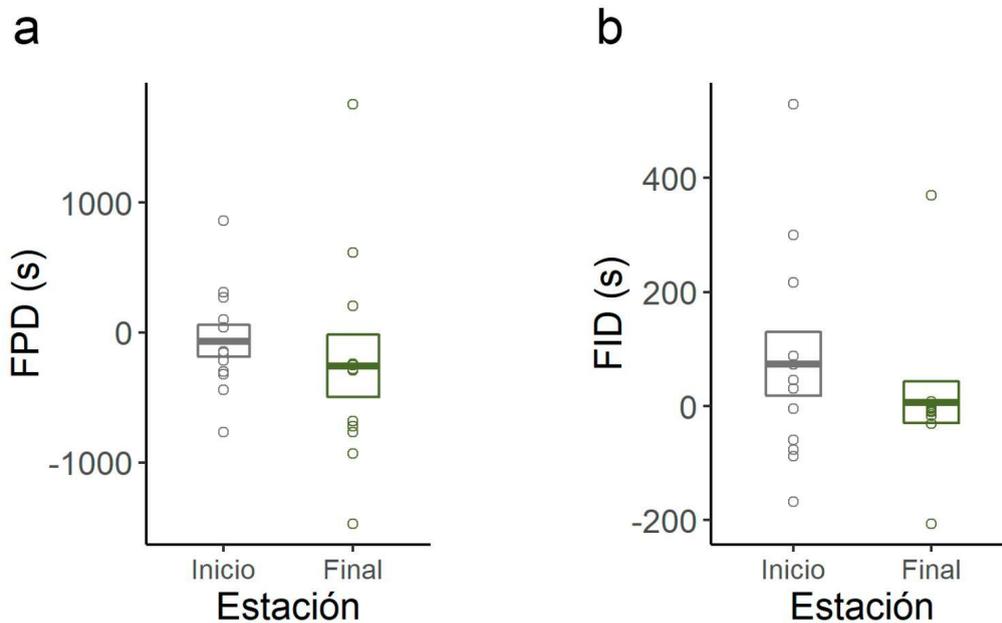
			<b>TZE (s)</b>	<b>Entradas ZE</b>	<b>TI (s)</b>	<b>N°I</b>
<b>Macho dominante</b>	<b>Media ± SD</b>	<b>Inicio</b>	778,0 ± 185,6	14,2 ± 7,8	147,8 ± 187,0	12,7 ± 18,0
		<b>Final</b>	568,5 ± 524,6	20,5 ± 19,2	46,8 ± 105,3	11,2 ± 15,4
	<b>p</b>		0,470	0,332	0,121	0,822
<b>Macho subordinado</b>	<b>Media ± SD</b>	<b>Inicio</b>	824,4 ± 296,8	18,4 ± 12,0	64,2 ± 52,5	11,7 ± 10,2
		<b>Final</b>	823,0 ± 418,9	20,0 ± 19,0	39,9 ± 60,5	10,1 ± 15,3
	<b>p</b>		0,910	0,816	0,183	0,775

De acuerdo al criterio de elección definido, durante el inicio de la estación 4 de las 12 hembras presentaron preferencia por uno de los machos estímulo (2 por el macho dominante y 2 por el subordinado), mientras que al final el número aumentó a 10 de 12 (2 por el macho dominante y 8 por el subordinado). La preferencia, independiente del macho estímulo elegido, presentó diferencias significativas entre ambos momentos de la estación reproductiva (prueba de Chi cuadrado,  $p = 0,012$ ), con aumento de la preferencia por el macho subordinado al final de la estación (prueba de Chi cuadrado,  $p = 0,013$ ) (Fig. 5).



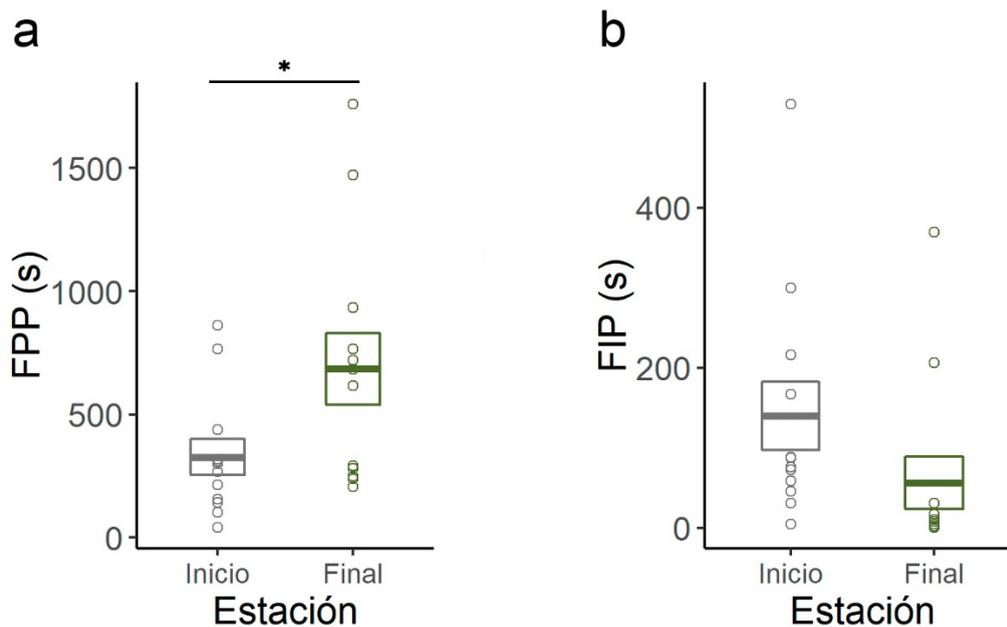
**Fig. 5.** Elección de las hembras sobre los machos estímulo en base al criterio de elección establecido, durante el inicio y final de la estación reproductiva. Criterio de elección:  $[\text{TZEdom} / (\text{TZEdom} + \text{TZesub})] \times 100$ . Para valores del índice  $\geq 60\%$  se consideró preferencia por el macho dominante. Para valores  $\leq 40\%$  se consideró preferencia por el subordinado. Para valores entre el 40% y 60%, se consideró que la hembra no consolidó su preferencia durante la duración del ensayo.

La fuerza de preferencia por el macho dominante (FPD) no presentó diferencias significativas entre el inicio y final de la estación reproductiva (inicio:  $-62,85 \pm 419,80$  s; final:  $-254,52 \pm 833,14$  s;  $p = 0,237$ ; Fig. 6a), al igual que la fuerza de la interacción por el macho dominante (FID; inicio:  $73,99 \pm 193,72$  s; final:  $6,85 \pm 127,98$  s;  $p = 0,329$ ; Fig. 6b).



**Fig. 6.** Fuerza de preferencia (a) y de la interacción (b) por el macho dominante (FPD y FID respectivamente) en el inicio (gris) y final (verde) de la estación reproductiva. Se muestra la Media  $\pm$  SE (prueba de Pearson).

Sin embargo, la fuerza de la preferencia por el macho preferido (FPP) fue mayor al final de la estación reproductiva (inicio:  $326,80 \pm 253,05$  s; final:  $684,69 \pm 503,36$  s;  $p = 0,043$ ; Fig. 7a). En este caso se definió al macho preferido como el macho estímulo con el cual la hembra interactuó más del 50% del tiempo de visita total a las zonas de elección. Por otro lado, la fuerza de la interacción de la hembra con el macho preferido (FIP) no presentó diferencias significativas entre el inicio y final de la estación (inicio:  $139,88 \pm 148,85$  s; final:  $56,33 \pm 113,88$  s;  $p = 0,138$ ; Fig. 7b).



**Fig. 7.** Fuerza de preferencia (a) y de la interacción (b) por el macho preferido en el inicio (gris) y final (verde) de la estación reproductiva. Se muestra la Media  $\pm$  SE (prueba de Pearson, \*  $p \leq 0,05$ ).

2. *Asociación entre la preferencia de las hembras y variables morfométricas y conductuales a lo largo de la estación reproductiva*

La FPP y FIP no presentaron relación con las variables morfométricas de la hembra focal (peso, largo) en ninguno de los dos momentos de la estación reproductiva (Tabla 2). Sin embargo, la FIP se asoció positivamente con la asimetría en la actividad de los machos estímulo al inicio de la estación reproductiva, en tanto al final de estación esta fuerza correlacionó con la asimetría en el peso corporal de los machos (Tabla 3).

**Tabla 2.** Correlaciones entre las fuerzas de preferencia y de la interacción por el macho preferido (FPP y FIP) y el peso y largo de las hembras focales, al inicio y final de la estación. Prueba de Pearson para muestras no pareadas.

		Inicio		Final	
		Peso (g)	Largo (mm)	Peso (g)	Largo (mm)
<b>Media ± SD</b>		0,27 ± 0,10	26,52 ± 2,80	0,34 ± 0,10	29,90 ± 2,20
<b>FPP</b>	<b>R</b>	0,066	-0,157	0,026	0,200
	<b>p</b>	0,837	0,666	0,940	0,533
<b>FIP</b>	<b>R</b>	-0,082	-0,064	0,187	0,273
	<b>p</b>	0,679	0,856	0,432	0,217

**Tabla 3.** Correlaciones entre las fuerzas de preferencia y de la interacción por el macho preferido (FPP y FIP) y asimetría de peso (Asim. Peso), asimetría de largo (Asim. Largo) y diferencia de actividad (DA) entre las díadas de machos estímulo, al inicio y final de la estación. Prueba de Pearson para muestras no pareadas

		Inicio			Final		
		Asim. Peso (%)	Asim. Largo (%)	DA	Asim. Peso (%)	Asim. Largo (%)	DA
<b>Media ± SD</b>		6,95 ± 6,97	5,06 ± 4,80	19,30 ± 19,04	8,91 ± 5,35	4,45 ± 2,52	22,57 ± 14,88
<b>FPP</b>	<b>R</b>	0,037	-0,147	-0,030	0,445	-0,075	-0,192
	<b>p</b>	0,876	0,532	0,891	0,147	0,826	0,098
<b>FIP</b>	<b>R</b>	-0,110	-0,366	0,601	0,5739	0,0181	-0,151
	<b>p</b>	0,639	0,267	<b>*0,039</b>	<b>*0,050</b>	0,938	0,493

\* Diferencia significativa

## DISCUSIÓN

En esta investigación las hembras adultas de *A. reicherti* reconocen la presencia de machos detrás de los tabiques divisores a partir de las pistas olfativas: visitan activamente ambas zonas de elección relacionadas a los estímulos, interactúan de forma distinguible con ellos y se posicionan inmediatamente delante de los tabiques moviéndose activamente, lo que sugiere que detectan la presencia de los machos al otro lado de los divisores en ausencia de claves visuales. Este comportamiento se observa tanto al inicio como al final de la estación y revela la motivación reproductiva al encontrarse expuestas únicamente a pistas químicas. Este resultado condice con estudios previos que reportan que las hembras reconocen las señales químicas de machos homoespecíficos y son capaces de discriminar si las señales olfativas provienen de hembras o de machos (Passos *et al.*, 2013b). Además, también se ha reportado que las pistas químicas proveen información suficiente para que las hembras distingan entre machos homo y heteroespecíficos (Reyes *et al.*, 2018). Las interacciones observadas durante las pruebas permiten asegurar que el diseño experimental es adecuado para evaluar el objetivo propuesto en este trabajo.

En una primera evaluación de las preferencias de las hembras, medida a través de diversos parámetros (tiempo de asociación e interacción, número de entradas a cada zona de elección y número de interacciones con cada macho estímulo), no se observaron diferencias en la elección entre machos dominantes y subordinados en ninguno de los dos momentos de la estación reproductiva. A su vez, estos parámetros no arrojaron diferencias en la selectividad al comparar el inicio con el final de la estación. Sin embargo, al utilizar el criterio de elección que considera la

proporción del tiempo total en las zonas de elección como indicador de preferencia de la hembra por uno de los machos estímulo, se observó una diferencia en la selectividad a lo largo de la estación reproductiva. Hacia el final de la estación una mayor proporción de hembras mostró clara preferencia por alguno de los machos estímulo (10/12) respecto al inicio (4/12). En el mismo sentido, la fuerza de la preferencia por el macho preferido (FPP) aumentó significativamente al final de la estación.

Los parámetros cuantitativos de tiempo y frecuencia de interacciones utilizados para determinar la elección de las hembras han sido ampliamente utilizados en peces en similares diseños experimentales (McLennan, 2003; Wong & Jennions, 2003; Shohet & Watt, 2004). En particular en *Austrolebias*, estos parámetros han sido validados como proxy de preferencias de apareamiento (Passos *et al.*, 2013a, 2013b, 2014, 2019). La aparente contradicción entre los dos criterios para determinar la elección de las hembras y que los parámetros usuales no hayan logrado dilucidar la preferencia puede tener varias explicaciones. En primer lugar, este análisis cuantitativo mostró una alta variabilidad intraespecífica y la comparación entre medias pudo enmascarar la manifestación de elección por parte de las hembras. Las señales químicas son compuestos altamente heterogéneos que pueden proporcionar información sobre diferentes características de los individuos además del estatus de dominancia, como la identidad de la especie (McLennan, 2003; Kozak *et al.*, 2009; Ward, 2014), el estado nutricional (Fisher & Rosenthal, 2006; Giaquinto, 2010) y la carga parasitaria (Poulin *et al.*, 1999; Hughes & Raldolph, 2001), por lo que es posible que las pistas químicas emitidas por los machos durante las pruebas sean portadoras de una amplia gama de información

además del estatus de dominancia, información que puede intervenir en el establecimiento de la preferencia sexual. En segundo lugar, es importante tener presente que en este trabajo se suprimió el canal visual, mientras que en las investigaciones que validan los parámetros considerados en un diseño experimental similar, se utiliza exclusivamente el canal visual o el conjunto de señales emitidas por los machos como información de evaluación (Wong & Jennions, 2003; Shohet & Watt, 2004; Passos *et al.*, 2014, 2019). En tercer lugar, en este estudio la asimetría en el tamaño de los machos estímulo no superó el 10%, lo cual suprime otra arista en la evaluación por parte de las hembras, ya que en condiciones de asimetría pronunciada prefieren a los machos de mayor tamaño corporal (Passos *et al.*, 2013a). En cuarto lugar, es posible que la duración del ensayo (30 min) no sea suficiente para captar el desarrollo de una elección en términos cuantitativos. Por último, durante la investigación se utilizaron poblaciones naturales de diferentes charcos temporales, por lo que es posible que las hembras expresaran estrategias individuales relacionadas a su experiencia previo a la captura. Si bien el análisis de las estrategias individuales excede este trabajo, la gran variabilidad en los resultados observados podría ser un aspecto a explorar a futuro.

En contraposición, el criterio de elección establecido permitió un análisis categórico que arrojó otro tipo de información y fue más exigente (se utilizan umbrales de 40 y 60% del TZE total para poder afirmar elección por el macho subordinado o dominante respectivamente). En base a este criterio se apreció una diferencia en los patrones de elección entre ambos momentos de la estación: i) las hembras presentaron mayor selectividad hacia el final de la estación reproductiva y ii) prefirieron asociarse a los machos subordinados en dicho momento. Los cambios en

la elección sexual observados en base a este criterio se contraponen a la hipótesis propuesta y también contradicen de forma parcial los antecedentes del modelo de estudio. De acuerdo a Passos *et al.* (2014), la selectividad de las hembras únicamente por el tamaño corporal utilizando señales visuales de los machos se torna más laxa hacia el final de la estación. Esta contradicción entre los resultados obtenidos y los antecedentes puede ser explicada por dos motivos: por un lado, y a diferencia de Passos *et al.* (2014), en los ensayos realizados se restringió a las hembras la posibilidad de realizar una evaluación de las parejas en base al tamaño corporal, pudiendo evaluar únicamente a través de pistas químicas, de las que se desconoce si transmiten esa información. Además, los machos estímulo presentaron una asimetría corporal mínima en ambos momentos de la estación, lo que sumado a la ausencia de evaluación visual impidió la discriminación por parte de las hembras en base a este rasgo. Además, si bien los machos estímulo utilizados en cada prueba de elección provienen de una contienda con resolución de jerarquía cuidadosamente validada al finalizar los encuentros agonísticos (aquellas diadas donde no se logró establecer una clara resolución de dominancia fueron excluidas de las pruebas de elección), es importante destacar que los “sellos” olfativos de dominancia y subordinación de los machos pueden haberse diluido durante el proceso de separación y manipulación al colocarlos en el sistema de elección y, por lo tanto, los machos pudieron presentar niveles de andrógenos similares al momento de comenzar la prueba. Los peces liberan subproductos metabólicos de las hormonas esteroideas que pueden funcionar como pistas químicas y ser detectados por las hembras (Sorensen & Stacey, 2004). Los machos dominantes de *A. reicherti* mantienen un mayor nivel de andrógenos circulantes respecto a los machos subordinados entre 30 y 60 min luego de la resolución del

encuentro agonístico (Reyes *et al.*, 2021). Sin embargo, la dinámica de este sello hormonal de dominancia más allá de esta ventana temporal es aún desconocida, así como si la diferencia en la concentración de andrógenos en sangre se ve reflejada en los metabolitos de estas hormonas que son liberados al medio.

La plasticidad en la preferencia sexual de las hembras de *A. reicherti* a lo largo de su ciclo de vida puede responder a que, además de los cambios en la demografía de los charcos, los cambios en las condiciones ambientales jerarquizan el uso de diferentes canales comunicativos (Wong *et al.*, 2007; Reparaz *et al.*, 2014). El canal visual podría jugar un rol de mayor relevancia al inicio de la estación, donde las condiciones de turbidez son bajas y el nivel de agua mayor. Sin embargo, al final de la estación, cuando el aumento de la turbidez del agua impide la comunicación visual, podría verse favorecido el uso del canal químico (Reyes *et al.*, 2017, 2021). En *A. reicherti*, esta plasticidad de privilegiar diferentes canales comunicativos tiene su correlato neuronal: las hembras son capaces de compensar condiciones ambientales de bajos niveles de luz con un mayor desarrollo de las estructuras encargadas de procesar la información olfativa y viceversa en condiciones de alta luminosidad. En función de esta plasticidad, un mayor desarrollo de las estructuras neurales asociadas al sistema olfativo permite una mejor capacidad de reconocimiento de homoespecíficos a través de pistas químicas cuando la información visual no se encuentra presente o es escasa, y lo contrario en condiciones de alta luminosidad (Berrosteguieta *et al.*, 2022). Respecto a la plasticidad en las preferencias de apareamiento de las hembras, es posible que el aumento del cortisol al final de la estación reproductiva en consonancia con el deterioro de la calidad ambiental de los charcos temporales actúe como mediador

fisiológico de esta plasticidad: hacia el final de la vida, tanto machos como hembras aumentan su inversión reproductiva aún a costa de la supervivencia (Passos *et al.*, 2021).

Además de que las hembras mostraron elección más marcada hacia el final de la estación respecto al inicio, ésta estuvo orientada hacia los machos subordinados (8/10). Este resultado sugiere la existencia de pistas químicas asociadas al estatus social en *A. reicherti*, y, al mismo tiempo, contradice la hipótesis planteada de una preferencia sexual por los machos dominantes. En general, en diversas especies de vertebrados las hembras suelen preferir asociarse a machos dominantes o territoriales (Haley *et al.*, 1994; Zedrosser *et al.*, 2007; Castillo & Arce, 2021). Sin embargo, en algunas especies, las hembras prefieren asociarse a machos subordinados o de menor jerarquía social (Qvarnström & Forsgren, 1998; Ophir & Galef, 2003). De todos modos, es importante mencionar que el cuerpo de evidencia existente en relación a la capacidad de discriminar el estatus de dominancia de homoespecíficos en base únicamente a pistas químicas se encuentra sesgado al reconocimiento entre machos durante encuentros agonísticos (Schneider *et al.*, 1999; Aquiloni *et al.*, 2012; Simões *et al.*, 2015), mientras que los antecedentes en relación a esta capacidad de reconocimiento en hembras son escasos (Kortet *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2019). Uno de los trabajos más recientes en la temática indica que las hembras de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) son capaces de discriminar el nivel de agresividad de machos dominantes únicamente en base a pistas químicas, prefiriendo a los machos con perfiles menos agresivos (Rossi *et al.*, 2019).

En *Austrolebias*, los antecedentes indican que las hembras prefieren aparearse con los machos de mayor tamaño (Passos *et al.*, 2013a), siendo estos quienes tienen mayor chance de resultar ganadores de un encuentro agonístico (Passos *et al.*, 2013a; Reyes *et al.*, 2021). Los machos dominantes de *A. reicherti* exhiben altos niveles de agresividad hacia otros machos, a los que continúan acosando incluso luego de la resolución del conflicto (Reyes *et al.*, 2021) y, a su vez, experimentos recientes muestran que los niveles de agresividad aumentan hacia el final de la estación (Reyes 2022, datos no publicados). Esta agresividad podría ser también dirigida hacia las hembras (Ophir & Galef, 2003; Rossi *et al.*, 2019). Por tanto, la preferencia que muestran las hembras de *A. reicherti* por los machos subordinados al final de la estación reproductiva podría estar asociada a la evitación tanto de potenciales heridas como de una sobrevigilancia por parte de los machos, tal como sucedería al aparearse con un individuo dominante altamente agresivo (Qvarnström & Forsgren, 1998; Moore & Moore 1999; Ophir & Galef, 2003; Bierbach *et al.*, 2013; Rossi *et al.*, 2019). Por otro lado, la dominancia podría asociarse a una mayor carga parasitaria, ya que mantener altas concentraciones de andrógenos representa un costo para el sistema inmune siendo los individuos más propensos a enfermedades e infecciones (Wingfield *et al.*, 2001, Kurtz *et al.*, 2007; Grear *et al.*, 2009). En machos subordinados de *A. reicherti* el resultado de una contienda agonística provoca el descenso de los niveles del andrógeno 11-ketotestosterona (11KT) (Reyes *et al.*, 2021), lo que les permitiría mantener mejores niveles de defensa contra patógenos. Estos elementos podrían desestimular la percepción del macho dominante como un individuo valioso y explicar la preferencia por los machos subordinados al final de la estación. Por último, también es importante destacar que los rasgos seleccionados por la competencia entre machos (mayor agresividad,

altos niveles de andrógenos, tamaño, etc.) simplemente podrían no reflejar su calidad genética y salud global, pudiendo las hembras basarse en otros rasgos para definir su elección, eligiendo a machos de menor estatus social (Qvarnström & Forsgren, 1998). Futuros estudios deberán abordar la relación entre los andrógenos y el sistema inmune en relación al estatus social en *Austrolebias*, así como la relación entre agresión, niveles de andrógenos y calidad genética.

Por último, al inicio de la estación reproductiva, a medida que aumentó la asimetría entre la actividad desplegada por los machos estímulo detrás del tabique divisorio, aumentó la fuerza de la interacción por el macho preferido (FIP). Esto implica no solo mayor proximidad de las hembras con el macho preferido, sino una mayor interacción, un despliegue comportamental que claramente muestra la motivación sexual de las hembras. Si bien los machos dominantes y subordinados no presentaron tasas de actividad estadísticamente diferentes entre sí, sí se registraron diferencias en la actividad desplegada entre los machos de cada díada. Es posible que esta mínima diferencia genere mayor ventilación de las pistas químicas emitidas por el individuo más activo a través de los orificios del tabique divisorio y hacia el compartimento central, favoreciendo la detección por parte de la hembra. Por el contrario, en el final de la estación la FIP se asoció positivamente con la asimetría de peso entre los machos. Al igual que con la diferencia entre las tasas de actividad, las díadas estímulo fueron pareadas con una diferencia de peso mínima (< 10%), lo que sugiere que las hembras son capaces de detectar estas sutiles diferencias en el tamaño basándose únicamente en pistas químicas y modular su tiempo de asociación con cada macho en base a las mismas. Además, es posible que las asociaciones de la FIP con distintos parámetros de los machos en cada momento

de la estación indiquen la adopción de diferentes estrategias evaluativas por parte de las hembras a lo largo de la estación reproductiva (Passos *et al.*, 2014, 2021).

En conclusión, los resultados de este trabajo sugieren que las pistas químicas son elementos fundamentales que las hembras integran en el proceso de elección de pareja y que su uso ocurre a lo largo de toda la estación reproductiva de la especie. Además, sugieren i) la presencia de pistas químicas indicadoras del estatus social de los machos en *A. reicherti*, ii) una preferencia por machos subordinados al final de la estación reproductiva, y iii) que la preferencia sexual por el estatus social de las hembras basándose únicamente en información olfativa, presenta plasticidad estacional. La preferencia por machos subordinados al final de la estación podría surgir como mecanismo para evitar machos con altos niveles de agresividad y/o una mayor exposición a patógenos. Este trabajo es el primero en abordar la relación entre la competencia entre machos y la preferencia sexual de las hembras a través de la comunicación química en peces anuales.

## CONTRIBUCIONES

Los resultados preliminares de este trabajo fueron presentados en modalidad de video corto en el evento académico “XXXVIII Encuentro Anual de Etología y III Reunión de Biología de Comportamiento del Cono Sur”, en noviembre de 2021.

Méndez, M., Reyes, F. & Tassino, B. (2021). Reconocimiento de la dominancia mediante señales químicas en el pez anual *Austrolebias reicherti*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akino, T., Yamamura, K., Wakamura, S., & Yamaoka, R. (2004). Direct behavioral evidence for hydrocarbons as nestmate recognition cues in *Formica japonica* (Hymenoptera: Formicidae). *Applied Entomology and Zoology*, 39(3), 381-387.

Alonso, F., Terán, G. E., Calviño, P., García, I., Cardoso, Y., & García, G. (2018). An endangered new species of seasonal killifish of the genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei) from the Bermejo river basin in the Western Chacoan Region. *PLOS ONE*, 13(5), e0196261.

Amo, L., López-Rull, I., Pagán, I., & García, C. M. (2015). Evidence that the house finch (*Carpodacus mexicanus*) uses scent to avoid omnivore mammals. *Revista chilena de historia natural*, 88(1), 1-7.

Amo, L., Tomás, G., & López-García, A. (2017). Role of chemical and visual cues of mammalian predators in nest defense in birds. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 71(3), 1-9.

Andersson, M. (1994). *Sexual selection*. Princeton University Press.

Andersson, S., Pryke, S. R., Örnborg, J., Lawes, M. J., & Andersson, M. (2002). Multiple receivers, multiple ornaments, and a trade-off between agonistic and epigamic signaling in a widowbird. *The American Naturalist*, 160(5), 683-691.

Aquiloni, L., Gonçalves, V., Inghilesi, A. F., & Gherardi, F. (2012). Who's what? Prompt recognition of social status in crayfish. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 66(5), 785-790.

Berois, N., Arezo, M.J., Papa, N.G. & Chalar, C. (2016). Life Cycle, Reproduction, and Development in Annual Fishes Cellular and Molecular Aspects. En *Annual Fishes Life History Strategy, Diversity and Evolution* (1.<sup>a</sup> ed., pp. 33-42). CRC Press: Boca Ratón, USA.

Berrosteguieta, I., Rosillo, J. C., Herrera, M. L., Olivera-Bravo, S., Casanova, G., Herranz-Pérez, V., ... & Fernández, A. S. (2022). Plasticity of cell proliferation in the retina of *Austrolebias charrua* fish under light and darkness conditions. *Current Research in Neurobiology*, 3, 100042.

Bierbach, D., Sassmannshausen, V., Streit, B., Arias-Rodriguez, L., & Plath, M. (2013). Females prefer males with superior fighting abilities but avoid sexually harassing winners when eavesdropping on male fights. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 67(4), 675-683.

Campos, S. M., Strauss, C., & Martins, E. P. (2017). In space and time: territorial animals are attracted to conspecific chemical cues. *Ethology*, 123(2), 136-144.

Castillo, Y., & Arce, E. (2021). Female preference for dominant males in the Mexican mojarra cichlid fish, *Cichlasoma istlanum*. *Journal of Fish Biology*, 98(1), 189-195.

Castorani, M. C., & Hovel, K. A. (2016). Native predator chemical cues induce anti-predation behaviors in an invasive marine bivalve. *Biological Invasions*, 18(1), 169-181.

Chivers, D. P., Brown, G. E., & Smith, R. J. F. (1996). The evolution of chemical alarm signals: attracting predators benefits alarm signal senders. *The American Naturalist*, 148(4), 649-659.

Coppock, A. G., Gardiner, N. M., & Jones, G. P. (2016). Sniffing out the competition? Juvenile coral reef damselfishes use chemical cues to distinguish the presence of conspecific and heterospecific aggregations. *Behavioural Processes*, 125, 43-50.

Costa, W. (2006). The South American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, descriptive morphology and taxonomic revision. *Zootaxa* 1213, 1–162.

Darwin, C. (1909). *The origin of species*. New York: PF Collier & Son.

Drickamer, L. C. (1992). Oestrous female house mice discriminate dominant from subordinate males and sons of dominant from sons of subordinate males by odour cues. *Animal Behaviour*, 43(5), 868–870.

Ferkin, M. H. (2019). Scent marks of rodents can provide information to conspecifics. *Animal cognition*, 22(3), 445-452.

Fisher, H., & Rosenthal, G. (2006). Female swordtail fish use chemical cues to select well-fed mates. *Animal Behaviour*, 72(3), 721-725.

Forsgren, E. (1997). Female sand gobies prefer good fathers over dominant males. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 264(1386), 1283-1286.

García, D., Loureiro, M., & Tassino, B. (2008). Reproductive behavior in the annual fish *Austrolebias reicherti* Loureiro & García 2004 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Neotropical Ichthyology*, 6, 243-248.

Giaquinto, P.C., da Silva Berbert, C.M. & Delicio, H.C (2010). Female preferences based on male nutritional chemical traits. *Behav Ecol Sociobiol* 64, 1029–1035.

Giaquinto, P. C., & Volpato, G. L. (1997). Chemical Communication, Aggression, and Conspecific Recognition in the Fish Nile Tilapia. *Physiology & Behavior*, 62(6), 1333–1338.

Gonçalves-de-Freitas, E., Teresa, F. B., Gomes, F. S., & Giaquinto, P. C. (2008). Effect of water renewal on dominance hierarchy of juvenile Nile tilapia. *Applied Animal Behaviour Science*, 112(1-2), 187-195.

Grear, D. A., Perkins, S. E., & Hudson, P. J. (2009). Does elevated testosterone result in increased exposure and transmission of parasites?. *Ecology Letters*, 12(6), 528-537.

Haley, M. P., Deutsch, C. J., & Le Boeuf, B. J. (1994). Size, dominance and copulatory success in male northern elephant seals, *Mirounga angustirostris*. *Animal Behaviour*, 48(6), 1249-1260.

Hubbard, P. C., Mota, V. C., Keller-Costa, T., da Silva, J. P., & Canário, A. V. (2014). Chemical communication in tilapia: a comparison of *Oreochromis mossambicus* with *O. niloticus*. *General and comparative endocrinology*, 207, 13-20.

Hughes, V. L., & Randolph, S. E. (2001). Testosterone increases the transmission potential of tick-borne parasites. *Parasitology*, 123(4), 365-371.

Karlson, P., & Lüscher, M. (1959). 'Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, 183(4653), 55-56.

Keller-Costa, T., Hubbard, P. C., Paetz, C., Nakamura, Y., da Silva, J. P., Rato, A., ... & Canario, A. V. (2014). Identity of a tilapia pheromone released by dominant males that primes females for reproduction. *Current Biology*, 24(18), 2130-2135.

Keller-Costa, T., Saraiva, J. L., Hubbard, P. C., Barata, E. N., & Canário, A. V. (2016). A multi-component pheromone in the urine of dominant male tilapia (*Oreochromis mossambicus*) reduces aggression in rivals. *Journal of Chemical Ecology*, 42(2), 173-182.

Kingston, J. J., Rosenthal, G. G., & Ryan, M. J. (2003). The role of sexual selection in maintaining a colour polymorphism in the pygmy swordtail, *Xiphophorus pygmaeus*. *Animal Behaviour*, 65(4), 735-743.

Kobayashi, M., Sorensen, P. W., & Stacey, N. E. (2002). Hormonal and pheromonal control of spawning behavior in the goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26(1), 71-84.

Kortet, R., & Hedrick, A. (2005). The scent of dominance: female field crickets use odour to predict the outcome of male competition. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 59(1), 77.

Kozak, G. M., Reiland, M., & Boughmann, J. W. (2009). Sex differences in mate recognition and conspecific preference in species with mutual mate choice. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 63(2), 353-365.

Kurtz, J., Kalbe, M., Langefors, Å., Mayer, I., Milinski, M., & Hasselquist, D. (2007). An experimental test of the immunocompetence handicap hypothesis in a teleost fish: 11-ketotestosterone suppresses innate immunity in three-spined sticklebacks. *The American Naturalist*, 170(4), 509-519.

Lehner, P. N. (1998). Handbook of ethological methods. Cambridge University Press.

Loureiro, M. & García, G. (2008). *Austrolebias reicherti* Loureiro & García, a valid species of annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from Uruguay. *Zootaxa*, 1940(1), 1-15.

Loureiro, M., Duarte, A., & Zarucki, M. (2011). A new species of *Austrolebias* Costa (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from northeastern Uruguay, with comments on distribution patterns. *Neotropical Ichthyology* 9, 335-342.

Martin, J., & Lopez, P. (2010). Condition-dependent pheromone signaling by male rock lizards: more oily scents are more attractive. *Chemical senses*, 35(4), 253-262.

Martin, P. & Bateson, P. (1993). Measuring behavior: an introductory guide. *Cambridge University Press*.

Maruska, K. P., & Fernald, R. D. (2012). Contextual chemosensory urine signaling in an African cichlid fish. *Journal of Experimental Biology*, 215(1), 68-74.

McLennan, D. A. (2003). The importance of olfactory signals in the gasterosteid mating system: sticklebacks go multimodal. *Biological Journal of the Linnean Society*, 80(4), 555-572.

Moore, A. J., & Moore, P. J. (1999). Balancing sexual selection through opposing mate choice and male competition. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 266(1420), 711-716.

Moreira, P. L., López, P., & Martín, J. (2006). Femoral secretions and copulatory plugs convey chemical information about male identity and dominance status in Iberian rock lizards (*Lacerta monticola*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 60(2), 166-174.

Müller-Schwarze, D. (1971). Pheromones in black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). *Animal Behaviour*, 19(1), 141-152.

Ophir, A. G., & Galef Jr, B. G. (2003). Female Japanese quail that 'eavesdrop' on fighting males prefer losers to winners. *Animal Behaviour*, 66(2), 399-407.

Passos, C., Tassinio, B., Loureiro, M., & Rosenthal, G. (2013a). Intra-and intersexual selection on male body size in the annual killifish *Austrolebias charrua*. *Behavioural processes*, 96, 20-26.

Passos, C., Reyes, F., Tassinio, B., Rosenthal, G. G., & González, A. (2013b). Female annual killifish *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) attend to male chemical cues. *Ethology*, 119(10), 891-897.

Passos, C., Tassinio, B., Reyes, F., & Rosenthal, G. G. (2014). Seasonal variation in female mate choice and operational sex ratio in wild populations of an annual fish, *Austrolebias reicherti*. *PloS one*, 9(7), e101649.

Passos, C., Tassinio, B., Rosenthal, G., Reichard, M. (2016). Reproductive Behavior and Sexual Selection in Annual Fishes. En *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity and Evolution* (1.<sup>a</sup> ed., pp. 207-208). CRC Press: Boca Ratón, USA.

Passos, C., Vidal, N., & D'Anatro, A. (2019). Male mate choice in the annual fish *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes: Rivulidae): when size matters. *Journal of Ethology*, 37(3), 301-306.

Passos, C., Reyes, F., Jalabert, C., Quintana, L., Tassinio, B., & Silva, A. (2021). Stress promotes reproduction in the annual fish *Austrolebias reicherti*. *Animal Behaviour*, 174, 105-114.

Poulin, R., Marcogliese, D. J., & McLaughlin, J. D. (1999). Skin-penetrating parasites and the release of alarm substances in juvenile rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 55(1), 47-53.

Qvarnström, A., & Forsgren, E. (1998). Should females prefer dominant males?. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(12), 498-501.

Reparaz, L. B., van Oers, K., Naguib, M., Doutrelant, C., Visser, M. E., & Caro, S. P. (2014). Mate preference of female blue tits varies with experimental photoperiod. *PloS one*, 9(3), e92527.

Reyes, F., Tassino, B., & Passos, C. (2018). Females of the annual killifish *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) recognize conspecific mates based upon chemical cues. *Behavioural processes*, 155, 33-37.

Reyes, F., Tassino, B. & Silva, A. (2019). Regulación hormonal de la conducta agonística en el pez anual *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). Tesis de maestría en Ciencias Biológicas, Universidad de la República.

Reyes, F., Quintana, L., & Tassino, B. (2021). Association of androgens and estrogens with agonistic behavior in the annual fish *Austrolebias reicherti*. *Hormones and Behavior*, 136, 105064.

Richard, F. J., & Hunt, J. H. (2013). Intracolony chemical communication in social insects. *Insectes sociaux*, 60(3), 275-291.

Rossi, V. S., de Sá, M. B., Sugihara, V. S., de Mello, I. M., & Giaquinto, P. C. (2019). Effect of male aggressivity profile on female chemical choice in Nile tilapia. *Journal of Ethology*, 37(3), 335-342.

Ruxton, G. D., & Schaefer, H. M. (2011). Resolving current disagreements and ambiguities in the terminology of animal communication. *Journal of evolutionary biology*, 24(12), 2574-2585.

Schneider, R. A. Z., Schneider, R. W., & Moore, P. A. (1999). Recognition of dominance status by chemoreception in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Journal of Chemical Ecology*, 25(4), 781-794.

Shohet, A. J., & Watt, P. J. (2004). Female association preferences based on olfactory cues in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 55(4), 363-369.

Simões, J. M., Barata, E. N., Harris, R. M., O'Connell, L. A., Hofmann, H. A., & Oliveira, R. F. (2015). Social odors conveying dominance and reproductive information induce rapid physiological and neuromolecular changes in a cichlid fish. *BMC genomics*, 16(1), 1-13.

Snellings, Y., Herrera, B., Wildemann, B., Beelen, M., Zwarts, L., Wenseleers, T., & Callaerts, P. (2018). The role of cuticular hydrocarbons in mate recognition in *Drosophila suzukii*. *Scientific reports*, 8(1), 1-11.

Smith, R. J. F. (1992). Alarm signals in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2(1), 33-63.

Sorensen, P. W., & Stacey, N. E. (2004). Brief review of fish pheromones and discussion of their possible uses in the control of non-indigenous teleost fishes. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 38(3), 399–417. doi:10.1080/00288330.2004.9517248

Stacey, N. (2003). Hormones, pheromones and reproductive behavior. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1), 229-235.

Stacey, N., & Sorensen, P. (2002). Hormonal pheromones in fish. In *Hormones, brain and behavior* (pp. 375-434). Academic Press.

Swaisgood, R. R., Lindburg, D. G., & Zhang, H. (2002). Discrimination of oestrous status in giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) via chemical cues in urine. *Journal of Zoology*, 257(3), 381-386.

Takken, W., & Dicke, M. (2006). Chemical ecology: A multidisciplinary approach. *Chemical ecology: From gene to ecosystem*, 16, 1.

Thünken, T., Bakker, T., & Baldauf, S. A. (2014). “Armpit effect” in an African cichlid fish: self-referent kin recognition in mating decisions of male *Pelvicachromis taeniatus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 68(1), 99-104.

Ward, A. J. (2014). Intraspecific social recognition in fishes via chemical cues. *Fish pheromones and related cues*, 113-130.

Weissburg, M., Poulin, R. X., & Kubanek, J. (2016). You are what you eat: a metabolomics approach to understanding prey responses to diet-dependent chemical cues released by predators. *Journal of Chemical Ecology*, *42*(10), 1037-1046.

Wingfield, J. C., Lynn, S. E., & Soma, K. K. (2001). Avoiding the 'costs' of testosterone: ecological bases of hormone-behavior interactions. *Brain, behavior and evolution*, *57*(5), 239-251.

Wong, B. B., & Jennions, M. D. (2003). Costs influence male mate choice in a freshwater fish. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *270*(suppl\_1), S36-S38.

Wong, B. B., Fisher, H. S., & Rosenthal, G. G. (2005). Species recognition by male swordtails via chemical cues. *Behavioral Ecology*, *16*(4), 818-822.

Wong, B. B., Candolin, U., & Lindström, K. (2007). Environmental deterioration compromises socially enforced signals of male quality in three-spined sticklebacks. *The American Naturalist*, *170*(2), 184-189.

Wyatt, T. D. (2003). Pheromones and animal behaviour: Communication by smell and taste. Cambridge University Press, Cambridge.

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

Zedrosser, A., Bellemain, E., Taberlet, P., & Swenson, J. E. (2007). Genetic estimates of annual reproductive success in male brown bears: the effects of body size, age, internal relatedness and population density. *Journal of Animal Ecology*, 76(2), 368-375.