



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

TESIS DE MAESTRÍA EN ZOOLOGÍA

Dinámica del aislamiento reproductivo entre las especies hermanas *Austrolebias reicherti* y *A. charrua*.

Noelle Rivas-Ortiz

Sección Etología, Facultad de Ciencias

Orientador: Dr. Carlos Passos

Co-orientador: Dr. Alejandro D'Anatro

Tribunal: Dras. Ana Silva y María José Albo, Dr. Gil G. Rosenthal.

Agradecimientos

A mis orientadores, especialmente a Caco. Por transmitirme su conocimiento sobre estos bichos y porque con su mirada unificadora me permitió aprender en el proceso y enriqueció este trabajo enormemente.

A Ana Silva, María José Albo y Gil G. Rosenthal, por aceptar el trabajo de formar parte del tribunal de esta tesis y por los comentarios que han hecho que la versión final mejore enormemente.

A Bettina Tassino, que significó un apoyo incondicional durante este proceso, desde lo académico, pero, especialmente, desde lo emocional, y me empujó a terminar este trabajo a pesar de los muchos desafíos que surgieron.

A Valentina Fraco-Trecu por su invaluable ayuda, que me permitió mejorar significativamente el análisis estadístico de este trabajo.

A Fede Reyes, Manuelita Méndez, Nico Fernández y Betta por el apoyo en el trabajo de campo.

A Ciro, Betta y Nico Boullosa por ayudarme a gestionar y cargar decenas de bidones de agua.

A Ivanna Tomasco, cuyos aportes fueron de mucha ayuda durante el trabajo en el Laboratorio de Evolución, y que siempre compartió el espacio con una buena charla y una sonrisa.

También a Eugenia Olivera, con quien el trabajo de laboratorio se hizo más llevadero.

A Ciro, Sheena, Andrés, Fede, Juli y Betta por sus comentarios, que nos ayudaron a encontrar un camino más claro cuando estábamos un poco perdidos.

A los compas del piso 6 por el apoyo permanente y el ánimo para enfrentar los desafíos más complejos, y por los muchos ratos compartidos que hicieron de este camino un recorrido más ameno y más feliz.

A mamá y Nico por nunca dudar de mis capacidades y crear una persona capaz de superar muchos obstáculos para cumplir con sus objetivos.

A Santi por su ayuda con la compra de *Tubifex sp* y con las fotos de *Austrolebias*, pero especialmente por apoyarme siempre en este proceso y por estar dispuesto a embarcarse conmigo en nuevos desafíos.

A Toti porque su apoyo emocional es invaluable en mi día a día.

A Diana, Leti, Mane y Dani, por estar siempre, desde hace muchos años, empujando para adelante.

A mis amigos de la querida Fcien, especialmente Lucy, Mati, Jenny, Cle y Santi P., por compartir juntos las incertidumbres que atañen a la vida académica en Uruguay.

Chingolito

Por tu cariño y compañía durante 14 años.

Índice

Resumen	5
Introducción	7
Hipótesis y objetivos	19
Capítulo 1: preferencias reproductivas a lo largo de la temporada.	
Metodología	20
Resultados	26
Discusión	31
Capítulo 2: efecto de la desecación y la temporada en el aislamiento reproductivo.	
Metodología	36
Resultados	42
Discusión	47
Discusión general	56
Aportes de la tesis	60
Perspectivas y limitaciones	63
Referencias bibliográficas	64
Material suplementario	82
Anexo	87

Resumen

La hibridación, el evento en el que individuos de distintas especies se entrecruzan, fue largamente considerada por los zoólogos como la consecuencia de errores en las decisiones reproductivas. Sin embargo, en los últimos años se ha evidenciado que es un evento más frecuente de lo que se creía en las poblaciones naturales. Evidencia creciente demuestra que la hibridación es modulada por múltiples factores y se puede dar en diversos contextos, en los que no solo puede no ser un error, sino que puede considerarse una estrategia adaptativa. La hibridación depende fuertemente del aislamiento reproductivo, que está determinado por diferentes mecanismos, entre los que se encuentran mecanismos comportamentales. Entre los comportamientos que impactan en el aislamiento reproductivo se encuentran la elección de pareja y la competencia intrasexual, que conforman a la selección sexual. Actualmente, se sabe que ambos sexos pueden impactar en el aislamiento reproductivo mediante la elección de pareja y la competencia. Ambos mecanismos son modulados por diversos factores, que abarcan desde condiciones ambientales hasta interacciones sociales, siendo la expectativa de reproducción futura, un gran modulador. La flexibilidad de la elección de pareja y la competencia intrasexual generan que el aislamiento reproductivo, y por lo tanto, la hibridación, se vea influido por múltiples factores, que hacen que pueda cambiar en tiempo y forma. *Austrolebias charrua* y *A. reicherti* son especies hermanas de peces anuales de divergencia reciente que comparten una zona híbrida, y habitan charcos temporales que se forman en invierno y se secan en verano. La selección sexual modela sus dinámicas reproductivas, y afecta el aislamiento reproductivo; las hembras prefieren machos homoespecíficos, favoreciendo su mantenimiento, mientras que la competencia entre machos podría favorecer eventos de hibridación. Existe evidencia de que la elección de pareja y en estas especies varía a medida que avanza la estación reproductiva, junto a la disminución en las expectativas de vida y a los cambios drásticos que sufren los charcos temporales que habitan. Sin embargo, se desconoce cuál es el impacto de la disminución de las expectativas de vida en el aislamiento reproductivo y en la frecuencia de hibridación. Bajo la hipótesis que el aislamiento reproductivo entre *A. charrua* y *A. reicherti* es dinámico y se debilita cuando disminuyen las expectativas de supervivencia y reproducción futura, el objetivo de la tesis fue evaluar la propensión a hibridar en diferentes momentos de la estación reproductiva y condiciones de desecación. Para esto, mediante pruebas de elección entre dos estímulos (capítulo 1), se evaluaron las preferencias de apareamiento por individuos homoespecíficos y heteroespecíficos al inicio y final de la estación reproductiva; y en pruebas de interacción

libre (capítulo 2) se valoró, mediante la elección de pareja y la competencia intrasexual, el efecto de la profundidad del agua (esto es, riesgo de desecación) actuando en conjunto con la temporada reproductiva, en el aislamiento reproductivo. En conjunto, los resultados evidencian que el aislamiento reproductivo entre *A. reicherti* y *A. charrua* se debilita en respuesta al aumento de riesgo de desecación y al avance de la temporada reproductiva. Al inicio de la temporada reproductiva, las hembras disminuyen cuánto discriminan a los machos ante un aumento del riesgo de desecación. Además, hacia el final de la estación reproductiva, hay una disminución en la selectividad de las hembras, al mismo tiempo que aumentan la frecuencia de apareamientos heteroespecíficos, la actividad reproductiva y la agresión. De esta forma, esta tesis evidencia que el grado de aislamiento reproductivo entre estas especies varía de acuerdo a las expectativas de vida, tanto a medida que avanza la estación reproductiva como cuando aumenta el riesgo de desecación de los charcos. Los resultados de esta tesis contribuyen a la comprensión general del fenómeno de la hibridación y su plasticidad, un tópico en la investigación evolutiva actual.

Introducción

Según el concepto biológico, las especies son grupos de poblaciones que se pueden reproducir entre sí y que están aislados reproductivamente de otros grupos (Mayr, 1942). Este concepto implica que el flujo génico entre especies debe estar restringido, y se conoce a los mecanismos involucrados en la reducción del flujo génico potencial como mecanismos de aislamiento reproductivo (Stankowski & Ravinet, 2021). Estos mecanismos actúan como barreras que permiten que se mantengan los rasgos distintivos de las poblaciones aun cuando están en contacto geográfico, y son cruciales en el proceso de especiación (Seehausen et al., 2014; Stankowski & Ravinet, 2021). Este concepto de especie entra en conflicto con los eventos de hibridación, en los que dos individuos de diferentes especies se entrecruzan (Pfennig, 2021).

A pesar de que la hibridación fue tradicionalmente considerada por los zoólogos como eventos aislados, consecuencia de errores reproductivos o del impacto humano (Genovart, 2009; Mallet, 2005; Servedio & Hermisson, 2020; Willis, 2013), actualmente se reconoce que es un evento extendido en poblaciones naturales. Mallet (2005) estimó que un 25% de las especies de plantas y un 10% de las especies animales hibridan por causas naturales, ajenas al impacto humano. Además, se reconoce que la hibridación puede sostenerse durante mucho tiempo (Mallet, 2005), y que incluso puede alcanzar equilibrios estables en los que, a pesar de haber flujo génico, las especies mantienen sus identidades (Barton, 2020; Servedio & Hermisson, 2020). Por otro lado, también se ha señalado a la hibridación como un agente que puede impactar en la evolución. Su impacto puede ser variado, dependiendo del éxito reproductivo y de supervivencia de los híbridos, los mecanismos de aislamiento reproductivo existentes, y el grado de diferenciación ecológica de las especies (Irwin & Schluter, 2022). El flujo génico causado por la hibridación puede generar que las poblaciones parentales se fusionen en una única especie híbrida que suplanta a las poblaciones parentales (Irwin & Schluter, 2022). Sin embargo, también puede tener el efecto contrario, y fortalecer el aislamiento reproductivo de las especies parentales mediante el reforzamiento (Abbott et al., 2013; Mallet, 2007), un proceso en el que la selección promueve la evolución de mecanismos de aislamiento reproductivo pre apareamiento en respuesta a híbridos de éxito reproductivo y supervivencia reducidos (Servedio & Noor, 2003). Además, puede causar introgresión, que es la incorporación de alelos de una especie en el genoma de otra especie por hibridación (Pfennig, 2021) y que puede impactar en las poblaciones mediante alelos deletéreos, o mediante alelos ventajosos (Pfennig, 2021). Por otro lado,

la hibridación puede ser una fuente de nuevas variantes, que pueden permitir a los híbridos explotar recursos y colonizar ambientes que las especies parentales no pueden. Esto ha sido vinculado con un rol facilitador de la hibridación en las radiaciones adaptativas (Seehausen, 2004), y con la especiación híbrida, un proceso que implica la evolución del aislamiento reproductivo entre los híbridos y otros grupos, incluyendo las especies parentales, y que consolida a los híbridos como una especie en sí (Abbott et al., 2013; Abbott et al., 2010; Mallet, 2007).

Los contextos en los que se da la hibridación son variados, y dependen de las características particulares de las especies, las decisiones individuales de los organismos y las condiciones ecológicas (Rosenthal, 2013). En este sentido, existe evidencia de que, en algunos contextos, hibridar podría no solo no ser un error, sino que podría ser adaptativo, ya sea porque es mejor aparearse con un individuo heteroespecífico que con uno homoespecífico o porque es mejor aparearse con un individuo heteroespecífico que permanecer sin aparearse (Nuechterlein & Buitron, 1998; Pfennig, 2021; Willis, 2013). Existe numerosa evidencia de casos en los que los individuos hibridan como estrategia alternativa en algunos contextos particulares, por ejemplo, ante determinadas condiciones ambientales (Chen & Pfennig, 2020; Pfennig, 2007), ante la disminución en la disponibilidad de parejas (Izzo & Gray, 2011; Nuechterlein & Buitron, 1998; Willis et al., 2011), o ante una restricción temporal (Heubel & Schlupp, 2008; Lynch et al., 2005; Nuechterlein & Buitron, 1998; Veen et al., 2001). Por ejemplo, las hembras del anfibio *Spea bombifrons* hibridan con machos de *S. multiplicata* en respuesta a condiciones ambientales que imponen una restricción temporal para el desarrollo de sus renacuajos, lo que se explica porque los renacuajos híbridos hacen metamorfosis más rápido que los individuos puros de *S. bombifrons* (Pfennig, 2007).

La selección sexual puede impactar en el aislamiento reproductivo.

La hibridación depende del mantenimiento del aislamiento reproductivo, que puede ser fuertemente influido por la selección sexual en sus dos formas, la elección de pareja (selección intersexual) y la competencia entre individuos del mismo sexo por el acceso a éstas (selección intrasexual).

Se espera que la selección favorezca los mecanismos que evitan la hibridación lo antes posible en el proceso de adquisición de pareja, de forma de maximizar el éxito reproductivo y de supervivencia (Rosenthal, 2017). En este sentido, las preferencias

reproductivas pueden jugar un rol importante en la evolución y el mantenimiento del aislamiento reproductivo. Por un lado, se ha encontrado evidencia de que el aislamiento reproductivo pre apareamiento puede evolucionar rápidamente, incluso más rápido que las barreras de aislamiento reproductivo pos apareamiento (Rosenthal, 2017; Uy et al., 2018). Por otro lado, son numerosos los trabajos que documentan elecciones de pareja que mantienen el aislamiento reproductivo al elegir individuos homoespecíficos (Atsumi et al., 2019; Justus & Mendelson, 2018; Pauers & Grudnowski, 2022; Peterson et al., 2007; Shahandeh et al., 2018; Van Huynh & Rice, 2019; West & Kodric-Brown, 2015). Por ejemplo, el fuerte aislamiento reproductivo entre las moscas *Drosophila simulans* y *D. sechellia* es mediado en gran medida porque los machos cortejan más a las hembras homoespecíficas, lo que dificulta que se progrese hacia el apareamiento interespecífico (Shahandeh et al., 2018). Por otra parte, las preferencias reproductivas pueden actuar en sentido contrario, y debilitar el aislamiento reproductivo al favorecer el flujo génico entre especies. En este sentido, existe evidencia de que en ocasiones los individuos no muestran preferencias en base a la especie, o que incluso prefieren a individuos heteroespecíficos (Pilakouta et al., 2017; Rosenfield & Kodric-Brown, 2003; Sato et al., 2016; Wyman et al., 2014).

La evolución de las preferencias por los individuos homoespecíficos puede verse afectada por la existencia o inexistencia de contacto geográfico durante la divergencia (Yukilevich & Peterson, 2019). En las poblaciones alopátridas, las preferencias reproductivas pueden divergir por diversos mecanismos (Rosenthal, 2017), y cuando la divergencia de las preferencias coevoluciona con los rasgos fenotípicos, pueden actuar en conjunto reforzando el aislamiento reproductivo. Sin embargo, la relación de coevolución rasgo-preferencia puede no tener siempre un efecto de aumento del aislamiento reproductivo (Rosenthal, 2017). Por otro lado, cuando las barreras geográficas son dinámicas, las poblaciones que divergieron en alopatria pueden retomar el contacto. En situaciones de contacto secundario, es posible que las preferencias actúen aumentando el aislamiento reproductivo, especialmente si existe reforzamiento (Kulmuni et al., 2020; Rosenthal, 2017; Servedio & Noor, 2003), sin embargo, las preferencias por las parejas homoespecíficas podrían verse alteradas por los costos individuales de la elección de parejas, por la historia evolutiva de las preferencias y los rasgos o por limitaciones funcionales (Rosenthal, 2017), por lo que así como la elección de pareja puede llevar a que se refuercen las barreras de aislamiento reproductivo, también las puede romper. Por su parte, cuando las especies evolucionan en simpatria, el rol de las preferencias no es tan claro, y ha sido objeto de debate. En los casos de especiación simpátrida, el impacto de las preferencias en el

aislamiento reproductivo puede variar incluso dependiendo de cuál es el mecanismo por el que se adquieren las preferencias (Verzijden et al., 2005). Sin embargo, actualmente se acepta que la elección de pareja puede tener un rol importante en el aislamiento reproductivo en la especiación simpátrida, pero es poco probable que por sí sola impida el flujo génico, sino que tiene que actuar en concierto con otros mecanismos que generen selección en contra de los híbridos (Rosenthal, 2017; Thibert-Plante & Hendry, 2011).

Por su parte, la competencia intrasexual también puede influir en el aislamiento reproductivo al reforzarlo o debilitarlo, tanto en poblaciones simpátridas, como alopátridas, como en contacto secundario (Boughman, 2018; Burdfield-Steel & Shuker, 2018; Lackey et al., 2018; Lipshutz, 2018; Qvarnström et al., 2012; Tinghitella et al., 2018; Uy et al., 2018). Por un lado, la competencia intrasexual podría impactar en el aislamiento reproductivo al influir en la evolución de los rasgos sexuales, generando su divergencia o convergencia (Burdfield-Steel & Shuker, 2018; Lipshutz, 2018; Tinghitella et al., 2018). Por otro lado, la competencia puede influir en el aislamiento reproductivo mediante la exclusión de rivales, que puede generar una segregación total o parcial de los competidores (Lipshutz, 2018; Qvarnström et al., 2012; Tinghitella et al., 2018). Esto es especialmente posible cuando existe competencia asimétrica, es decir, una especie es superior competitivamente (Lipshutz, 2018). La competencia asimétrica puede reforzar el aislamiento reproductivo cuando la especie que compite mejor desplaza a la otra especie (por ejemplo, Vallin & Qvarnström, 2011). Sin embargo, también puede promover el flujo génico y facilitar la hibridación cuando no hay exclusión, pero los mejores competidores tienen ventajas a la hora de conseguir parejas (Lipshutz, 2018), o la escasez de parejas homoespecíficas lleva a hibridar, casos que han sido documentados (Bronson et al., 2003; Rosenfield & Kodric-Brown, 2003; Sefc et al., 2015; Vallin, Rice, Arntsen, et al., 2012; Vallin, Rice, Bailey, et al., 2012; While et al., 2015). En este sentido, la competencia puede influir en el aislamiento reproductivo mediante su interacción con la elección de pareja de los individuos, ya sea porque les impide acceder a su pareja preferida, o porque genera cambios en las preferencias, lo que puede favorecer o debilitar el aislamiento reproductivo. El par de especies de aves *Ficedula hypoleuca* y *F. albicollis* representa un completo y complejo ejemplo de cómo la competencia puede influir en el aislamiento reproductivo, tanto promoviendo como disminuyendo la hibridación en diferentes escenarios. Los machos de *F. hypoleuca* tienen dos variantes de coloración que son desplazados geográficamente en distinto grado por los machos de *F. albicollis*. Por un lado, la competencia asimétrica favorece el aislamiento reproductivo mediante el desplazamiento geográfico de los machos

negros de *F. hypoleuca* a zonas con menor propensión a hibridar. Por otro lado, favorece la hibridación entre las hembras de *F. hypoleuca*, que demoran más tiempo que los machos en dejar el área, y los machos de *F. albicollis*. Adicionalmente, también favorece la hibridación entre la variante marrón de *F. hypoleuca* y las hembras de *F. albicollis*, ya que los machos marrones de *F. hypoleuca* permanecen en el área de *F. albicollis* a la vez que muestran altas habilidades competitivas (Vallin, Rice, Arntsen, et al., 2012; Vallin, Rice, Bailey, et al., 2012; Vallin & Qvarnström, 2011).

Las preferencias reproductivas y la competencia intrasexual son flexibles.

Las preferencias reproductivas y la competencia intrasexual son comportamientos flexibles y contexto-dependientes, por lo que las condiciones ambientales, ecológicas y sociales pueden impactar en ellos e influir así en el aislamiento reproductivo. Incluso modelos teóricos plantean que los individuos capaces de modificar sus decisiones reproductivas ante cambios ambientales o sociales experimentarán una mejora en su éxito reproductivo y de supervivencia, y, por tanto, serán favorecidos por la selección (Gowaty & Hubbell, 2005, 2009; Henshaw, 2018; Watts et al., 2022).

A pesar de que las preferencias reproductivas fueron tradicionalmente consideradas fijas, actualmente se reconoce que son moduladas por múltiples factores, tanto intrínsecos como extrínsecos. Numerosas referencias en la literatura evidencian que los individuos son capaces de modificar sus decisiones reproductivas ante cambios ambientales, ecológicos o sociales, como pueden ser la disponibilidad de parejas, la experiencia, la edad, el riesgo de depredación, el momento de la temporada reproductiva y la expectativa de supervivencia (Ah-King, 2019; Ah-King & Gowaty, 2016; Cotton et al., 2006; Dougherty, 2020; Jennions & Petrie, 1997; C. W. Miller & Svensson, 2014; Rosenthal, 2017). Algunos de estos factores, como la edad, el riesgo de depredación, y las temporadas reproductivas, pueden ser indicadores de una reducción en la supervivencia, y, por lo tanto, pueden suponer una restricción temporal en las posibilidades de reproducción a futuro. Se espera que la expectativa de supervivencia influya fuertemente en las preferencias reproductivas (Gowaty & Hubbell, 2009), y, en este sentido, se predice que a medida que ésta se reduce, los individuos deberían ser menos selectivos con sus parejas (Gowaty & Hubbell, 2005, 2009; Henshaw, 2018; Watts et al., 2022). Se ha documentado que el riesgo de depredación, que implica una amenaza a la supervivencia, cumple con esa predicción, y múltiples trabajos han demostrado una pérdida de selectividad ante dicho factor (Dougherty, 2021;

Edomwande & Barbosa, 2020; Pilakouta et al., 2017; Willis et al., 2012). El avance de la temporada reproductiva también puede suponer una amenaza a la supervivencia, por lo que puede impactar en las preferencias reproductivas. Las hembras de *F. albicollis*, incrementan su selectividad hacia el final de la temporada reproductiva, al aumentar su preferencia por un rasgo fenotípico de los machos que se asocia con un mayor éxito reproductivo únicamente al final de la temporada (Qvarnström et al., 2000). Por el contrario, en algunos casos se espera que la selectividad disminuya a medida que avanza la temporada reproductiva (Henshaw, 2018; Watts et al., 2022), ya que, al igual que la expectativa de supervivencia, las temporadas reproductivas también imponen una restricción a las expectativas de reproducción futura. Por otro lado, la disponibilidad de parejas también puede modular las preferencias reproductivas (Dougherty, 2021; Gowaty & Hubbell, 2005, 2009; Henshaw, 2018; Kokko & Mappes, 2005; Kokko & Rankin, 2006; Watts et al., 2022). La proporción operacional de sexos (de ahora en adelante OSR, por Operational Sex Ratio, su nombre en inglés) es la relación entre machos y hembras reproductivamente activos en un momento dado (Emlen & Oring, 1977), y, junto con la densidad poblacional, es un indicador de la disponibilidad de parejas. El OSR y la densidad poblacional han mostrado ser importantes en la modulación de las preferencias reproductivas, y se ha documentado que una percepción de menos parejas disponibles puede disminuir la selectividad de los individuos (Atwell & Wagner, 2014; Dougherty, 2021; Holveck et al., 2015; Lipkowski et al., 2019; Scott et al., 2020; Willis et al., 2011), lo que coincide con predicciones teóricas (Gowaty & Hubbell, 2005, 2009; Henshaw, 2018; Kokko & Mappes, 2005; Watts et al., 2022). Por ejemplo, mediante la manipulación del OSR y la densidad poblacional, Holveck y colegas (2015) documentaron que la selectividad de las hembras aumentó a mayores densidades poblacionales y en OSR sesgados hacia machos (es decir, cuando había más machos disponibles por cada hembra). Por su parte, algunos factores moduladores de las preferencias pueden mostrar variación a lo largo de las temporadas reproductivas, lo que puede generar la interacción entre ambos factores. Esto puede influir en las preferencias reproductivas, que se pueden ajustar a un contexto que cambia en más de un factor. Por ejemplo, en algunos sistemas, el OSR cambia a lo largo de la temporada reproductiva, y genera un escenario de disminución de las expectativas de vida en interacción con una disminución en las parejas disponibles, que deriva en una pérdida de selectividad en los individuos (Borg et al., 2006; Nuechterlein & Buitron, 1998; Passos et al., 2014).

De la misma forma que las preferencias reproductivas pueden modificarse acorde a cambios ambientales y sociales (Ah-King, 2019; Ah-King & Gowaty, 2016; Cotton et al.,

2006; Dougherty, 2020; Jennions & Petrie, 1997; C. W. Miller & Svensson, 2014; Rosenthal, 2017), la competencia intrasexual es también modulada por múltiples factores. Dos factores que pueden influir en la competencia intrasexual son la densidad de población y el OSR (Kokko & Rankin, 2006; Watts et al., 2022; Weir et al., 2011). Se espera que, en general, la intensidad de la competencia aumente cuando la presencia de competidores es mayor, por ejemplo, a mayores densidades poblacionales, o en OSR sesgados (Kokko & Rankin, 2006; Watts et al., 2022; Weir et al., 2011), fenómenos que han sido registrados (House et al., 2019; O'Rourke & Mendelson, 2013). Por otro lado, la agresión está fuertemente regulada por las hormonas. En particular, los andrógenos, los glucocorticoides y su interacción han mostrado un rol regulador de la agresión (Liening & Josephs, 2010; Summers et al., 2005). En general, los andrógenos tienen un rol promotor de la agresión en machos, y están positivamente vinculados a la dominancia (Giammanco et al., 2005; Liening & Josephs, 2010; Remage-Healey & Bass, 2006; Soma, 2006; Wingfield & Soma, 2002); sin embargo, se han evidenciado casos en los que los andrógenos tienen efectos contrarios (Scotti et al., 2008). Los glucocorticoides son un grupo de hormonas involucradas en la modulación de las respuestas de los organismos ante situaciones de estrés (Sapolsky et al., 2000). Están relacionados con la modulación de las interacciones sociales, incluyendo la agresión (Summers et al., 2005), y se ha reportado que aumentos en los niveles de glucocorticoides pueden generar tanto un aumento (Dunlap et al., 2002; Kruk et al., 2004), como una disminución (Denardo & Licht, 1993) en los niveles de agresión, dependiendo de la especie, el contexto y la duración del tratamiento (Summers et al., 2005). Al igual que sucede con las preferencias, la temporada reproductiva puede interactuar con otros factores moduladores de la competencia. En ese sentido, tanto la densidad poblacional (Kasumovic et al., 2008), como el OSR (Cratsley & Lewis, 2005; Forsgren et al., 2004; Gownaris et al., 2020; Kasumovic et al., 2008; Nuechterlein & Buitron, 1998), como las hormonas (Armitage, 1991; Goymann et al., 2007; Passos et al., 2021), pueden variar a lo largo de las temporadas reproductivas, lo que puede tener impactos en la competencia intrasexual.

***Austrolebias* como modelo**

Los peces anuales habitan charcos temporales que se forman en otoño o invierno y se secan durante la primavera y el verano, lo que lleva a la muerte de los adultos. Se reproducen mediante huevos resistentes a la desecación, que son depositados en el sustrato, permanecen latentes mientras el charco está seco y eclosionan al año

siguiente cuando los charcos vuelven a formarse (Wourms, 1972; Berois et al., 2016). Poseen de los ciclos vitales más cortos entre los vertebrados (Blažek et al., 2013), y se caracterizan tener un gran potencial reproductivo, ya que alcanzan rápidamente la madurez sexual (Blažek et al., 2013) y, desde ese momento, las hembras desovan a diario (Wourms, 1972).

Austrolebias es un género de peces anuales que comprende más de 48 especies distribuidas en las cuencas La Plata-Paraná y Los Patos-Merín (Loureiro et al., 2018). Entre las especies que habitan en Uruguay, se encuentran *A. reicherti* y *A. charrua*, dos especies hermanas de divergencia reciente que tienen distribuciones parapátricas, compartiendo una zona de contacto en la parte baja del Río Cebollatí, en la que se ha constatado hibridación (García, 2006; García et al., 2009; García et al., 2014, 2020; Loureiro & García, 2008) (Figura 1). Estas especies forman parte del complejo de especies *A. adloffii*, un grupo de especies que se habría diversificado recientemente en un rápido proceso de especiación múltiple simultánea, y que podría haber sufrido eventos de reticulación (García, 2006; García et al., 2014).

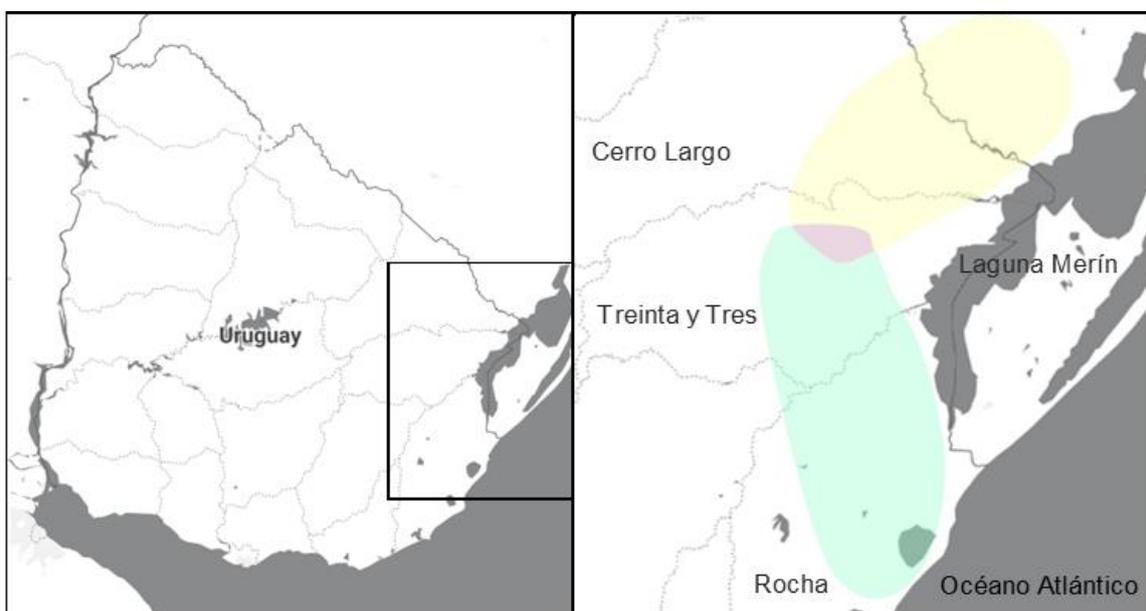


Figura 1. Distribución de *Austrolebias reicherti* y *A. charrua*. A la izquierda, mapa de Uruguay, el recuadro muestra el sitio que se amplía en la imagen de la derecha. A la derecha, en amarillo se muestra la distribución de *A. reicherti*, en verde la de *A. charrua*, y en lila la zona de contacto.

Austrolebias. reicherti y *A. charrua* son especies sexualmente dimórficas y se diferencian mayoritariamente por el patrón de coloración corporal de los machos. Los machos de *A. reicherti* poseen un patrón de bandas oscuras delgadas sobre un fondo

claro y aletas dorsal y anal de pigmentación uniforme, mientras que los machos de *A. charrua* presentan bandas oscuras más gruesas y sus aletas dorsal y anal poseen puntos claros en sus bases (Loureiro & García, 2008). Por su parte, las hembras son similares entre sí, con cuerpos marrones y aletas transparentes, y pueden presentar manchas irregulares en los flancos y aletas (Loureiro, 2004) (Figura 2).



Figura 2. Ejemplares de *Austrolebias charrua* (izquierda) y *A. reicherti* (derecha). Arriba, hembras, indistinguibles entre sí a simple vista, de cuerpo amarronado y aletas transparentes. Abajo, machos, distinguibles entre sí por el patrón de bandas en sus flancos y los puntos claros en la base de las aletas de *A. charrua*.

La selección sexual modula fuertemente las dinámicas reproductivas de estas especies, en las preferencias reproductivas y en la competencia intrasexual. En ambas especies se dan cortejos similares, durante los que los machos tienen un rol activo mientras que las hembras tienen un rol evaluador (García et al., 2008; Passos et al., 2016). Durante los cortejos, los machos se aproximan a las hembras y realizan despliegues locomotores, que incluyen vibraciones en las aletas y ondulaciones corporales. Si la hembra es receptiva, se acerca al macho y se entierran en el sustrato, en el que liberan los gametos (García et al., 2008; Passos et al., 2016). Por otro lado, hembras y machos expresan preferencias reproductivas, mostrando selectividad por el tamaño corporal (Passos, 2013; Passos et al., 2013, 2019). Por su parte, la competencia intrasexual es intensa, los machos despliegan agresión rápidamente cuando se encuentran con otros machos (Passos et al., 2016). Durante los encuentros agresivos, los machos desarrollan una serie de despliegues. Muchos de los despliegues realizados en la agresión

coinciden con los utilizados durante el cortejo, pero además se realizan otros comportamientos típicos de la agresión como los ataques y las persecuciones (Passos et al., 2013; Rivas, 2018). El conflicto termina cuando uno de los machos se subordina, lo que desata cambios morfológicos y comportamentales en los machos. El macho subordinado disminuye su coloración corporal, repliega las aletas y permanece inactivo en la periferia del acuario, mientras que el macho dominante aumenta su coloración corporal, despliega las aletas y se mueve libremente (Fabra, 2011; Passos et al., 2013). De esta forma, los machos dominantes monopolizan el acceso a áreas de desove (Fabra, 2011), lo que posiblemente tenga un rol importante en el acceso a las potenciales parejas.

Si bien se ha constatado que *A. reicherti* y *A. charrua* hibridan en la naturaleza (García et al., 2020) y en el laboratorio (Passos, 2013), estas especies presentan aislamiento reproductivo pre apareamiento y pos apareamiento. El aislamiento pre apareamiento difiere entre las poblaciones parapátridas y alopátridas. Mientras las hembras de las poblaciones alopátridas no mostraron preferencias por los machos homoespecíficos ni heteroespecíficos, las hembras de las poblaciones parapátridas muestran aislamiento pre apareamiento al reconocer y preferir machos homoespecíficos (Passos, 2013), para lo que se basan en señales visuales y químicas (Berrosteguieta, 2020; Passos, 2013; Reyes Blengini et al., 2018). Por el contrario, los machos no muestran preferencias por las hembras de ninguna especie en particular (Passos, 2013), por lo que su comportamiento podría favorecer el flujo génico. Además del aislamiento pre apareamiento, se demostró la existencia de mecanismos de aislamiento reproductivo pos apareamiento mediante experimentos en laboratorio. Si bien las cruzas entre individuos de *A. reicherti* y *A. charrua* producen híbridos fértiles, su éxito reproductivo es reducido, ya que las cruzas homoespecíficas dan origen a individuos adultos con mayor proporción que las retrocruzas y las cruzas entre híbridos (Passos, 2013). Por otro lado, estas especies muestran diferencias en cuanto a la agresión interespecífica, ya que los machos de *A. reicherti* dirigen más agresión a los machos homoespecíficos, y los machos de *A. charrua* agreden a machos de ambas especies por igual. Este patrón en la agresión podría influir en las dinámicas reproductivas, favoreciendo la hibridación entre estas especies (Rivas, 2018).

Los charcos temporales que habitan los peces anuales son extremadamente variables. Entre otras cosas, la temperatura, turbidez, oxígeno y disponibilidad de agua pueden variar drásticamente a lo largo del día y a medida que avanza la temporada reproductiva (Passos et al., 2021; Podrabsky et al., 2016). Por ejemplo, a medida que progresa la temporada, aumentan la temperatura y la turbidez, a la vez que disminuye el volumen

de agua (Passos et al., 2021). Sin embargo, a pesar de la gran variabilidad en las condiciones ambientales, existe la certeza de que la temporada reproductiva es finita. En este sentido, las señales ambientales son críticas en la historia de vida de estos animales, que son altamente capaces de responder a las claves ambientales que informan sobre el estado del charco donde habitan (Podrabsky et al., 2016). Por ejemplo, *Nothobranchius wattersi*, una especie de pez anual africano, responde a la disminución en la profundidad del agua, que puede actuar como un indicador de la finalización de la temporada reproductiva, aumentando el número de huevos desovados (Grégoir et al., 2017). De la misma forma, los individuos de *Austrolebias* han demostrado ser capaces de responder a señales que indican el final de la temporada. Específicamente, hembras y machos de estas especies aumentan su esfuerzo reproductivo al final de la temporada reproductiva en respuesta al aumento de cortisol, un glucocorticoide que aumenta al final de la temporada y que actuaría como señalizador del final de temporada reproductiva (Passos et al., 2021). Además de que los niveles de cortisol aumentan en las poblaciones naturales, también se simuló un escenario de finalización de temporada por medio de un tratamiento de cortisol en laboratorio, que produjo los mismos resultados de aumento de esfuerzo reproductivo encontrados en individuos de poblaciones naturales (Passos et al., 2021). Este aumento en el esfuerzo reproductivo se reflejó morfológica y comportamentalmente. Morfológicamente, mediante el aumento del índice hepatosomático en hembras, que está relacionado con la producción de vitelogenina; y comportamentalmente, mediante el aumento de la duración y frecuencia de cortejos y la intensidad de la coloración corporal de los machos (Passos et al., 2021). Por otro lado, las poblaciones de *Austrolebias* sufren variaciones demográficas a lo largo de la temporada, marcadas por un cambio drástico en el OSR, que pasa de ser una hembra por cada macho al inicio de la temporada, a ser de 3 hembras por cada macho al final de la temporada (Passos et al., 2014). Las hembras de *Austrolebias* han demostrado ser capaces de responder a ese cambio mediante preferencias reproductivas plásticas que se ajustan a su perspectiva de vida y a la disponibilidad de parejas. Al inicio de la temporada reproductiva, cuando hay más expectativas de vida y la disponibilidad de parejas es mayor, las hembras prefieren machos grandes. Sin embargo, pierden esas preferencias al final de la temporada, cuando la expectativa de reproducción de vida se reduce y disminuye la cantidad de machos disponibles para aparearse (Passos et al., 2014). Esta reducción en la selectividad al final de la temporada reproductiva puede ser interpretada como otro componente del aumento de esfuerzo reproductivo en respuesta a la reducción en las expectativas de vida (Passos et al., 2021). En conjunto, estos resultados muestran que estos peces anuales tienen una excepcional capacidad de

responder a las reducciones en la expectativa de vida y reproducción futura que implica la vida en charcos estacionales, y evidencian la existencia de plasticidad en el comportamiento reproductivo de *Austrolebias*.

La evidencia reunida a lo largo de los años sugiere un escenario de plasticidad del comportamiento reproductivo de *Austrolebias* acorde a las expectativas de vida y reproducción futura, en el que la disminución de las expectativas de vida podría debilitar el aislamiento reproductivo entre *A. reicherti* y *A. charrua*. Por un lado, existe hibridación en poblaciones naturales, a pesar de que las hembras prefieren a los machos homoespecíficos. Por otro lado, hacia el final de la temporada reproductiva, las hembras disminuyen la selectividad por el tamaño corporal de los machos, la proporción operacional de sexos se sesga hacia las hembras, y, en concierto con cambios hormonales, aumenta la inversión reproductiva en ambos sexos. Además, el comportamiento de los machos podría favorecer la hibridación mediante la ausencia de preferencias por las hembras homoespecíficas y la competencia interespecífica. Esta serie de cambios que ocurre a medida que avanza la temporada reproductiva, sugiere que el aislamiento reproductivo entre *A. reicherti* y *A. charrua* podría debilitarse al disminuir sus expectativas de vida. Sin embargo, hasta el momento, no se había investigado el impacto de las expectativas de vida en el aislamiento reproductivo en estas especies. En este trabajo, se puso a prueba el efecto del avance de la temporada reproductiva y el riesgo de desecación, ambos indicadores de la disminución de las expectativas de vida, en el aislamiento reproductivo entre *A. reicherti* y *A. charrua*.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis general: el aislamiento reproductivo entre *Austrolebias reicherti* y *A. charrua* se debilita a medida que disminuyen las expectativas de supervivencia y reproducción futura, que son señalizadas por el avance de la temporada reproductiva y el riesgo de desecación.

Objetivo general: evaluar cómo la temporada reproductiva y el riesgo de desecación, actuando independientemente y en conjunto, influyen en el aislamiento reproductivo y los niveles de hibridación entre *A. reicherti* y *A. charrua*.

Capítulo 1

Hipótesis 1: los individuos de *A. reicherti* y *A. charrua* disminuyen la selectividad por las parejas homoespecíficas hacia el final de la temporada reproductiva.

Objetivo 1: evaluar el efecto de la temporada en las preferencias reproductivas y la selectividad por individuos homoespecíficos y heteroespecíficos, de hembras y machos de *A. reicherti* y *A. charrua*.

Capítulo 2

Hipótesis 2: el aislamiento reproductivo disminuye en condiciones de alto riesgo de desecación, al final de la temporada reproductiva, y cuando ambos factores actúan en conjunto.

Objetivo 2: evaluar el efecto que tienen el riesgo de desecación y la temporada reproductiva, por sí solas y actuando en conjunto, sobre el aislamiento reproductivo entre *A. reicherti* y *A. charrua*, en condiciones en las que interactúan la elección de pareja y la competencia interespecífica.

Capítulo 1: preferencias reproductivas a lo largo de la temporada.

En este capítulo se evaluaron las preferencias por parejas homoespecíficas y heteroespecíficas, de hembras y machos de *A. reicherti* y *A. charrua*, al inicio y al final de la temporada reproductiva.

Se espera que al final de la temporada reproductiva disminuya la selectividad por las parejas homoespecíficas, en respuesta a una disminución de las expectativas de vida y reproducción futura.

Metodología

Colecta y mantenimiento de ejemplares

Se utilizaron ejemplares adultos de *Austrolebias reicherti* y *A. charrua* provenientes de poblaciones ubicadas en los departamentos de Treinta y Tres y Rocha, respectivamente (Figura 1.1). Se realizaron dos colectas durante la temporada reproductiva de 2021, la primera se llevó adelante a inicios de la temporada, a principios del mes de julio, y la segunda se realizó a finales de la temporada, a fines del mes de setiembre. Las colectas se realizaron utilizando redes manuales, y los individuos fueron trasladados al acuario de Facultad de Ciencias para su mantenimiento. Para cada oportunidad, durante las primeras 72 horas, los individuos se alojaron en peceras comunales (25 x 12 x 15 cm., largo x ancho x altura) en grupos de hasta 6 individuos, reflejando las condiciones de proporción de sexos observadas en el campo durante las colectas, es decir, proporción 1:1 al inicio de la temporada, y proporción 3:1 sesgada hacia hembras al final de la temporada.

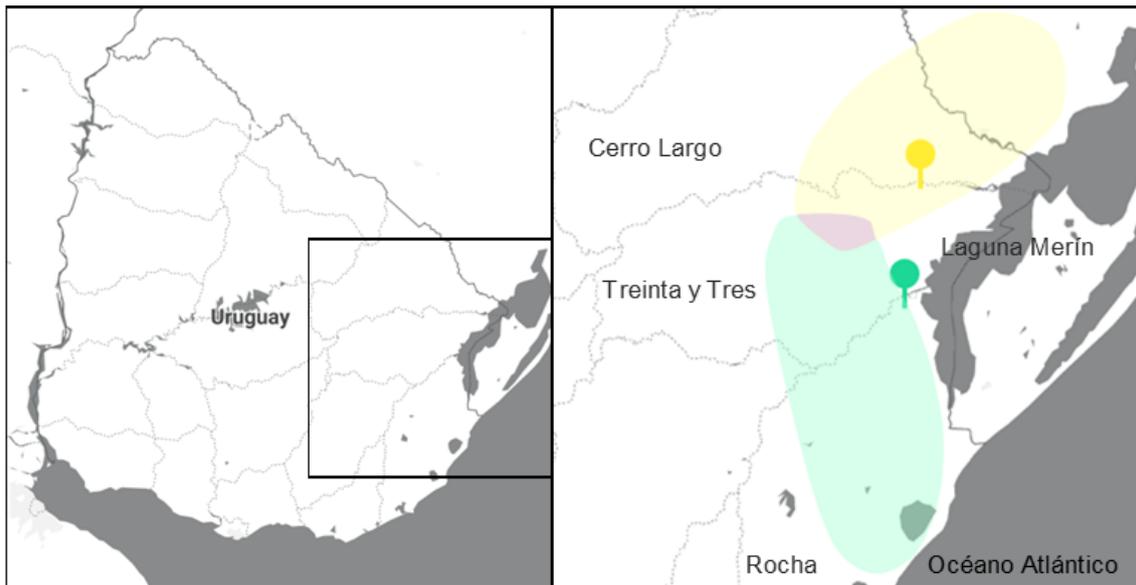


Figura 1.1. Sitios de colecta de ejemplares de *Austrolebias reicherti* y *A. charrua*. A la izquierda, mapa de Uruguay, el recuadro muestra el sitio que se amplía en la imagen de la derecha. A la derecha, en amarillo se muestra la distribución y sitio de colecta de los ejemplares de *A. reicherti*, en verde, la distribución y sitio de colecta de los ejemplares de *A. charrua*, y en lila la zona de contacto de ambas especies.

Luego, con el objetivo de estandarizar las condiciones reproductivas, 36 horas previo a la experimentación, los animales fueron alojados en peceras individuales (20 x 8 x 16 cm.) aisladas visualmente entre sí por medio de acrílicos opacos.

Los animales fueron mantenidos en condiciones de fotoperíodo natural y temperatura constante a 19°C, y fueron alimentados *ad libitum* con *Tubifex sp.* Todas peceras contaron con sistema de oxigenación de agua y se colocaron plantas acuáticas *Vesicularia dubyana*, con el objetivo de proveer refugio.

Diseño experimental

Se realizaron pruebas de elección entre dos estímulos para hembras y machos de ambas especies. Los estímulos fueron dos individuos del sexo opuesto a los individuos focales, uno homoespecífico y otro heteroespecífico. Las experiencias se realizaron al inicio y al final de la temporada reproductiva siguiendo el mismo procedimiento experimental. Se realizaron 21 réplicas para cada sexo y especie de individuo focal al inicio de la temporada y 18 al final de la temporada, sumando un total de 156 réplicas. Cada par de individuos estímulo fue utilizado para dos pruebas (una prueba con un individuo focal de cada especie), mientras que cada individuo focal fue utilizado una única vez. Fueron descartadas las pruebas en las que los individuos no visitaron ambos

estímulos durante los primeros 20 minutos de videograbación. Como resultado, el número de ensayos considerados para su análisis fue: al inicio de la temporada, N=14 para hembras focales *A. charrua*, N=15 para hembras focales *A. reicherti* y machos *A. charrua* y, N=12 para los machos *A. reicherti*. Al final de la temporada, N=18 para las hembras focales *A. charrua*, y N=14 para hembras y machos *A. reicherti*, y para el macho *A. charrua*.

Todos los ensayos se realizaron en el laboratorio de la Sección Etología de la Facultad de Ciencias bajo temperatura constante (19°C), entre las 08:00 y las 16:00 h.

I) Acuarios experimentales

Las pruebas de elección entre dos estímulos se realizaron en acuarios experimentales (60 x 20 x 20 cm.) (Figura 1.2) divididos en tres secciones separadas entre sí por tabiques verticales. Se definieron así dos secciones laterales, de 10 cm. de largo cada una, que serían las secciones de los individuos estímulos, y una zona central de 40 cm. de largo donde se colocaría a los individuos focales. Dentro de la zona central se hicieron marcas externas, delimitando así dos zonas de elección, de 10 cm. cada una, en los extremos, y una zona neutra, de 20 cm., en el centro. Se utilizaron tabiques transparentes y perforados que permitieron que los individuos focales evaluaran a los estímulos por medio de información visual y química. Ambos canales de información han mostrado ser relevantes en las pruebas de elección entre dos estímulos (Passos, 2013; Passos et al., 2013; Reyes Blengini et al., 2018). Las paredes laterales y posteriores fueron cubiertas con acrílico opaco a modo de evitar perturbaciones durante las experiencias. Los acuarios experimentales utilizados fueron implementados exitosamente en pruebas de preferencia realizadas previamente (Passos, 2013; Passos et al., 2019; Reyes Blengini et al., 2018).

II) Pruebas de elección entre dos estímulos

Se colocó a los individuos estímulos en los compartimientos de los extremos, y acto seguido se colocó al individuo focal en la zona neutra, dando inicio a las pruebas. Se videograbó el comportamiento de los peces durante 2 tandas de 20 minutos cada una. Con el fin de evitar sesgos de los individuos focales por algún sector específico de la pecera, los individuos estímulos fueron asignados aleatoriamente a alguno de los compartimientos de los extremos. Además, luego de los primeros 20 minutos de videograbación, se intercambiaron los estímulos de lugar. Para esto, se recluyó al

individuo focal en un prisma opaco, que le impedía la visión, mientras se realizaba el intercambio.

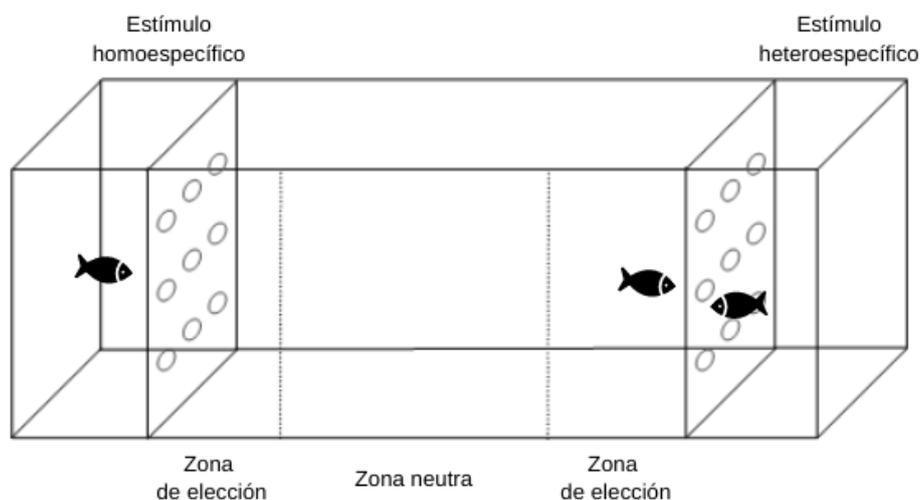


Figura 1.2. Peceras experimentales de las pruebas de elección entre dos estímulos. En los extremos, los individuos estímulo, uno homoespecífico y otro heteroespecífico, colocados aleatoriamente en sus compartimentos. En el centro, la zona del individuo focal se separa de la zona de los estímulos por tabiques transparentes perforados y se divide en 3 secciones por medio de marcas externas, una zona neutra central, y dos zonas de elección en los laterales.

Con el fin de evitar sesgos en el comportamiento asociados al tamaño corporal, se seleccionó pares de individuos estímulo de tamaño similar, ya que el tamaño corporal afecta las preferencias reproductivas de hembras y machos de *Austrolebias* (Passos et al., 2013, 2019). Los animales se colocaron sobre un vidrio con una referencia métrica y se les tomó una fotografía de uno de los flancos. Posteriormente, se extrajeron las medidas de las fotografías utilizando el programa ImageJ, versión 1.53k (Schneider et al., 2012), con el que se midió el largo desde el margen anterior de la cabeza hasta el margen distal del pedúnculo caudal. Posteriormente se confirmó que no hubo diferencias significativas entre los largos corporales de los individuos estímulo (Tabla S1).

Se observó las videograbaciones utilizando el software de observación de comportamiento BORIS, versión 7.10.7 (Friard & Gamba, 2016), y se registró cuánto tiempo estuvo cada individuo focal en las zonas de elección de los estímulos y en la zona neutra. En peces, el tiempo de asociación a los estímulos es ampliamente utilizado como indicador de preferencia en las pruebas de elección entre dos estímulos (Dougherty, 2020; Passos et al., 2013, 2019; Reyes Blengini et al., 2018; Rosenthal, 2017). En *Austrolebias*, ha demostrado ser un indicador fiable de la preferencia

reproductiva, ya que las hembras desovan más huevos con los machos con los que se asocian durante más tiempo en las pruebas de preferencia (Passos, 2013).

Análisis de datos

Se realizaron modelos de regresiones lineales mixtas con el objetivo de evaluar diferencias entre el tiempo que los individuos focales interactuaron con los estímulos homoespecíficos y heteroespecíficos. Se realizó un modelo para las hembras y uno para los machos, ambos modelos incluyeron como variables de efecto fijo al tipo de interacción, la temporada y la especie del individuo focal, y como variables de efecto aleatorio la identidad de los individuos focales. Las variables de efecto fijo se incluyeron como variables categóricas de dos niveles, los niveles para el tipo de interacción fueron homoespecífica y heteroespecífica, para la temporada fueron inicio y final, y para la especie fueron *A. reicherti* y *A. charrua*. Se evaluó el efecto simple de las variables, así como su interacción.

Se calculó la fuerza de preferencia por el estímulo homoespecífico como el tiempo que el individuo focal pasó en la zona del estímulo homoespecífico respecto al tiempo total que el individuo focal pasó en ambas zonas de elección (tiempo con el estímulo homoespecífico/tiempo total en las zonas de elección). Para evaluar variación estacional en la fuerza de preferencia por los estímulos homoespecíficos se realizaron modelos lineales generalizados (Zuur et al., 2009) con distribución beta y función de enlace logit (Douma & Weedon, 2019; Ferrari & Cribari-Neto, 2004). Se realizó un modelo para las hembras y uno para los machos. Los modelos incluyeron la fuerza de preferencia por el estímulo homoespecífico como variable de respuesta, y temporada y especie del individuo focal como variables explicativas. La especie consistió en una variable categórica con los niveles *A. charrua* y *A. reicherti*, y la temporada se incluyó como una variable categórica con los niveles inicio y final. Se evaluaron los efectos simples de las variables y también su interacción.

La simplificación de variables se realizó en base a los valores de significancia de las variables, evaluados mediante estructuras de modelos anidados, eliminando las variables e interacciones entre variables no significativas ni marginalmente significativas. En cada paso de simplificación se verificó el AIC del modelo, y en los casos en los que el AIC subió menos de 2 puntos, se eligió el modelo cuya estructura fuera más simple. Los modelos considerados y su AIC se muestran en las tablas S3,

S4, S5 y S6. Los modelos seleccionados mostraron un ajuste satisfactorio al ser sujeto al análisis de residuales (Zuur et al., 2009).

Para evaluar la motivación de los individuos focales por los estímulos presentados, se evaluó la existencia de diferencias entre el tiempo que los individuos pasaron en la zona neutra y en las zonas de elección, para lo que se realizaron pruebas pareadas.

Para evaluar la existencia de diferencias entre los largos corporales de los pares de individuos estímulo se realizaron pruebas pareadas.

En todos los casos en que se realizaron muestras pareadas se evaluó el ajuste de datos a normalidad utilizando la prueba Shapiro-Wilk, y la homogeneidad de varianza empleando la prueba de Levene. Los datos que ajustaron a distribución normal y mostraron homogeneidad de varianza fueron analizados utilizando pruebas de t para muestras pareadas y aquellos que no ajustaron a distribución normal se analizaron utilizando la prueba de Wilcoxon.

En aquellos casos en que el resumen de los modelos no brindó las comparaciones necesarias para responder a los objetivos, se realizaron pruebas a posteriori, utilizando la prueba HSD de Tukey.

El nivel de significancia considerado fue siempre $\alpha = 0.05$; y todos los datos fueron analizados utilizando el software R, versión 4.1.2 (R Core Team, 2021) y las librerías nlme, versión 3.1-162 (Pinheiro et al., 2023) y glmmTMB, versión 1.0.0 (Brooks et al., 2017).

Resultados

Preferencias reproductivas

Hembras

La temporada influyó significativamente en el tiempo en que las hembras focales pasaron con los estímulos homoespecíficos y heteroespecíficos, y este efecto fue diferente entre las hembras de *A. reicherti* y *A. charrua* (Tabla 1.1). Al inicio de la temporada reproductiva, las hembras de *A. charrua* pasaron significativamente más tiempo en la zona de elección de los machos heteroespecíficos que de los homoespecíficos (prueba HSD de Tukey, $t_{57} = -2,8$, $p = 0,007$), mientras que hacia el final de la temporada no mostraron diferencias significativas en el tiempo que pasaron asociadas a los machos homoespecíficos y heteroespecíficos (prueba HSD de Tukey, $t_{57} = 0,45$, $p = 0,66$). Por su parte, para las hembras de *A. reicherti* no hubo diferencias significativas en el tiempo que pasaron asociadas a los estímulos homoespecíficos y heteroespecíficos en ningún momento de la temporada reproductiva (Inicio de temporada: prueba HSD de Tukey $t_{57} = 1,5$, $p = 0,14$; final de temporada: prueba HSD de Tukey $t_{57} = -1,04$, $p = 0,30$) (Figura 1.3).

Tabla 1.1. Análisis de varianza del modelo lineal mixto para el modelo de la preferencia por los estímulos homoespecíficos y heteroespecíficos de las hembras de *A. reicherti* y *A. charrua*. Se muestran el estadístico F, sus grados de libertad entre paréntesis y su valor de probabilidad.

Variable de respuesta	Variable explicativa	Estadístico F	p
	Tipo de interacción	0,73 (1,57)	0,40
	Temporada	0,21 (1,57)	0,65
	Especie	3,61 (1,57)	0,06
Tiempo de interacción (s)	Tipo de interacción : temporada	0,15 (1,57)	0,70
	Tipo de interacción : especie	1,79 (1,57)	0,19
	Temporada : especie	1,59 (1,57)	0,21
	Tipo de interacción : temporada : especie	8,68 (1,57)	0,005

Machos

Los machos de ambas especies no mostraron diferencias significativas en el tiempo que pasaron en las zonas de elección de los estímulos homoespecíficos y heteroespecíficos (Tabla 1.2, Tabla 1.3). La temporada y la especie tampoco tuvieron un efecto significativo en el tiempo que los individuos pasaron con los estímulos, y fueron removidas del modelo durante la selección de variables (Tabla S6).

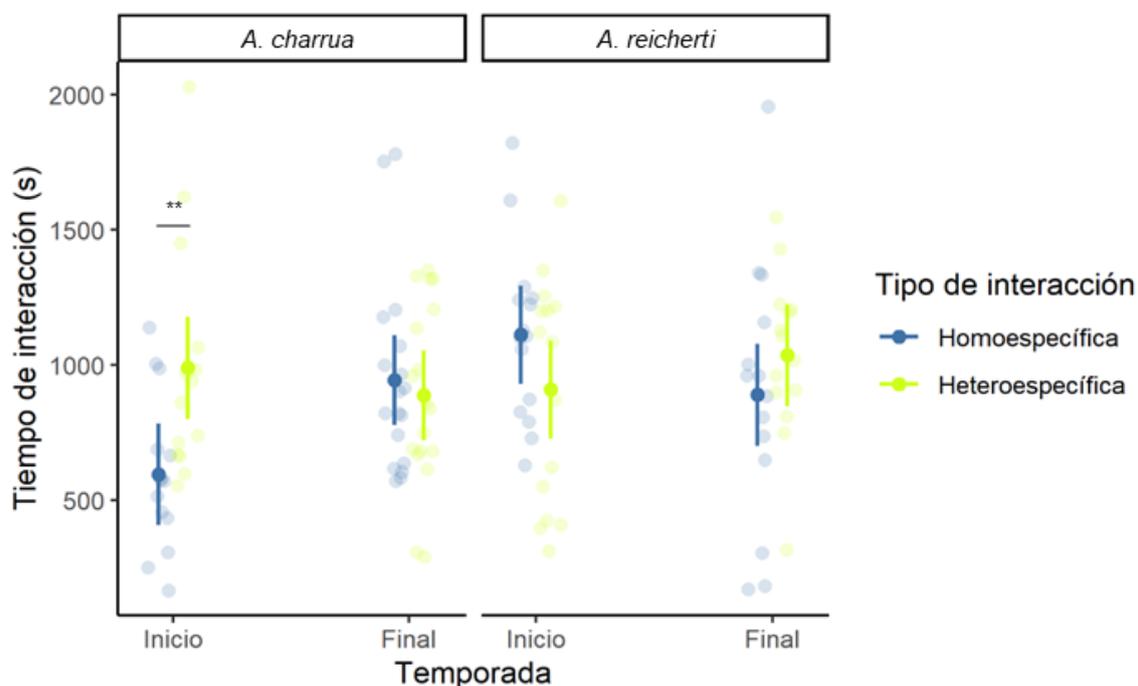


Figura 1.3. Estimados del modelo de preferencias por los estímulos homoespecíficos y heteroespecíficos para las hembras de *A. reicherti* y *A. charrua*. Se representan la media estimada y los intervalos de confianza 95% del tiempo que las hembras pasaron en las zonas de los estímulos homoespecíficos y heteroespecíficos, al inicio y al final de la temporada reproductiva. También se muestran los datos de las observaciones reales. (**) indica p entre 0,001 y 0,01.

Tabla 1.2. Análisis de varianza del modelo lineal mixto para el modelo de la preferencia por los estímulos homoespecíficos y heteroespecíficos de los machos de *A. reicherti* y *A. charrua*. Se muestran el estadístico F, sus grados de libertad entre paréntesis y su valor de probabilidad.

Variable de respuesta	Variable explicativa	Estadístico	p
Tiempo de interacción	Tipo de interacción	1,47 (1,54)	0,23

Tabla 1.3. Resultados del modelo lineal mixto para la preferencia por los estímulos homoespecíficos y heteroespecíficos de los machos de *A. reicherti* y *A. charrua*. Se muestran la media estimada y su intervalo de confianza 95%.

Variable de respuesta		Estimado	IC 95%
Tiempo de interacción	Tipo de interacción: homoespecífica	841,96	744.88 - 939.03
	Tipo de interacción: heteroespecífica	927,58	830.50 - 1024.65

Fuerza de preferencia por los estímulos homoespecíficos

Hembras

La fuerza de preferencia por los estímulos homoespecíficos cambió hacia el final de la temporada reproductiva, y ese cambio fue diferente entre las especies (Tabla 1.4). Por un lado, para las hembras de *A. charrua* hubo un cambio significativo en la fuerza de preferencia por el estímulo homoespecífico al final de la temporada reproductiva (prueba HSD Tukey, $t_{56} = -2,16$, $p = 0,04$), mientras que para las hembras de *A. reicherti* se evidenció una tendencia a disminuir la fuerza de preferencia por el estímulo homoespecífico al final de la temporada (prueba HSD Tukey, $t_{56} = 1,91$, $p = 0,06$) (Figura 1.4)

Tabla 1.4. Análisis de deviancia del modelo lineal generalizado para la fuerza de preferencia de las hembras por el estímulo homoespecífico. Se muestran el estadístico, sus grados de libertad entre paréntesis y el valor de probabilidad de la prueba de Chi-cuadrado.

Variable de respuesta	Variable explicativa	Estadístico	p
Fuerza de preferencia por el homoespecífico	Temporada	0,05 (1)	0,82
	Especie	0,93 (1)	0,34
	Temporada : especie	8,25 (1)	0,004

Machos

La temporada no tuvo un efecto significativo en la fuerza de preferencia de los machos por los estímulos homoespecíficos, ya que no se evidenciaron cambios significativos en la fuerza de preferencia por el estímulo homoespecífico al inicio y al final de la temporada reproductiva (Tabla 1.5, Tabla 1.6). La especie del individuo focal tampoco afectó significativamente la fuerza de preferencia por el estímulo homoespecífico, y fue removida del modelo durante la selección de variables (Tabla S4).

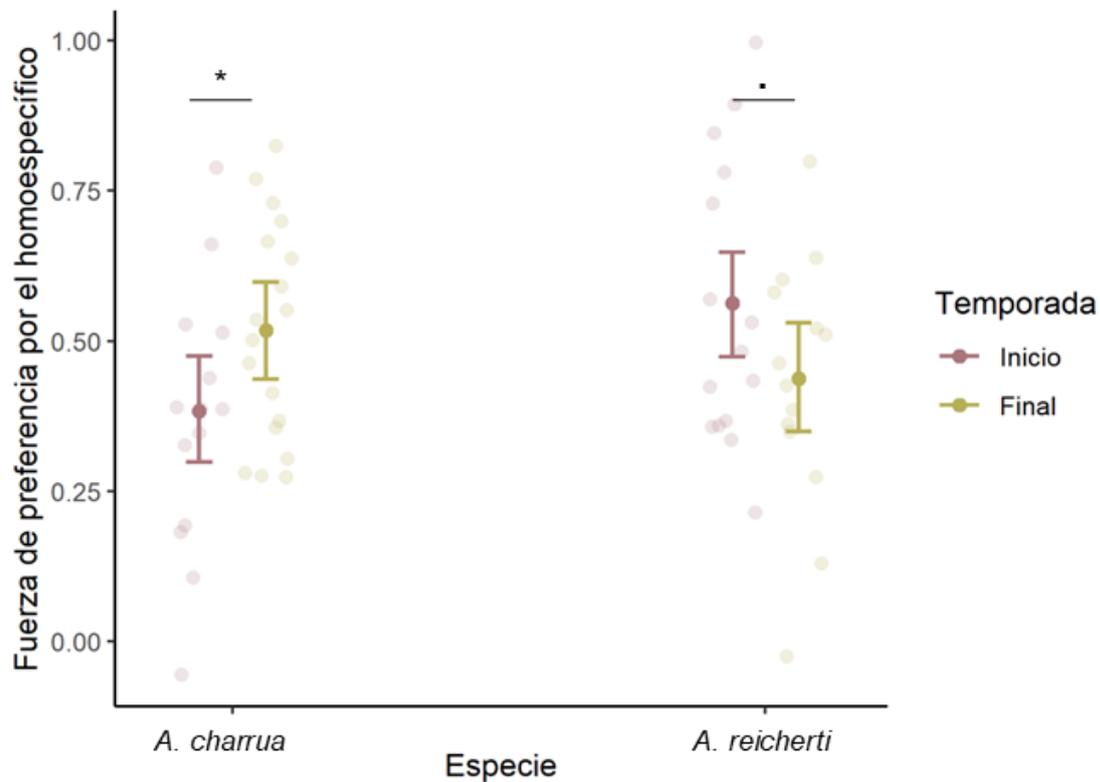


Figura 1.4. Estimados del modelo de fuerza de preferencia de las hembras por el estímulo homoespecífico. Se representan la media estimada y los intervalos de confianza 95% de la fuerza de preferencia cada especie, al inicio y al final de la temporada reproductiva. También se muestran los datos de las observaciones reales. (*) indica p entre 0,01 y 0,05. (-) indica p entre 0,05 y 0,1.

Tabla 1.5. Análisis de deviancia del modelo lineal generalizado para la fuerza de preferencia de los machos por el estímulo homoespecífico. Se muestran el estadístico, sus grados de libertad entre paréntesis y el valor de probabilidad de la prueba de Chi-cuadrado.

Variable de respuesta	Variable explicativa	Estadístico	p
Fuerza de preferencia por el homoespecífico	Temporada	0,11 (1)	0,74

Tabla 1.6. Resultados del modelo lineal generalizado para la fuerza de preferencia de los machos por el estímulo homoespecífico. Se muestran la media estimada y su intervalo de confianza 95%.

Variable de respuesta	Estimado	IC 95%
Fuerza de preferencia por el homoespecífico	Temporada: inicio	0,47 0,39 – 0,54
	Temporada: final	0,48 0,41 – 0,56

Permanencia en zonas de elección y en zona neutra

Los individuos focales pasaron la mayor parte del tiempo en las zonas de elección, tanto al inicio (hembras *A. charrua*, $75,29 \pm 9,69$ %; hembras *A. reicherti*, $84,47 \pm 9,22$ %, machos *A. charrua* $70,07 \pm 17,58$ %, machos *A. reicherti* $82,08 \pm 7,69$ %) como al final de la temporada reproductiva (hembras *A. charrua* $76,17 \pm 11,27$ %, hembras *A. reicherti*, $80,21 \pm 11,02$ %, machos *A. charrua*, $72,13 \pm 10,39$ %, machos *A. reicherti* $76,43 \pm 10,26$ %). En todos los casos, esta diferencia de tiempo fue significativa (inicio de temporada reproductiva: hembras *A. charrua*, prueba t para muestras pareadas, $t_{13}=8,07$, $p<0,001$; hembras *A. reicherti*: prueba t para muestras pareadas, $t_{14}=14,34$, $p<0,001$; machos *A. charrua*, prueba t para muestras pareadas, $t_{14}=4,49$, $p<0,001$; machos *A. reicherti*, prueba t para muestras pareadas $t_{11}=13,66$, $p<0,001$. Final de temporada reproductiva: hembras *A. charrua*, prueba t para muestras pareadas, $t_{17}=9,98$, $p<0,001$; hembras *A. reicherti*, final de temporada, prueba t para muestras pareadas, $t_{13}=10,23$, $p<0,001$; machos *A. charrua*, final de temporada, prueba t para muestras pareadas $t_{13}=7,61$, $p<0,001$; machos *A. reicherti*, final de temporada, prueba t para muestras pareadas, $t_{13}=9,71$, $p<0,001$) (Figura 1.5).

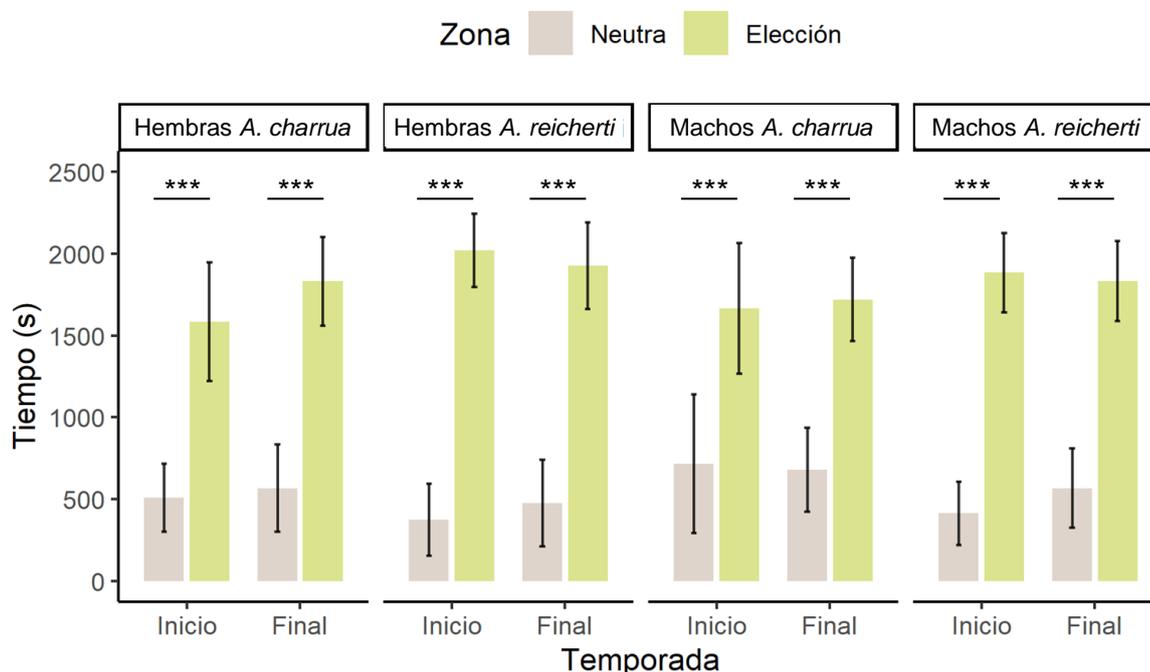


Figura 1.5. Tiempo (media y desvío estándar) que pasan los individuos focales de cada sexo y especie en la zonas neutra y de elección. (***) indica $p<0,001$.

Discusión

Las pruebas de elección entre dos estímulos confirman que la selectividad de las hembras disminuye hacia el final de la temporada reproductiva. Al final de la temporada reproductiva, las hembras de *A. charrua* perdieron la preferencia que tenían por los machos de *A. reicherti* al inicio de la temporada. Además, las hembras de *A. reicherti* mostraron una tendencia a disminuir la fuerza de preferencia por el macho homoespecífico al final de la temporada.

Estos resultados coinciden con las predicciones teóricas de algunos modelos que establecen que cuando las expectativas de supervivencia se reducen, la respuesta más adaptativa es reducir la selectividad (Gowaty & Hubbell, 2005, 2009; Henshaw, 2018; Watts et al., 2022). Además, diversos trabajos han constatado una pérdida de selectividad en condiciones de amenazas a la supervivencia, por ejemplo, ante riesgo de depredación (Dougherty, 2021; Edomwande & Barbosa, 2020; Pilakouta et al., 2017; Willis et al., 2012), a mayor edad (Kodric-Brown & Nicoletto, 2001; Moore & Moore, 2001), o ante otras restricciones temporales (Lynch et al., 2005). Otro factor que puede estar influyendo en la disminución de selectividad de las hembras es que, en estas especies, hay cambios demográficos al final de la temporada reproductiva. Al inicio de la temporada, el OSR es de una hembra por cada macho, y al final de la temporada es de 3 hembras por cada macho, por lo que la disponibilidad de parejas para las hembras es menor al final de la temporada (Passos et al., 2014). Nuevamente los resultados coinciden con modelos teóricos que predicen que, ante una disminución en las parejas disponibles, la selectividad se reduciría (Gowaty & Hubbell, 2005, 2009; Henshaw, 2018; Kokko & Mappes, 2005; Kokko & Rankin, 2006; Watts et al., 2022), y con resultados experimentales que documentan una pérdida de selectividad ante una menor disponibilidad de parejas (Atwell & Wagner, 2014; Holveck et al., 2015; Lipkowski et al., 2019; Scott et al., 2020; Willis et al., 2011). Por otro lado, se ha constatado que en *Austrolebias*, los niveles de cortisol aumentan al final de la temporada reproductiva (Passos et al., 2021). En otras especies, se ha vinculado un aumento moderado de los niveles de glucocorticoides con aumento la selectividad (Baugh et al., 2021). Sin embargo, también existe evidencia en el sentido contrario, en el que altos niveles de cortisol se vinculan con disminuciones en la selectividad de los individuos (Davis & Leary, 2015; Vitousek & Romero, 2013). En este sentido, en *Austrolebias*, los altos niveles de cortisol al final de la temporada, podrían estar influyendo en la disminución de la selectividad de las hembras. Se ha propuesto que los elevados niveles de cortisol en *Austrolebias* pueden actuar como señalizadores de final de temporada (Passos et

al., 2021), por lo tanto, una respuesta ante elevados niveles de cortisol, podría implicar también una respuesta ante una expectativa de vida reducida. Es posible que la disminución de selectividad de las hembras sea una respuesta a la interacción entre todos los factores: el avance de la temporada reproductiva, el aumento en los niveles de cortisol, y el OSR sesgado hacia machos. Un meta-análisis reciente sugiere que la pérdida de selectividad puede ser más fuerte cuando la favorecen varios factores (Dougherty, 2021). En este sentido, en otras especies en las que el OSR cambia a medida que avanza la temporada reproductiva, también se ha evidenciado una disminución en la selectividad (Borg et al., 2006; Cratsley & Lewis, 2005; Nuechterlein & Buitron, 1998; Tinghitella et al., 2013).

Por su parte, no se constataron efectos de la temporada reproductiva en las preferencias de los machos. Al contrario que para las hembras, debido al sesgo en el OSR, los machos gozan de una mayor disponibilidad de hembras al final de la temporada reproductiva. La mayor disponibilidad de parejas tendría un efecto opuesto en la selectividad al que tienen el aumento en los niveles de cortisol y de la reducción en las expectativas de vida. El balance entre todos los factores podría estar generando que los machos no cambien sus preferencias al final de la temporada reproductiva. Sin embargo, se ha planteado que la expectativa de supervivencia debería ser el factor con más impacto en la selectividad (Gowaty & Hubbell, 2009), y, además, el aumento en los niveles de cortisol también apunta en esa dirección, por lo que sería esperable que la selectividad se redujera. Si bien se ha establecido que los machos de *Austrolebias* exhiben preferencias en base al tamaño corporal de las hembras homoespecíficas en pruebas de elección entre dos estímulos (Passos et al., 2019), no hay evidencias de que tengan preferencias o puedan distinguir a las hembras homoespecíficas de las heteroespecíficas en este tipo de pruebas (Passos, 2013), por lo que la no reducción en la selectividad, podría deberse a la inexistencia de preferencias por una especie en particular o a la incapacidad de reconocer a las hembras en este tipo de ensayos.

Mientras que estos resultados apoyan la hipótesis general de que la selectividad de los individuos disminuye hacia el final de la temporada reproductiva, al menos para las hembras, no se cumplió la hipótesis de que al inicio de la temporada reproductiva se expresarían preferencias de apareamiento homoespecíficas. Por un lado, la preferencia que mostraron las hembras de *A. charrua* al inicio de la temporada fue por los machos heteroespecíficos, y, por otro lado, las hembras de *A. reicherti* y los machos de ambas especies no mostraron preferencias por ninguno de los estímulos en ningún momento de la temporada.

El hecho de que las hembras de *A. reicherti* y los machos de ambas especies no expresen preferencias por ninguna especie en particular en ningún momento de la temporada reproductiva, podría estar vinculado con que los individuos fueron colectados en poblaciones alopátridas. El modelo de reforzamiento propone que cuando las especies divergen en alopatría, acumulan cierto grado de aislamiento, y luego solapan sus distribuciones, evoluciona el aislamiento pre apareamiento en respuesta a la selección que actúa contra la hibridación (Servedio & Noor, 2003). Si bien se han propuesto mecanismos por los que las preferencias pueden surgir en poblaciones alopátridas (Rosenthal, 2017), y diversos trabajos han documentado su existencia (Martin & Mendelson, 2013; Mendelson, 2003; Swenton, 2011; Uy et al., 2018; Wymann & Whiting, 2003; Yang et al., 2016), el modelo de reforzamiento predice que en las poblaciones alopátridas no evolucionarían preferencias basadas en la especie, lo que coincidiría con los resultados encontrados en *Austrolebias*. Adicionalmente, la falta de preferencias en los machos podría explicarse porque en muchas especies los machos no expresan preferencias reproductivas en base a la especie (Kozak et al., 2009; O'Rourke & Mendelson, 2010), sin embargo, también existe evidencia de que los machos son capaces de preferir hembras según su especie (Atsumi et al., 2019; Espinedo et al., 2010; Justus & Mendelson, 2018; Shahandeh et al., 2018; Swenton, 2011; Van Huynh & Rice, 2019).

Una posible explicación para las preferencias de las hembras de *A. charrua* es que, en algunas ocasiones, los individuos se sienten atraídos por individuos con fenotipos novedosos o individuos desconocidos (Clarke & Faulkes, 1999; Hughes et al., 1999; Rosenthal, 2017; Schausberger & Sato, 2020; Verzijden et al., 2012), incluso aunque sean heteroespecíficos (Pilakouta et al., 2017). Esto podría estar vinculado con la existencia de sesgos preexistentes o con evitar aparearse con individuos emparentados. En ese sentido, hay evidencia de que los individuos pueden evitar aparearse con parientes (Becker et al., 2012; Frommen & Bakker, 2006; Schausberger & Sato, 2020; Tien et al., 2011). Los charcos temporales que habitan los individuos de *Austrolebias* son espacios reducidos, generalmente aislados entre sí, y aunque pueden conectarse por eventos de inundación, se estima que la tasa de migración hacia las poblaciones de *A. charrua* es baja (García et al., 2016); por lo que el grado de parentesco entre los individuos que habitan el charco puede llegar a ser elevado. En este escenario, la preferencia por un estímulo nuevo podría evitar el aparearse con un pariente. De hecho, recientemente se ha resaltado el rol que la hibridación podría jugar al disminuir los efectos de la endogamia y la deriva en los charcos de *Austrolebias* (García et al., 2020). Sin embargo, un meta-análisis reciente (De Boer et al., 2021), encontró poca evidencia

de que los individuos eviten aparearse con parientes, y, por el contrario, ignorar el parentesco a la hora de aparearse parece estar ampliamente extendido entre los animales. Dorsey y Rosenthal (2022), plantean que los mecanismos que llevan a evitar aparearse con parientes pueden generar un aumento de la hibridación, por lo que es posible que los costos de hibridar favorezcan mecanismos que eviten aparearse con individuos heteroespecíficos más de lo que evitan aparearse con parientes. Sin embargo, los individuos empleados en estos ensayos fueron colectados en poblaciones alopátridas, por lo que es poco probable que las hembras de *A. charrua* se encontrasen con un macho de *A. reicherti* en su población. En este sentido, es esperable que no existan mecanismos que penalicen la preferencia por una novedad. Por su parte, los sesgos preexistentes pueden generar preferencias por rasgos que actualmente ya no existen porque se han perdido en la evolución (Rosenthal, 2017; Willis, 2013). Por ejemplo, en *Xiphophorus*, se ha constatado que las hembras muestran preferencias por la característica del cortejo, por lo que prefieren machos heteroespecíficos que cortejan ante machos homoespecíficos que no lo hacen (Ryan & Wagner, 1987), y se ha propuesto que puede deberse a una preferencia ancestral por el cortejo. Sin embargo, en el caso de *A. charrua*, este escenario parece no aplicar, ya que *A. reicherti* es más reciente que *A. charrua* evolutivamente (García et al., 2009; García et al., 2014). Por otro lado, las preferencias por individuos heteroespecíficos pueden deberse a una mayor estimulación sensorial (Rosenthal, 2017; Ryan & Rand, 1993; Svensson et al., 2010), por lo que las hembras de *A. charrua* podrían preferir a los machos de *A. reicherti* si éstos poseyeran alguna característica particular que estimulara más sus sistemas sensoriales. A simple vista, no se detecta ninguna característica de los machos de *A. reicherti* que pueda ser más estimulante que los machos de *A. charrua*; en su cortejo, que es igual entre ambas especies (Passos et al., 2016), ni en su coloración. Sin embargo, los peces podrían estar utilizando canales sensoriales que nosotros no exploramos, por lo que podrían estar evaluando características que escapan a nuestra valoración. Por ejemplo, se sabe que algunos peces tienen preferencias basadas en rasgos visualizables bajo luz ultravioleta (Macías García & de Perera, 2002; Palmer & Hankison, 2015; Smith et al., 2002), o utilizan información acústica (Amorim et al., 2013; Maruska et al., 2012). Además, la comunicación química es muy importante en estas especies (Passos, 2013; Reyes Blengini et al., 2018), por lo que también podría transmitirse información adicional por dicho canal, que explique las preferencias de las hembras de *A. charrua* por los machos de *A. reicherti*. Si bien se estableció que las hembras de *A. reicherti* pueden reconocer machos homoespecíficos de los de *A. charrua* en base a señales químicas (Reyes Blengini et al., 2018), no se ha puesto a prueba la respuesta de las hembras de *A. charrua* a machos de ambas especies en base a pistas

químicas. El hecho de que las hembras de este ensayo hayan sido colectadas en poblaciones alopátridas, permite explicar que no hayan evolucionado mecanismos que penalicen la preferencia por un estímulo sensorial más fuerte debido al riesgo de hibridar. Por ejemplo, las hembras de *S. multiplicata* de poblaciones alopátridas prefieren cantos exagerados, que son similares a los de individuos heteroespecíficos; mientras que en poblaciones simpátridas prefieren cantos promedio, lo que ayuda a evitar la hibridación (Pfennig, 2000). Si las preferencias de las hembras de *A. charrua* por los machos de *A. reicherti* se debieran a características de los machos de *A. reicherti* que sobre estimularan los sentidos, sería esperable que las hembras de *A. reicherti* también mostrasen preferencia por los machos de *A. reicherti*, evento que no sucedió. Por otro lado, no se midió el nivel de actividad de los estímulos, que podría impactar en las preferencias de las hembras. Dicha posibilidad permanece pendiente de explorada.

Capítulo 2: efecto de la desecación y la temporada en el aislamiento reproductivo.

En este capítulo se evaluó cómo el riesgo de desecación, el momento de la temporada reproductiva y ambos factores en conjunto, influyeron sobre el aislamiento reproductivo y los niveles de hibridación entre *A. reicherti* y *A. charrua* cuando interactúan en conjunto la elección de pareja y la competencia intrasexual.

Se espera que el aislamiento reproductivo disminuya hacia el final de la temporada reproductiva y en condiciones de alta desecación.

Metodología

Colecta y mantenimiento de ejemplares

La colecta y el mantenimiento de los ejemplares se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito en el capítulo 1.

Diseño experimental

Se realizaron pruebas de interacción libre entre individuos mantenidos en distintas profundidades de agua, simulando diferentes condiciones de desecación, al inicio y al final de la temporada reproductiva. La manipulación de los individuos y las actividades experimentales se realizaron bajo el mismo protocolo en ambos momentos de la temporada reproductiva.

I) Mantenimiento experimental

Transcurrida la aclimatación, se comenzó con el mantenimiento experimental, que consistió en el establecimiento de poblaciones de individuos en tanques de mantenimiento con diferentes profundidades de agua. En las poblaciones control la profundidad de agua fue de 15 cm., simulando las condiciones de profundidad de los

charcos al momento de la colecta, ya que 15 cm. es una profundidad que se encuentra en los charcos tanto al inicio como al final de la temporada reproductiva, porque los charcos temporales donde habitan *A. charrua* y *A. reicherti* son extremadamente heterogéneos en sus profundidades, no solo entre charcos sino dentro del mismo charco (Loureiro et al., 2016). En las poblaciones tratamiento, la profundidad fue de 5 cm., simulando un charco con alto riesgo de desecación. Cada población constó de 3 individuos de cada especie y sexo, conformando un total de 12 individuos por población. El tamaño es determinante en las preferencias reproductivas y en la agresión en *Austrolebias* (Passos et al., 2013, 2019), por lo que, para evitar sesgos en el comportamiento asociados al tamaño corporal, se eligieron individuos por pares de tamaños similares.

Por otro lado, mientras que los machos de *A. charrua* y *A. reicherti* son fácilmente distinguibles por su patrón de pigmentación corporal (Loureiro & García, 2008), las hembras de *Austrolebias* comparten un patrón de pigmentación (Loureiro, 2004), por lo que se estableció un código de marcas naturales para poder identificar la especie de las hembras.

Los tanques de mantenimiento (Figura 2.1) consistieron en tanques (57 x 37 x 20 cm., largo x ancho x altura) de paredes opacas que contaron con oxigenación permanente. Cada uno tuvo 2 contenedores (20 x 14 x 2 cm.) llenos con fibra de coco a modo de sustrato apto para oviposición, e iguales cantidades de plantas *Vesicularia dubyana*, y piedras, con el objetivo de proveer refugio. Las poblaciones permanecieron establecidas durante 2 semanas, y cada 7 días se realizó un cambio del 50% del agua y del 100% del sustrato para oviposición.

Luego de transcurridos 14 días, para estandarizar las condiciones reproductivas previo a los ensayos experimentales, los peces fueron individualizados y mantenidos por 36 horas en acuarios (20 x 8 x 16 cm.) aislados visualmente entre sí por acrílicos opacos, respetando la profundidad de su tanque de origen.

Durante el mantenimiento experimental, los animales se mantuvieron en el acuario de Facultad de Ciencias, en condiciones de fotoperíodo natural y temperatura constante a 19°C. Asimismo, fueron alimentados *ad libitum* con *Tubifex sp.*

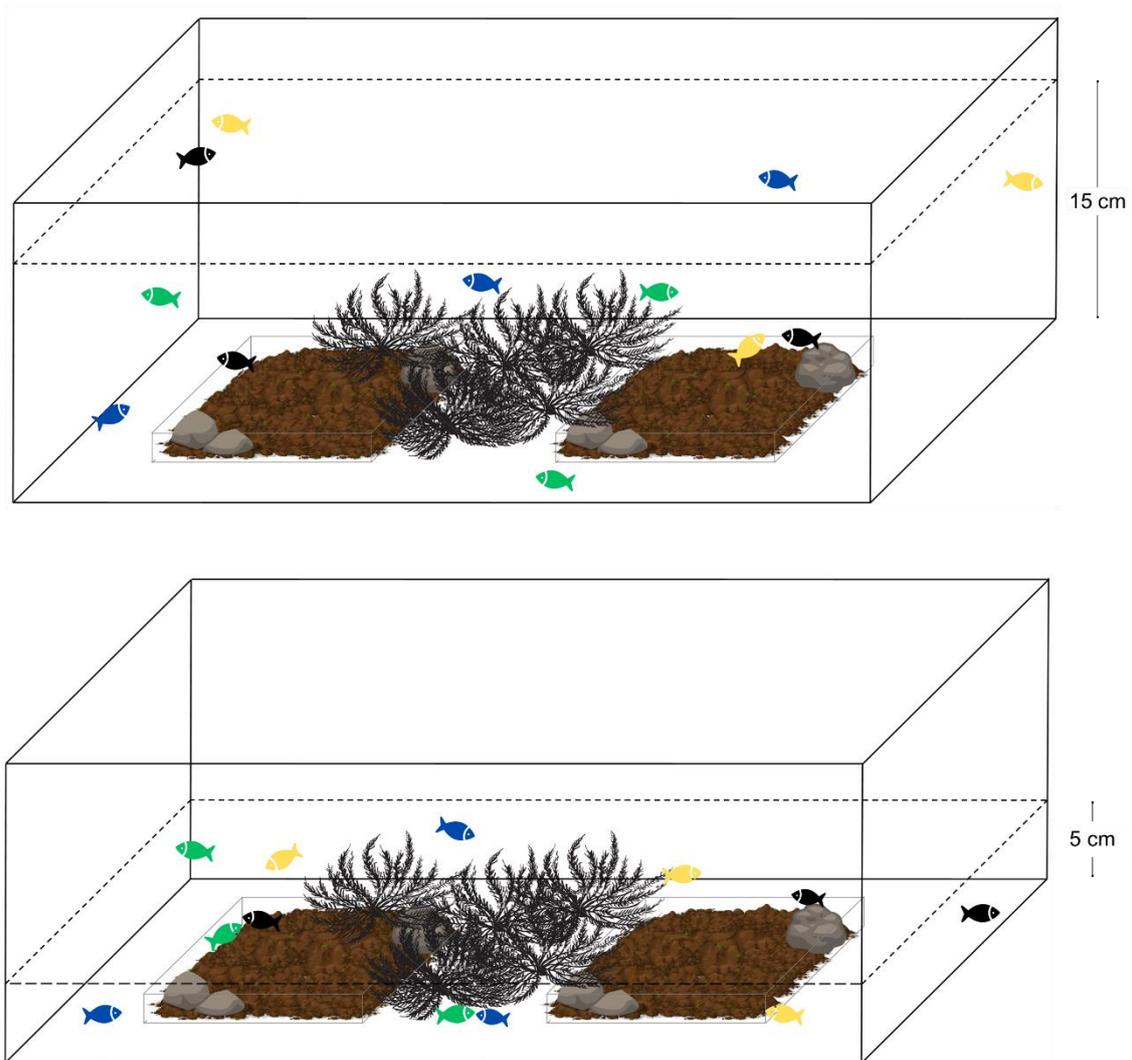


Figura 2.1. Tanques de mantenimiento experimental. Los tanques contaron con iguales cantidades de sustrato apto para desove, plantas acuáticas y piedras. La población de 12 individuos estuvo compuesta por 3 individuos de cada sexo y especie, que se representan con diferentes colores. La línea discontinua indica el nivel del agua de cada tanque. Arriba, tanque de mantenimiento utilizado para el grupo control, con una profundidad de agua de 15 cm. Abajo, tanque de mantenimiento utilizado para el grupo tratamiento, con una profundidad de agua de 5 cm.

II) Pruebas de interacción libre

Las pruebas de interacción libre se realizaron en acuarios (40 x 13 x 16 cm.), cada uno conteniendo 2 placas de Petri (90 x 13 mm., diámetro x altura) con esferas de vidrio de 500 μm de diámetro (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ) a modo de sustrato apto para oviposición. Las paredes laterales y posteriores fueron cubiertas con acrílico opaco para evitar perturbaciones durante las experiencias, y todos los acuarios contaron con oxigenación permanente. Los acuarios experimentales mantuvieron las condiciones de profundidad del mantenimiento experimental.

Se establecieron grupos experimentales de 4 individuos, una hembra y un macho de cada especie, provenientes de los tanques de mantenimiento experimental. Se seleccionaron pares de individuos del mismo sexo de tamaños similares apuntando a evitar sesgos en el comportamiento asociados al tamaño corporal.

Las pruebas de interacción libre consistieron en observar la libre interacción de los 4 individuos durante 3 días en los que se realizaron 4 observaciones diarias de 10 minutos de duración cada una, separadas por intervalos de 1 hora; obteniendo así un total de 120 minutos de observación de cada acuario. Durante la observación, se contabilizó la ocurrencia de apareamientos, cortejos, y comportamientos agresivos (ataques, despliegues laterales, despliegues sigmoides y persecuciones) de todos los individuos (Tabla 2.1). Con el fin de obtener la medida de longitud corporal, se les fotografió uno de los flancos siguiendo el mismo procedimiento descrito para el capítulo 1. Posteriormente se confirmó que no hubo diferencias significativas en el largo corporal de los individuos del mismo sexo de cada acuario (Tabla S2).

Al finalizar los 3 días de interacción, se contabilizó la cantidad de huevos desovados en cada acuario. Para esto, se filtró el sustrato de oviposición y el agua del acuario utilizando una red de 1mm. que retuvo los huevos en él y permitió su conteo.

Al inicio de la temporada se realizaron 7 pruebas para el control y 7 para el tratamiento, y al final de la temporada se realizaron 6 pruebas para el control y 6 para el tratamiento, sumando un total de 26 réplicas.

Las pruebas de interacción libre se realizaron en el laboratorio de la Sección Etología de la Facultad de Ciencias bajo temperatura constante (19°C), entre las 08:00 y las 16:00 h.

Tabla 2.1. Descripción de las unidades comportamentales consideradas para la observación de las pruebas de interacción libre (Passos et al., 2016; Rivas, 2018).

Sexo	Unidad comportamental	Contexto	Descripción
Machos	Ataque	Agresión	El individuo muerde o intenta morder a otro. Usualmente dirigido a las aletas.
	Persecución	Agresión	Un individuo persigue rápidamente a otro.
	Despliegue lateral	Agresión y cortejo	El individuo extiende sus aletas, que pueden vibrar o no, mientras permanece quieto.
	Despliegue sigmoide	Agresión y cortejo	Despliegue lateral con ondulaciones corporales.
	Invitación a seguir	Cortejo	El individuo realiza sucesivos nados cortos
	Invitación a nadar	Cortejo	El individuo hace vibrar sus aletas extendidas, se mantiene con el cuerpo en posición vertical o inclinada, con la cabeza sobre el sustrato.
Hembras	Aceptación a seguir	Cortejo	La hembra sigue al macho que realizó invitación a seguir
	Aceptación del nado	Cortejo	La hembra se posiciona al lado del macho, tocando su flanco
Ambos	Apareamiento	Cortejo	El macho presiona el cuerpo de la hembra sobre el sustrato, la hembra se entierra parcial o completamente en el sustrato.

Análisis de datos

Se construyó un modelo para cada variable registrada en las observaciones como variable de respuesta.

Para evaluar la existencia de diferencias de la actividad reproductiva entre individuos homoespecíficos y heteroespecíficos, y su vínculo con la temporada reproductiva y las condiciones de mantenimiento experimental, se realizaron modelos lineales generalizados mixtos, utilizando la distribución binomial negativa y función de enlace log (Zuur et al., 2009). Se construyó la variable “tipo de interacción” con los niveles homoespecífico y heteroespecífico, que se utilizó como variable explicativa de efecto fijo junto con la temporada y las condiciones de mantenimiento, de las que se evaluó su efecto simple, así como sus interacciones. La temporada se incluyó como variable categórica con los niveles inicio y final, y el mantenimiento como variable categórica con los niveles control y tratamiento. Como variables de respuesta se utilizó el número de apareamientos y cortejos. Por otro lado, se modeló como efecto aleatorio la identidad de los grupos para controlar las medidas repetidas del tipo de interacción.

Con el objetivo de evaluar la influencia de la temporada reproductiva y el mantenimiento en el número de huevos desovados y en los niveles de agresión, se construyeron modelos lineales generalizados, con distribución binomial negativa y función de enlace log (Zuur et al., 2009). Se construyó un modelo para cada una de las variables de respuesta, siendo estas el conteo de los huevos desovados, ataques, despliegues laterales, despliegues sigmoides y persecuciones. Las variables explicativas para todas las variables de respuesta fueron temporada y mantenimiento, cada una como variable categórica de dos niveles (inicio y final para la temporada, control y tratamiento para las condiciones de mantenimiento), y se consideró tanto su efecto simple como las interacciones entre ellas.

En aquellos casos en que el resumen de los modelos no brindó las comparaciones necesarias para responder a los objetivos, se realizaron pruebas a posteriori, utilizando la prueba HSD de Tukey.

Se realizaron pruebas pareadas para evaluar la existencia de diferencias entre los largos corporales de los pares de individuos del mismo sexo.

Las pruebas pareadas y la selección de variables de los modelos se realizaron siguiendo los mismos procedimientos descritos para el capítulo 1. Todos los modelos considerados y su AIC se muestran en las tablas S7 y S8. Los modelos seleccionados mostraron ajustar satisfactoriamente al ser sometidos al análisis de residuales (Zuur et al., 2009).

Resultados

Actividad reproductiva

La temporada y las condiciones del mantenimiento experimental influyeron significativamente en los apareamientos realizados (Tabla 2.2). Al inicio de la temporada reproductiva, en el control, se realizaron significativamente más apareamientos homoespecíficos que heteroespecíficos (prueba HSD de Tukey, $t_{44} = 3,58$, $p < 0,001$), mientras que en el tratamiento no hubo diferencias significativas entre el número de apareamientos homoespecíficos y heteroespecíficos (prueba HSD de Tukey, $t_{44} = 1,35$, $p = 0,18$). Por el contrario, al final de la temporada no se evidenció una diferencia entre el número de apareamientos homoespecíficos y heteroespecíficos, ni en el control (prueba HSD de Tukey, $t_{44} = 1,39$, $p = 0,17$), ni en el tratamiento (prueba HSD de Tukey, $t_{44} = -1,1$, $p = 0,28$). Adicionalmente, se constató que al final de la temporada aumentaron significativamente los apareamientos heteroespecíficos respecto del inicio de la temporada, tanto en el control como en el tratamiento (prueba HSD de Tukey, $t_{44} = 2,39$, $p = 0,02$). Sin embargo, no se constató una diferencia en el número de apareamientos homoespecíficos realizados al inicio y al final de la temporada (prueba HSD de Tukey, $t_{44} = 0,51$, $p = 0,61$). Por otro lado, tampoco hubo diferencias en el número de apareamientos estimados entre control y tratamiento, tanto para apareamientos homoespecíficos (prueba HSD de Tukey, $t_{44} = 1,51$, $p = 0,14$) como heteroespecíficos (prueba HSD de Tukey, $t_{44} = -0,51$, $p = 0,61$), en ningún momento de la temporada reproductiva (Figura 2.2).

Tabla 2.2. Análisis de deviancia del modelo lineal generalizado mixto para los apareamientos. Se muestran los estadísticos, sus grados de libertad entre paréntesis y los valores de probabilidad de la prueba de Chi-cuadrado.

Variable de respuesta	Variable explicativa	Estadístico	P
Apareamientos	Tipo de interacción	3,08 (1)	0,08
	Temporada	2,04 (1)	0,15
	Mantenimiento	0,63 (1)	0,43
	Tipo de interacción : temporada	4,43 (1)	0,04
	Tipo de interacción : mantenimiento	4,23 (1)	0,04

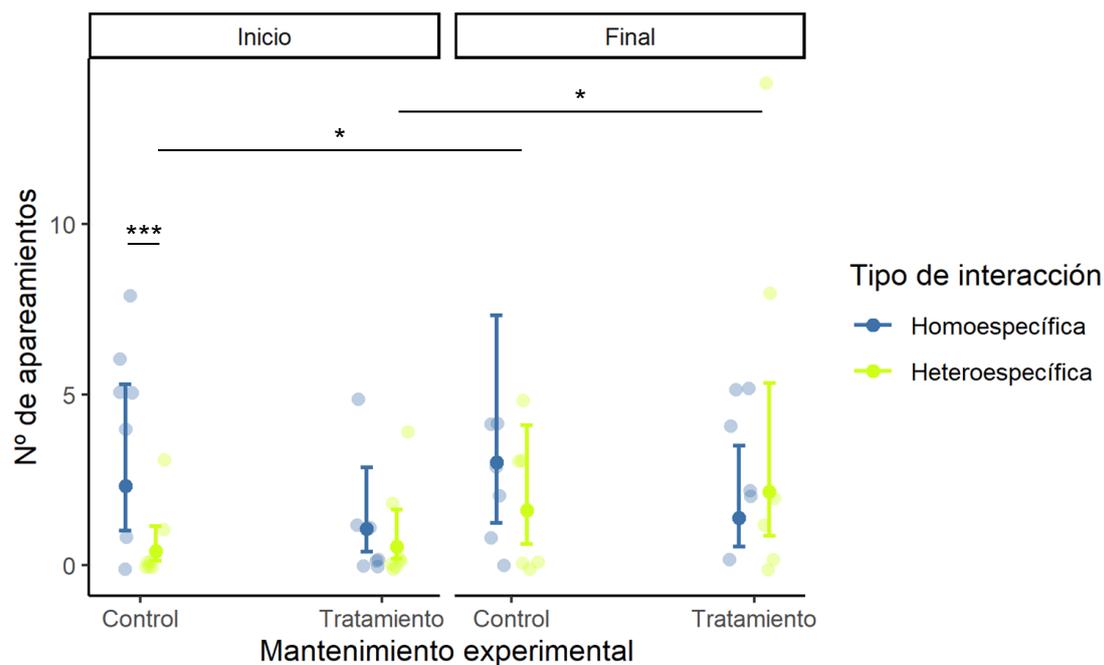


Figura 2.2. Estimados del modelo para apareamientos. Se muestran la media estimada del número de apareamientos homoespecíficos y heteroespecíficos para las diferentes condiciones de mantenimiento experimental al inicio y al final de la temporada reproductiva. También se representan los intervalos de confianza 95% de las medias estimadas y los datos de las observaciones reales. (***) indica $p < 0,001$. (*) indica p entre 0,01 y 0,05.

Respecto a los cortejos, los machos realizaron significativamente más cortejos homoespecíficos que heteroespecíficos, tanto al inicio como al final de la temporada reproductiva. Por otro lado, la temporada influyó significativamente tanto en los cortejos homoespecíficos como heteroespecíficos, que aumentaron hacia el final de la temporada reproductiva (Tabla 2.3, Figura 2.3). Por su parte, el mantenimiento experimental no tuvo efecto en los cortejos, y fue eliminado del modelo durante la selección de variables (Tabla S7).

Tabla 2.3. Análisis de deviancia del modelo lineal generalizado mixto para los cortejos. Se muestran los estadísticos, sus grados de libertad entre paréntesis y los valores de probabilidad de la prueba de Chi-cuadrado.

Variable de respuesta	Variable explicativa	Estadístico	P
Cortejos	Tipo de interacción	5,2 (1)	0,02
	Temporada	3,8 (1)	0,05

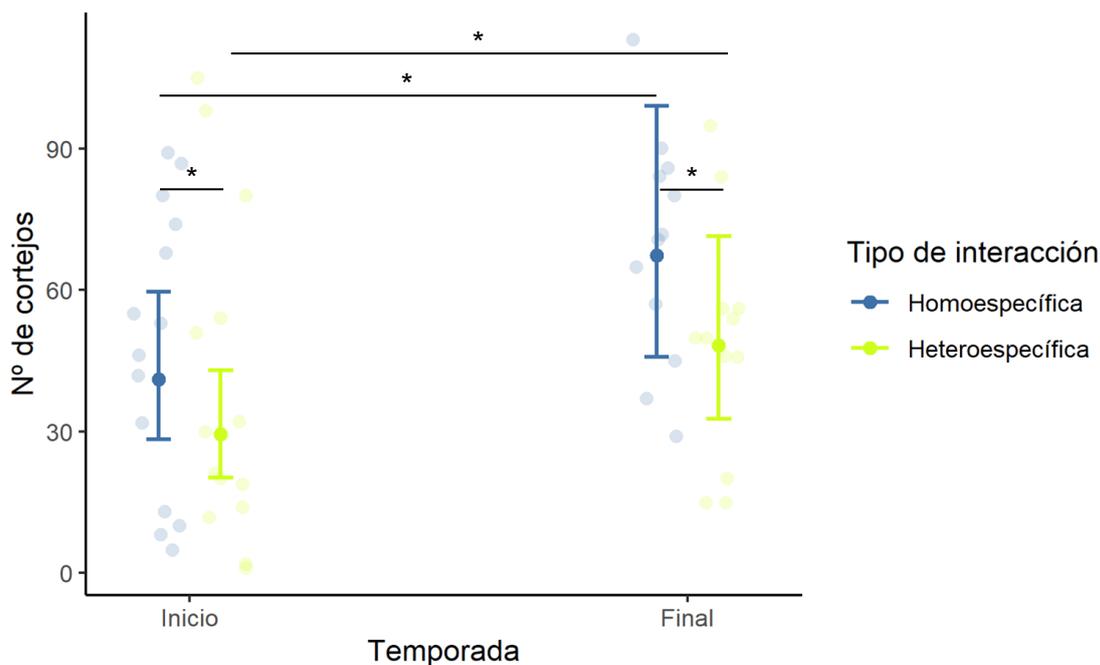


Figura 2.3. Estimados del modelo para los cortejos. Se muestran la media estimada y el intervalo de confianza 95% del número de cortejos homoespecíficos y heteroespecíficos al inicio y al final de la temporada. Además, se muestran los datos de las observaciones reales. (*) indica p entre 0,01 y 0,05.

Respecto al número de huevos desovados (Tabla 2.4), ni la temporada (análisis de deviancia del modelo, prueba de Chi-cuadrado, $X^2=1,15$ (1), $p=0,28$) ni el mantenimiento experimental, tuvieron efecto en el número de huevos desovados. El mantenimiento experimental fue removido del modelo durante la selección de variables (Tabla S8).

Tabla 2.4. Resultados del modelo lineal generalizado para los huevos desovados. Se muestran la media estimada y su intervalo de confianza 95%.

Variable de respuesta		Estimado	IC 95%
Huevos desovados	Temporada: inicio	15,79	10,77 - 23,15
	Temporada: final	21,42	14,26 - 32,17

Agresión

Excepto en los ataques, la temporada influyó significativamente sobre todas las unidades agresivas consideradas. Los individuos realizaron significativamente más

despliegues sigmoides, despliegues laterales y persecuciones al final de la temporada que al inicio (Tabla 2.5, Figura 2.4). Por otro lado, el mantenimiento experimental no influyó sobre ninguna de las unidades agresivas consideradas, y fue removido del modelo durante la selección de variables (Tabla S8).

Tabla 2.5. Análisis de deviancia de los modelos de agresión. Se muestran el estadístico, sus grados de libertad entre paréntesis y el valor de probabilidad de la prueba de Chi-cuadrado.

Variable de respuesta	Variable explicativa	Estadístico	P
Ataques	Temporada	0,04 (1)	0,85
Despliegues sigmoides	Temporada	9,43 (1)	0,002
Despliegues laterales	Temporada	8,09 (1)	0,005
Persecuciones	Temporada	6,31 (1)	0,01

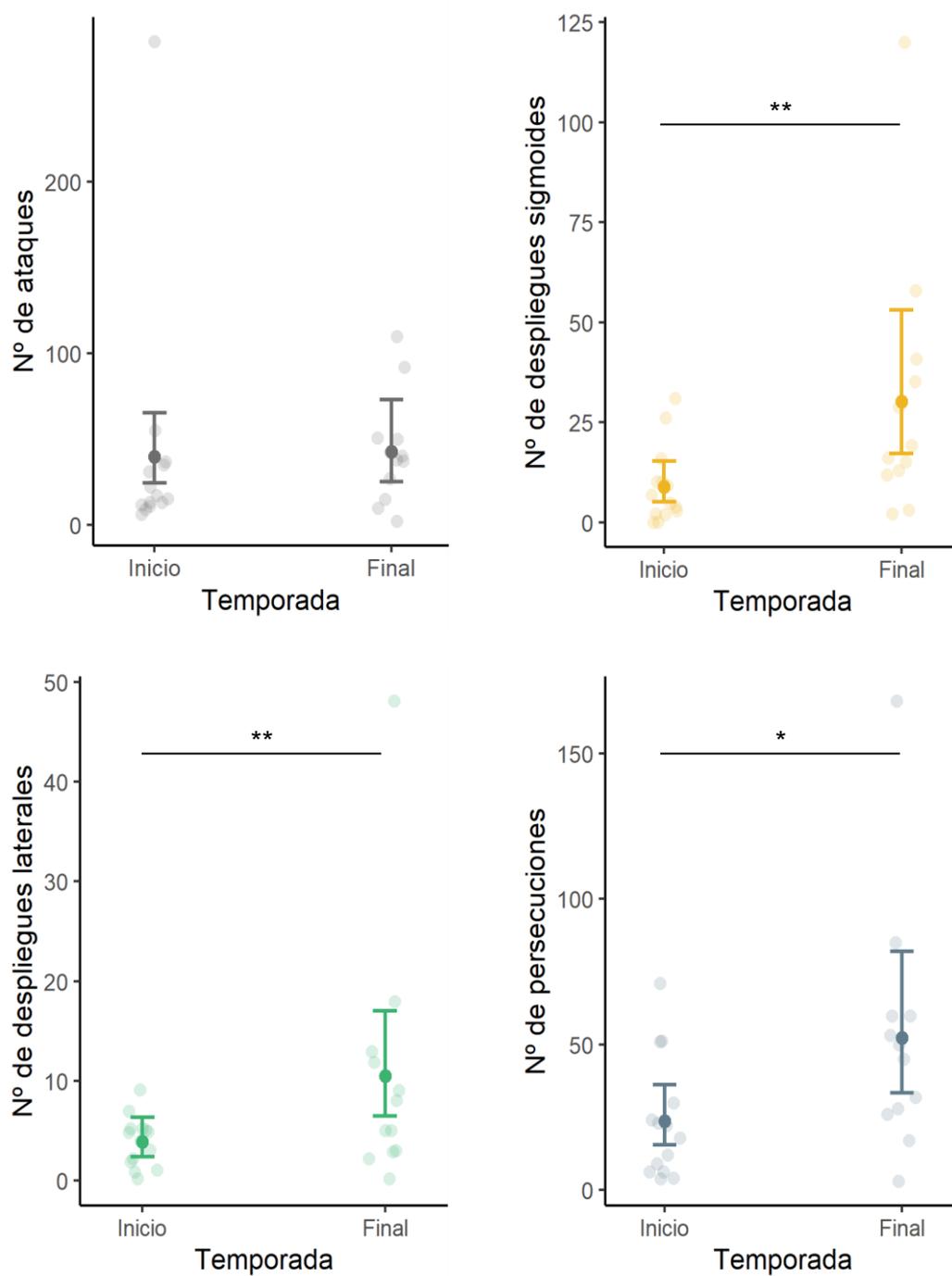


Figura 2.4. Estimados de los modelos para agresión. Se muestran la media estimada y su intervalo de confianza 95% para el número ataques, despliegues sigmoides, despliegues laterales y persecuciones al inicio y al final de la temporada. Además, se muestran los datos de las observaciones reales. (**) indica p entre 0,001 y 0,01. (*) indica p entre 0,01 y 0,05.

Discusión

Los resultados de este capítulo refrendan la hipótesis de que el aislamiento reproductivo entre *A. reicherti* y *A. charrua* disminuye a medida que disminuyen las expectativas de vida, y que esto se da en respuesta al riesgo de desecación y al avance de la temporada reproductiva. Por otro lado, los resultados también informan de un aumento en la inversión reproductiva hacia el final de la temporada, y de estrategias reproductivas diferentes entre hembras y machos.

El riesgo de desecación influyó directamente en el aislamiento reproductivo, ya que en el tratamiento no hubo diferencias en el número de apareamientos homoespecíficos y heteroespecíficos, a diferencia del control de inicio de temporada, en el que se realizaron más apareamientos homoespecíficos que heteroespecíficos. La temporada reproductiva también impactó directamente en la hibridación, ya que el número de apareamientos heteroespecíficos realizados al final de la temporada aumentó respecto al inicio de la temporada. Además, al final de la temporada se perdió el predominio de apareamientos homoespecíficos que se vio en el control de inicio de la temporada.

Por otro lado, la temporada reproductiva influyó sobre el nivel de actividad reproductiva, tanto a nivel intersexual como en la competencia intrasexual. Al final de la temporada, los machos realizaron significativamente más cortejos, despliegues laterales, despliegues sigmoides y persecuciones.

El aumento de cortejos, apareamientos heteroespecíficos y agresión que ocurre al final de la temporada confirma directamente que los individuos aumentan su actividad reproductiva al final de la temporada. Estos resultados están en consonancia con el escenario de aumento de inversión reproductiva mediado por cortisol que se plantea para los individuos de *Austrolebias* al final de la temporada.

Apareamientos e hibridación

Efecto del riesgo de desecación

Los resultados obtenidos refrendan la hipótesis de que el aislamiento reproductivo disminuye en condiciones de alto riesgo de desecación, ya que la predominancia de apareamientos homoespecíficos que se ve al inicio de la temporada reproductiva en las poblaciones control, no existe en las poblaciones de tratamiento. Este resultado coincide

con trabajos en otras especies, en las que se ha documentado que la profundidad del agua actúa como señal de una reducción del tiempo disponible y desencadena estrategias reproductivas alternativas (Chen & Pfennig, 2020; Grégoir et al., 2017; Pfennig, 2007). Por ejemplo, las hembras de *S. bombifrons* hibridan con machos de *S. multiplicata* únicamente en charcos someros, lo que está directamente vinculado con la ventana temporal que tienen los renacuajos para desarrollarse (Pfennig, 2007). Incluso, son capaces de elegir llamadas nupciales interespecíficas según el impacto que tienen en su éxito reproductivo, y solo muestran ese comportamiento en los charcos someros, en los que la profundidad del agua señala que hibridar es ventajoso (Chen & Pfennig, 2020). Asimismo, en peces anuales también se han documentado respuestas ante la disminución de la profundidad del agua. Las hembras de *Nothobranchius wattersi*, una especie de pez anual africano, responden a un tratamiento de simulación de desecación aumentando el número de huevos desovados (Grégoir et al., 2017).

Efecto de la temporada reproductiva

Se refrenda la hipótesis de que al final de la temporada reproductiva se debilita el aislamiento reproductivo. Al contrario de lo que sucede al inicio de la temporada, al final de la temporada reproductiva no hubo diferencias entre la cantidad de apareamientos homoespecíficos y heteroespecíficos en las poblaciones provenientes del control. Estos resultados apoyan la hipótesis planteada y coinciden con predicciones teóricas y con evidencia experimental de que, ante restricciones temporales y menor disponibilidad de parejas, los individuos discriminan menos a las potenciales parejas (Henshaw, 2018; Watts et al., 2022; Kodric-Brown & Nicoletto, 2001; Lynch et al., 2005; Borg et al., 2006; Cratsley & Lewis, 2005; Nuechterlein & Buitron, 1998; Tinghitella et al., 2013). Además, en *Austrolebias* se ha propuesto que los niveles de cortisol, que aumentan al final de la temporada y generan un aumento en los niveles de actividad reproductiva, podrían estar vinculados con una disminución en qué tan selectivas son las hembras (Passos et al., 2021), algo que se ha visto también en otras especies (Davis & Leary, 2015; Vitousek & Romero, 2013). En este sentido, al final de la temporada, podrían actuar en conjunto las restricciones temporales, la menor disponibilidad de parejas para las hembras, debido al sesgo en el OSR (Passos et al., 2014), y elevados niveles de cortisol, generando que las hembras ya no prioricen los apareamientos homoespecíficos, y que disminuya así el aislamiento reproductivo.

Por otro lado, el número de apareamientos heteroespecíficos al final de la temporada reproductiva también apoya la hipótesis de que el aislamiento reproductivo se debilita

en respuesta al avance de la temporada, ya que independientemente de las condiciones de mantenimiento experimentales, el número de apareamientos heteroespecíficos fue mayor al final de la temporada que al inicio. Este resultado es un indicador directo de que la disminución de las expectativas de vida genera un aumento en la hibridación entre *A. reicherti* y *A. charrua*. Cuando los individuos disminuyen qué tan selectivos son, pero no la motivación reproductiva, y la disminución de la selectividad está ligada a un factor ambiental, dicho factor podría actuar promoviendo el flujo génico entre las especies (Rosenthal, 2017). En este sentido, en *Austrolebias* no solo se mantiene la motivación al final de la temporada, sino que aumenta la actividad reproductiva (Passos et al., 2021), y en interacción con que al final de la temporada las hembras no priorizan los apareamientos homoespecíficos sobre los heteroespecíficos, se favorece la hibridación en respuesta al avance de la temporada reproductiva y la reducción de las expectativas de vida.

Al inicio de la temporada reproductiva, el tratamiento experimental desencadenó la disminución del aislamiento reproductivo en respuesta a una señal de desecación, eliminando el predominio de apareamientos homoespecíficos que se vio en el control. Sin embargo, al final de la temporada reproductiva, se evidenció una disminución del aislamiento reproductivo ya en el control, y el tratamiento parece no generar cambios. Estos resultados son diferentes de los encontrados en los experimentos de simulación de desecación en *N. wattersi* (Grégoir et al., 2017), en los que los individuos que responden al tratamiento de desecación son los adultos, es decir, aquellos en los que la desecación del charco es un evento más probable. En ese sentido, qué tan probable sea un evento, y qué tan confiable sea su señal, podría ser importante en la modulación del comportamiento reproductivo en las hembras de *Austrolebias*. Es posible que el avance de la temporada reproductiva sea una señal más confiable de la reducción de la supervivencia que la profundidad del charco, ya que la profundidad de los charcos es muy variable entre años y entre poblaciones, y puede variar a lo largo de la temporada reproductiva dependiendo del régimen de lluvias. En esta línea, es posible que para las hembras de *Austrolebias*, el avance de la temporada reproductiva sea una señal de reducción de las expectativas de supervivencia lo suficientemente confiable para modificar su comportamiento reproductivo, independientemente de los niveles de profundidad; lo que explicaría la disminución del aislamiento reproductivo en el control de final de temporada. En este sentido, se ha propuesto que las estrategias reproductivas que se desatan como respuesta a una disminución de las expectativas de reproducción futura, un fenómeno conocido como inversión terminal, se desatan al

superar umbrales, y que éstos pueden ser dinámicos y depender de las señales de reducción de expectativas de vida (Duffield et al., 2017).

Cortejos y agresión

A diferencia de lo que sucede con los apareamientos, el mantenimiento experimental parecería no tener efecto en el comportamiento de los machos, tanto en los cortejos realizados como en la agresión; sin embargo, la temporada reproductiva sí mostró tener un efecto sobre su comportamiento. Los machos aumentaron la frecuencia de cortejos y la agresión al final de la temporada. Sorpresivamente, la temporada no tuvo efecto en la predominancia de los cortejos homoespecíficos sobre los heteroespecíficos, ya que los machos realizaron más cortejos homoespecíficos que heteroespecíficos en ambos momentos de la temporada reproductiva.

Efecto del riesgo de desecación

La profundidad del agua parece no haber tenido un efecto en el comportamiento de los machos. La no existencia de un efecto de la profundidad de agua al final de la temporada podría deberse, al igual que se propuso para las hembras, a que el avance de la temporada reproductiva podría ser una señal suficientemente fuerte para modificar el comportamiento reproductivo incluso en ausencia de desecación. En este sentido, aumentan la cantidad de cortejos realizados y los niveles de agresión; por lo que es evidente que la temporada tiene un efecto sobre el comportamiento de los machos. Respecto al inicio de la temporada, la inexistencia de estrategias alternativas ante la señal de disminución de profundidad, podría estar relacionada con la fiabilidad de la señal de desecación en ya que, al inicio de la temporada reproductiva, la señal de desecación podría no ser muy confiable. En esta misma línea van los resultados que se obtuvieron con los experimentos de desecación de *N. wattersi*, en los que los individuos jóvenes no respondieron a la señal de desecación, posiblemente por ser una señal no tan confiable temprano en su vida (Grégoir et al., 2017). Sin embargo, la diferencia entre el comportamiento de machos y hembras podría radicar en el costo de responder o no a esta señal. Mientras que para las hembras podría ser muy costoso no responder a la desecación porque han tenido menos oportunidades de aparearse y han generado gametos más costosos, puede no ser ventajoso para los machos responder a la señal, ya que es de esperar que hayan tenido más eventos reproductivos que las hembras, y toda inversión reproductiva genera un costo. Sin embargo, los machos suelen tener

“poco que ganar y mucho que perder” al dejar pasar oportunidades reproductivas (Rosenthal, 2013), por lo que su comportamiento posiblemente pueda explicarse por otros factores. Por otro lado, los machos podrían ser menos sensibles que las hembras a los cambios en el nivel de agua, o una menor profundidad de agua podría imponerles menos costos. En apoyo a esta última alternativa, Grégoir y colegas (2017) no encontraron efectos del tratamiento de desecación sobre la supervivencia de los machos de *N. wattersi*, a pesar de que la supervivencia de las hembras se redujo considerablemente. El diseño experimental de esta tesis no permite poner a prueba estas posibilidades, que permanecen pendientes de ser evaluadas.

Efecto de la temporada reproductiva

También en contraste con las hembras, el momento de la temporada reproductiva no influyó sobre el predominio de cortejos homoespecíficos que realizaron los machos, que realizaron más cortejos homoespecíficos que heteroespecíficos en ambos momentos de la temporada reproductiva. Dicho predominio al inicio de la temporada puede responder a los costos que implica hibridar, y coincide con otros trabajos que han demostrado el rol de la elección de pareja de los machos en el mantenimiento del aislamiento reproductivo (Atsumi et al., 2019; Justus & Mendelson, 2018; Shahandeh et al., 2018; Van Huynh & Rice, 2019). Por otro lado, al final de la temporada, el predominio de cortejos homoespecíficos se puede explicar porque, en las poblaciones naturales, el OSR cambia hacia el final de la temporada, pasando a ser sesgado hacia los machos (Passos et al., 2014), por lo que los machos cuentan con más hembras disponibles que al inicio de la temporada. Se ha evidenciado que los individuos muestran mayor selectividad cuando la disponibilidad de parejas es mayor, lo que podría favorecer que los machos sigan realizando más cortejos homoespecíficos que heteroespecíficos (Atwell & Wagner, 2014; Holveck et al., 2015; Lipkowski et al., 2019; Scott et al., 2020; Willis et al., 2011). Sin embargo, teóricamente, la disminución en las expectativas de vida sería el factor que más promovería que los individuos sean menos selectivos (Gowaty & Hubbell, 2009). Además, tal como se mencionó para las hembras, el aumento en los niveles de cortisol al final de la temporada reproductiva, podría estar vinculado con una disminución de los niveles de selectividad (Davis & Leary, 2015; Passos et al., 2021; Vitousek & Romero, 2013), por lo que el avance de la temporada reproductiva en conjunto con los altos niveles de cortisol, debería sobrepasar el efecto del OSR sesgado hacia machos. Tomando en cuenta que los machos no muestran cambios en el predominio de los cortejos homoespecíficos en respuesta a la desecación ni a la

temporada, es posible que en los mismos no tengan mecanismos de regulación de la elección de pareja. Si bien las diferencias de plasticidad entre los sexos no están del todo claras, y hay evidencia de plasticidad distinta entre los sexos (Fox et al., 2019; Hangartner et al., 2022), en un meta análisis reciente (Hangartner et al., 2022), no se encontró evidencia de diferencias importantes en la plasticidad entre sexos en respuesta a condiciones térmicas, un factor que varía mucho en la temporada reproductiva de *Austrolebias*. En la misma línea, tanto hembras como machos del pez espinoso, *Gastrosteus aculeatus*, mostraron ajustar su comportamiento reproductivo ante cambios en la turbidez del agua (Candolin & Jensen, 2021), otro factor ampliamente variable durante la temporada reproductiva de *Austrolebias*. Por otro lado, resultados teóricos plantean que, a priori, las estrategias de disminución en la selectividad no tendrían por qué diferir entre los sexos; sin embargo, sí podrían diferir si los individuos de diferentes sexos estuvieran sujetos a diferentes presiones, como exposición a patógenos o depredadores (Gowaty & Hubbell, 2009). En este sentido, se ha evidenciado que el contexto social influye en la evolución de la plasticidad en el comportamiento reproductivo de machos de *Drosophila melanogaster*, en la que sólo en los machos de líneas evolutivas con un OSR sesgado a machos, aparece plasticidad en los cortejos; mientras que eso no sucede con machos de líneas evolutivas sin sesgo, o sesgadas a hembras (Dore et al., 2021), por lo que las condiciones de OSR podrían jugar un rol en la existencia de mecanismos de plasticidad en la elección de parejas que existen entre hembras y machos de *Austrolebias*.

Por el contrario, la temporada reproductiva sí influyó en el nivel de actividad reproductiva y de competencia intrasexual, ya que los machos realizaron más cortejos, despliegues laterales, despliegues sigmoides y persecuciones al final de la temporada reproductiva. Estos resultados coinciden con lo esperado según los niveles de cortisol y su rol en la reproducción en estas especies, en las que el incremento de cortisol está vinculado con un aumento en el esfuerzo reproductivo (Passos et al., 2021). Específicamente, el tratamiento de cortisol en laboratorio generó que los machos cortejaran más, y que su coloración se vuelva más brillante (Passos et al., 2021). De la misma forma, el aumento de agresión podría estar vinculado con los niveles elevados de cortisol, ya que los glucocorticoides han sido vinculados con aumentos de agresión en algunos casos (Dunlap et al., 2002; Kruk et al., 2004), y si bien también hay evidencias de que pueden disminuir la agresión (Denardo & Licht, 1993), sus efectos son contexto-dependiente (Summers et al., 2005). En este sentido, el aumento de agresión al final de la temporada puede ser interpretado como otro componente del aumento del esfuerzo reproductivo de final de temporada que se observa en estas especies, ya que los machos dominantes

pueden monopolizar territorios de desove (Fabra, 2011). Por otro lado, de acuerdo a los cambios de OSR que ocurren en las poblaciones naturales, se esperaría una menor agresión al final de la temporada reproductiva, ya que el OSR se sesga hacia las hembras (Passos et al., 2014), sin embargo, existe evidencia de que en otros peces la temporada reproductiva puede modular la agresión independientemente de los sesgos en el OSR, como ocurre con *G. aculeatus* (Tinghitella et al., 2013).

El aumento de la agresión al final de la temporada podría impactar en el aislamiento reproductivo al disminuir las parejas disponibles o al generar cambios en las elecciones de las hembras. Previamente se reportó que los machos de *A. reicherti* agreden más a los machos homoespecíficos mientras que los machos de *A. charrua* agreden a ambas especies por igual, y se planteó que dicho escenario podría facilitar la hibridación al disminuir el acceso de las hembras de *A. reicherti* a los machos homoespecíficos (Rivas, 2018). Además, la competencia también puede promover la hibridación al impactar en la elección de las hembras. Si las hembras eligen a los machos según su nivel de agresión o según el resultado de las contiendas más que por la especie, un mayor nivel de agresión al final de la temporada podría promover los eventos de hibridación (por ejemplo, Grava et al., 2012; Sefc et al., 2015). En este sentido, la competencia en *Austrolebias* podría limitar el acceso a las áreas de desove, ya que los machos dominantes monopolizan dichas áreas en experimentos en laboratorio (Fabra, 2011). Sin embargo, el impacto de dicho comportamiento puede ser diferente en las poblaciones naturales, ya que las áreas de desove pueden ser más abundantes. Además, el resultado de las contiendas parece no impactar en las preferencias de las hembras de *Austrolebias* (Passos et al., 2013). Por otro lado, los resultados de esta tesis demuestran que los machos realizan más cortejos homoespecíficos que heteroespecíficos, en ambos momentos de la temporada reproductiva. En este sentido, si la competencia no impacta en la disponibilidad de machos en las poblaciones naturales o en las elecciones de las hembras, el comportamiento de los machos podría actuar promoviendo el aislamiento reproductivo. Sin embargo, los resultados de esta tesis demuestran que el aislamiento reproductivo disminuye al final de la temporada reproductiva a pesar de que los machos realizan más cortejos homoespecíficos que heteroespecíficos.

En estas especies, es la primera vez que se informa que los machos son capaces de reconocer y elegir entre hembras homoespecíficas y heteroespecíficas. El hecho de que los machos hayan realizado más cortejos homoespecíficos que heteroespecíficos, y que hayan demostrado un aumento de la actividad reproductiva, tanto en cortejos como en

agresión, mueve a los machos del rol pasivo que se les asignó previamente en el aislamiento reproductivo. Estos resultados van en consonancia con la evidencia creciente de que los machos pueden mostrar preferencias por hembras homoespecíficas (Atsumi et al., 2019; Justus & Mendelson, 2018; Shahandeh et al., 2018; Van Huynh & Rice, 2019). Sin embargo, es de notar que, a pesar de que los cortejos de los machos tenderían a reforzar el aislamiento reproductivo entre *A. reicherti* y *A. charrua*, este comportamiento no se reflejó en los apareamientos, ya que no hubo diferencias en el número de apareamientos homoespecíficos y heteroespecíficos al final de la temporada reproductiva. El hecho de que las hembras acepten apareamientos homoespecíficos y heteroespecíficos por igual en condiciones de baja expectativa de vida, podría ser un comportamiento favorecido por la selección. Si la plasticidad en sí misma genera un aumento en el éxito reproductivo de las hembras capaz de contrarrestar la disminución del éxito reproductivo y de supervivencia de los híbridos, la selección podría favorecer que las hembras no prioricen los apareamientos homoespecíficos en condiciones de baja expectativa de supervivencia. Si la plasticidad materna es heredable, el hecho de que se transmita a la descendencia y que asegure la reproducción de la misma, podría jugar un rol en el éxito reproductivo de las hembras y favorecer el mantenimiento de la plasticidad, lo que podría explicar que las hembras aumenten los apareamientos heteroespecíficos al final de la temporada reproductiva aún en presencia de machos homoespecíficos que las cortejan. En este sentido, hay evidencias de que la selección sexual puede favorecer la transmisión de la plasticidad a la progenie. Las hembras de *S. multiplicata* eligen machos con rasgos que indican que su descendencia será plástica en su comportamiento (Kelly et al., 2019). En dicho escenario, cabe preguntarse qué sucede con la heredabilidad de la plasticidad en las hembras de *Austrolebias*. Otra posibilidad sería que al final de la temporada los machos heteroespecíficos se vuelvan más valiosos o que los híbridos tengan ventajas sobre la descendencia pura, como ocurre con *S. bombifrons* (Pfennig, 2007). Sin embargo, no hay información de si el éxito reproductivo y de supervivencia de los híbridos varía dentro de la temporada reproductiva; por lo que dicho escenario permanece pendiente de ser puesto a prueba.

Huevos desovados

No se constataron efectos del riesgo de desecación ni de la temporada en el número de huevos desovados. Respecto al riesgo de desecación, estos resultados difieren de los encontrados para *N. wattersi*, en los que las hembras del tratamiento de desecación

aumentaron en un 100% los huevos desovados (Grégoir et al., 2017). Por otro lado, sería esperable un aumento de los huevos desovados hacia el final de la temporada reproductiva, ya que se evidenció un aumento del número de cortejos y de apareamientos heteroespecíficos al final de la temporada. Si bien por la historia de vida de estos organismos, es esperable que el nivel de esfuerzo reproductivo siempre sea alto, se puede descartar que las hembras estén dando su máximo esfuerzo reproductivo en todo momento de la temporada reproductiva, ya que al final de la misma, éstas aumentan su esfuerzo de producción de vitelogenina (Passos et al., 2021). Sin embargo, un aumento de vitelogenina podría implicar el desove de huevos más grandes, y no necesariamente de más huevos. Existe evidencia de que las hembras de otras especies son capaces de modificar el tamaño de sus huevos en función de ciertas variables (Amiri et al., 2020; Kolm, 2001; Steigenga et al., 2005; Vrtílek & Reichard, 2015). Por ejemplo, las hembras de *N. furzeri* modifican el tamaño y número de sus huevos dependiendo de su edad, con las hembras de mayor edad desovando huevos más grandes en lugar de aumentar el tamaño de la puesta (Vrtílek & Reichard, 2015), lo que coincidiría con un aumento en el tamaño de los huevos al final de la temporada reproductiva de *Austrolebias*. Sin embargo, la estrategia de desovar menos huevos al final de la temporada no parece encajar con el patrón general de aumento de actividad reproductiva en *Austrolebias*, y sería explicable únicamente si los huevos más grandes implicaran una ventaja para los alevines únicamente al final de la temporada reproductiva, evento del que no hay información en *Austrolebias*, y que parece no aplicar tampoco en *Nothobranchius*, para quienes el tamaño del huevo no parece tener vínculo con la probabilidad de supervivencia de los embriones (Reichard, 2016). Alternativamente, es posible que el aumento de esfuerzo reproductivo de final de temporada no se refleje en el nivel de desove debido a restricciones metodológicas, como el tiempo de duración de las pruebas de interacción libre, o el reducido número de réplicas. En apoyo a esta alternativa, si bien la diferencia en el número de huevos del inicio y el final de la temporada no fue significativa, la media estimada de huevos desovados al final de la temporada reproductiva aumentó en un 35,44% respecto al inicio de la temporada.

Discusión general

De este trabajo se desprende el resultado de que el aislamiento reproductivo entre *A. reicherti* y *A. charrua* es modulado por las expectativas de supervivencia y reproducción futura, y que éstas son señalizadas por el riesgo de desecación y la temporada reproductiva. Específicamente, en los experimentos de interacción libre, en los que no solo entra en juego la elección de pareja sino las interacciones competitivas, el aislamiento reproductivo disminuyó en condiciones de reducción de la expectativa de vida. Adicionalmente, el aislamiento reproductivo no solamente disminuyó, sino que esa relajación del aislamiento reproductivo impactó directamente en los niveles de hibridación, que aumentaron al final de la temporada reproductiva. Además, este trabajo informa que la selectividad de las hembras también se debilita en condiciones de reducción de las expectativas de vida, y que la actividad reproductiva intersexual e intrasexual aumenta hacia el final de la temporada reproductiva.

Cuando se consideran los resultados de las pruebas de elección entre dos estímulos en conjunto con los resultados de las pruebas de interacción libre, y con los resultados de trabajos anteriores, destacan algunas situaciones.

Un evento notorio, es que las preferencias expresadas en las pruebas de elección entre dos estímulos no se trasladan a las pruebas de interacción libre. Dicha diferencia podría explicarse por el efecto de la experiencia. La experiencia puede modular las elecciones reproductivas (Ah-King, 2019; Ah-King & Gowaty, 2016; C. W. Miller & Svensson, 2014; Rosenthal, 2017), y se han documentado casos en los que esto ocurre entre individuos de distintas especies (Izzo & Gray, 2011; Magurran & Ramnarine, 2004; Verzijden et al., 2012). Por ejemplo, los machos del pez *Poecilia reticulata* provenientes de poblaciones alopátricas y sin experiencia previa con hembras de *P. picta*, no muestran preferencias por las hembras homoespecíficas o heteroespecíficas. Sin embargo, luego de una semana de interacción con hembras heteroespecíficas, aprenden a distinguir las y muestran preferencias por hembras homoespecíficas (Magurran & Ramnarine, 2004). Resultados similares se obtuvieron para las hembras de *Xiphophorus malinche*, que no muestran preferencias por individuos homoespecíficos o heteroespecíficos cuando son expuestas a machos homoespecíficos, pero muestran preferencias por machos homoespecíficos luego de convivir por varios días con machos de *X. birchmanni* (Verzijden et al., 2012). Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos en esta tesis. Mientras que los individuos de las pruebas de preferencia no habían tenido experiencia previa con individuos heteroespecíficos, porque provenían de poblaciones

alopátridas, los individuos de las pruebas de interacción libre habían tenido experiencia con individuos de ambas especies durante dos semanas, en las que podrían haber aprendido a distinguirlos. Si bien también se ha documentado que el aprendizaje también puede tener efectos distintos (Verzijden et al., 2012), y las pruebas de elección entre dos estímulos y las pruebas de interacción libre no son comparables, se abre la posibilidad de que el aprendizaje, por medio de la experiencia, tenga un rol en el aislamiento reproductivo en estas especies. Por otro lado, mientras que las preferencias son representaciones internas (Dougherty, 2020; Rosenthal, 2017) de las potenciales parejas, la elección de pareja es el resultado de muchos factores que interactúan entre sí e influyen en la elección de la pareja (Cotton et al., 2006), por lo que las preferencias no siempre se reflejan en la elección de pareja (Cotton et al., 2006; Rosenthal, 2017). Entre los factores que influyen en la elección de pareja, se incluyen las interacciones competitivas (Cotton et al., 2006; Dougherty, 2020), y, en ocasiones, es difícil separar el rol de las interacciones intersexuales de la competencia intrasexual en la elección de pareja (Dougherty, 2020; C. W. Miller & Svensson, 2014). Sin embargo, este no parece ser el caso en este trabajo. En *Austrolebias*, los machos dominantes suelen monopolizar las áreas de desove y expresan sus preferencias reproductivas libremente (Fabra, 2011), y los resultados de esta tesis muestran que la elección de pareja de los machos no coincide con la de las hembras, lo que sugiere que las hembras son capaces de mantener sus elecciones de pareja con cierta independencia de las de los machos, evento que ha sido documentado en otras especies (Friberg et al., 2008; Swenton, 2011). Los resultados obtenidos en esta tesis contrastan con los obtenidos en trabajos previos en *Austrolebias*, en los que las pruebas de elección dual y de interacción libre arrojaron resultados similares (Passos, 2013). La alternativa del aprendizaje permite explicar por qué los resultados de Passos (2013) no coinciden con los obtenidos en esta tesis, ya que, en dicho trabajo los individuos empleados en las pruebas de elección entre dos estímulos no habían experimentado un tratamiento de convivencia.

Al contrario de lo evidenciado en esta tesis, las pruebas realizadas previamente por Passos (2013) no identificaron diferencias en el número de cortejos y apareamientos homoespecíficos y heteroespecíficos, ni preferencias por estímulos homoespecíficos y heteroespecíficos en individuos provenientes de poblaciones alopátridas. Las diferencias en los resultados podrían deberse a diferencias metodológicas. Los individuos empleados en el trabajo de Passos (2013) provenían de varias poblaciones diferentes, mientras que en esta tesis todos los individuos de la misma especie provenían de la misma población. Los diversos factores que moldean el comportamiento reproductivo (Ah-King, 2019; Ah-King & Gowaty, 2016; Cotton et al., 2006; Dougherty,

2020; Jennions & Petrie, 1997; C. W. Miller & Svensson, 2014; Rosenthal, 2017), que podrían variar entre poblaciones, en conjunto con la extraordinaria plasticidad y capacidad de responder al contexto ambiental y social que los rodea (Berrosteguieta, 2020; Passos et al., 2014, 2021), sugieren que es posible que los resultados obtenidos en cada trabajo dependan de las condiciones a las que se han expuesto sus individuos, y a la heterogeneidad u homogeneidad de las muestras. Lejos de invalidar los resultados de alguno de estos dos trabajos, la diferencia en los resultados obtenidos puede ser considerada como una muestra más de cómo las condiciones de cada individuo, influidas por su origen, contexto social, experiencia y expectativa de vida, son modeladoras de las decisiones reproductivas en este grupo de animales tan particulares y tan sorprendentes.

Consecuencias de la debilitación del aislamiento reproductivo

El impacto que puede tener la hibridación en las poblaciones es variado, y depende de varios factores, incluyendo el éxito darwiniano de los híbridos y la acción de la selección (Irwin & Schluter, 2022), por lo que es difícil predecir cuál es el impacto de la relajación del aislamiento reproductivo en estas especies. Por un lado, se sabe que el aislamiento reproductivo puede permanecer incompleto durante largos períodos de tiempo y llegar a alcanzar equilibrios estables, y que las especies pueden mantener ciertos niveles de flujo génico y aun así mantener sus identidades como especies (Barton, 2020; Servedio & Hermisson, 2020). Específicamente, se ha planteado que las estrategias reproductivas plásticas en las que la selectividad es contexto-dependiente, como es el caso en estas especies, pueden llevar a casos de aislamiento reproductivo parcial estable en el tiempo (Servedio & Hermisson, 2020). En este sentido, los genomas de *Austrolebias* sugieren indicios de eventos de hibridación a lo largo de su historia evolutiva (García, 2006), lo que sugiere que estas especies pueden ser capaces de mantener su identidad aún en presencia de eventos de flujo génico. También se ha señalado que la hibridación puede causar la fusión de dos especies en una sola (Irwin & Schluter, 2022), o dar origen a nuevas especies mediante la especiación híbrida (Abbott et al., 2013; Abbott et al., 2010; Mallet, 2007). En este sentido, si bien los híbridos de las cruas entre *A. reicherti* y *A. charrua* son viables y producen descendencia fértil, muestran un éxito reducido respecto a las cruas homoespecíficas (Passos, 2013), por lo que es esperable que la selección penalice la hibridación y limite el flujo génico entre estas especies. En otro escenario, la hibridación puede causar introgresión, es decir, la incorporación de alelos de una especie en el genoma de otra especie (Pfennig, 2021),

generalmente mediante retrocruzas con los parentales. En este sentido, las retrocruzas han demostrado ser la cruce híbrida con menos éxito entre *A. reicherti* y *A. charrua* (Passos, 2013), por lo que la introgresión parece limitada. A pesar de esto, se ha propuesto que, en la zona de contacto entre *A. reicherti* y *A. charrua*, podría ocurrir introgresión (García et al., 2009; García, 2006), por lo que no se puede descartar su impacto.

Además, se ha planteado que la plasticidad podría influir en la persistencia de las poblaciones ante riesgos de extinción, particularmente los vinculados con el cambio climático (Fox et al., 2019; Hangartner et al., 2022). En este contexto, se ha señalado que la plasticidad de la selección sexual puede jugar un rol importante en las respuestas rápidas ante el cambio ambiental (Fuxjäger et al., 2019). En el caso particular de *Austrolebias*, es esperable que el cambio climático impacte en los ciclos de los charcos, modificando la duración de las temporadas reproductivas, por lo que es posible que influya en las poblaciones naturales por medio de la plasticidad de la selectividad. Sin embargo, un aumento de la plasticidad implica un aumento de la hibridación, y los híbridos tienen un éxito reducido (Passos, 2013), por lo que es difícil predecir el impacto. En este sentido, numerosos autores han traído atención sobre la importancia de estudiar el impacto de la hibridación en las especies a la luz del cambio climático y el aumento de temperaturas (C. W. Miller & Svensson, 2014; Todesco et al., 2016).

Aportes de la tesis

Esta tesis es un aporte al cuerpo de datos creciente sobre los factores moduladores del aislamiento reproductivo y la hibridación, y, especialmente, a su dinámica temporal. Estos resultados se suman a los no muy abundantes trabajos (por ejemplo, Pilakouta et al., 2017; Willis et al., 2011, 2012) que evidencian que la plasticidad comportamental puede actuar a nivel interespecífico, impactando en el aislamiento reproductivo. Algunos autores han señalado la importancia del estudio experimental para comprender cómo las distintas variables influyen en la elección de pareja y en las trayectorias del aislamiento reproductivo entre las especies, y cómo estos pueden variar en el tiempo y afectar a las poblaciones (Rios Moura et al., 2021; Schumer et al., 2017; Stankowski & Ravinet, 2021; Willis, 2013). Sin embargo, si bien existen numerosos trabajos que estudian cómo la hibridación y el aislamiento reproductivo pueden variar en el espacio (por ejemplo, Moran & Fuller, 2018; Pfennig, 2000; Yang et al., 2016), el estudio de cómo varía la hibridación en el tiempo es un área menos explorada, de la que queda mucho para desentrañar. En este sentido, este trabajo es una evidencia importante a una temática que ha sido poco explorada. Asimismo, estos resultados se suman a los trabajos que mueven a la hibridación de la visión que la posicionaba como un error y que la empiezan a considerar como otro resultado posible de un apareamiento (Willis, 2013).

Por otra parte, este trabajo representa un aporte crucial al cuerpo de conocimiento de selección sexual y comportamiento reproductivo en *Austrolebias*. Si bien se conocía que la temporada reproductiva influye en las decisiones reproductivas de las hembras de *Austrolebias*, es la primera vez que se pone a prueba el efecto de la temporada reproductiva en las elecciones reproductivas interespecíficas, ya que los antecedentes informaban la pérdida de selectividad de las hembras por una característica de los machos de su propia especie (Passos et al., 2014). Además, esta tesis evidencia por primera vez que el riesgo de desecación también influye en las elecciones reproductivas de *Austrolebias*. Estos hallazgos en conjunto confirman que las expectativas de supervivencia afectan el comportamiento reproductivo de estas especies, y que esto no ocurre solo en las preferencias reproductivas intraespecíficas sino también a nivel interespecífico, lo que impacta directamente en el aislamiento reproductivo entre ellas. Por otro lado, esta tesis confirma por primera vez que los individuos de *Austrolebias* aumentan su actividad reproductiva en respuesta al avance de la temporada, tanto en el número de cortejos realizados, como en el número de apareamientos

heteroespecíficos y en los niveles de competencia intrasexual. Si bien se conocía el efecto del cortisol en individuos de laboratorio, y se lo había vinculado con un aumento del esfuerzo reproductivo al final de la temporada (Passos et al., 2021), hasta ahora no se había puesto a prueba directamente el efecto de la temporada en el nivel de actividad reproductiva en animales provenientes de poblaciones naturales. Por otra parte, este trabajo evidencia por primera vez que los machos de estas especies reconocen entre las hembras homoespecíficas y heteroespecíficas, y que eligen a las hembras homoespecíficas, hecho que coincide con la literatura creciente que documenta la existencia de preferencias reproductivas en los machos (Atsumi et al., 2019; Justus & Mendelson, 2018; Shahandeh et al., 2018; van Huynh & Rice, 2019). En definitiva, este trabajo evidencia el potencial que tiene este par de especies para aportar al conocimiento sobre la modulación del comportamiento reproductivo en general, y especialmente del aislamiento reproductivo; y en conjunto con los trabajos previos (Passos et al., 2014, 2021), consolida a este par de especies como un modelo de estudio de las dinámicas temporales del comportamiento reproductivo y la selección sexual.

Otras contribuciones de esta tesis

Este trabajo fue presentado en dos congresos:

- Rivas, N., D'Anatro, A. & Passos, C. (2021). Strength of reproductive isolation between *Austrolebias reicherti* and *A. charrua* varies depending on life expectancies. Póster presentado en The 4th Nothobranchius Symposium, República Checa.
- Rivas, N., D'Anatro, A. & Passos, C. (2021). La fuerza del aislamiento reproductivo entre *Austrolebias reicherti* y *A. charrua* varía dependiendo de las expectativas de vida. Video corto presentado en III Reunión de Biología del Comportamiento del Cono Sur, Brasil.

Además, se prevé que los resultados de esta tesis sean sometidos a la revista arbitrada *Journal of Evolutionary Biology*:

Rivas, N. & Passos, C. The reduction in survival expectancies increases the hybridization between the annual fishes *Austrolebias reicherti* y *A. charrua*.

Fuentes de financiación

Beca de finalización del posgrado de la Comisión Académica de Posgrado, UdelaR, Uruguay. Período 2022.

Beca de posgrado nacional de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Uruguay. Período 2020 – 2022.

Perspectivas y limitaciones

Durante la realización de esta maestría se avanzó en dos aspectos íntimamente vinculados con esta tesis, que constituyen dos grandes perspectivas. La primera consiste en la elaboración del manuscrito del trabajo cuyos resultados sientan las bases teóricas de esta tesis, y la segunda consiste en la estimación de las frecuencias de hibridación de las poblaciones del mantenimiento experimental. Ambos son trabajos en proceso, y se detallan en el anexo.

Asimismo, de este trabajo también se desprenden otros aspectos a explorar. Por un lado, sería importante realizar los mismos experimentos con individuos colectados en poblaciones cercanas a la zona de contacto. Esto permitiría evaluar cómo varía el aislamiento reproductivo en aquellas poblaciones que tienen una posibilidad mayor de contacto con los individuos de la especie hermana. Por otro lado, esta investigación abre dudas sobre la existencia de mecanismos que expliquen las preferencias por los machos heteroespecíficos que mostraron las hembras de *A. charrua*, así como sobre las diferencias en los mecanismos de plasticidad entre hembras y machos, y sobre un posible rol del aprendizaje en el reconocimiento de individuos homoespecíficos en poblaciones alopátridas. Dichos escenarios permanecen pendientes de ser puestos a prueba.

Por su parte, este trabajo presenta algunos aspectos que podrían mejorar. Principalmente, el bajo número de réplicas de los experimentos. Sobre todo, en las pruebas de interacción libre, que requieren 4 individuos emparejados por tamaño. Estas especies son nativas y han sido declaradas como especies prioritarias para la conservación por el Sistema Nacional de Áreas Protegidas, con *A. reicherti* identificada como una especie amenazada (Soutullo et al., 2013), por lo que el número de animales colectados se redujo lo más posible. En este sentido, es un plan del grupo de trabajo el explorar la utilidad de animaciones digitales para reducir el número de animales empleados en las pruebas. Por otro lado, si bien los experimentos en laboratorio son cruciales para entender los factores que impactan en el aislamiento reproductivo, representan escenarios simplificados. Sería una ganancia realizar ensayos comportamentales en poblaciones naturales, sin embargo, la visibilidad dentro de los charcos es muy restringida e imposibilita realizar observaciones dentro de cada charco. En este sentido, la estimación de las frecuencias de hibridación de las poblaciones de mantenimiento experimental, puede arrojar luz sobre el aislamiento reproductivo de estos animales en condiciones más complejas.

Referencias bibliográficas

- Abbott, R., Albach, D., Ansell, S., Arntzen, J. W., Baird, S. J. E., Bierne, N., Boughman, J., Brelsford, A., Buerkle, C. A., Buggs, R., Butlin, R. K., Dieckmann, U., Eroukhmanoff, F., Grill, A., Cahan, S. H., Hermansen, J. S., Hewitt, G., Hudson, A. G., Jiggins, C., ... Zinner, D. (2013). Hybridization and speciation. In *Journal of Evolutionary Biology* (Vol. 26, Issue 2, pp. 229–246). <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02599.x>
- Abbott, R. J., Hegarty, M. J., Hiscock, S. J., & Brennan, A. C. (2010). Homoploid hybrid speciation in action. *Taxon*, 59(5), 1375–1386.
- Ah-King, M. (2019). Flexible mate choice. In *Encyclopedia of Animal Behavior* (pp. 421–431). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.01280-2>
- Ah-King, M., & Gowaty, P. A. (2016). A conceptual review of mate choice: stochastic demography, within-sex phenotypic plasticity, and individual flexibility. In *Ecology and Evolution* (Vol. 6, Issue 14, pp. 4607–4642). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/ece3.2197>
- Amiri, E., Le, K., Melendez, C. V., Strand, M. K., Tarpay, D. R., & Rueppell, O. (2020). Egg-size plasticity in *Apis mellifera*: Honey bee queens alter egg size in response to both genetic and environmental factors. *Journal of Evolutionary Biology*, 33(4), 534–543. <https://doi.org/10.1111/jeb.13589>
- Amorim, M. C. P., da Ponte, A. N., Caiano, M., Pedroso, S. S., Pereira, R., & Fonseca, P. J. (2013). Mate preference in the painted goby: The influence of visual and acoustic courtship signals. *Journal of Experimental Biology*, 216(21), 3996–4004. <https://doi.org/10.1242/jeb.088682>
- Applied Biosystems (2006). Peak Scanner™
- Armitage, K. B. (1991). Factors affecting corticosteroid concentrations in yellow-bellied marmots. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 98(1), 47–54.
- Atsumi, K., Kishida, O., & Koizumi, I. (2019). Visual preference of males for conspecific mates in mutually ornamented fish: possible support for the species recognition hypothesis. *Journal of Ethology*, 37(3), 353–362. <https://doi.org/10.1007/s10164-019-00610-9>
- Atwell, A., & Wagner, W. E. (2014). Female mate choice plasticity is affected by the interaction between male density and female age in a field cricket. *Animal Behaviour*, 98, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2014.10.007>

- Barton, N. H. (2020). On the completion of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 375(1806), 20190530.
- Baugh, A. T., Gall, M. D., Silver, S. C., & Bee, M. A. (2021). Moderately elevated glucocorticoids increase mate choosiness but do not affect sexual proceptivity or preferences in female gray treefrogs. *Hormones and Behavior*, 130, 104950.
- Becker, P. A., Miller, P. S., Gunther, M. S., Somers, M. J., Wildt, D. E., & Maldonado, J. E. (2012). Inbreeding avoidance influences the viability of reintroduced populations of African wild dogs (*Lycaon pictus*). *Plos One*, 7(5), e37181.
- Berois, N., Arezo, M.J., Papa, N.G. & Chalar, C. (2016). Life Cycle, Reproduction, and Development in Annual Fishes. Cellular and Molecular Aspects. En Berois, N., García, G. & O. De Sá, R. (Eds.) *Annual Fishes Life History Strategy, Diversity and Evolution* (pp. 33-42). Montevideo, Uruguay.
- Berrosteguieta, I. (2020). *Estudio de la neuroplasticidad en peces del género Austrolebias frente a cambios en la luminosidad*. [Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad de la República]
- Blažek, R., Polačik, M., & Reichard, M. (2013). Rapid growth, early maturation and short generation time in African annual fishes. *EvoDevo*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/2041-9139-4-24>
- Borg, Å. A., Forsgren, E., & Amundsen, T. (2006). Seasonal change in female choice for male size in the two-spotted goby. *Animal Behaviour*, 72(4), 763–771. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2005.11.025>
- Boughman, J. W. (2018). When does male competition foster speciation?: a comment on Tinghitella et al. *Behavioral Ecology*.
- Bronson, C. L., Grubb, T. C., Sattler, G. D., & Braun, M. J. (2003). Mate preference: A possible causal mechanism for a moving hybrid zone. *Animal Behaviour*, 65(3), 489–500. <https://doi.org/10.1006/anbe.2003.2103>
- Brooks, M. E., Kristensen, K., van Benthem, K. J., Magnusson, A., Berg, C. W., Nielsen, A., Skaug, H. J., Machler, M., & Bolker, B. M. (2017). glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. *The R Journal*, 9(2), 378–400.
- Burdfield-Steel, E. R., & Shuker, D. M. (2018). Divergence is not speciation, or why we need females: a comment on Tinghitella et al. *Behavioral Ecology*, 29(4), 801.

- Candolin, U., & Jensen, I. (2021). Phenotypic plasticity in courtship exposed to selection in a human-disturbed environment. *Evolutionary Applications*, 14(10), 2392–2401. <https://doi.org/10.1111/eva.13225>
- Chen, C., & Pfennig, K. S. (2020). Female toads engaging in adaptive hybridization prefer high-quality heterospecifics as mates. *Science*, 367(6484), 1377–1379. <https://doi.org/10.1126/science.aaz5109>
- Clarke, F. M., & Faulkes, C. G. (1999). Kin discrimination and female mate choice in the naked mole-rat *Heterocephalus glaber*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 266(1432), 1995–2002.
- Cotton, S., Small, J., & Pomiankowski, A. (2006). Sexual selection and condition-dependent mate preferences. *Current Biology*, 16(17), R755–R765.
- Cratsley, C. K., & Lewis, S. M. (2005). Seasonal variation in mate choice of *Photinus ignitus* fireflies. *Ethology*, 111(1), 89–100.
- Davis, A. G., & Leary, C. J. (2015). Elevated stress hormone diminishes the strength of female preferences for acoustic signals in the green treefrog. *Hormones and Behavior*, 69, 119–122. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.01.005>
- De Boer, R. A., Vega-Trejo, R., Kotrschal, A., & Fitzpatrick, J. L. (2021). Meta-analytic evidence that animals rarely avoid inbreeding. *Nature Ecology & Evolution*, 5(7), 949–964.
- DeNardo, D. F., & Licht, P. (1993). Effects of corticosterone on social behavior of male lizards. *Hormones and Behavior*, 27(2), 184–199.
- Dore, A. A., Rostant, W. G., Bretman, A., & Chapman, T. (2021). Plastic male mating behavior evolves in response to the competitive environment. *Evolution*, 75(1), 101–115. <https://doi.org/10.1111/evo.14089>
- Dorsey, O. C., & Rosenthal, G. G. (2022). A taste for the familiar: explaining the inbreeding paradox. *Trends in Ecology & Evolution*.
- Dougherty, L. R. (2020). Designing mate choice experiments. *Biological Reviews*, 95(3), 759–781. <https://doi.org/10.1111/brv.12586>
- Dougherty, L. R. (2021). Meta-analysis shows the evidence for context-dependent mating behaviour is inconsistent or weak across animals. *Ecology Letters*, 24(4), 862–875.

- Douma, J. C., & Weedon, J. T. (2019). Analysing continuous proportions in ecology and evolution: A practical introduction to beta and Dirichlet regression. *Methods in Ecology and Evolution*, *10*(9), 1412–1430.
- Duffield, K. R., Bowers, E. K., Sakaluk, S. K., & Sadd, B. M. (2017). A dynamic threshold model for terminal investment. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *71*(12), 1–17.
- Dunlap, K. D., Pelczar, P. L., & Knapp, R. (2002). Social interactions and cortisol treatment increase the production of aggressive electrocommunication signals in male electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *Hormones and Behavior*, *42*(2), 97–108. <https://doi.org/10.1006/hbeh.2002.1807>
- Edomwande, C., & Barbosa, F. (2020). The influence of predation risk on mate signaling and mate choice in the lesser waxmoth *Achroia grisella*. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57481-1>
- Emlen, S. T., & Oring, L. W. (1977). Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science*, *197*(4300), 215–223.
- Espinedo, C. M., Gabor, C. R., & Aspbury, A. S. (2010). Males, but not females, contribute to sexual isolation between two sympatric species of *Gambusia*. *Evolutionary Ecology*, *24*(4), 865–878. <https://doi.org/10.1007/s10682-009-9343-z>
- Fabra, A. L. (2011). *Comportamiento agonístico en machos de Austrolebias reicherti*. [Tesina de grado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República]
- Ferrari, S., & Cribari-Neto, F. (2004). Beta regression for modelling rates and proportions. *Journal of Applied Statistics*, *31*(7), 799–815.
- Forsgren, E., Amundsen, T., Borg, Å. A., & Bjelvenmark, J. (2004). Unusually dynamic sex roles in a fish. *Nature*, *429*(6991), 551–554. <https://doi.org/10.1038/nature02562>
- Fox, R. J., Donelson, J. M., Schunter, C., Ravasi, T., & Gaitán-Espitia, J. D. (2019). Beyond buying time: the role of plasticity in phenotypic adaptation to rapid environmental change. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, *374*(1768), 20180174
- Friard, O., & Gamba, M. (2016). BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods in Ecology and Evolution*, *7*(11), 1325–1330.
- Friberg, M., Vongvanich, N., Borg-Karlson, A. K., Kemp, D. J., Merilaita, S., & Wiklund, C. (2008). Female mate choice determines reproductive isolation between sympatric

butterflies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62(6), 873–886.
<https://doi.org/10.1007/s00265-007-0511-2>

Frommen, J. G., & Bakker, T. C. M. (2006). Inbreeding avoidance through non-random mating in sticklebacks. *Biology Letters*, 2(2), 232–235. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0432>

Fuxjäger, L., Wanzenböck, S., Ringler, E., Wegner, K. M., Ahnelt, H., & Shama, L. N. S. (2019). Within-generation and transgenerational plasticity of mate choice in oceanic stickleback under climate change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1768). <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0183>

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.

García, G. (2006). Multiple simultaneous speciation in killifishes of the *Cynolebias adloffii* species complex (Cyprinodontiformes, Rivulidae) from phylogeography and chromosome data. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 44(1), 75–87. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2005.00346.x>

García, G., Gutiérrez, V., Ríos, N., & O de Sá, R. (2016). Comparative phylogeographic patterns in *Austrolebias* from different South American basins. En Berois, N., García, G. & O. De Sá, R. (Eds.) *Annual Fishes Life History Strategy, Diversity and Evolution*. (pp. 259-279). Montevideo, Uruguay.

García, G., Gutiérrez, V., Ríos, N., Papa, N., Serra, S., & Loureiro, M. (2020). Characterization of a hybrid zone between two annual killifish genus *Austrolebias* from the Biosphere Reserve and Ramsar Sites in South America. *Hydrobiologia*, 847(2), 421–442. <https://doi.org/10.1007/s10750-019-04104-0>

García, G., Gutiérrez, V., Ríos, N., Turner, B., Santiñaque, F., López-Carro, B., & Folle, G. (2014). Burst speciation processes and genomic expansion in the neotropical annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Genetica*, 142(1), 87–98. <https://doi.org/10.1007/s10709-014-9756-7>

García, G., Loureiro, M., Berois, N., Arezo, M. J., Casanova, G., Clivio, G., & Olivera, A. (2009). Pattern of differentiation in the annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from a biosphere reserve site in South America: A multidisciplinary approach. *Biological Journal of the Linnean Society*, 98(3), 620–635. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2009.01303.x>

- Genovart, M. (2009). Natural hybridization and conservation. *Biodiversity and Conservation*, 18(6), 1435–1439. <https://doi.org/10.1007/s10531-008-9550-x>
- Giammanco, M., Tabacchi, G., Giammanco, S., di Majo, D., & la Guardia, M. (2005). Testosterone and aggressiveness. *Med Sci Monit*, 11(4), 136–145.
- Gowaty, P. A., & Hubbell, S. P. (2005). Chance, time allocation, and the evolution of adaptively flexible sex role behavior. *Integrative and Comparative Biology*, 45(5), 931–944.
- Gowaty, P. A., & Hubbell, S. P. (2009). Reproductive decisions under ecological constraints: it's about time. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(supplement_1), 10017–10024.
- Gownaris, N. J., García Borboroglu, P., & Boersma, P. D. (2020). Sex ratio is variable and increasingly male biased at two colonies of Magellanic penguins. *Ecology*, 101(3), e02939.
- Goymann, W., Landys, M. M., & Wingfield, J. C. (2007). Distinguishing seasonal androgen responses from male-male androgen responsiveness-Revisiting the Challenge Hypothesis. *Hormones and Behavior*, 51(4), 463–476. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.01.007>
- Grava, A., Grava, T., Didier, R., Lait, L. A., Dosso, J., Koran, E., Burg, T. M., & Otter, K. A. (2012). Interspecific dominance relationships and hybridization between black-capped and mountain chickadees. *Behavioral Ecology*, 23(3), 566–572.
- Grégoir, A. F., Philippe, C., Pinceel, T., Reniers, J., Thoré, E. S. J., Vanschoenwinkel, B., & Brendonck, L. (2017). Life stage dependent responses to desiccation risk in the annual killifish *Nothobranchius wattersi*. *Journal of Fish Biology*, 91(3), 880–895. <https://doi.org/10.1111/jfb.13385>
- Gutiérrez, V., Pereyra, S., Ríos, N., & García, G. (2014). Isolation and characterization of eight microsatellites from the South American annual fish *Austrolebias charrua*. *Conservation Genetics Resources*, 6(4), 991–993.
- Hangartner, S., Sgrò, C. M., Connallon, T., & Booksmythe, I. (2022). Sexual dimorphism in phenotypic plasticity and persistence under environmental change: An extension of theory and meta-analysis of current data. *Ecology Letters*.
- Henshaw, J. M. (2018). Finding the one: optimal choosiness under sequential mate choice. *Journal of Evolutionary Biology*, 31(8), 1193–1203. <https://doi.org/10.1111/jeb.13296>

- Heubel, K. U., & Schlupp, I. (2008). Seasonal plasticity in male mating preferences in sailfin mollies. *Behavioral Ecology*, *19*(6), 1080–1086. <https://doi.org/10.1093/beheco/arn105>
- Holveck, M. J., Gauthier, A. L., & Nieberding, C. M. (2015). Dense, small and male-biased cages exacerbate male-male competition and reduce female choosiness in *Bicyclus anynana*. *Animal Behaviour*, *104*, 229–245. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2015.03.025>
- House, C. M., Rapkin, J., Hunt, J., & Hosken, D. J. (2019). Operational sex ratio and density predict the potential for sexual selection in the broad-horned beetle. *Animal Behaviour*, *152*, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2019.03.019>
- Hughes, K. A., Du, L., Rodd, F. H., & Reznick, D. N. (1999). Familiarity leads to female mate preference for novel males in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Animal Behaviour*, *58*(4), 907–916.
- Irwin, D., & Schluter, D. (2022). Hybridization and the Coexistence of Species. *The American Naturalist*, *200*(3), E93–E109.
- Izzo, A. S., & Gray, D. A. (2011). Heterospecific courtship and sequential mate choice in sister species of field crickets. *Animal Behaviour*, *81*(1), 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2010.10.015>
- Jennions, M. D., & Petrie, M. (1997). Variation in mate choice and mating preferences: A review of causes and consequences. *Biological Reviews*, *72*(2), 283–327. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1997.tb00015.x>
- Justus, K. T., & Mendelson, T. C. (2018). Male preference for conspecific mates is stronger than females' in *Betta splendens*. *Behavioural Processes*, *151*, 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.02.024>
- Kasumovic, M. M., Bruce, M. J., Andrade, M. C. B., & Herberstein, M. E. (2008). Spatial and temporal demographic variation drives within-season fluctuations in sexual selection. *Evolution*, *62*(9), 2316–2325. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00446.x>
- Kelly, P. W., Pfennig, D. W., de La Serna Buzón, S., & Pfennig, K. S. (2019). Male sexual signal predicts phenotypic plasticity in offspring: Implications for the evolution of plasticity and local adaptation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *374*(1768). <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0179>
- Kodric-Brown, A., & Nicoletto, P. F. (2001). Age and experience affect female choice in the guppy (*Poecilia reticulata*). *American Naturalist*, *157*(3), 316–323. <https://doi.org/10.1086/319191>

- Kokko, H., & Mappes, J. (2005). Sexual selection when fertilization is not guaranteed. *Evolution*, 59(9), 1876–1885. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2005.tb01058.x>
- Kokko, H., & Rankin, D. J. (2006). Lonely hearts or sex in the city? Density-dependent effects in mating systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1466), 319–334. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1784>
- Kolm, N. (2001). Females produce larger eggs for large males in a paternal mouthbrooding fish. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268(1482), 2229–2234. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1792>
- Kozak, G. M., Reiland, M., & Boughmann, J. W. (2009). Sex differences in mate recognition and conspecific preference in species with mutual mate choice. *Evolution*, 63(2), 353–365. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00564.x>
- Kruk, M. R., Halasz, J., Meelis, W., & Haller, J. (2004). Fast positive feedback between the adrenocortical stress response and a brain mechanism involved in aggressive behavior. *Behavioral Neuroscience*, 118(5), 1062.
- Kulmuni, J., Butlin, R. K., Lucek, K., Savolainen, V., & Westram, A. M. (2020). Towards the completion of speciation: The evolution of reproductive isolation beyond the first barriers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 375(1806). <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0528>
- Lackey, A. C. R., Martin, M. D., & Tinghitella, R. M. (2018). Male competition and speciation: Expanding our framework for speciation by sexual selection. In *Current Zoology* (Vol. 64, Issue 1, pp. 69–73). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/cz/zoy009>
- Liening, S. H., & Josephs, R. A. (2010). It Is Not Just About Testosterone: Physiological Mediators and Moderators of Testosterone's Behavioral Effects. *Social and Personality Psychology Compass*, 4(11), 982–994. <https://doi.org/10.1111/j.1751-9004.2010.00316.x>
- Lipkowski, K., Plath, M., Klaus, S., & Sommer-Trembo, C. (2019). Population density affects male mate choosiness and morphology in the mate-guarding amphipod *Gammarus roeselii* (Crustacea: Amphipoda). *Biological Journal of the Linnean Society*, 126(4), 899–911.
- Lipshutz, S. E. (2018). Interspecific competition, hybridization, and reproductive isolation in secondary contact: Missing perspectives on males and females. *Current Zoology*, 64(1), 75–88. <https://doi.org/10.1093/cz/zox060>

- Loureiro, M. (2004). *Sistemática y biogeografía de los peces anuales de la subtribu Cynolebiatina (Cyprinodontiformes: Rivulidae: Cynolebiatinae)*. [Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República]
- Loureiro, M., Borthagaray, A., Hernández, D., Duarte, A., Pinelli, V., & Arim, M. (2016). *Austrolebias* in space. Scaling from ponds to biogeographical regions. En Berois, N., García, G. & O. De Sá, R. (Eds.) *Annual Fishes Life History Strategy, Diversity and Evolution*. (pp. 111-132). Montevideo, Uruguay.
- Loureiro, M., de Sá, R., Serra, S. W., Alonso, F., Lanés, L. E. K., Volcan, M. V., Calviño, P., Nielsen, D., Duarte, A., & García, G. (2018). Review of the family rivulidae (Cyprinodontiformes, aplocheiloidei) and a molecular and morphological phylogeny of the annual fish genus *Austrolebias* Costa 1998. *Neotropical Ichthyology*, 16(3). <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20180007>
- Loureiro, M., & Garcia, G. (2008). *Austrolebias reicherti* Loureiro & García, a valid species of annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from Uruguay. *Zootaxa*, 1940(1), 1–15.
- Lynch, K. S., Rand, A. S., Ryan, M. J., & Wilczynski, W. (2005). Plasticity in female mate choice associated with changing reproductive states. *Animal Behaviour*, 69(3), 689–699. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.05.016>
- Macías García, C., & de Perera, T. B. (2002). Ultraviolet-based female preferences in a viviparous fish. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 52(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s00265-002-0482-2>
- Mackiewicz, M., Tatarenkov, A., Perry, A., Martin, J. R., Elder Jr, J. F., Bechler, D. L., & Avise, J. C. (2006). Microsatellite documentation of male-mediated outcrossing between inbred laboratory strains of the self-fertilizing mangrove killifish (*Kryptolebias marmoratus*). *Journal of Heredity*, 97(5), 508–513.
- Magurran, A. E., & Ramnarine, I. W. (2004). Learned mate recognition and reproductive isolation in guppies. *Animal Behaviour*, 67(6), 1077–1082. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2003.10.010>
- Mallet, J. (2005). Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(5), 229–237.
- Mallet, J. (2007). Hybrid speciation. *Nature*, 446(7133), 279–283.
- Martin, M. D., & Mendelson, T. C. (2013). Incomplete behavioural isolation and asymmetric female preference in darter sister species (Percidae: Etheostoma). *Journal of Fish Biology*, 83(5), 1371–1380. <https://doi.org/10.1111/jfb.12239>

- Maruska, K. P., Ung, U. S., & Fernald, R. D. (2012). The African cichlid fish *Astatotilapia burtoni* uses acoustic communication for reproduction: sound production, hearing, and behavioral significance. *PloS One*, *7*(5), e37612.
- Mayr, E. (1942). *Systematics and the origin of species*—Columbia Univ. Press, New York.
- Mendelson, T. C. (2003). Sexual isolation evolves faster than hybrid inviability in a diverse and sexually dimorphic genus of fish (Percidae: Etheostoma). *Evolution*, *57*(2), 317–327. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00266.x>
- Miller, C. W., & Svensson, E. I. (2014). Sexual selection in complex environments. *Annual Review of Entomology*, *59*, 427–445. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162044>
- Miller, S., Dykes, D., & Polesky, H. (1988). Extraction of high molecular weight DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, *16*, 1215.
- Moore, P. J., & Moore, A. J. (2001). Reproductive aging and mating: The ticking of the biological clock in female cockroaches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(16), 9171–9176. <https://doi.org/10.1073/pnas.161154598>
- Moran, R. L., & Fuller, R. C. (2018). Male-driven reproductive and agonistic character displacement in darters and its implications for speciation in allopatry. *Current Zoology*, *64*(1), 101–113.
- Nuechterlein, G. L., & Buitron, D. (1998). Interspecific mate choice by late-courting male western grebes. *Behavioral Ecology*, *9*(3), 313–321.
- O'Rourke, C. F., & Mendelson, T. C. (2010). Male and female preference for conspecifics in a fish with male parental care (Percidae: Catonotus). *Behavioural Processes*, *85*(2), 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2010.07.005>
- O'Rourke, C. F., & Mendelson, T. C. (2013). Behavioural responses to season and adult sex ratio in the fantail darter *Etheostoma flabellare*. *Animal Behaviour*, *85*(1), 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.10.004>
- Palmer, M. S., & Hankison, S. J. (2015). Use of ultraviolet cues in female mate preference in the sailfin molly, *Poecilia latipinna*. *Acta Ethologica*, *18*(2), 153–160. <https://doi.org/10.1007/s10211-014-0195-3>
- Papa, N. G., Clivio, G. A., & Montagne, J. (2016). Husbandry, reproduction, and embryo culture of anual fishes under laboratory conditions. En Berois, N., García, G. & O. De

- Sá, R. (Eds.) *Annual Fishes Life History Strategy, Diversity and Evolution*. (pp. 99-107). Montevideo, Uruguay
- Passos, C. (2013). *Austrolebias: un modelo para explorar la selección sexual* [Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República]
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2021.02.003>
- Passos, C., Tassinio, B., Loureiro, M., & Rosenthal, G. G. (2013). Intra- and intersexual selection on male body size in the annual killifish *Austrolebias charrua*. *Behavioural Processes*, *96*, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2013.01.008>
- 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.G. & Reichard, M. (2016). Reproductive behaviour and sexual selection in annual fishes. En Berois, N., García, G. & O. De Sá, R. (Eds.) *Annual Fishes Life History Strategy, Diversity and Evolution*. (pp. 207-229). Montevideo, Uruguay.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10164-019-00601-w>
- Pauers, M. J., & Grudnowski, J. A. (2022). Female preferences for conspecific males indicate reproductive isolation between sympatric *Labeotropheus* Ahl from Lake Malaŵi. *Ethology*, *128*(6), 482–488. <https://doi.org/10.1111/eth.13282>
- Peterson, M. A., Dobler, S., Larson, E. L., Juárez, D., Schlarbaum, T., Monsen, K. J., & Francke, W. (2007). Profiles of cuticular hydrocarbons mediate male mate choice and sexual isolation between hybridising *Chrysochus* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Chemoecology*, *17*(2), 87–96.
- Pfennig, K. S. (2000). Female spadefoot toads compromise on mate quality to ensure conspecific matings. *Behavioral Ecology*, *11*(2), 220–227.
- Pfennig, K. S. (2007). Facultative mate choice drives adaptive hybridization. *Science*, *318*(5852), 965–967.

- Pfennig, K. S. (2021). Biased hybridization and its impact on adaptive introgression. *Trends in Ecology & Evolution*, 36(6), 488–497.
- Pilakouta, N., Correa, M. A., & Alonzo, S. H. (2017). Predation Risk Reduces a Female Preference for Heterospecific Males in the Green Swordtail. *Ethology*, 123(2), 95–104. <https://doi.org/10.1111/eth.12573>
- Pinheiro J., Bates D., & R Core Team (2023). *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*. R package version 3.1-162, <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
- Podrabsky, J. E., Riggs, C. L., & Wagner, J. T. (2016). Tolerance of environmental stress. En Berois, N., García, G. & O. De Sá, R. (Eds.) *Annual Fishes Life History Strategy, Diversity and Evolution*. (pp. 159-184). Montevideo, Uruguay.
- Qvarnström, A., Pärt, T., & Sheldon, B. C. (2000). Adaptive plasticity in mate preference linked to differences in reproductive effort. *Nature*, 405(6784), 344–347.
- Qvarnström, A., Vallin, N., & Rudh, A. (2012). The role of male contest competition over mates in speciation. *Current Zoology*, 58(3), 493–509.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Reichard, M. (2016). The evolutionary ecology of African annual fishes. En Berois, N., García, G. & O. De Sá, R. (Eds.) *Annual Fishes Life History Strategy, Diversity and Evolution*. (pp. 133-158). Montevideo, Uruguay
- Remage-Healey, L., & Bass, A. H. (2006). From social behavior to neural circuitry: Steroid hormones rapidly modulate advertisement calling via a vocal pattern generator. *Hormones and Behavior*, 50(3), 432–441. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2006.05.007>
- Reyes Blengini, F., Tassinio, 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. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2017.08.007>
- Rios Moura, R., Oliveira Gonzaga, M., Silva Pinto, N., Vasconcellos-Neto, J., & Requena, G. S. (2021). Assortative mating in space and time: patterns and biases. *Ecology Letters*, 24(5), 1089–1102.
- Rivas, N. (2018). *Estudio de la agresión entre machos de Austrolebias reicherti y A. charrua y su efecto sobre el aislamiento sexual entre ambas especies*. [Tesina de grado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República]

- Rosenfield, J. A., & Kodric-Brown, A. (2003). Sexual selection promotes hybridization between Pecos pupfish, *Cyprinodon pecosensis* and sheepshead minnow, *C. variegatus*. *Journal of Evolutionary Biology*, 16(4), 595–606. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2003.00557.x>
- Rosenthal, G. G. (2013). Individual mating decisions and hybridization. *Journal of Evolutionary Biology*, 26(2), 252–255.
- Rosenthal, G. G. (2017). *Mate choice: the evolution of sexual decision making from microbes to humans*. Princeton University Press.
- Ryan, M. J., & Rand, A. S. (1993). Species recognition and sexual selection as a unitary problem in animal communication. *Evolution*, 47(2), 647–657. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1993.tb02118.x>
- Ryan, M. J., & Wagner Jr, W. E. (1987). Asymmetries in mating preferences between species: female swordtails prefer heterospecific males. *Science*, 236(4801), 595–597.
- Sapolsky, R. M., Romero, L. M., & Munck, A. U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*, 21(1), 55–89.
- Sato, Y., Staudacher, H., & Sabelis, M. W. (2016). Why do males choose heterospecific females in the red spider mite? *Experimental and Applied Acarology*, 68(1), 21–31. <https://doi.org/10.1007/s10493-015-9985-1>
- Schausberger, P., & Sato, Y. (2020). Kin-mediated male choice and alternative reproductive tactics in spider mites. *Biology*, 9(11), 1–12. <https://doi.org/10.3390/biology9110360>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675.
- Schumer, M., Powell, D. L., Delclós, P. J., Squire, M., Cui, R., Andolfatto, P., & Rosenthal, G. G. (2017). Assortative mating and persistent reproductive isolation in hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(41), 10936–10941. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711238114>
- Scott, C. E., McCann, S., & Andrade, M. C. B. (2020). Black widows as plastic wallflowers: female choosiness increases with indicators of high mate availability in a natural population. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65985-z>
- Scotti, M. A. L., Belén, J., Jackson, J. E., & Demas, G. E. (2008). The role of androgens in the mediation of seasonal territorial aggression in male Siberian hamsters (*Phodopus*

sungorus). *Physiology and Behavior*, 95(5), 633–640.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.09.009>

Seehausen, O. (2004). Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(4), 198–207

Seehausen, O., Butlin, R. K., Keller, I., Wagner, C. E., Boughman, J. W., Hohenlohe, P. A., Peichel, C. L., Saetre, G.-P., Bank, C., & Brännström, Å. (2014). Genomics and the origin of species. *Nature Reviews Genetics*, 15(3), 176–192.

Sefc, K. M., Hermann, C. M., Steinwender, B., Brindl, H., Zimmermann, H., Mattersdorfer, K., Postl, L., Makasa, L., Sturmbauer, C., & Koblmüller, S. (2015). Asymmetric dominance and asymmetric mate choice oppose premating isolation after allopatric divergence. *Ecology and Evolution*, 5(8), 1549–1562. <https://doi.org/10.1002/ece3.1372>

Servedio, M. R., & Hermisson, J. (2020). The evolution of partial reproductive isolation as an adaptive optimum. *Evolution*, 74(1), 4–14. <https://doi.org/10.1111/evo.13880>

Servedio, M. R., & Noor, M. A. F. (2003). The role of reinforcement in speciation: theory and data. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 339–364.

Shahandeh, M. P., Pischedda, A., & Turner, T. L. (2018). Male mate choice via cuticular hydrocarbon pheromones drives reproductive isolation between *Drosophila* species. *Evolution*, 72(1), 123–135. <https://doi.org/10.1111/evo.13389>

Smith, E. J., Partridge, J. C., Parsons, K. N., White, E. M., Cuthill, I. C., Bennett, A. T. D., & Church, S. C. (2002). Ultraviolet vision and mate choice in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Behavioral Ecology*, 13(1), 11–19.

Soma, K. K. (2006). Testosterone and Aggression: Berthold, Birds and Beyond. *Journal of Neuroendocrinology*, 18(7), 543–551. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2006.01440.x>

Soutullo, Á., Clavijo, C., & Martínez-Lanfranco, J. A. (2013). Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares. *Sistema Nacional de Áreas Protegidas/Dirección Nacional de Medio Ambiente/Ministerio de Vivienda Desarrollo Territorial y Medio Ambiente/Dirección de Ciencia y Tecnología/Ministerio de Educación y Cultura. Montevideo.*

Stankowski, S., & Ravinet, M. (2021). Defining the speciation continuum. *Evolution*, 75(6), 1256–1273. <https://doi.org/10.1111/evo.14215>

- Steigenga, M. J., Zwaan, B. J., Brakefield, P. M., & Fischer, K. (2005). The evolutionary genetics of egg size plasticity in a butterfly. *Journal of Evolutionary Biology*, *18*(2), 281–289. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2004.00855.x>
- Summers, C. H., Watt, M. J., Ling, T. L., Forster, G. L., Carpenter, R. E., Korzan, W. J., Lukkes, J. L., & Øverli, Ø. (2005). Glucocorticoid interaction with aggression in non-mammalian vertebrates: Reciprocal action. *European Journal of Pharmacology*, *526*(1–3), 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.09.059>
- Svensson, E. I., Eroukhanoff, F., Karlsson, K., Runemark, A., & Brodin, A. (2010). A role for learning in population divergence of mate preferences. *Evolution*, *64*(11), 3101–3113. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.01085.x>
- Swenton, D. M. (2011). Sex Differences in Mate Preference Between Two Hybridizing Species of Poeciliid Fish. *Ethology*, *117*(3), 208–216. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2010.01861.x>
- Szekeres, P., Haak, C. R., Wilson, A. D. M., Danylchuk, A. J., Brownscombe, J. W., Shultz, A. D., & Cooke, S. J. (2020). Juvenile bonefish (*Albula vulpes*) show a preference to shoal with mojarra (*Eucinostomus spp.*) in the presence of conspecifics and another gregarious co-occurring species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *527*, 151374. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2020.151374>
- Teixeira de Mello, F. (2019). Colecta y manejo de peces en el ambiente: énfasis en peces de aguas continentales. En Comisión Honoraria de Experimentación Animal. Franco Teixeira de Mello (Ed.) *Experimentación con animales no tradicionales en Uruguay*. (pp. 33-57). Montevideo, Uruguay.
- Thibert-Plante, X., & Hendry, A. P. (2011). Factors influencing progress toward sympatric speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, *24*(10), 2186–2196. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02348.x>
- Tien, N. S. H., Massourakis, G., Sabelis, M. W., & Egas, M. (2011). Mate choice promotes inbreeding avoidance in the two-spotted spider mite. *Experimental and Applied Acarology*, *54*(2), 119–124. <https://doi.org/10.1007/s10493-011-9431-y>
- Tinghitella, R. M., Lackey, A. C. R., Martin, M., Dijkstra, P. D., Drury, J. P., Heathcote, R., Keagy, J., Scordato, E. S. C., & Tyers, A. M. (2018). On the role of male competition in speciation: a review and research agenda. *Behavioral Ecology*, *29*(4), 783–797.

- Tinghitella, R. M., Weigel, E. G., Head, M., & Boughman, J. W. (2013). Flexible mate choice when mates are rare and time is short. *Ecology and Evolution*, 3(9), 2820–2831. <https://doi.org/10.1002/ece3.666>
- Todesco, M., Pascual, M. A., Owens, G. L., Ostevik, K. L., Moyers, B. T., Hübner, S., Heredia, S. M., Hahn, M. A., Caseys, C., & Bock, D. G. (2016). Hybridization and extinction. *Evolutionary Applications*, 9(7), 892–908.
- Uy, J. A. C., Irwin, D. E., & Webster, M. S. (2018). Behavioral isolation and incipient speciation in birds. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 49, 1–24.
- Vallin, N., & Qvarnström, A. (2011). Learning the hard way: Imprinting can enhance enforced shifts in habitat choice. *International Journal of Ecology*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/287532>
- Vallin, N., Rice, A. M., Arntsen, H., Kulma, K., & Qvarnström, A. (2012). Combined effects of interspecific competition and hybridization impede local coexistence of *Ficedula* flycatchers. *Evolutionary Ecology*, 26(4), 927–942. <https://doi.org/10.1007/s10682-011-9536-0>
- Vallin, N., Rice, A. M., Bailey, R. I., Husby, A., & Qvarnström, A. (2012). Positive feedback between ecological and reproductive character displacement in a young avian hybrid zone. *Evolution*, 66(4), 1167–1179. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01518.x>
- Van Huynh, A., & Rice, A. M. (2019). Conspecific olfactory preferences and interspecific divergence in odor cues in a chickadee hybrid zone. *Ecology and Evolution*, 9(17), 9671–9683. <https://doi.org/10.1002/ece3.5497>
- Veen, T., Borge, T., Griffith, S. C., Saetre, G.-P., Bures, S., Gustafsson, L., & Sheldon, B. C. (2001). Hybridization and adaptive mate choice in flycatchers. *Nature*, 411(6833), 45–50.
- Verzijden, M. N., Culumber, Z. W., & Rosenthal, G. G. (2012). Opposite effects of learning cause asymmetric mate preferences in hybridizing species. *Behavioral Ecology*, 23(5), 1133–1139. <https://doi.org/10.1093/beheco/ars086>
- Verzijden, M. N., Lachlan, R. F., & Servedio, M. R. (2005). Female mate-choice behavior and sympatric speciation. *Evolution*, 59(10), 2097–2108.
- Vitousek, M. N., & Romero, L. M. (2013). Stress responsiveness predicts individual variation in mate selectivity. *General and Comparative Endocrinology*, 187, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.03.009>

- Vrtílek, M., & Reichard, M. (2015). Highly plastic resource allocation to growth and reproduction in females of an African annual fish. *Ecology of Freshwater Fish*, 24(4), 616–628. <https://doi.org/10.1111/eff.12175>
- Ward, A. J. W., Hart, P. J. B., & Krause, J. (2004). The effects of habitat- and diet-based cues on association preferences in three-spined sticklebacks. *Behavioral Ecology*, 15(6), 925–929. <https://doi.org/10.1093/beheco/arh097>
- Watts, J. C., Hebets, E. A., & Tenhumberg, B. (2022). Mate Sampling Behavior Determines the Density Dependence of Sexual Selection. *The American Naturalist*, 200(4), 467–485.
- Weir, L. K., Grant, J. W. A., & Hutchings, J. A. (2011). The influence of operational sex ratio on the intensity of competition for mates. *American Naturalist*, 177(2), 167–176. <https://doi.org/10.1086/657918>
- West, R. J. D., & Kodric-Brown, A. (2015). Mate Choice by Both Sexes Maintains Reproductive Isolation in a Species Flock of Pupfish (*Cyprinodon spp*) in the Bahamas. *Ethology*, 121(8), 793–800. <https://doi.org/10.1111/eth.12394>
- While, G. M., Michaelides, S., Heathcote, R. J. P., Macgregor, H. E. A., Zajac, N., Beninde, J., Carazo, P., Pérez i de Lanuza, G., Sacchi, R., Zuffi, M. A. L., Horváthová, T., Fresnillo, B., Schulte, U., Veith, M., Hochkirch, A., & Uller, T. (2015). Sexual selection drives asymmetric introgression in wall lizards. *Ecology Letters*, 18(12), 1366–1375. <https://doi.org/10.1111/ele.12531>
- Willis, P. M. (2013). Why do animals hybridize? *Acta Ethologica*, 16(3), 127–134.
- Willis, P. M., Rosenthal, G. G., & Ryan, M. J. (2012). An indirect cue of predation risk counteracts female preference for conspecifics in a naturally hybridizing fish *Xiphophorus birchmanni*. *PLoS ONE*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034802>
- Willis, P. M., Ryan, M. J., & Rosenthal, G. G. (2011). Encounter rates with conspecific males influence female mate choice in a naturally hybridizing fish. *Behavioral Ecology*, 22(6), 1234–1240. <https://doi.org/10.1093/beheco/arr119>
- Wingfield, J. C., & Sapolsky, R. M. (2003). Reproduction and resistance to stress: when and how. *Journal of Neuroendocrinology*, 15(8), 711–724.
- Wingfield, J. C., & Soma, K. K. (2002). Spring and autumn territoriality in song sparrows: same behavior, different mechanisms? *Integrative and Comparative Biology*, 42(1), 11–20.

- Wong, B. B. M., & Rosenthal, G. G. (2005). Shoal choice in swordtails when preferences conflict. *Ethology*, *111*(2), 179–186.
- Wourms, J. P. (1972). The developmental biology of annual fishes. III. Pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *Journal of Experimental Zoology*, *182*(3), 389–414. <https://doi.org/10.1002/jez.1401820310>
- Wyman, M. T., Locatelli, Y., Charlton, B. D., & Reby, D. (2014). No preference in female sika deer for conspecific over heterospecific male sexual calls in a mate choice context. *Journal of Zoology*, *293*(2), 92–99. <https://doi.org/10.1111/jzo.12123>
- Wymann, M. N., & Whiting, M. J. (2003). Male mate preference for large size overrides species recognition in allopatric flat lizards (*Platysaurus broadleyi*). *Acta Ethologica*, *6*(1), 19–22. <https://doi.org/10.1007/s10211-003-0082-9>
- Yang, Y., Richards-Zawacki, C. L., Devar, A., & Dugas, M. B. (2016). Poison frog color morphs express assortative mate preferences in allopatry but not sympatry. *Evolution*, *70*(12), 2778–2788. <https://doi.org/10.1111/evo.13079>
- Yukilevich, R., & Peterson, E. K. (2019). The evolution of male and female mating preferences in *Drosophila* speciation. *Evolution*, *73*(9), 1759–1773. <https://doi.org/10.1111/evo.13752>
- Zuur, A. F., Ieno, E. N., Walker, N. J., Saveliev, A. A., & Smith, G. M. (2009). *Mixed effects models and extensions in ecology with R* (Vol. 574). Springer.

Material suplementario:

Control metodológico: longitudes corporales

Tabla S1. Longitud corporal en centímetros (media \pm desvío estándar) de los individuos estímulo de las pruebas de preferencia del capítulo 1. Se muestran los estadísticos y valores de probabilidad de las pruebas realizadas para evaluar diferencias entre la longitud de los pares de individuos estímulo. Para las hembras focales de inicio de temporada, prueba de Wilcoxon; para el resto de los casos, prueba t para muestras pareadas.

Individuos focales	Temporada	Individuos	Longitud (cm)	Estadístico	p
Hembras <i>A. charrua</i>	Inicio	Estímulos <i>A. charrua</i>	3,37 \pm 0,39	Z = -0,06	0,95
		Estímulos <i>A. reicherti</i>	3,37 \pm 0,43		
	Final	Estímulos <i>A. charrua</i>	3,66 \pm 0,41	t ₁₇ = -0,8	0,44
		Estímulos <i>A. reicherti</i>	3,61 \pm 0,51		
Hembras <i>A. reicherti</i>	Inicio	Estímulos <i>A. charrua</i>	3,37 \pm 0,38	Z = -0,47	0,64
		Estímulos <i>A. reicherti</i>	3,41 \pm 0,44		
	Final	Estímulos <i>A. charrua</i>	3,64 \pm 0,44	t ₁₃ = 1,35	0,20
		Estímulos <i>A. reicherti</i>	3,56 \pm 0,49		
Machos <i>A. charrua</i>	Inicio	Estímulos <i>A. charrua</i>	2,88 \pm 0,27	t ₁₄ = 1,50	0,16
		Estímulos <i>A. reicherti</i>	2,94 \pm 0,29		
	Final	Estímulos <i>A. charrua</i>	3,11 \pm 0,24	t ₁₃ = -1,38	0,19
		Estímulos <i>A. reicherti</i>	3,05 \pm 0,22		
Machos <i>A. reicherti</i>	Inicio	Estímulos <i>A. charrua</i>	2,88 \pm 0,18	t ₁₁ = -1,60	0,14
		Estímulos <i>A. reicherti</i>	2,92 \pm 0,20		
	Final	Estímulos <i>A. charrua</i>	3,11 \pm 0,24	t ₁₃ = 1,44	0,17
		Estímulos <i>A. reicherti</i>	3,05 \pm 0,22		

Tabla S2. Longitud corporal de los individuos de las pruebas de interacción libre del capítulo 2, en centímetros (media \pm desvío estándar). Se muestran los estadísticos y valores de probabilidad de las pruebas realizadas para evaluar diferencias entre la longitud de los pares de individuos del mismo sexo. Para los machos del tratamiento y de inicio de temporada, prueba de Wilcoxon; para el resto de los casos, prueba t para muestras pareadas.

Temporada	Tratamiento	Individuos	Longitud (cm)	Estadístico	p
Inicio	Control	Hembras <i>A. reicherti</i>	3,32 \pm 0,15	$t_6 = 0,33$	0,75
		Hembras <i>A. charrua</i>	3,35 \pm 0,37		
		Machos <i>A. reicherti</i>	3,72 \pm 0,31	$t_6 = 0,38$	0,72
		Machos <i>A. charrua</i>	3,74 \pm 0,25		
	Tratamiento	Hembras <i>A. reicherti</i>	3,20 \pm 0,25	$t_6 = 1,91$	0,11
		Hembras <i>A. charrua</i>	3,34 \pm 0,17		
		Machos <i>A. reicherti</i>	3,50 \pm 0,38	$Z = -0,89$	0,38
		Machos <i>A. charrua</i>	3,61 \pm 0,52		
Final	Control	Hembras <i>A. reicherti</i>	3,33 \pm 0,34	$t_5 = 1,29$	0,25
		Hembras <i>A. charrua</i>	3,47 \pm 0,34		
		Machos <i>A. reicherti</i>	4,08 0,33	$t_5 = 0,14$	0,9
		Machos <i>A. charrua</i>	4,09 0,33		
	Tratamiento	Hembras <i>A. reicherti</i>	3,27 \pm 0,13	$t_5 = 1,23$	0,28
		Hembras <i>A. charrua</i>	3,35 \pm 0,18		
		Machos <i>A. reicherti</i>	3,88 \pm 0,49	$t_5 = 1,70$	0,15
		Machos <i>A. charrua</i>	3,97 \pm 0,46		

Información complementaria sobre la selección de modelos.

Tabla S3. Modelos realizados para la fuerza de preferencia de las hembras por el estímulo homoespecífico. Se muestran sus AICs, y el nombre y valor de probabilidad de cada variable, o interacción de variables, simplificada en cada paso mediante estructura de modelos anidados.

Variable de respuesta	Variabes explicativas	AIC	Variable simplificada. p
Fuerza de preferencia por el homoespecífico.	Temporada * especie	-32,21	
	Temporada + especie	-26,41	Temporada : especie. 0,005

Tabla S4. Modelos realizados para la fuerza de preferencia de los machos por el estímulo homoespecífico. Se muestran sus AICs, y el nombre y valor de probabilidad de cada variable, o interacción de variables, simplificada en cada paso mediante estructura de modelos anidados.

Variable de respuesta	Variabes explicativas	AIC	Variable simplificada. p
Fuerza de preferencia por el homoespecífico.	Temporada * especie	-15,09	
	Temporada + especie	-16,53	Temporada : especie. 0,45
	Temporada	-17,93	Especie. 0,44

Tabla S5. Modelos realizados para el tiempo de interacción de las hembras con los estímulos. Se muestran sus AICs, y el nombre y valor de probabilidad de cada variable, o interacción de variables, simplificada en cada paso mediante estructura de modelos anidados.

Variable de respuesta	Variabes explicativas	AIC	Variable simplificada. p
Tiempo de interacción.	Tipo de interacción * temporada * especie	1802,22	
	Tipo de interacción * temporada + tipo de interacción * especie + temporada * especie	1809,17	Interacción triple. 0,003

Tabla S6. Modelos realizados para el tiempo de interacción de los machos con los estímulos. Se muestran sus AICs, y el nombre y valor de probabilidad de cada variable, o interacción de variables, simplificada en cada paso mediante estructura de modelos anidados.

Variable de respuesta	Variabes explicativas	AIC	Variable simplificada. p
Tiempo de interacción.	Tipo de interacción * temporada * especie	1627,76	
	Tipo de interacción * temporada + tipo de interacción * especie + temporada * especie	1626,41	Interacción triple. 0,42
	Tipo de interacción * temporada + tipo de interacción * especie	1624,56	Temporada : especie. 0,71
	Tipo de interacción * temporada + temporada * especie	1625,06	Tipo de interacción : especie. 0,42
	Tipo de interacción * especie + temporada * especie	1625,46	Tipo de interacción : temporada. 0,31
	Tipo de interacción + temporada + especie	1622,16	
	Tipo de interacción + temporada	1621,53	Especie. 0,24
	Tipo de interacción + especie	1620,16	Temporada. 0,98
	Tipo de interacción	1619,54	

Tabla S7. Modelos realizados para los apareamientos y cortejos. Se muestran las variables y el AIC de cada modelo, y el nombre y valor de probabilidad de cada variable, o interacción de variables, simplificada en cada paso mediante estructura de modelos anidados.

Variable de respuesta	Variabes explicativas	AIC	Variable simplificada. p
Apareamientos	Tipo de interacción * temporada * mantenimiento	206,81	
	Tipo de interacción * temporada + tipo de interacción * mantenimiento + temporada * mantenimiento	206,69	Interacción triple. 0,17
	Tipo de interacción * temporada + tipo de interacción * mantenimiento	207,03	Temporada : mantenimiento. 0,13
	Tipo de interacción * temporada + mantenimiento	209,04	Tipo de interacción : mantenimiento. 0,05
	Temporada + tipo de interacción * mantenimiento	208,82	Tipo de interacción : mantenimiento. 0,05
Cortejos	Tipo de interacción * temporada * mantenimiento	512,22	
	Tipo de interacción * temporada + tipo de interacción * mantenimiento + temporada * mantenimiento	510,26	Interacción triple. 0,84
	Tipo de interacción * temporada + tipo de interacción * mantenimiento	508,45	Temporada : mantenimiento. 0,66
	Tipo de interacción * temporada + mantenimiento	506,79	Tipo de interacción : mantenimiento. 0,56
	Tipo de interacción + temporada + mantenimiento	504,93	Tipo de interacción : mantenimiento. 0,71
	Tipo de interacción + temporada	503,26	Mantenimiento. 0,56
	Tipo de interacción	504,94	Temporada. 0,06
Temporada	505,76	Tipo de interacción. 0,03	

Tabla S8. Modelos realizados para los huevos desovados y las diferentes variables de agresión. Se muestran las variables y el AIC de cada modelo, y el nombre y valor de probabilidad de cada variable, o interacción de variables, simplificada en cada paso mediante estructura de modelos anidados.

Variable de respuesta	Variables explicativas	AIC	Variable simplificada. p
Huevos desovados	Temporada * mantenimiento	209,02	
	Temporada + mantenimiento	207,02	Temporada : mantenimiento. 0,98
	Temporada	205,12	Mantenimiento. 0,74
Ataques	Temporada * mantenimiento	252,94	
	Temporada + mantenimiento	251,35	Temporada : mantenimiento. 0,53
	Temporada	251,66	Mantenimiento. 0,13
Despliegues sigmoides	Temporada * mantenimiento	206,36	
	Temporada + mantenimiento	204,91	Temporada : mantenimiento. 0,46
	Temporada	203,00	Mantenimiento. 0,76
Despliegues laterales	Temporada * mantenimiento	154,9	
	Temporada + mantenimiento	155,59	Temporada : mantenimiento. 0,10
	Temporada	154,90	Mantenimiento. 0,25
Persecuciones	Temporada * mantenimiento	240,90	
	Temporada + mantenimiento	241,43	Temporada : mantenimiento. 0,11
	Temporada	239,44	Mantenimiento. 0,93

Anexo

Elaboración de manuscrito.

Durante esta tesis se trabajó en el análisis estadístico y la elaboración del manuscrito del trabajo de Passos (2013), que representa un antecedente directo a esta tesis. En dicho trabajo se exploró el aislamiento reproductivo pre apareamiento y su variación en el espacio, es decir, en poblaciones alopátridas y poblaciones cercanas a la zona de contacto. Además, se exploró la existencia de mecanismos de aislamiento reproductivo pos apareamiento.

Los resultados de dicho trabajo revelan que, al contrario de lo que ocurre con las poblaciones alopátridas, los individuos de las poblaciones cercanas a la zona de contacto tienen mecanismos de aislamiento comportamental, ya que las hembras prefieren a los machos homoespecíficos por sobre los machos heteroespecíficos. Por otro lado, los resultados de este trabajo también informan de la existencia de mecanismos de aislamiento reproductivo pos apareamiento, ya que las retrocruzas tienen menor éxito de fecundación, eclosión y supervivencia que las cruzas homoespecíficas.

La elaboración de este manuscrito está actualmente en proceso, y se prevé su pronta publicación en una revista arbitrada.

Estimación de las frecuencias de hibridación de las poblaciones del mantenimiento experimental.

Una de las grandes perspectivas de este trabajo es poner a prueba si los resultados comportamentales de las pruebas de interacción libre se traducen en una mayor frecuencia de hibridación en poblaciones más complejas que permanecen juntas por más tiempo. En este sentido, se prevé estimar las frecuencias de hibridación de las poblaciones del mantenimiento experimental.

Durante esta maestría se avanzó enormemente en dicho trabajo. Por un lado, se conservaron los tejidos de los individuos parentales, se colectó los sustratos de desove de las poblaciones de mantenimiento experimental y se las mantuvo en condiciones adecuadas de humedad, y se realizó la eclosión de los alevines y su colecta y conservación. Por otro lado, se avanzó en el trabajo molecular: se realizaron las

extracciones de ADN de todos los parentales y de la mayoría progenie, y se identificaron los microsatélites a utilizar.

Individuos parentales.

Al finalizar las pruebas de interacción libre, se retiró a los ejemplares y se les realizó eutanasia mediante inmersión en 2-fenoxietanol con una concentración de 2mL/L (Teixeira de Mello, 2019). Posteriormente, se los almacenó en alcohol 95°. Los ejemplares se encuentran en la colección de la Sección Etología de la Facultad de Ciencias.

Almacenamiento del sustrato.

El sustrato para oviposición de las poblaciones de mantenimiento experimental se colectó cada 7 días, y fue almacenado siguiendo protocolos estandarizados (Papa et al., 2016). Se dejó secar el sustrato y se controló progresivamente su nivel de humedad, que es necesaria, en cierto nivel, para la supervivencia de los embriones. Una vez alcanzada la humedad adecuada, se empaquetó el sustrato en bolsas de plástico y se las almacenó en oscuridad a 19°C durante 5 meses en el acuario de Facultad de Ciencias.

Eclosión, colecta y eutanasia de los alevines.

La eclosión de los alevines de las turbas de las poblaciones de mantenimiento experimental se realizó acorde a las indicaciones de Papa y colaboradores (2016). Las turbas conteniendo los huevos desovados se colocaron en peceras (25 x 12 x 15 cm., largo x ancho x altura) y fueron humedecidas con agua libre de cloro durante 30 minutos. Posteriormente, se llenó los acuarios con más agua libre de cloro, se colocó aireación, y se los mantuvo a temperatura constante de 19°C por 24 horas. Transcurridas las 24 horas, se procedió a colectar al azar 20 alevines de cada población de mantenimiento experimental. La colecta se realizó filtrando el agua de los acuarios con una malla fina que retuvo los alevines en ella. Inmediatamente luego de ser colectados, se realizó la eutanasia de los individuos mediante inmersión con 2-fenoxietanol a una concentración de 2mL/L (Teixeira de Mello, 2019). Luego de la eutanasia, los alevines se almacenaron en alcohol 95° para una posterior utilización de sus tejidos, y se encuentran en la colección de la Sección Etología de la Facultad de Ciencias.

Extracción de ADN y reacciones en cadena de la polimerasa.

La extracción de ADN de alevines y parentales previamente almacenados en alcohol 95° se realizó utilizando un protocolo modificado en base a lo detallado en Miller et al., (1988).

Se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos para 9 microsatélites, 6 de los cuales fueron diseñados específicamente para *A. charrua* (Ach-1, Ach-3, Ach-4, Ach-6, Ach-7 y Ach-8, de Gutiérrez et al., 2014), y mostraron ser polimórficos también para *A. reicherti* (Gutiérrez et al., 2014). Los otros 3 oligonucleótidos fueron diseñados para *Kryptolebias marmoratus* (R3, R4 y R11 de Mackiewicz et al., 2006), y mediante pruebas preliminares indicaron ser polimórficos también para *A. charrua* y *A. reicherti*. La secuencia “forward” de cada par de oligonucleótidos fue modificada mediante la adición de un fluoróforo, lo que permite el posterior genotipado de los individuos en forma automática

Los experimentos de PCR se realizaron en un volumen final de 20 µL, conteniendo 0,2 µM de cada oligonucleótido, 0,2 mM de dNTP, 3,5 mM de MgCl₂, 0,04 unidades/µL de Taq DNA Polimerasa (BIORON), 1X buffer de reacción (BIORON), y 10 µL de extracción de ADN. Las condiciones de las reacciones consistieron en una etapa inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de asociación a 50°C-59°C, y 30 segundos de extensión a 72°C. El último paso de la reacción consistió en una extensión final durante 7 minutos a 72°C.

Los productos de PCR fueron enviados a Macrogen (Seúl, Corea del Sur) para su análisis mediante electroforesis capilar en un secuenciador ABI 3730xl. Los resultados recibidos fueron analizados con el software PeakScanner™ versión 1.0 (Applied Biosystems). Se enviaron un total de 192 productos de PCR, en los que se incluyeron muestras de todos los oligonucleótidos puestos a prueba.

Resultados preliminares

Los resultados de los análisis permitieron delinear en forma preliminar cuáles de los pares de oligonucleótidos empleados serían más adecuados para genotipar los individuos de ambas especies. Los que se encontró como más apropiados para esta

tarea, ya sea por el grado de polimorfismo que presentan o por la facilidad de su identificación, fueron: Ach-3, Ach-4, Ach-7, Ach-8 y R3.