



TESIS DE DOCTORADO

Austrolebias: un modelo para explorar la selección sexual

Carlos Passos

Sección Etología

Facultad de Ciencias

Orientador

Dr. Gil G. Rosenthal

Department of Biology

Texas A&M University

Co-orientador

Dr. Marcelo Loureiro

Sección Zoología de Vertebrados

Facultad de Ciencias

Tribunal

Presidente: **Dr. Enrique Lessa**

Vocales: **Dras. Graciela García y Ana Silva**

Junio 2013

AGRADECIMIENTOS

A Gil Rosenthal por su apoyo y estímulo continuo, su excelente onda, y su constante disposición a colaborar.

A Marcelo Loureiro por haberme enseñado el trabajo de campo.

A los miembros del Tribunal, Enrique Lessa, Graciela García y Ana Silva, por la lectura detallada del trabajo y por las subsecuentes correcciones y sugerencias.

A todos los integrantes de la Sección Etología por la oportunidad de realizar las experiencias en su laboratorio y por su compañerismo.

Al Grupo Peces Anuales por permitirme el uso de sus instalaciones.

A Bettina Tassino y Federico Reyes, co-autores de la tesis. El desarrollo de este trabajo no hubiese sido posible sin su continua participación. Muy especialmente a Bettina por apoyarme y acompañarme desde el inicio, y por la enorme colaboración en todas las instancias.

A Sebastián Serra por compartir sus conocimientos acuaristas y por su gran ayuda en el mantenimiento de los peces.

A André González por su imprescindible asesoramiento y colaboración durante el estudio de la comunicación química.

A Alejandro D'Anatro por enseñarme morfometría geométrica y por su participación activa durante el análisis de datos.

A Ana Silva, por la donación de elastómeros y por el asesoramiento durante la inyección de los mismos.

A la Intendencia de Treinta y Tres por brindarnos alojamiento en La Charqueada durante el trabajo de campo.

A Amanda Martínez, el gordo Bonomo, Jorge Sanatana, Fernando Giménez, la familia Zuluaga y a todos quienes amablemente permitieron el acceso a los sitios de colecta y facilitaron este trabajo.

A Nicolás Papa, Guillermo Reheman, Franca Stábile, Felipe Librán, Alejandro Duarte, Clemente Olivera, Gabriela Arévalo y mi madre por la invaluable colaboración durante el trabajo de campo.

A Valentina Franco-Trecu y Ciro Invernizzi por compartir todo este proceso, por el gran apoyo académico y afectivo.

Lucía, Mateo y Simona

ÍNDICE

Resumen	6
Introducción general	8
Hipótesis y Objetivos	18
Capítulo 1	
Selección intra e intersexual sobre el tamaño corporal de los machos	
Introducción	21
Materiales y Métodos	23
Resultados	30
Discusión	33
Capítulo 2	
Comunicación química durante el comportamiento reproductivo	
Introducción	37
Materiales y Métodos	39
Resultados	43
Discusión	45
Capítulo 3	
Variación en la preferencia de apareamiento y en la proporción de sexos a lo largo de la estación reproductiva	
Introducción	49
Materiales y Métodos	53
Resultados	58
Discusión	63

Capítulo 4

Hibridación entre dos especies hermanas de distribución parapátrida: *A. reicherti* y *A. charrua*

Introducción	69
Materiales y Métodos	72
Resultados	75
Discusión	87

Capítulo 5

Naturaleza del aislamiento reproductivo entre *Austrolebias reicherti* y *A. charrua*

Introducción	92
Materiales y Métodos	97
Resultados	105
Discusión	113
Conclusiones generales y perspectivas	121
Contribuciones	127
Referencias bibliográficas	128
Apéndice	146

RESUMEN

La selección sexual resulta en el éxito reproductivo diferencial entre los individuos de un mismo sexo y se manifiesta a través de la competencia (selección intrasexual) o a través de la elección de pareja (selección intersexual). Constituye un tema de activa investigación y ha tenido un importante desarrollo teórico y empírico en los últimos años, con especial énfasis en el seno del conflicto sexual, la selección intersexual en base a múltiples caracteres, la plasticidad adaptativa en las preferencias de apareamiento, y la especiación. En esta tesis se abordaron experimentalmente estos cuatro tópicos de debate actual, en los peces anuales del género *Austrolebias*. El marcado dimorfismo sexual sugiere que la selección sexual modela el comportamiento reproductivo de este grupo de peces. Además, la elevada turbidez propia de los charcos temporales donde habitan estos organismos dificulta el contacto visual, lo cual sugiere que otras modalidades sensoriales podrían también estar involucradas durante la reproducción. Por otra parte, el particular ciclo de vida combinado con la intensa variación temporal en diversos factores ecológicos que caracteriza al hábitat de los peces anuales, ofrecen novedosas y propicias condiciones para investigar la variación estacional en la intensidad de la selección sexual. Por último, el escenario de especiación simultánea y múltiple junto a las diferencias en la pigmentación en los machos, convierte al género *Austrolebias* en un excelente modelo para investigar el papel de la selección sexual en el proceso de especiación.

La presente tesis tuvo como objetivo evaluar la elección de pareja en las hembras y la competencia entre los machos, y determinar los caracteres involucrados en estos comportamientos en la díada de especies *A. reicherti* y *A. charrua*. Además, se propuso determinar la naturaleza del aislamiento reproductivo entre ambas especies, con el fin de poner a prueba los modelos de reforzamiento y de especiación por selección sexual. Para ello, primero se valoró la selección sexual sobre el tamaño corporal de los machos de *A. charrua* a través de la preferencia de apareamiento de las hembras, la competencia entre machos, y su interacción. Segundo, se evaluó la presencia de comunicación química en el comportamiento reproductivo de *A. reicherti*. Para ello se investigó si las hembras responden a pistas químicas liberadas por los machos, evaluando a su vez la naturaleza de las mismas mediante el fraccionamiento de acuerdo a la polaridad. Tercero, se valoró la variación temporal de la selección sexual mediante el estudio experimental de la preferencia de apareamiento de las

hembras de *A. reicherti* a lo largo de la estación reproductiva. Cuarto, se investigó la hibridación entre *A. charrua* y *A. reicherti* desde una perspectiva morfológica y a través de la experimentación en cautiverio. Por último, se evaluó el grado de aislamiento reproductivo entre estas especies, investigando en el laboratorio el sistema de señales de apareamiento como mecanismo de aislamiento reproductivo y la existencia de las barreras post-apareamiento mediante estimaciones de *performance* reproductiva.

Este estudio determinó que en *A. charrua*, la selección intra e intersexual actúan en concierto con respecto al tamaño corporal de los machos. Además, se puso en evidencia que los machos de *A. reicherti* liberan señales químicas que provocan cambios comportamentales en las hembras de su especie. Por otra parte, se constató la existencia de plasticidad en la preferencia de apareamiento de las hembras de *A. reicherti* en consonancia con cambios demográficos ocurridos durante el transcurso del ciclo reproductivo. Por último, se sugiere que *A. charrua* y *A. reicherti* hibridan en la naturaleza, que existe desventaja en la *performance* reproductiva de los individuos híbridos y que el aislamiento sexual es más pronunciado en la zona de solapamiento de la distribución de ambas especies. En conjunto, estos resultados indican la incidencia de la selección sexual en la dinámica reproductiva de estas especies de peces anuales y sugieren que la naturaleza del aislamiento reproductivo entre *A. charrua* y *A. reicherti* es congruente con el modelo de reforzamiento. Los resultados de esta tesis ponen de manifiesto la importancia de consolidar a estos peces anuales como modelo para el estudio de la selección sexual y enfatizan la inclusión de *A. charrua* y *A. reicherti* (particularmente de la zona de contacto) en un programa de conservación prioritario.

Esta tesis fue financiada por el Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) y la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC).

INTRODUCCIÓN GENERAL

La selección sexual (Darwin 1871) resulta en el éxito reproductivo diferencial entre los individuos de un mismo sexo, siendo una fuerza determinante en la evolución de rasgos sexualmente dimórficos y de mecanismos cognitivos, y su acción afecta a su vez la estructura genética de las poblaciones (Andersson 1994). Se manifiesta a través de la competencia directa entre miembros de un mismo sexo (selección intrasexual) o a través de la atracción de un sexo por el otro (selección intersexual) (Wilson 1980). Las hembras realizan una gran inversión energética en la formación de gametos y su potencial reproductivo está a menudo limitado por la disponibilidad de recursos. Por el contrario, el número de espermatozoides que pueden producir los machos raramente limita el éxito reproductivo de éstos. Como consecuencia, las hembras a menudo son selectivas en su decisión de apareamiento, mientras que los machos generalmente compiten activamente por el acceso a parejas o a recursos necesarios para atraerlas (Andersson 1994). Si bien tradicionalmente se postula que los machos no ejercen selección y maximizan su éxito reproductivo al aumentar el número de cópulas frente a la calidad de las parejas (Bateman 1948), aproximaciones teóricas también sugieren la ocurrencia de elección mutua aún en especies donde cada uno de los sexos se ajusta a los roles convencionales (Bergstrom & Real 2000, Kokko & Johnstone 2002, Edward & Chapman 2011).

En los procesos de selección intersexual, los individuos basan su elección en señales indicadoras de la calidad de las parejas potenciales (Darwin 1871, Andersson 1994). Los beneficios de la selectividad reproductiva, podrían relacionarse directamente con la supervivencia o la fecundidad. Así, por ejemplo, la selección favorecerá las preferencias de apareamiento con individuos de gran fertilidad, o que provean mayor cantidad de recursos y cuidado parental (Andersson 1994). Por otra parte, la elección de pareja podría ser adaptativa en función de los beneficios indirectos alcanzados mediante el apareamiento con determinados individuos: producción de descendencia con genotipos que incrementen la viabilidad (modelo de “buenos genes” Zahavi 1975) o la mera atractividad para los miembros del sexo opuesto (“corrida” de Fisher 1930), estableciendo una correlación genética entre la preferencia de apareamiento y el carácter seleccionado (Andersson 1994). Por último, es posible que las preferencias de apareamiento se hayan originado por otras razones que la obtención de beneficios directos e indirectos. La elección podría responder a un sesgo sensorial preexistente que ha evolucionado en un contexto diferente al reproductivo, tal como

la evasión de predación o el forrajeo (modelo de explotación sensorial, Endler & Basolo 1998). Todos los mecanismos mencionados pueden actuar aislados o, más probablemente, combinados entre sí determinando la evolución de la elección de pareja y de los caracteres sexuales (Kokko *et al.* 2003).

El análisis de diferentes aspectos de la selección sexual ha tenido un importante desarrollo en las últimas dos décadas, con especial énfasis en el seno del conflicto sexual (Andersson & Simmons 2006), la selección intersexual en base a múltiples caracteres (Candolin 2003), la plasticidad adaptativa en las preferencias de apareamiento (Forsgren *et al.* 2004), y la especiación (Ritchie 2007).

Los componentes intra e intersexuales de la selección

Un aspecto de la teoría de la selección sexual que ha recibido especial interés en los últimos años ha sido el papel que juega la interacción entre la competencia y la elección de pareja en la evolución de los caracteres sexuales (Wong & Candolin 2005). Aunque la evolución de ciertos caracteres puede ser impulsada exclusivamente por la selección intra o intersexual, generalmente ambos componentes actúan en simultáneo sobre los mismos rasgos (Andersson 1994, Qvarnström & Forsgren 1998, Moore & Moore 1999, Maynard-Smith & Harper 2003).

Tradicionalmente se ha asumido que las dos fuerzas actúan al unísono, y que operan mediante un proceso de reforzamiento mutuo promoviendo la expresión de los mismos caracteres en los machos (Berglund *et al.* 1996, Wiley & Poston 1996, Arnqvist & Rowe 2005). La elección de las hembras debería reforzar la acción de la selección intrasexual cuando los rasgos favorecidos por la competencia macho-macho están correlacionados con beneficios directos o indirectos que las hembras obtienen al aparearse con esos individuos (Robinson *et al.* 2011). En este sentido, ha sido ampliamente documentada la elección de las hembras en base a caracteres indicadores del estatus de dominancia de los machos (Candolin 1999, 2000, Doutrelant & McGregor 2000, Berglund & Rosenqvist 2001, Kortet & Hedrick 2005, para una revisión de los beneficios de apareamiento con el macho dominante ver Wong & Candolin 2005).

Sin embargo, la elección de las hembras en base a las habilidades de lucha de los machos podría estar menos extendida de lo que se ha asumido tradicionalmente. En términos de optimización de la eficacia, el apareamiento con machos dominantes no implica necesariamente que la hembra obtenga mayores beneficios (Qvarnstrom & Forsgren 1998). En

este sentido, la evidencia empírica indica que en muchos casos ambos componentes de la selección sexual ejercen presiones selectivas opuestas sobre un mismo carácter (revisado en Arnqvist & Rowe 2005).

La elección de pareja en base a múltiples caracteres

La elección de pareja basada en múltiples caracteres, más que en uno solo, ha sido un tema generador de reciente investigación en el marco de la selección sexual (Candolin 2003, McLennan 2003). A menudo, los despliegues sexuales son de alta complejidad e involucran distintas señales de una misma o de múltiples modalidades sensoriales (Hebets & Papaj 2005, Taff *et al.* 2012).

Se han propuesto diversas razones para explicar la utilización de señales combinadas (revisado en Candolin 2003, van Doorn & Weissing 2004). De acuerdo a la hipótesis de múltiples mensajes, las distintas señales indican diferentes cualidades de la pareja (Møller & Pomiankowski 1993, Johnstone 1997). Por otra parte, la hipótesis de redundancia propone que todas las señales reflejan la misma cualidad y que la utilización de múltiples señales asegura la correcta valoración de la pareja (Møller & Pomiankowski 1993, Johnstone 1997). A su vez, diversas señales podrían haber evolucionado como eficaz barrera para prevenir la hibridación. Bajo algunas circunstancias, la selección sexual y el reconocimiento específico pueden estar en conflicto directo. Muchos estudios han demostrado que la preferencia direccional por un carácter elaborado de un macho puede reducirse o incluso desaparecer en poblaciones donde ese carácter es compartido por heteroespecíficos simpátridos (Pfennig 2000, Collins & Luddem 2002, Pryke & Andersson 2008). Cuando este compromiso se presenta en un carácter único, las hembras pueden considerar caracteres adicionales para evitar el conflicto entre la elección de pareja intra e interespecífica (Crapon de Caprona & Ryan 1990, Gerhardt 2001, Rosenthal & Ryan 2011). Por último, las señales formadas por componentes de diferentes modalidades sensoriales podrían potenciar la detección, reconocimiento y discriminación de la señal a través de la facilitación intersensorial (Candolin 2003). Recientemente se ha reconocido que la habilidad de las hembras de detectar y evaluar diferentes señales es dependiente del contexto. En muchos casos, la importancia relativa y el número de señales valoradas por las hembras durante la elección de pareja varían de acuerdo a las condiciones ambientales y el contexto social (Jennions & Petrie 1997, Møller *et al.* 1998, Kodric-Brown & Nicoletto 2001, Uy & Safran 2013).

En consecuencia, el efecto del uso de múltiples señales (particularmente señales multimodales) sobre la selección sexual constituye otro tópico de interés y fuente de discusión actual.

Variación en la intensidad y dirección de la selección sexual

Tradicionalmente, las preferencias de apareamiento han sido consideradas como caracteres fijos y uniformes dentro de las especies. Sin embargo, estudios teóricos y empíricos han demostrado que la fuerza y la dirección de la selección sexual pueden variar en el tiempo y/o el espacio, si cambian las condiciones ambientales, demográficas o las propiedades intrínsecas de los individuos (Kvarnemo & Ahnesjö 1996, Jennions & Petrie 1997, Cunningham & Birkhead 1998, Widemo & Sæther 1999). En diversos taxa se ha documentado variación a lo largo de la estación reproductiva en la dirección y/o intensidad de los distintos componentes de la selección sexual (Jennions & Petrie 1997, Qvarnström 1999, Jann *et al.* 2000, Prohl 2002, Forsgren *et al.* 2004, Borg *et al.* 2006, Cockburn *et al.* 2008, Kasumovic *et al.* 2008, Reichard *et al.* 2008). El estudio de la variación estacional de la selección sexual es relevante dado que la selección neta a lo largo de la vida de un individuo es la que en última instancia determina la evolución de caracteres particulares (Preziosi & Fairbairn 2000, Cornwallis & Uller 2010).

Diversos factores ecológicos pueden influir en la intensidad y en la dirección de la selección sexual, tales como la condición individual (Hunt *et al.* 2005, Burley & Foster 2006), la disponibilidad de recursos (Fisher & Rosenthal 2006, Moskalik & Uetz 2011), la presión de predación (Evans *et al.* 2004), la intensidad de parasitismo (Lozano 1994, Olson & Owens 1998), y la estructura poblacional (Kvarnemo *et al.* 1995). Así, por ejemplo, se predice menor selectividad en las hembras cuando los costos de búsqueda son altos o la densidad de parejas potenciales es baja (Howard & Young 1998, Jirotkul 1999a), en cambio la selectividad se incrementará si aumenta la variabilidad en la calidad de los machos (Kvarnemo & Forsgren 2000). Uno de los factores determinantes sobre el modo y la fuerza de la selección sexual es la relación operacional de sexos (ROS) (Owens & Thompson 1994), definida como la relación machos/hembras aptos para reproducirse en un momento dado (Emlen & Oring 1977). Cambios en la ROS pueden alterar tanto la selección intrasexual como la selección intersexual, así como también las tácticas reproductivas de ambos sexos (Spence & Smith 2005, Fitze & Le Galliard 2008, Wacker *et al.* 2013). Además, estudios teóricos y empíricos han demostrado que la densidad poblacional puede influir en el comportamiento, las estrategias reproductivas y la intensidad de la selección sexual (Jirotkul 1999b, Kokko & Rankin 2006). En muchos casos se ha documentado variación en diversas variables ecológicas y patrones demográficos a lo largo de

la estación reproductiva y por lo tanto, la relación costo-beneficio de ejercer elección podría variar temporalmente (Jennions & Petrie 1997, Qvarnström 2001). De acuerdo a estas condiciones, podría favorecerse la plasticidad adaptativa de las preferencias y de los niveles de selectividad de las hembras (Qvarnström *et al.* 2000).

Durante muchos años, uno de los temas de mayor controversia en ecología evolutiva ha sido la persistencia de la variación heredable de los caracteres sexualmente seleccionados. De acuerdo con los modelos evolutivos tradicionales de la elección de pareja, las hembras seleccionan machos que poseen recursos de alta calidad, buenos genes o tendencia a engendrar hijos atractivos. Se espera, que bajo un régimen de selección direccional provocado por la elección de las hembras sobre los caracteres sexuales masculinos, los alelos beneficiosos se fijen en las poblaciones y por lo tanto se reduzca la variación genética de los caracteres. Consecuentemente, los beneficios resultantes de la elección de las hembras desaparecerán gradualmente. Esta disminución potencial de la elección de las hembras fue llamada “paradoja del lek” (Kirkpatrick & Ryan 1991, Rowe & Houle 1996, Kotiaho *et al.* 2001, Houle & Kondrashov 2002, Kokko *et al.* 2003). Sin embargo, esta predicción no se ajusta a la realidad, ya que los datos empíricos sugieren que la variación genética heredable, tanto en la elección de las hembras como en los caracteres de los machos, es generalizada. La interacción entre la selección intra e intersexual, la elección en base a múltiples caracteres, y la variación espacio-temporal de la selección sexual han sido algunos de los mecanismos propuestos para resolver la aparente paradoja. La acción antagónica de la preferencia de las hembras y la competencia entre los machos podría ser una fuerza que impide la fijación de alelos, especialmente si la importancia relativa de las dos componentes varía en el espacio o en el tiempo (Roff 1997, Moore & Moore 1999). Además, la reducción en la fuerza de la selección sobre un carácter en particular debido al uso de múltiples señales, también podría contribuir al mantenimiento de la variación. Por último, se mantendrá la variación genética de los caracteres sexuales cuando los beneficios de la elección de pareja dependan del ambiente o de la propia condición de la hembra (Jennions & Petrie 1997).

Selección sexual y especiación

La selección sexual es foco de investigación en el marco de la discusión moderna sobre los procesos de especiación (Panhuis *et al.* 2001, Ritchie 2007). Aunque su influencia en la evolución intrapoblacional ha sido ampliamente reconocida, la selección sexual ha sido recientemente invocada como una fuerza conductora de la especiación. La especiación por selección sexual ocurre cuando un cambio paralelo en las preferencias y caracteres sexuales

dentro de una población conducen al aislamiento precopulatorio entre poblaciones (Lande 1981), y cuando esto es la causa primaria del aislamiento reproductivo.

Las fuerzas evolutivas capaces de producir cambios vinculados a los sistemas de señales de apareamiento, juegan un rol importante en el establecimiento de barreras para el intercambio de genes entre poblaciones e inciden por lo tanto en los procesos de especiación (Butlin & Ritchie 1994). En particular, la selección sexual tiene un alto potencial para la formación de nuevas especies porque afecta directamente caracteres que influyen en el éxito reproductivo y en el sistema de reconocimiento de pareja (West-Eberhard 1983, Sampson 1999). Modelos recientes sugieren que el aislamiento reproductivo puede evolucionar rápidamente con muy poco cambio genético (Turner & Burrows 1995, Higashi *et al.* 1999, Dieckmann & Doebeli 1999, Kondrashov & Kondrashov 1999, Kirkpatrick & Ravigné 2002). La rápida divergencia puede ser facilitada a través del desarrollo de una correlación genética entre las preferencias y los caracteres sexuales, donde la selección sexual será directamente responsable de la especiación. De esta forma, la restricción del flujo génico interespecífico puede ser una consecuencia incidental de la selección sexual operando dentro de las especies.

Si la especiación es generada por selección sexual, es de esperar que las especies cercanamente emparentadas difieran marcadamente en los caracteres sexuales y en sus preferencias, y que estas diferencias sean la mayor causa del aislamiento. Sin embargo, puede ser difícil de excluir la posibilidad de que el propio reconocimiento específico haya sido una fuerza importante en modelar el cambio observado en los caracteres sexuales y las preferencias (Ritchie 2007). El reconocimiento específico es importante cuando existe un aislamiento postcopulatorio, a través del cual los apareamientos heteroespecíficos producen una descendencia relativamente inviable o estéril. Los rasgos que facilitan el reconocimiento específico podrían entonces divergir bajo selección cuando las poblaciones solapan sus rangos de distribución. De esta forma, el reforzamiento podría conducir el cambio en los caracteres sexuales y en las preferencias de las poblaciones en respuesta a la selección contra apareamientos interespecíficos desventajosos, eliminando el rol directo de la selección sexual (Dobzhansky 1940, Servedio & Noor 2003).

El papel de la selección sexual en la especiación es fuente de controversia en biología evolutiva. La teoría proporciona una variedad de mecanismos mediante los cuales la selección sexual puede provocar o facilitar la especiación (Lande 1981, Servedio 2007, Uyeda *et al.* 2009, van Doorn *et al.* 2009, Servedio *et al.* 2011). Sin embargo, la teoría también provee argumentos sólidos de apoyo a la idea de que la selección sexual rara vez conduce a la

especiación por sí misma, especialmente en simpatria (Ritchie 2007). Por otro lado, existen pocos estudios empíricos que respalden a los modelos propuestos (Boughman 2001, Seehausen *et al.* 2008, revisado en Mann & Seehausen 2011) y no es posible evaluar la frecuencia con que la especiación por selección sexual ocurre realmente en la naturaleza. Algunos de los grupos que han sido estudiados en este sentido son los cíclidos de los grandes lagos del Este africano (Seehausen *et al.* 1997), las moscas del género *Drosophila* (Boake 2000) y los peces del género *Gasterosteus* (Boughman 2001), entre otros.

***Austrolebias* como modelo biológico**

Los peces anuales del género *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) poseen un ciclo de vida muy particular que consiste en la deposición, por parte de los adultos, de huevos con resistencia a la desecación en el fondo de los charcos temporales que habitan (Simpson 1979). Estos huevos presentan una capa coriónica externa extremadamente gruesa y ornamentada que los aísla del medio externo adverso (Simpson 1979, Loureiro & de Sá 1996, 2000). La desaparición de las masas de agua temporales durante los períodos de desecación (primavera-verano), se acompaña de la muerte masiva de las formas adultas. La capacidad de las poblaciones de resistir a los cíclicos eventos de desecamiento se centra en la facultad de los embriones de atravesar hasta tres períodos de diapausa (Wourms 1972a,b, Berois *et al.* 2012) lo que les permiten retrasar el tiempo de desarrollo hasta el momento en que las condiciones ambientales son nuevamente propicias para la eclosión de los alevines. Estos organismos poseen adaptaciones fisiológicas y comportamentales a charcos efímeros, y por lo tanto a una variación extrema en las condiciones ambientales, tales como la temperatura, el nivel de oxígeno y la disponibilidad de alimentos (Berois *et al.* 2012). Además, presentan una elevada tasa metabólica que les permite alcanzar la madurez sexual rápidamente luego de la eclosión, en algunos casos solamente 4 semanas después del nacimiento (Cardozo 1999). Una vez adultos, los peces se reproducen constantemente hasta su muerte, la cual ocurre poco antes de que los charcos se sequen, posiblemente debido al aumento de la temperatura al final de la primavera (Simpson 1979, Errea & Danulat 2001) y la concomitante disminución de la concentración de oxígeno en estos pequeños y someros cuerpos de agua. Presentan fecundación externa y el comportamiento reproductivo consiste en el despliegue de conductas de atracción y respuesta por parte del macho y la hembra, y culmina con el enterramiento total o parcial de la pareja con el fin de depositar los huevos dentro del sustrato (Vaz-Ferreira *et al.* 1964, Belote & Costa 2002, García *et al.* 2008). Poseen un alto potencial reproductivo, y en condiciones de laboratorio las hembras desovan de 20 a 100 huevos diarios hasta la

senescencia (Wourms 1967). Este particular ciclo de vida no está presente en todos los taxa de la familia Rivulidae ni es exclusivo a la misma, ya que al menos dos géneros africanos de la familia Aplocheilidae son anuales (Wourms 1964, 1967, Wourms 1972a,b,c). Este hecho ha generado controversias acerca del origen único o múltiple e independiente del anualismo como estrategia de vida (Costa 1998, Murphy *et al.* 1999, Hrbek & Larson 1999).

El género *Austrolebias* incluye aproximadamente 40 especies de peces anuales distribuidas en los ambientes temporales de las cuencas del Río Paraná medio y bajo, el Río Uruguay y el sistema Los Patos-Merín (Costa 2006, Loureiro *et al.* 2011). En este último sistema es donde se encuentra el mayor número de especies endémicas de peces anuales de la región subtropical (Costa 2002). Una de las principales razones propuestas para explicar la elevada diversidad encontrada en esta área, es la compleja historia geomorfológica de la región, la cual ha estado sujeta a transgresiones y regresiones marinas al menos desde el Mioceno, entre 15 y 30 millones de años atrás (Sprechmann 1978). La última de estas transgresiones es muy reciente y data de solamente 5 mil años atrás (García-Rodríguez *et al.* 2002, García-Rodríguez & Witkowiak 2003). Es probable que estos cambios hayan afectado la historia evolutiva de los peces anuales de esta región (García *et al.* 2000, 2001, Loureiro & García 2006).

El complejo de especies "*A. adloffii*", grupo monofilético formado por 6 especies (Costa 2002, García 2006), se caracterizan por un marcado dimorfismo sexual y sus especies se diferencian básicamente por el patrón de coloración de los machos, mientras que las hembras son similares entre sí y relativamente crípticas (Loureiro 2004, Costa 2006). De acuerdo a García (2006) el complejo de especies "*A. adloffii*" se habría diferenciado recientemente, posiblemente mediante un proceso de especiación simultánea y múltiple asociada a eventos de reticulación. Este escenario, junto con las diferencias en los patrones de pigmentación en los machos y el marcado dimorfismo sexual en morfología y comportamiento reproductivo de estas especies, sugiere que la selección sexual pudo estar en la base de la rápida diferenciación fenotípica y especiación. Dentro de este complejo, *A. charrua* y *A. reicherti* son dos especies hermanas de divergencia reciente, endémicas del sistema Los Patos-Merín, que presentan una distribución parapátrida (García *et al.* 2009). *Austrolebias charrua* se encuentra desde el Río Cebollatí hasta la cuenca de la Laguna Negra y sureste de la cuenca de la Laguna Merín (Costa & Cheffe 2001, Loureiro 2004), mientras que *A. reicherti* se distribuye desde el Río Yaguarón hasta el Río Cebollatí (Loureiro & García 2004, García *et al.* 2009). La distribución de estas especies presenta una zona de contacto en la parte baja de la cuenca del Río Cebollatí (García *et al.* 2009). Al igual que el resto de las especies del complejo, *A. charrua* y *A. reicherti* se

diferencian básicamente por el patrón de coloración de los machos mientras el comportamiento reproductivo es cualitativamente similar en ambas especies (García *et al.* 2008). Los machos de ambas especies se distinguen en base al diseño de bandas verticales oscuras y a la pigmentación de las aletas impares (Loureiro & García 2008) (Figura 1).

El dimorfismo sexual en el tamaño, la pigmentación y el comportamiento, sugiere que la selección sexual modela el comportamiento reproductivo de estas especies (Andersson 1994). Aunque estas características indican que las señales visuales juegan un rol importante en la elección de pareja, la elevada turbidez propia de los charcos donde habitan estos organismos dificulta el contacto visual, lo cual sugiere que otras modalidades sensoriales podrían también estar involucradas durante la reproducción. Por otra parte, la particular historia de vida combinada con la intensa variación temporal en diversos ejes ambientales que caracteriza al hábitat de este grupo de peces (Williams 2006), ofrecen novedosas y propicias condiciones para investigar causas y consecuencias de la plasticidad adaptativa de los niveles de selectividad y preferencias de apareamiento, y por lo tanto en las oportunidades para la selección sexual. Por último, el escenario de especiación simultánea y múltiple (García 2006) junto a las diferencias en la pigmentación en los machos, convierte a ese grupo de peces en un excelente modelo para investigar el rol de la selección sexual en el proceso de especiación.

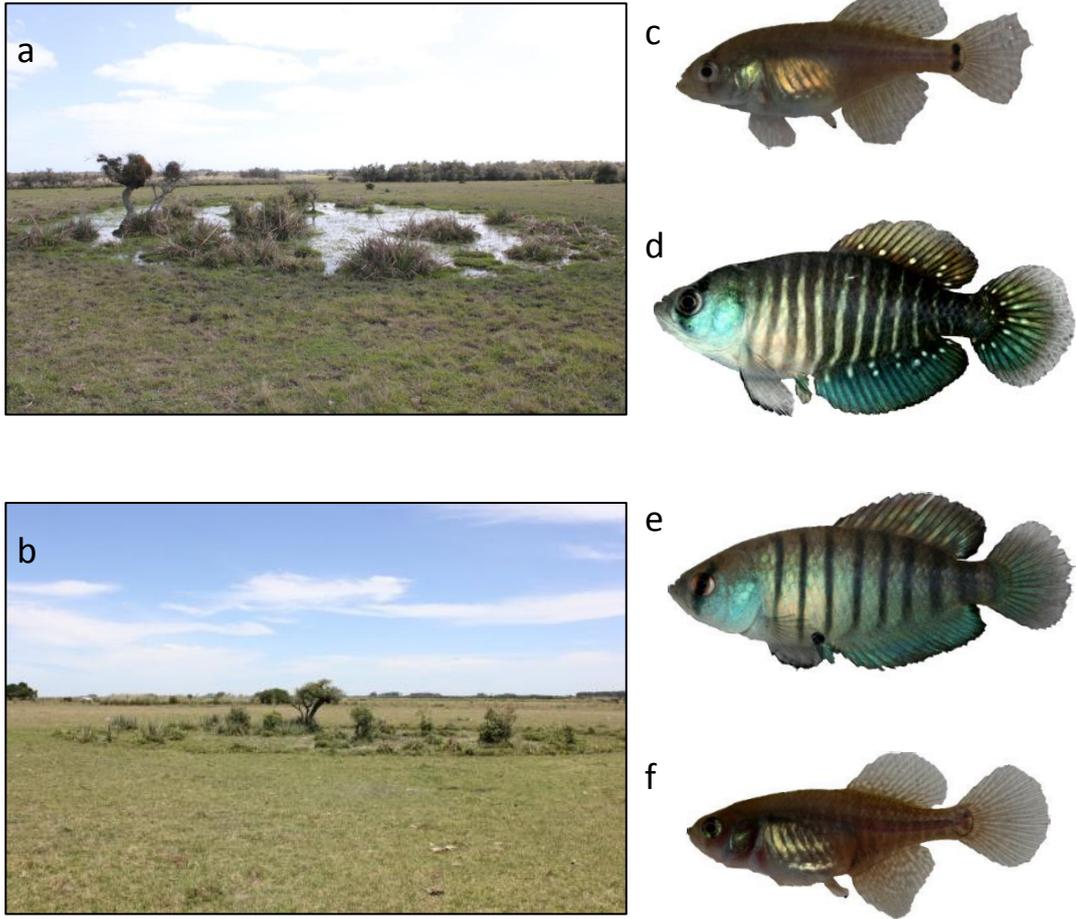


FIGURA 1. Ambiente temporal típico de los peces anuales durante la estación lluviosa (a) y el período de desecación (b). A la derecha se observan ejemplares adultos de *Austrolebias charrua* y *A. reicherti*: hembra *A. charrua* (c), macho *A. charrua*, (d) macho *A. reicherti* (e) y hembra *A. reicherti* (f).

HIPOTESIS GENERAL DE TRABAJO

El marcado dimorfismo sexual en el tamaño corporal, la pigmentación del cuerpo y el comportamiento, junto con el particular ciclo de vida de *Austrolebias*, fundamentan la hipótesis de que la selección sexual incide en la dinámica reproductiva en este grupo de peces. Asimismo, el escenario de especiación simultánea y múltiple planteado para el complejo de especies “*A. adloffii*” conjuntamente con que los machos de *A. reicherti* y *A. charrua* se distinguen básicamente por el patrón de pigmentación, sugieren que la selección sexual es responsable de la divergencia entre estas dos especies.

OBJETIVOS

1. Evaluar las preferencias de apareamiento en las hembras y la competencia entre los machos, y determinar los caracteres involucrados en estos comportamientos en la díada de especies *A. reicherti* y *A. charrua*. *Específicamente:*

a) Determinar el efecto del tamaño corporal de los machos sobre la elección de las hembras y la competencia intrasexual, y la interacción entre ambos mecanismos de selección.

b) Evaluar la existencia de comunicación química en el comportamiento reproductivo.

c) Establecer el patrón temporal en la intensidad de la selección sexual y su relación con la proporción sexual.

2. Determinar la naturaleza del aislamiento reproductivo entre *A. reicherti* y *A. charrua*, con el fin de poner a prueba el modelo de especiación por selección sexual en este grupo de peces. *Específicamente:*

a) Determinar la existencia de hibridación en cautiverio y en la naturaleza.

b) Evaluar el sistema de señales de apareamiento como mecanismo pre-apareamiento de aislamiento reproductivo, comparando áreas de contacto versus áreas de alopatría.

c) Evaluar los mecanismos de aislamiento reproductivo post-apareamiento, mediante estimaciones de fecundidad, eclosión, viabilidad y tasa de crecimiento.

Con el propósito de desarrollar este sistema modelo, esta tesis aborda experimentalmente cuatro tópicos de debate y controversia actual en la investigación sobre la selección sexual. La estructura de la tesis ordena los experimentos realizados y los resultados obtenidos en capítulos que habilitan la lectura independiente de cada uno de ellos. El capítulo 1 trata sobre la interacción de los dos componentes de la selección sexual – la elección de pareja y la competencia intrasexual. En el capítulo 2 se explora la multimodalidad de las señales reproductivas. En el capítulo 3 se investiga la variación estacional de la selección sexual y por último, en los capítulos 4 y 5 se evalúa el rol de la selección sexual en el proceso de especiación. Específicamente, en el capítulo 4 se explora la existencia de hibridación, mientras que el capítulo 5 se evalúa la naturaleza del aislamiento reproductivo entre *A. reicherti* y *A. charrua*.

CAPÍTULO 1.

Selección intra e intersexual sobre el tamaño corporal de
los machos

INTRODUCCIÓN

La selección sexual es un mecanismo por el cual se produce un éxito reproductivo diferencial entre los individuos de un mismo sexo, y típicamente actúa en mayor medida sobre los machos debido a la diferencias sexuales en la inversión de recursos en la formación de gametos y en las estrategias de búsqueda de pareja (Kokko *et al.* 2006). Aunque la evolución de ciertos rasgos puede ser promovida exclusivamente por uno de los dos componentes de la selección sexual, a menudo ambos factores están involucrados tanto en las decisiones de apareamiento de las hembras como en el resultado de las contiendas entre los machos (Qvarnström & Forsgren 1998, Moore & Moore 1999, Candolin 2004).

La evidencia empírica sugiere que la selección sexual vía competencia intrasexual y vía elección de pareja, podría actuar de manera opuesta sobre los mismos atributos (revisado en Arnqvist & Rowe 2005) y el resultado neto es reflejo del balance entre ambas fuerzas. En muchos casos, sin embargo, la selección intra e intersexual tiene efectos complementarios, promoviendo la expresión de los mismos rasgos en los machos (Wong & Candolin 2005, Benson & Basolo 2006, Gagliardi-Seeley & Itzkowitz 2006). En este caso, cualquier carácter favorecido por la selección intrasexual podría por lo tanto ser también beneficiado por la selección intersexual. La elección de las hembras debería reforzar la acción de la selección intrasexual cuando los rasgos favorecidos por la competencia macho-macho están correlacionados con beneficios directos o indirectos que las hembras obtienen al aparearse con esos machos (Robinson *et al.* 2011). Las señales conspicuas mediante las cuales los machos obtienen y defienden un recurso durante los encuentros agresivos, se espera que también sean pistas honestas a las que recurran las hembras para la elección de pareja ya que advierten sobre las cualidades y/o motivaciones de los machos de manera confiable (Candolin 1999, Berglund & Rosenqvist 2001). De esta forma, las interacciones agresivas se convierten en una fuente de información para evaluar la calidad de las parejas potenciales. Sobre este punto existe evidencia experimental directa de que el hecho de presenciar la interacción macho-macho influye en la subsecuente elección de pareja por parte de las hembras (Candolin 1999, Doutrelant & McGregor 2000). En algunos casos inclusive, las hembras incitan la competencia entre sus pretendientes para incrementar las chances de aparearse con el macho dominante (Cox & LeBoeuf 1977, Montgomerie & Thornhill 1989).

Austrolebias charrua es una especie del complejo “*A. adloffii*”, endémica del sistema Los Patos-Merín (Costa & Cheffe 2001, Loureiro & García 2008, García *et al.* 2009). Al igual que el resto de las especies del complejo, *A. charrua* presenta un marcado dimorfismo sexual: los machos son de mayor tamaño y presentan un patrón de coloración que consiste en un diseño de bandas verticales oscuras sobre un fondo claro, azulado, en el flanco; y poseen las aletas impares intensamente pigmentadas, mientras que las hembras son de color marrón claro y relativamente crípticas (Costa 2006, García *et al.* 2009).

En este estudio, se evaluó la selección sexual sobre el tamaño corporal de los machos de *A. charrua* a través de la preferencia de apareamiento de las hembras, la competencia entre los machos, y su interacción. Primero, se utilizaron pruebas de elección simultánea entre dos estímulos para valorar la preferencia de las hembras por el tamaño de los machos. Luego, se realizaron ensayos de competencia macho-macho para medir el efecto del tamaño corporal sobre el resultado de las contiendas. Finalmente, se evaluó directamente el efecto de la competencia entre los machos sobre la preferencia de apareamiento, permitiendo a las hembras visualizar la interacción agonística de los machos y posteriormente elegir entre ellos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta y mantenimiento

Se colectaron individuos adultos de *A. charrua* con red de mano en charcos temporales localizados en el Departamento de Rocha, Uruguay (Anexo 1), al comienzo de la estación reproductiva (agosto 2009). Los peces capturados fueron trasladados a la Facultad de Ciencias y mantenidos en cautividad entre 10 y 20 días bajo condiciones de temperatura constante (19°C) y fotoperiodo natural, alimentados diariamente con *Tubifex sp.* Los machos fueron alojados en acuarios individuales (20 x 9 x 15 cm, largo x ancho x altura) mientras que las hembras se mantuvieron en acuarios comunales (40 x 13 x 15 cm) en grupos de hasta 5 individuos. Luego de la experimentación, los peces fueron retornados a los acuarios de mantenimiento constituyendo el stock de cría en cautiverio.

Acuario experimental

El dispositivo experimental consistió en un acuario (45 x 28 x 20 cm) dividido a lo largo en dos compartimentos de igual tamaño mediante un vidrio fijo transparente. Para las pruebas de preferencia de las hembras, uno de los compartimentos fue a su vez subdividido por un vidrio opaco removible, cuyo perímetro fue recubierto con goma para prevenir el flujo de agua entre sectores (Figura 1.1). A fin de asemejar las condiciones naturales de los charcos en que habitan los peces anuales, el piso del acuario fue cubierto con una capa de 3 cm de turba. Para reducir cualquier fuente de disturbio externo y proveer un fondo uniforme, tanto las paredes laterales como la pared trasera del acuario fueron recubiertas con láminas plásticas de color negro. Todos los experimentos fueron realizados entre las 8:00 y 14:00 hs.

Preferencia de apareamiento

Para determinar si las hembras responden diferencialmente a machos de distinto tamaño, en el *día 1* se evaluó la preferencia de 30 hembras frente a 30 pares distintos de machos con una diferencia promedio de 8.2 ± 0.5 mm (Tabla 1.1). Cada individuo fue utilizado solamente una vez. Para evitar sesgo en los resultados debido a la preferencia de las hembras por un sector particular del acuario, para cada ensayo la hembra focal fue colocada en el compartimento de elección y los machos fueron asignados aleatoriamente al compartimento estímulo derecho o

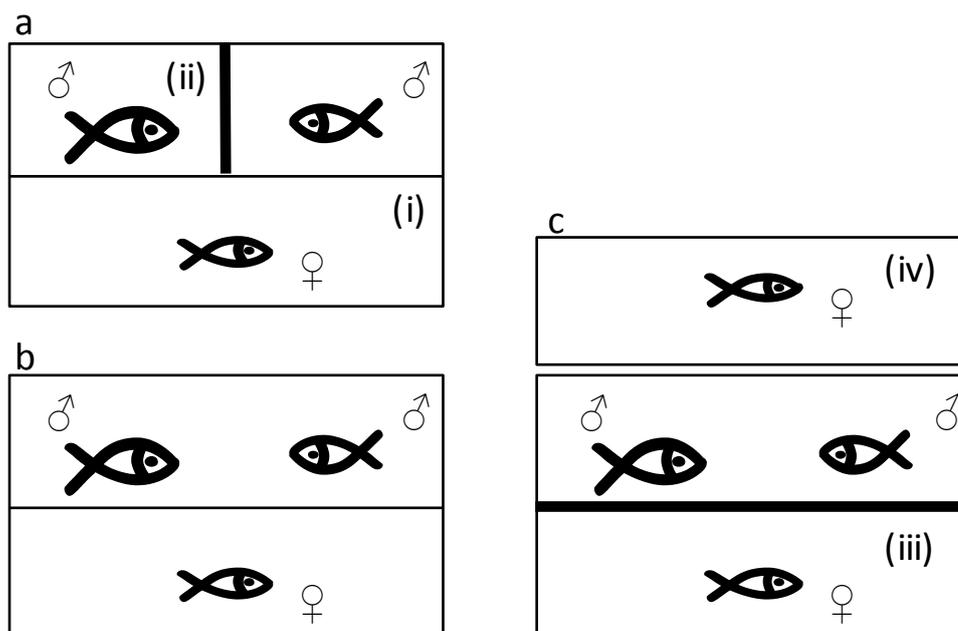


FIGURA 1.1 Acuario experimental. (a) Durante las pruebas de preferencia, el acuario experimental fue dividido en tres compartimentos. Un vidrio transparente separó a la hembra focal de los machos estímulo (i), y un vidrio opaco separó a los machos entre sí (ii). La separación entre los machos fue removida durante las pruebas de interacción agonística. En (b) las hembras presenciaron la interacción competitiva. En (c) la visualización de la interacción entre los machos estuvo impedida por una lámina negra colocada entre el compartimento de la hembra y el de los machos (iii). Para proveer estimulación visual a los machos durante la contienda, otra hembra fue puesta adyacente al acuario (iv).

TABLA 1.1. Tamaño (largo estándar, mm) de las hembras focales y los machos estímulo.

hembra	macho			hembra	macho		
	grande	chico	diferencia		grande	chico	diferencia
28.9	44.6	40.5	4.1	35.1	54.1	42.5	11.6
32	47.9	43.7	4.2	35.2	49.2	41.6	7.6
32.5	49.1	40.7	8.4	35.5	53.3	40.8	12.5
32.6	50.6	46.6	4	35.8	50.3	40.4	9.9
32.8	56.6	45	11.6	36	56.6	43.9	12.7
33.1	49.1	40.4	8.7	36	49.4	35.2	14.2
33.7	49.4	44.8	4.6	36.1	51.3	42.9	8.4
33.8	48.2	37.3	10.9	36.3	52.2	47.9	4.3
33.9	50.6	42.5	8.1	36.5	49.1	43.9	5.2
34.1	53.3	44.2	9.1	36.7	49.1	41.9	7.2
34.3	43.6	37.3	6.3	36.8	54.1	40.8	13.3
34.4	51.3	43.7	7.6	36.8	48.2	40.6	7.6
34.5	47	42.9	4.1	36.9	47.2	41.8	5.4
34.7	49	41.8	7.2	36.9	47.1	38.7	8.4
35	50.3	40.7	9.6	37.3	44.2	35.2	9

izquierdo. El diseño experimental previno la interacción visual y química entre los machos y por lo tanto cualquier efecto de competencia entre ellos (Figura 1.1a). Durante la primera hora de aclimatación al acuario experimental, una lámina opaca mantuvo a la hembra visualmente aislada de los machos. Luego, la lámina fue removida y se obtuvo el video-registro de dos períodos de 15 minutos espaciados por un intervalo de 1 hora. Después de cada prueba de preferencia, la lámina fue colocada nuevamente entre el compartimento de la hembra y el de los machos, y los individuos permanecieron visualmente aislados por el resto del día.

Interacción agonística

En el *día 2*, se removió la separación entre los dos machos, permitiendo que ambos interactuaran libremente. Se realizaron observaciones preliminares de la interacción macho-macho, para identificar las unidades comportamentales agonísticas, para establecer un criterio de resolución de la contienda y para determinar el ganador del enfrentamiento. Los machos exhibieron dos tipos de conductas agresivas: ataques y despliegue de las aletas con movimientos ondulatorios (Tabla 1.2). El resultado del enfrentamiento fue indicado por diferencias morfológicas y comportamentales entre los machos (Figura 1.2). El macho subordinado se caracterizó por la pérdida de coloración, la desaparición de las bandas verticales y el plegado de la aleta dorsal, asemejándose a una hembra. Además, este individuo se ubicó en la periferia del acuario y se mantuvo inactivo la mayor parte del tiempo, evitando la interacción con el otro macho. En contraste, el macho dominante permaneció con la aleta dorsal desplegada, la coloración marcada y se movió libremente por todo el acuario realizando comportamientos agresivos hacia el otro macho. El tiempo de resolución del conflicto fue considerado como el período desde el comienzo del encuentro hasta la sumisión de uno de los machos (Tabla 1.2). Se realizó un video-registro de los enfrentamientos hasta que el conflicto se resolvió, momento en que ambos machos fueron separados en sus compartimentos originales mediante un vidrio opaco. Aunque las interacciones entre los machos son a menudo agresivas, los individuos fueron separados rápidamente luego de determinar el ganador, y no se observaron lesiones en ningún ensayo.

Consistencia en la preferencia de apareamiento

Luego de la interacción agonística, los individuos permanecieron visualmente aislados por 3 horas; tiempo suficiente para retomar las actividades normales de forrajeo y nado en el acuario (observación personal). Para valorar la consistencia en la elección de pareja, para cada hembra se llevó a cabo una segunda prueba de preferencia entre la misma pareja de machos

TABLA 1.2. Unidades comportamentales identificadas en los enfrentamientos agresivos entre machos.

Ataque	el actor muerde o intenta morder al receptor; a menudo dirigido a las aletas
Despliegue lateral	el actor expone su flanco al receptor y mantiene su postura, con extensión y vibración de las aletas
Despliegue lateral con contacto	despliegue lateral donde ambos individuos permanecen con sus flancos en contacto en posición paralela o antiparalela
Despliegue sigmoide	despliegue lateral con movimientos ondulatorios del cuerpo
Sumisión	huída repentina hacia la periferia, acompañada con pérdida de coloración y retracción de la aleta dorsal

que en el *día 1*. Se obtuvo un video-registro de dos períodos de 15 minutos espaciados por un intervalo de 1 hora. Para evaluar si visualizar el enfrentamiento entre los machos induce cambios en la preferencia de apareamiento, las hembras fueron azarosamente separadas en dos grupos. Un grupo de hembras ($N = 15$) tuvo la oportunidad de observar la competencia previa entre los machos (Figura 1.1b), mientras que a otro grupo de hembras ($N = 15$) se le impidió presenciar el enfrentamiento colocando una lámina opaca entre su compartimento y el compartimento de los machos (Figura 1.1c). Cuando a las hembras focales se les impidió observar la competencia, el enfrentamiento de los machos fue presenciado por una segunda hembra, externa al experimento y utilizada exclusivamente en esta etapa, para controlar el posible efecto audiencia sobre la interacción macho-macho (Figura 1.1c). Los dos grupos experimentales no difirieron ni en el tamaño de las hembras ni en la asimetría de tamaño entre los machos (largo estándar de las hembras: prueba t para muestras independientes: $t_{28} = 1.721$, $N_1 = N_2 = 15$, $P = 0.097$; diferencia en largo estándar de los machos: prueba t para muestras independientes: $t_{28} = -0.576$, $N_1 = N_2 = 15$, $P = 0.569$).

Variables y análisis estadístico

Luego de finalizados los ensayos comportamentales, el flanco izquierdo de todos los individuos fue fotografiado en un acuario de 15 x 10 x 12 cm, donde los peces fueron cuidadosamente inmovilizados entre una esponja y la pared del acuario. Este procedimiento no tardó más de 20 segundos y la manipulación no tuvo efectos detectables en el subsecuente comportamiento. A partir de las imágenes digitales se realizaron medidas de largo estándar (desde el margen anterior de la cabeza hasta el margen distal del pedúnculo caudal) utilizando el software *tpsDig2*. Al final de cada etapa, se registró el índice de apariencia de los machos con una

puntuación entre 2 y 6. Esta puntuación resultó de la suma entre el valor de intensidad de coloración y el grado de despliegue de la aleta dorsal. La intensidad de coloración se basó en una escala ordinal: 1- sin bandas verticales en el flanco, coloración parda uniforme; 2- bandas verticales tenues, puntos coloreados de las aletas apenas visibles; 3- bandas verticales bien definidas en alto contraste con el fondo azul iridiscente, especialmente en la zona opercular; aletas impares oscurecidas intensificando el contraste con los puntos coloreados. La escala ordinal utilizada para cuantificar el despliegue de la aleta dorsal fue: 1- replegada totalmente; 2- replegada parcialmente; 3- desplegada. La mayor calificación (6) indica el máximo de intensidad de coloración y grado de despliegue de la aleta dorsal. En contraste, la menor puntuación (2) indica la pérdida total de coloración y bandas verticales, y el repliegue total de la aleta dorsal (Figura 1.2).



FIGURA 1.2. Interacción agonística macho-macho. Macho dominante (detrás) y macho subordinado (delante).

La preferencia de las hembras fue estimada como el tiempo de interacción con cada uno de los machos en un ensayo de elección simultánea (Basolo 1990, Kingston *et al.* 2003, Lehtonen & Lindström 2008, Walling *et al.* 2010). El comportamiento de interacción incluye la orientación de la hembra a los machos estímulo, la natación conjunta, la aceptación al seguimiento y al enterramiento, como se detalla en Belote & Costa (2004), García *et al.* (2008). Las videograbaciones fueron analizadas para cuantificar tanto la interacción de la hembra con ambos machos como el cortejo de cada uno de ellos. En todos los ensayos las hembras interactuaron con ambos machos y 58/60 machos realizaron despliegues de cortejo. La fuerza de la preferencia fue medida como la diferencia en el tiempo que la hembra interactuó con cada macho, y se examinó su relación con la diferencia de tamaño de los machos (largo estándar del macho de mayor tamaño – largo estándar del macho de menor tamaño) y con el tamaño de la hembra. Debido a que el tamaño de la hembra podría afectar no solamente la fuerza de su preferencia por un macho en particular, sino también la disposición general a

interactuar con los machos, se evaluó el potencial relacionamiento entre el tamaño de la hembra y el tiempo de interacción con ambos machos. Por otro lado, los machos tienen un rol activo en el cortejo (Belote & Costa 2004), y la preferencia de las hembras podría estar relacionada con la intensidad de cortejo de los machos. Para evaluar el efecto del cortejo de los machos sobre la preferencia en las hembras, se comparó la actividad de cortejo (porcentaje de tiempo de cortejo cuando la hembra estuvo frente a su compartimento) y el índice de apariencia entre los machos que resultaron preferidos y no preferidos por las hembras.

Los enfrentamientos agonísticos fueron divididos en dos etapas: 1- preconflicto: desde el comienzo del encuentro (tiempo 0) hasta la ocurrencia del primer ataque; 2- conflicto: desde la ocurrencia del primer ataque hasta la resolución del conflicto (tiempo de resolución). La resolución del conflicto fue establecida como el momento en el que uno de los peces se mostró sumiso. Las videograbaciones fueron analizadas para determinar la duración del preconflicto y conflicto, y el estatus (dominante/subordinado) de los machos basado en el resultado del enfrentamiento. Además, se registró la frecuencia de comportamientos agresivos (ataques, despliegues laterales, despliegues sigmoides, Tabla 1.2) y se evaluó la relación entre el tiempo de resolución y la diferencia de tamaño de ambos machos (largo estándar del macho dominante – largo estándar del macho subordinado).

El mismo criterio para determinar la preferencia de las hembras fue utilizado durante la primera parte del experimento y la etapa de evaluación de la consistencia de la preferencia. Una hembra particular fue valorada como consistente cuando prefirió al mismo macho en el *día 1* y *día 2*. Un macho fue considerado preferido si la hembra interactuó con él más del 50% del tiempo total de interacción (Wong 2004). El grado de consistencia y el cambio en la fuerza de preferencia entre el *día 1* y *día 2* (fuerza de preferencia *día 2* – fuerza de preferencia *día 1*) fue comparado entre las hembras que visualizaron el enfrentamiento y las hembras a las que se les impidió presenciar la competencia entre sus pretendientes. Debido a problemas técnicos, un ensayo de cada grupo de hembras no fue registrado ni durante el encuentro agonístico ni durante la evaluación de la consistencia de la preferencia.

Todos los datos fueron evaluados para la normalidad usando el test de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizaron pruebas paramétricas (prueba t, correlación de Pearson) a menos que las asunciones no se hayan cumplido. En estos casos, fueron utilizados equivalentes no paramétricos (prueba Wilcoxon, correlación de Spearman). Para evaluar la frecuencia con que los machos de mayor y menor tamaño resultaron dominantes, y para estimar la consistencia en la preferencia de apareamiento, se utilizó la prueba binomial. A menos que se indique, los

valores reportados son la media \pm error estándar. Para los análisis estadísticos se utilizó el software SPSS, versión 15.0 para Windows. La significancia estadística fue considerada a $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS

Preferencia de apareamiento

Las hembras permanecieron la mayor parte del tiempo ($74.3 \pm 4.4 \%$) en interacción con los machos, y significativamente más tiempo interactuando con el macho de mayor tamaño (prueba t para muestras relacionadas: $t_{29} = 2.475$, $P = 0.019$; Figura 1.3). Sin embargo, los machos preferidos y no preferidos mostraron valores similares tanto en la actividad de cortejo como en el índice de apariencia (cortejo: macho preferido = $68.3 \pm 3.7 \%$, macho no preferido = $64.1 \pm 4.9 \%$, prueba t para muestras relacionadas: $t_{29} = 0.696$, $P = 0.492$; índice de apariencia: macho preferido (mediana) = 5, macho no preferido = 4, prueba Wilcoxon: $Z = -1.403$, $N = 30$, $P = 0.161$). Por lo tanto, la preferencia de la hembra no fue determinada por el tiempo que los machos dedicaron a los despliegues de cortejo ni por su apariencia.

La fuerza de la preferencia no mostró una relación significativa con la diferencia en el tamaño de los machos (correlación de Pearson: $r_{28} = -0.007$, $P = 0.971$). Por otro lado, el tamaño de las hembras no se correlacionó con la fuerza de la preferencia (correlación de Pearson: $r_{28} = -0.085$, $P = 0.655$) ni con el tiempo total de interacción con los machos (correlación de Spearman: $r_s = 0.143$, $P = 0.452$).

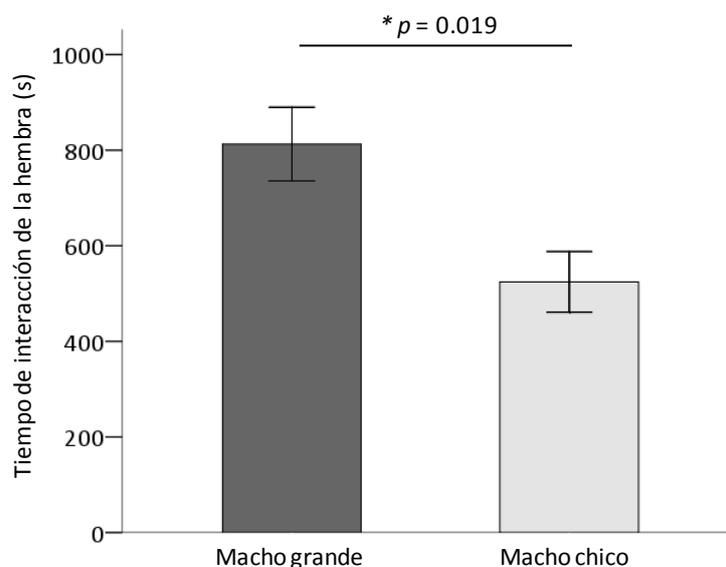


FIGURA 1.3. Tiempo de interacción (media \pm ES) de la hembra con los machos estímulo en un experimento de elección simultánea ($N = 30$)

Interacción agonística

El preconflicto mostró una duración de 55.3 ± 6.2 s y exhibición de despliegues laterales con y sin contacto (Tabla 1.2). En 6/28 casos la dominancia se estableció durante esta etapa. En el resto de los ensayos la dominancia se estableció a lo largo del conflicto, que abarcó 332.0 ± 106.2 s. Durante esta etapa los machos realizaron despliegues con contacto que alternaron con ataques y despliegues de amenaza (despliegue lateral y sigmoide, Tabla 1.2). En todos los ensayos uno de los machos estableció la dominancia sobre el otro, y usualmente el de mayor tamaño de la díada fue el dominante (24/28; prueba binomial: $P < 0.001$). Durante el conflicto, los machos de mayor tamaño fueron los más agresivos (prueba Wilcoxon: $Z = -4.057$, $N = 28$, $P < 0.001$): realizaron significativamente más ataques y más despliegues laterales que los machos de menor tamaño (prueba Wilcoxon: ataques: $Z = -4.040$, $N = 28$, $P < 0.001$; despliegues laterales: $Z = -4.081$, $N = 28$, $P < 0.001$) aunque no evidenciaron diferencias respecto a la frecuencia de despliegues sigmoides (prueba Wilcoxon: $Z = -0.360$, $N = 28$, $P = 0.719$) (Figura 1.4). Además, el macho de mayor tamaño de la díada presentó índice de apariencia superior (macho grande (mediana) = 6, macho chico = 3; prueba Wilcoxon: $Z = -3.636$, $N = 28$, $P < 0.001$). El tiempo de resolución del conflicto y la diferencia de tamaño de los machos se relacionaron negativamente (correlación de Spearman: $r_s = -0.606$, $N = 28$, $P = 0.001$; Figura 1.5).

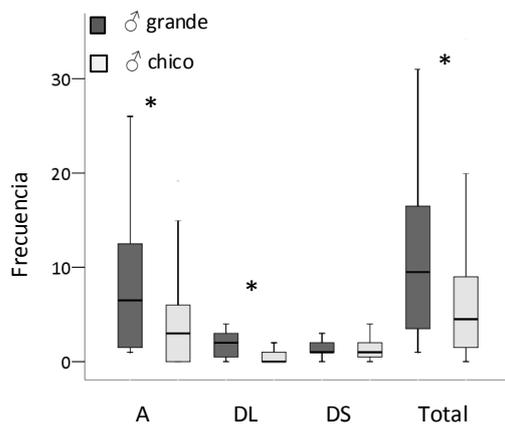


FIGURA 1.4. Frecuencia de las distintas unidades de comportamiento agresivo identificadas durante la interacción agonística: (A) ataques, (DL) despliegues laterales y (DS) despliegues sigmoides; (*) $p < 0.001$.

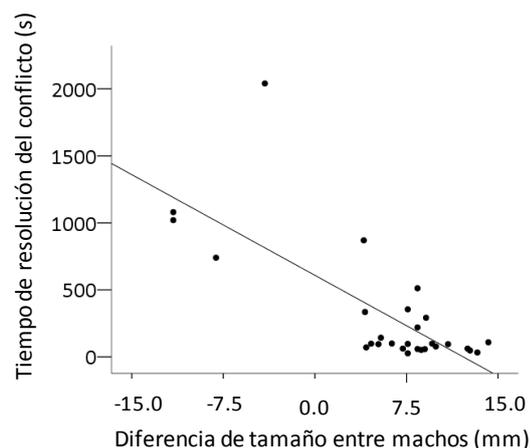


FIGURA 1.5. Relación entre el tiempo de resolución del conflicto en pruebas de interacción macho-macho y diferencia en el tamaño de los machos (largo estándar del macho dominante – largo estándar del macho subordinado).

Consistencia en la preferencia de apareamiento

Las hembras fueron consistentes en su elección en el *día 1* y *día 2*. En el 71.4% de los casos, eligieron al mismo macho en las dos pruebas (20/28 consistencias; prueba binomial: $P = 0.036$), sin diferencias entre las hembras que presenciaron y no presenciaron la competencia (prueba exacta de Fisher: $P = 0.678$; Tabla 1.3). La asimetría en el tamaño de los machos no fue significativamente diferente en los ensayos donde las hembras cambiaron o mantuvieron su preferencia (ensayos consistentes = 7.9 ± 0.6 mm, ensayos inconsistentes = 9.5 ± 1.1 mm; prueba t para muestras independientes: $t_{28} = -1.252$, $N_1 = 20$, $N_2 = 8$, $P = 0.222$). Además, los cambios en la preferencia no fueron dirigidos hacia los machos que resultaron dominantes en la interacción competitiva (2/5 y 1/3 de los cambios ocurridos fueron en dirección al macho dominante en las hembras que presenciaron y no presenciaron la competencia, respectivamente). Si bien la elección en el *día 2* fue consistente, la fuerza de la preferencia con el primer macho elegido (inicialmente preferido) decreció significativamente (*día 1* = 544.1 ± 75.7 s, *día 2* = 242.6 ± 118.1 s; prueba t para muestras relacionadas: $t_{27} = 2.429$, $P = 0.022$). Contrario a la predicción, el cambio promedio de la fuerza de preferencia con el macho inicialmente preferido, no difirió entre las hembras que visualizaron la interacción competitiva y aquellas que fueron privadas de esa condición (hembras que presenciaron la interacción = -508.9 ± 164.9 s, hembras que no presenciaron la interacción = -94.1 ± 173.8 s; prueba t para muestras independientes: $t_{26} = -1.731$, $N_1 = N_2 = 14$, $P = 0.095$). El subsecuente comportamiento de los machos no estuvo afectado por el resultado de la interacción agonística previa, dado que, durante la prueba de preferencia en el *día 2*, ni el índice de apareamiento ni el porcentaje de cortejo fue significativamente diferente entre los machos dominantes y subordinados (índice de apareamiento: macho dominante (mediana) = 4, macho subordinado = 4; prueba Wilcoxon: $Z = -0.994$, $N = 28$, $P = 0.320$; cortejo: macho dominante = 49.7 ± 6.5 %, macho subordinado = 43.7 ± 5.0 %; prueba t para muestras relacionadas: $t_{27} = 1.606$, $P = 0.120$).

TABLA 1.3. Consistencia en la elección de las hembras en pruebas de preferencia conducidas en dos días consecutivos, en casos donde las hembras presenciaron y no presenciaron la interacción competitiva entre los machos. Una hembra fue valorada como consistente en su elección cuando ella prefirió al mismo macho en ambos días (ver texto).

	Hembras que presenciaron la competencia	Hembras que no presenciaron la competencia	Total
Consistencia	9	11	20
Inconsistencia	5	3	8
Total	14	14	28

DISCUSIÓN

Este estudio demuestra que tanto la selección intra- como intersexual favorecen a los machos de mayor tamaño en *Austrolebias charrua*. Las hembras interactuaron más con el macho de mayor tamaño en un clásico paradigma de elección entre dos estímulos. Además, el tamaño corporal afectó el resultado de las contiendas, donde el macho de mayor tamaño fue socialmente dominante en la mayoría de los casos.

El porcentaje de tiempo que las hembras permanecieron orientadas e interactuando con los machos (aprox. 75%) y el tiempo invertido de los machos en despliegues de cortejo (aprox. 65%) durante las pruebas de elección, refleja la motivación reproductiva y valida la utilización en *Austrolebias* de un diseño experimental ampliamente utilizado para evaluar elección de pareja en peces (Berglund & Rosenqvist 2001, Kangas & Lindström 2001, Wong 2004, Walling *et al.* 2010). La preferencia exhibida por las hembras de *A. charrua* hacia los machos de mayor tamaño es congruente con la elección de las hembras basada en el tamaño corporal de los machos, documentada en muchos grupos taxonómicos (Andersson 1994), específicamente en peces (Ryan & Wagner 1987, Ryan *et al.* 1990, Rosenthal & Evans 1998).

Esta preferencia de las hembras por machos de mayor tamaño podría tener varias causas. Primero, las hembras podrían obtener beneficios directos al aparearse con machos grandes porque el tamaño corporal está correlacionado con el estatus de dominancia (Wong & Candolin 2005). Los beneficios directos potenciales de aparearse con machos dominantes podrían incluir refugios y mejores sitios para desovar, ambos factores limitantes para la reproducción y la viabilidad de los huevos. Segundo, los machos de mayor tamaño lograrían provocar mayor estimulación visual y por lo tanto explotar un sesgo sensorial subyacente a las preferencias de las hembras (Rosenthal & Evans 1998). Tercero, la preferencia de las hembras también podría evolucionar vía selección indirecta sobre rasgos de los machos (Fisher 1930, Zahavi 1975, Andersson 1994). Los resultados indican que la preferencia de las hembras no estuvo afectada por la diferencia en el tamaño entre los machos. Posiblemente, esto se deba a que la reducida variación en el tamaño de los machos ya que en la mayoría de las díadas el macho de mayor tamaño fue entre 1.1 y 1.3 veces más grande que el macho de menor tamaño.

Muchos estudios han documentado preferencia de apareamiento a favor de machos que despliegan mayor intensidad de cortejo y/o que exhiben más colores (ver Andersson 1994, Kokko *et al.* 2003). En el presente trabajo, ni el tiempo que los machos dedicaron a cortejar ni el índice de aparencia fueron diferentes entre los machos preferidos y no preferidos. En este experimento, la preferencia de las hembras fue evaluada frente a una díada de machos con asimetría en el tamaño, previamente seleccionados de acuerdo al tamaño corporal. Aunque esta aproximación incrementa sustancialmente las habilidades de detectar preferencias por el tamaño de los machos, inevitablemente reduce la capacidad de detectar la contribución relativa de otros rasgos.

El tamaño corporal también afectó el resultado de la competencia intrasexual, donde los machos de mayor tamaño resultaron dominantes en la mayoría de los casos. Los machos de mayor tamaño poseen ventajas competitivas en muchas otras especies de peces (Beaugrand *et al.* 1996, Moretz 2003, Benson & Bassolo 2006). La duración del conflicto disminuyó a medida que aumentaron las diferencias en el tamaño de los contrincantes al igual que lo reportado en otros estudios (Arnott & Elwood 2009, Briffa & Sneddon 2010). Además, el macho de mayor tamaño, usualmente el ganador, realizó mayor número de despliegues agonísticos hacia su oponente.

Los despliegues laterales y sigmoides son conductas realizadas por los machos durante el cortejo y los encuentros agonísticos, y pautas comportamentales similares han sido documentados en numerosas ocasiones para otros peces (por ej. Enquist & Jakobsson 1986, Morris *et al.* 1995). El despliegue lateral, en donde uno de los machos expone su flanco al oponente con extensión y oscilación de las aletas, probablemente provea pistas vibratorias, visuales y táctiles correlacionadas con el tamaño corporal. El despliegue sigmoide a su vez, donde un individuo realiza movimientos ondulatorios del cuerpo a alta velocidad, podría ser indicador de la condición corporal, la motivación y la habilidad locomotora del emisor. En concordancia con esta interpretación, durante los encuentros agonísticos los machos de mayor tamaño realizaron más despliegues laterales y ataques que los de menor tamaño, mientras que la frecuencia de despliegues sigmoides no estuvo relacionada con el tamaño.

Finalmente, se evaluó el efecto de presenciar la interacción competitiva entre machos en la preferencia de apareamiento de las hembras de *A. charrua*. Las hembras fueron consistentes en su elección independientemente de si visualizaron o no la competencia. A pesar de la consistencia observada, la fuerza de la preferencia decreció en el *día 2*, y esta disminución fue independiente de si el macho preferido fue dominante o subordinado en la

interacción competitiva, sugiriendo que la competencia no incrementa el atractivo del macho dominante sobre el subordinado. Sin embargo, dada la dificultad de distinguir entre estos dos rasgos altamente correlacionados, no es posible concluir que la percepción del estatus social de los machos sea irrelevante en la elección de la hembra. Los machos de mayor tamaño tienen ventajas en las interacciones agonísticas y son preferidos por las hembras. Este patrón es consistente con el modelo de utilidad dual (Berglund *et al.* 1996), en el cual se espera que aquellos rasgos importantes para la competencia intrasexual sean a la vez utilizados por las hembras como señales honestas para la elección de pareja. Alternativamente, la preferencia de las hembras podría simplemente ser una función de la estimulación sensorial, con machos de gran tamaño provocando mayor respuesta desde la periferia visual (Rosenthal & Evans 1998). Dado que tanto la preferencia de apareamiento de las hembras como la competencia macho-macho favorecen al macho de mayor tamaño, estudios adicionales son requeridos para valorar la importancia relativa de la selección intra- e intersexual en la naturaleza.

En conclusión, este trabajo muestra que, en el pez anual *A. charrua*, la competencia intrasexual y la elección de pareja actúan en concierto con respecto al tamaño corporal de los machos. Este es el primer trabajo que evalúa selección intra- e intersexual sobre el tamaño corporal en *Austrolebias*.

CAPÍTULO 2.

Comunicación química durante el comportamiento reproductivo

INTRODUCCIÓN

El olfato es crucial en las actividades reproductivas de muchos organismos (Wyatt 2003). En peces, la comunicación química ha sido reconocida como un importante mediador de las interacciones sociales, incluyendo tanto el cuidado parental y la señalización de alarma, como la coordinación de actividades de forrajeo, nado en cardumen y migración (revisado en Stacey & Sorensen 2005, Wisenden & Stacey 2005). Además, las señales químicas en peces tienen un rol importante en la elección de pareja (Milinski *et al.* 2005, Fisher & Rosenthal 2006), la competencia intrasexual (Almeida *et al.* 2005, Barata *et al.* 2007) y los procesos de especiación (Plenderleith *et al.* 2005). Las señales químicas pueden jugar un rol particularmente importante en el reconocimiento de homoespecíficos, y por lo tanto actuar como un mecanismo de aislamiento reproductivo entre especies cercanamente emparentadas (McLennan & Ryan 1997, 1999, Kodric-Brown & Strecker 2001, Wong *et al.* 2005, Rafferty & Boughma 2006).

Aunque ha sido ampliamente aceptado que las señales químicas son un mediador importante en la fisiología y el comportamiento reproductivo de peces, la naturaleza química de las feromonas ha sido estudiada solamente en unas pocas especies (Stacey 2003, Stacey & Sorensen 2005, Sorensen & Hoye 2010). Generalmente, los peces no tienen glándulas especializadas para la producción de feromonas ni manifiestan comportamientos de marcaje visualmente aparentes, lo que plantea dificultades en la recolección de muestras para el análisis químico (Rosenthal *et al.* 2011, Maruska & Fernald 2012). La mayoría de las feromonas de peces que han sido químicamente identificadas hasta la fecha, incluyen prostaglandinas y esteroides, aunque también ha sido reportado el rol comunicativo de ciertos aminoácidos y ácidos biliares (revisado en Sorensen & Hoye 2010). Estas categorías de compuestos difieren en su polaridad, y por lo tanto dicha propiedad es una información clave cuando se intenta caracterizar químicamente a las feromonas de peces.

Austrolebias reicherti es una especie del complejo "*A. adloffii*", endémica de los Humedales del Este de Uruguay (Loureiro & García 2008). Al igual que el resto de las especies del complejo, los machos realizan despliegues de cortejo y exhiben una coloración sexualmente dimórfica, sugiriendo que las señales visuales juegan un rol importante en la elección de pareja (García *et al.* 2008). Sin embargo, la poca profundidad y elevada turbidez que caracteriza a los charcos temporales donde habitan estos peces dificulta el contacto visual,

y por tanto otras modalidades sensoriales podrían también estar involucradas en el comportamiento reproductivo. De hecho, la comunicación acústica ha sido reportada en peces anuales del género *Cynolebias* (Belote & Costa 2003, Costa *et al.* 2010), y la comunicación química podría también verse favorecida en el contexto de elección y encuentro de parejas sexuales.

En este estudio, se evaluó la presencia de comunicación química en el comportamiento reproductivo de *A. reicherti*. Específicamente, se investigó si: *a)* las hembras responden a pistas químicas liberadas por machos homoespecíficos en un contexto reproductivo; *b)* las hembras discriminan entre pistas químicas liberadas por hembras y machos homoespecíficos; *c)* la fracción polar y apolar de las pistas químicas liberadas por los machos son igualmente atractivas para las hembras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y condiciones de mantenimiento

Los experimentos fueron realizados con adultos de *Austrolebias reicherti* criados en cautiverio, obtenidos a partir de cruzamientos aleatorios entre un stock grande de peces adultos. Los peces fueron alojados en acuarios de mantenimiento bajo un régimen de temperatura constante (19° C) y fotoperíodo natural, y fueron alimentados con *Artemia salina* y *Tubifex* sp. *ad libitum*. Una vez alcanzada la diferenciación sexual, los machos fueron separados y alojados en acuarios individuales de 20 x 9 x 15 cm (largo x ancho x alto), para reducir el estrés provocado por las interacciones agonísticas y prevenir el establecimiento de jerarquías. Las hembras fueron alojadas en acuarios comunales de 40 x 13 x 15 cm, en grupos de hasta 5 individuos.

Estímulo químico

La obtención y presentación de estímulos químicos se realizó en base a un protocolo establecido en estudios previos en peces Cyprinodontiformes (McLennan & Ryan 1999, Wong *et al.* 2005, Fisher *et al.* 2006, Rosenthal *et al.* 2011). Las pistas químicas fueron obtenidas desde machos (largo estándar = 30.5 ± 3.2 mm, N = 28) y hembras (largo estándar = 25.4 ± 2.4 mm N = 28) alojados individualmente en acuarios de 20 x 9 x 15 cm conteniendo 1 L de agua declorinada y aireada. Los acuarios fueron previamente lavados con detergente y alcohol 95%, y enjuagados exhaustivamente. Para obtener estímulos químicos, se condicionó agua de la siguiente manera: un acuario conteniendo un macho y otro conteniendo una hembra se dispusieron adyacentemente por el lado mayor, por un período de 24 horas, para permitir la comunicación visual entre ellos. Se evitó el contacto visual con el resto de los peces mediante una lámina opaca colocada alrededor de los dos acuarios. Los individuos fueron privados de alimento 24 horas antes y durante la producción de estímulos para minimizar la presencia de señales alimenticias desde la excreción. El comportamiento del macho fue continuamente observado durante la primera y la última hora del período de 24 horas en que permaneció para condicionar el agua con sus odorantes. En todas las diadas se observó comportamiento de cortejo, que consistió en despliegues laterales, despliegues sigmoides, e invitación al seguimiento, como fue reportado previamente (García *et al.* 2008). Para obtener estímulos homogéneos, el agua conteniendo posibles odorantes de 14 individuos de un mismo sexo (a

partir de aquí agua condicionada) fue mezclada en un acuario de 40 x 30 x 20 cm previamente lavado con detergente y alcohol 95%, y enjuagado exhaustivamente, obteniendo dos réplicas de estímulo químico para cada sexo. Los peces normalmente nadan en una “sopa” de olores, y la mezcla de agua condicionada por distintos individuos seguramente fue mejor reflejo de la realidad de los charcos y permitió a su vez promediar la variación individual (McLennan 2004). Debido a que no se observaron diferencias en la respuesta de las hembras entre ambas réplicas de estímulo, los datos fueron analizados de manera conjunta. Se generó agua control utilizando el mismo protocolo que para la producción de agua condicionada, pero sin introducir peces en los acuarios. Las muestras de agua condicionada y control fueron almacenadas a -20°C por dos semanas antes de los experimentos comportamentales, y se usaron 7 l de agua condicionada por machos para el fraccionamiento químico. Para el almacenamiento se utilizaron contenedores de tereftalato de polietileno de 2 l que previamente contuvieron agua mineral purificada. Cada contenedor fue usado una única vez y luego descartado.

Fraccionamiento químico del agua condicionada por machos

Para evaluar la polaridad de las señales químicas, el agua condicionada por machos fue sometida a una extracción en fase sólida (SPE), utilizando cartuchos de fase reversa C-18 (1000 mg, Alltech Assoc. Inc., USA). El agua condicionada por machos fue filtrada para remover sólidos (papel Whatman n°4), y se adicionó MeOH hasta alcanzar una concentración de 2%. La solución fue entonces aplicada a cartuchos SPE (1 l/cartucho, ca. 5 ml/min) previamente condicionados con aplicación secuencial de MeOH y 2% MeOH (10 ml de cada uno). La solución que contuvo los componentes no retenidos (a partir de aquí fracción polar) fue almacenada a -20 °C por dos semanas antes de los experimentos comportamentales, y los cartuchos se eluyeron con 2 x 10 ml de MeOH, y lavados con 10 ml de 2% MeOH. El eluido (a partir de aquí fracción apolar) se diluyó con 1 l de agua de clorinada, y fue almacenado a -20 °C por dos semanas antes de los experimentos comportamentales. Para controlar el posible efecto del MeOH sobre el comportamiento de las hembras, el agua control utilizada para evaluar la preferencia frente a las fracciones fue adicionada con MeOH hasta alcanzar una concentración de 2%.

Pruebas de preferencia

Se realizaron pruebas de elección simultánea para evaluar la respuesta de las hembras frente a: *a)* agua condicionada por machos vs agua control; *b)* agua condicionada por machos vs agua

condicionada por hembras; c) la fracción polar y d) apolar del agua condicionada por machos, ambas contra agua control con 2% MeOH. Los ensayos a) y b) fueron realizados secuencialmente con un grupo de 20 hembras (largo estándar = 25.5 ± 1.8 mm). Los ensayos c) y d) fueron también realizados secuencialmente con otro grupo de 20 hembras (largo estándar = 29.7 ± 4.0 mm). Los ensayos sucesivos con una hembra determinada fueron realizados con un intervalo de 24 horas, y los estímulos fueron presentados en orden aleatorio para evitar sesgos debido a la experiencia previa de las hembras.

Las pruebas de preferencia fueron realizadas en acuarios experimentales de 60 x 20 x 20 cm, conteniendo cada uno 18 L de agua declorinada y aerada. En cada acuario se definieron tres sectores mediante marcas externas: un área central de 30 cm (zona neutra) y dos sectores laterales de 15 cm cada uno (zonas de elección) (Figura 2.1). Las hembras fueron individualmente colocadas en el acuario experimental y se les permitió nadar libremente durante 30 minutos de aclimatación. Una vez transcurrido el período de aclimatación, las hembras fueron recluidas por 5 minutos en el centro del acuario en un prisma de acrílico opaco (10 x 10 x 20 cm, largo x ancho x altura), que fue removido una vez que la liberación de los estímulos se inició de manera simultánea. Los estímulos químicos fueron adicionados en los extremos del acuario experimental a un flujo constante de 10 ml/min, desde tubos de vidrio (100 x 5 cm, largo, diámetro) equipados con llaves ajustables (Figura 2.1). Un estudio preliminar utilizando una solución acuosa de colorante de alimento, determinó que, una vez iniciado el goteo, los estímulos no se mezclan durante los primeros 30 minutos del ensayo.

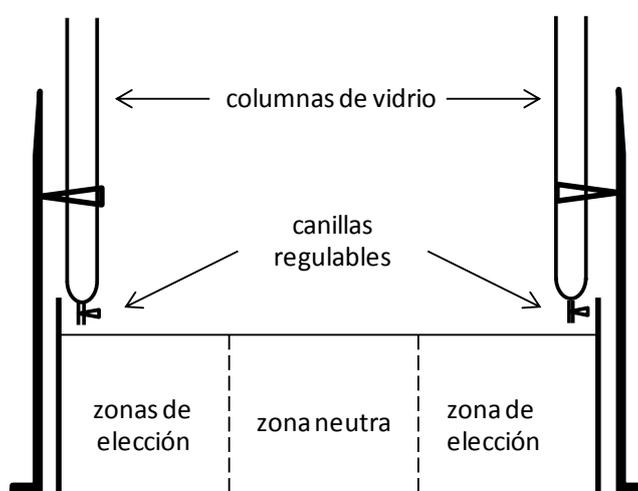


FIGURA 2.1. Acuario experimental para pruebas de preferencia. Los estímulos fueron producidos en otro conjunto de acuarios y luego adicionados a las columnas de vidrio. La velocidad del flujo fue establecida por canillas regulables. La zona neutra y zonas de elección fueron definidas mediante marcas externas (líneas punteadas).

A fin de asegurar que las hembras estuvieran expuestas a ambas señales, y que fueran por lo tanto capaces de realizar una elección entre los dos estímulos, solamente se utilizaron en el análisis los ensayos donde las hembras visitaron ambos lados del acuario dentro de los primeros 10 minutos (67/80). Una vez que ambos sectores del acuario experimental fueron visitados, se video-registró el comportamiento de las hembras durante los siguientes 20 minutos. Los estímulos fueron asignados aleatoriamente al sector derecho o izquierdo en cada experimento para evitar sesgo de lateralidad. Luego de cada prueba, las hembras fueron retornadas a su acuario de mantenimiento, y tanto el acuario experimental como las columnas de vidrio se lavaron con detergente y alcohol 95%, y se enjuagaron exhaustivamente.

Análisis estadístico

Todos los datos fueron evaluados para la normalidad utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. El tiempo de asociación de las hembras con los diferentes estímulos fue comparado con la prueba t. La frecuencia de entrada a cada zona de elección y el número de eventos de contacto (orientación evidente hacia el estímulo y localización de la hembra en la superficie del agua, donde el goteo del estímulo fue aplicado) fueron comparados con la prueba Wilcoxon. Para los análisis estadísticos se utilizó el software SPSS, versión 15.0 para Windows. La significancia estadística fue considerada a $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS

Preferencia de las hembras por agua condicionada por machos

Las hembras pasaron significativamente más tiempo asociadas con el estímulo olfativo del macho que con el agua control (prueba t para muestras relacionadas: $t_{17} = 3.805$, $P = 0.001$; Figura 2.2a) o con el agua condicionada por hembras (prueba t para muestras relacionadas: $t_{19} = 4.784$, $P < 0.001$; Figura 2.2b). Además, las hembras realizaron significativamente más eventos de contacto con el agua condicionada por machos que con el agua control o con el agua condicionada por hembras (Tabla 2.1).

La frecuencia de entradas también fue significativamente superior en la zona del acuario correspondiente al estímulo macho que en la zona con agua control (Tabla 2.1). Sin embargo, aunque se observó una tendencia a entrar mayor número de veces a la zona del estímulo macho ($P = 0.08$), la frecuencia de entrada en la zona donde se liberó el agua condicionada por hembras no fue significativamente menor (Tabla 2.1).

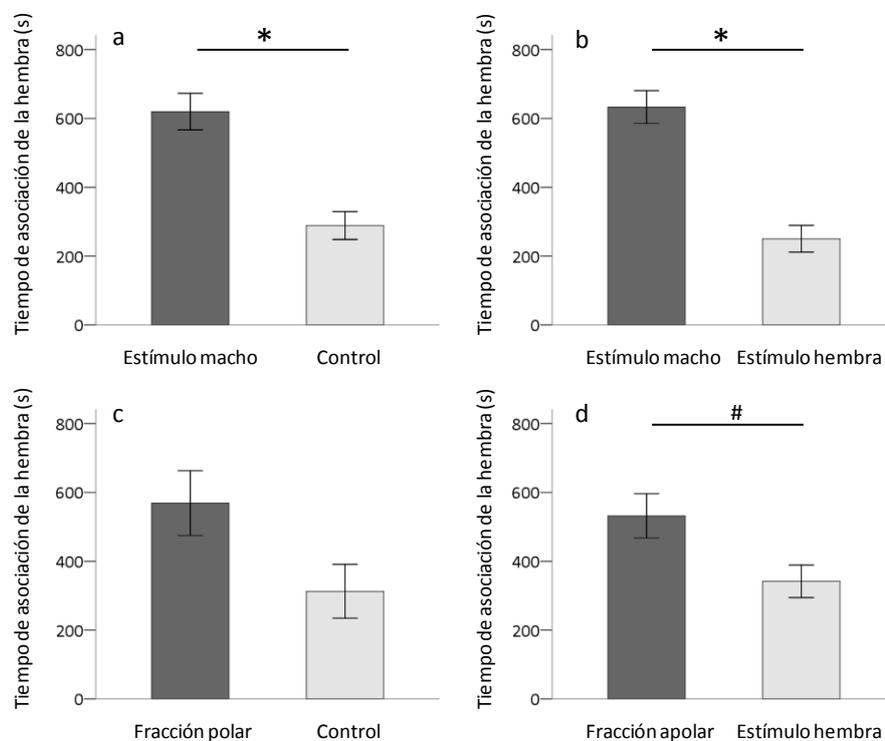


FIGURA 2.2 Tiempo de asociación (media \pm ES) de hembras *A. reicherti* con señales químicas. (a) Agua condicionada por machos vs agua control, (b) agua condicionada por machos vs agua condicionada por hembras, (c) fracción polar del agua condicionada por machos vs agua control y (d) fracción apolar del agua condicionada por machos vs agua control. (*) $p < 0.01$; (#) valor marginal $0.1 < p < 0.05$.

Preferencia de las hembras por las fracciones del agua condicionada por machos

El tiempo de asociación de las hembras con el agua control y la fracción polar del agua condicionada por machos no fue significativamente diferente (prueba t para muestras relacionadas: $t_{14} = 1.581$, $P = 0.136$; Figura 2.2c). En las pruebas con la fracción apolar del agua condicionada por machos, se observó una tendencia no significativa hacia esta fracción respecto al agua control (prueba t para muestras relacionadas: $t_{14} = 1.812$, $P = 0.091$; Figura 2.2d). La frecuencia de entradas a la zona de estímulos versus la zona control no fue significativamente diferente para ninguna de las fracciones (Tabla 2.1). Además, el número de eventos de contacto no difirió entre el agua control y ambas fracciones del estímulo macho, aunque en este caso se observó una tendencia no significativa hacia la fracción apolar del agua condicionada por machos ($P = 0.08$) (Tabla 2.1).

TABLA 2.1 Respuesta comportamental de hembras de *A. reicherti* en un experimento de elección simultánea con diferentes estímulos. La movilidad de la hembra refleja el número de entradas a cada zona de elección; los eventos de contacto consisten en la orientación evidente hacia el estímulo y la localización de la hembra en la superficie del agua, donde el goteo del estímulo fue aplicado. (a) Media \pm DE, (b) valor de probabilidad de la prueba Wilcoxon.

Prueba de elección (N)	Estímulos	Movilidad de la hembra ^a	p ^b	Eventos de contacto ^a	p ^b
a (18)	Agua condicionada por machos	14.6 \pm 8.0		4.4 \pm 4.3	
	Control	11.4 \pm 8.1	0.01	1.2 \pm 1.8	0.01
b (19)	Agua condicionada por machos	13.9 \pm 10.3		3.4 \pm 5.4	
	Agua condicionada por hembras	10.9 \pm 11.8	0.08	1.0 \pm 2.3	0.03
c (15)	Fracción polar	16.5 \pm 10.0		3.8 \pm 4.6	
	Control	16.2 \pm 15.8	0.65	0.5 \pm 0.8	0.1
d (15)	Fracción apolar	19.3 \pm 16.0		4.2 \pm 5.6	
	Control	16.1 \pm 14.7	0.25	1.3 \pm 2.4	0.08

DISCUSIÓN

Este estudio demuestra la existencia de comunicación química en un contexto reproductivo en *Austrolebias reicherti*, a través de respuestas específicas de las hembras a señales químicas producidas por los machos. Estas señales podrían ser importantes durante el estado inicial de localización y reconocimiento de la pareja sexual, cuando la distancia dentro del charco impide la detección visual. Además, las señales químicas podrían actuar a corta distancia vía reforzamiento de las pistas visuales, por ejemplo durante el cortejo. En peces del género *Xiphophorus*, las hembras evalúan tanto señales visuales como olfativas durante el cortejo, donde las últimas juegan un rol determinante en el reconocimiento de pareja homoespecífica (Crapon de Caprona & Ryan 1990, Hankison & Morris 2003).

La preferencia de las hembras por las señales de los machos se redujo o dispó cuando el estímulo fue separado en la fracción polar y apolar. Sin embargo, se observó una tendencia ($P = 0.09$) para la atracción hacia la fracción que incluía los componentes retenidos en el cartucho de fase reversa, sugiriendo que las señales podrían estar constituidas por compuestos orgánicos de polaridad media. Estos compuestos incluyen esteroides, prostaglandinas y ácidos biliares, pero no aminoácidos, los cuales no serían retenidos en este proceso. Alternativamente, compuestos de distinta polaridad podrían combinarse para producir una señal multicomponente que sea atractiva para las hembras (Sorensen & Hoye 2010). En este sentido, Levesque *et al.* (2011) reportaron componentes polares y apolares en feromonas de reconocimiento específico del pez *Carassius auratus*, y determinaron la presencia de ambas fracciones como condición necesaria para lograr actividad biológica. Futuros estudios deberían valorar la preferencia por la mezcla que contenga ambas fracciones.

La importancia de la comunicación química durante las interacciones sociales en peces ha sido ampliamente reconocida. Por ejemplo, en peces espinosos *Gasterosteidae*, las feromonas son utilizadas en el reconocimiento de parejas (Ostlund 1995, McLennan 2003, 2004, Rafferty & Boughma 2006), en la valoración de la condición reproductiva (Waas & Colgan 1992, Häberli & Aeschlimann 2004), y de la inmunocompatibilidad (Reusch *et al.* 2001, Aeschlimann *et al.* 2003, Milinski *et al.* 2005). Las señales olfativas también pueden ser relevantes en el reconocimiento de homoespecíficos, y por lo tanto pueden actuar como mecanismo de aislamiento reproductivo entre especies cercanamente emparentadas. Esto ha sido demostrado de manera convincente en *Xiphophorus*, un género que ha sido

detalladamente investigado en torno a los mecanismos de reconocimiento específico y a la elección de pareja (Crapon de Caprona & Ryan 1990, McLennan & Ryan 1997, 1999, Wong *et al.* 2005, Fisher & Rosenthal 2006, Fisher *et al.* 2009). Por ejemplo, especies simpátricas de este género utilizan señales químicas durante el reconocimiento específico, y la disrupción en este canal comunicativo ha causado entrecruzamiento en poblaciones naturales (Rosenthal *et al.* 2003, Culumber *et al.* 2010). Por otra parte, Plenderleith *et al.* (2005) demostraron que las señales químicas están implicadas en el reconocimiento específico en los cíclidos de los grandes lagos de oriente africano y postulan que la comunicación química pudo tener un papel primario en la radiación explosiva de este grupo de peces.

La señalización química podría también estar involucrada en el reconocimiento de pareja en especies que habitan agua turbias, donde la comunicación visual podría verse afectada (Wickett & Corkum 1998, Gammon *et al.* 2005). Heuschele *et al.* (2009) reportaron que en *Gasterosteus aculeatus*, las limitaciones visuales durante la valoración de pareja resultantes de cambios en la turbidez del agua, fueron parcialmente compensadas por el uso de señales químicas (ver también Chapman *et al.* 2010). El hábitat de los peces anuales como *A. reicherti* consiste principalmente en charcos de poca profundidad con sustrato fangoso, agua turbia y elevada densidad de vegetación, lo que podría dificultar el uso de la visión para localizar parejas a distancia, y favorecer por lo tanto el empleo de señales químicas durante la búsqueda y elección de pareja reproductiva.

El género *Austrolebias* se presenta como un interesante y novedoso modelo para estudiar comunicación química en peces. Recientemente, Fernández *et al.* (2011) reportaron proliferación celular en el cerebro en especies del género *Austrolebias*, y encontraron además variación entre regiones del cerebro asociadas a distintas modalidades sensoriales. Mientras que en *A. affinis* se detectaron niveles altos de proliferación neural en áreas asociadas con la visión, en *A. reicherti*, y su especie hermana *A. charrua*, la proliferación se observó mayoritariamente en el bulbo olfatorio, sugiriendo por lo tanto que el olfato es un canal sensorial importante en estas últimas especies. Esta diferencia intra-genérica a nivel celular podría deberse a la acción de la selección natural favoreciendo las modalidades sensoriales que resuelvan mejor las restricciones ambientales que enfrenta cada una de las especies (Fernández *et al.* 2011). Por otra parte, el hábitat extremadamente frágil proporcionado por los charcos temporales, expone a *A. reicherti* a cambios ambientales drásticos, por lo que ésta y otras especies de peces anuales brindan una excelente oportunidad para explorar el efecto

de los cambios ambientales en el uso de diferentes modalidades sensoriales durante el ciclo de vida.

En conclusión, este estudio demuestra que los machos adultos del pez anual *A. reicherti* liberan señales químicas que provocan cambios comportamentales en las hembras adultas. El potencial de la comunicación química para la elección de pareja y reconocimiento específico en *Austrolebias* amerita estudios futuros. Este trabajo representa la primera aproximación al estudio de la comunicación química en peces anuales.

CAPÍTULO 3.

Variación en la preferencia de apareamiento y en la proporción de sexos a lo largo de la estación reproductiva

INTRODUCCIÓN

En muchas especies, los machos que presentan mayor grado de desarrollo de caracteres sexuales secundarios son preferidos por las hembras durante la elección de pareja reproductiva. La existencia de preferencias de apareamiento ha sido ampliamente reconocida y actualmente no constituye un tema de controversia en biología evolutiva (Andersson 1994). Estudios teóricos tradicionales sobre la evolución de la elección de pareja (ver Introducción general) han considerado a las preferencias de apareamiento como atributos estáticos y uniformes dentro de las especies: debido a que las hembras se benefician al aparearse con machos de buena calidad, preferirán invariablemente parejas de esas características. Sin embargo, actualmente se reconoce que el comportamiento de elección de pareja es un fenómeno contextual modulado por diversos factores (Jennions & Petrie 1997), y los efectos de aparearse con determinado macho podrían variar en magnitud y dirección si cambian las condiciones ambientales o la propia condición de la hembra (Jennions & Petrie 1997, Qvarnström 2001).

Diferentes aproximaciones teóricas sugieren que la elección de pareja puede verse afectada, por ejemplo, por el grado de variabilidad en la calidad del sexo opuesto y la tasa de encuentro de parejas potenciales (Kokko & Monaghan 2001, Kokko & Mappes 2005). En este sentido, se predice que las hembras exhibirán menores niveles de selectividad en la elección de pareja cuando el costo de búsqueda es alto o la densidad de parejas potenciales es baja (Howard & Young 1998, Jirotkul 1999a). En cambio, la selectividad será mayor cuando la variabilidad en la calidad de los machos es elevada (Kvarnemo & Forsgren 2000). Por otro lado, estudios empíricos han demostrado que la elección de pareja es afectada por la presencia de especies cercanamente emparentadas (Noor 1999), el riesgo de predación (Berglund 1993, Godin & Briggs 1996, Candolin 1997, Willis *et al.* 2012), el riesgo de parasitismo (Vélez & Brockmann 2006), la condición individual del elector (Amundsen & Forsgren 2003, Hunt *et al.* 2005, Burley & Foster 2006), las restricciones en el tiempo de reproducción (Backwell & Passmore 1996), la disponibilidad de recursos (Fisher & Rosenthal 2006, Moskalik & Uetz 2011), la intensidad de competencia macho-macho (Lehtonen & Lindström 2008), y los patrones demográficos (Kvarnemo *et al.* 1995, Wacker *et al.* 2013). Uno de los factores determinantes sobre el modo y la fuerza de la selección sexual es la relación operacional de sexos (ROS) (Owens & Thompson 1994), definida como la relación machos/hembras aptos para

reproducirse en un momento dado (Emlen & Oring 1977). La ROS puede incidir tanto en la competencia intrasexual (revisado en Kvarnemo & Ahnesjö 1996, Weir *et al.* 2011, O'Rourke & Mendelson 2012) como en los niveles de selectividad (Berglund 1994, Balshine-Earn 1996, Jirotkul 1999a, Kokko & Mappes 2005). Además, una variedad de estudios en peces han mostrado que factores ambientales abióticos, tales como la concentración de oxígeno (Reynolds & Jones 1999), la intensidad de luz (Rick *et al.* 2006), la turbidez de agua (Jarvenpaa & Lindstrom 2004), y la temperatura (Silva *et al.* 2007), pueden ser agentes efectivos en la modulación del comportamiento de apareamiento.

Las fluctuaciones a lo largo de la estación reproductiva, tanto de diversas variables ecológicas como de los patrones demográficos, han sido ampliamente documentadas en diversos taxa, y en estos casos la relación costo-beneficio de la elección de pareja podría variar temporalmente (Jennions & Petrie 1997). Estas variaciones proveen las condiciones para que se vea favorecida la plasticidad adaptativa en las preferencias de apareamiento y en los niveles de selectividad de las hembras (Qvarnström *et al.* 2000). Si las preferencias y/o el grado de selectividad varían en el tiempo, entonces la selección sobre un carácter en particular podría decrecer y conducir a un detrimento en la expresión del mismo. Alternativamente, la variación en las preferencias de las hembras podría resultar en el mantenimiento selectivo del polimorfismo del rasgo del macho (Jennions & Petrie 1997, Howard & Young 1998). La plasticidad en la elección de pareja y los cambios concomitantes en los patrones de apareamiento a través del tiempo, pueden debilitar la fuerza de la selección sexual y mantener la variación genética subyacente en varios ornamentos sexuales (Chaine & Lyon 2008). La investigación acerca de la plasticidad adaptativa en el comportamiento de elección de las hembras ha tenido un importante auge en las últimas décadas (Qvarnström 2001). Numerosos estudios dan soporte a la idea que las preferencias de apareamiento no son estáticas y que además esta plasticidad comportamental es adaptativa (Lynch *et al.* 2005, Borg *et al.* 2006, Pfennig 2007, Reaney & Bacckwell 2007, Chaine & Lyon 2008, Heubel & Schlupp 2008, Kasumovic *et al.* 2008, Milner *et al.* 2010). En este sentido, aproximaciones recientes sobre las preferencias de apareamiento en diferentes momentos de la estación reproductiva, han contribuido a una mejor comprensión de la relación entre factores demográficos, como la ROS y la densidad poblacional, y los cambios en la fuerza y dirección de la selección sexual (Jann *et al.* 2000, Pröhl 2002, Forsgren *et al.* 2004, Borg *et al.* 2006, Cockburn *et al.* 2008, Kasumovic *et al.* 2008). En consecuencia, el estudio de la variación en estos parámetros poblacionales es relevante en la medida que afectan la presión de selección y por lo tanto determinan la tasa y la dirección de la evolución de un carácter por selección sexual.

El ambiente biótico y abiótico raramente es estable, y la flexibilidad en la preferencia de apareamiento de las hembras a lo largo de la estación reproductiva probablemente sea frecuente. A su vez, estudios longitudinales han detectado oscilaciones en las preferencias de apareamiento de las hembras a lo largo de distintas estaciones reproductivas (Chaine & Lyon 2008, Lehtonen *et al.* 2010). En este sentido, se espera que las especies que habitan ambientes altamente variables con fluctuaciones predecibles, presenten plasticidad fenotípica en las preferencias de apareamiento (Milner *et al.* 2010).

Los peces anuales del género *Austrolebias* habitan charcos temporales de poca profundidad que presentan grandes variaciones en diversos ejes ambientales a lo largo del ciclo (Williams 2006). El hábitat, en combinación con la historia de vida de este grupo de peces, genera dos escenarios sustancialmente diferentes y predecibles, al inicio y al final de la estación reproductiva. Hacia el final de la temporada, la evaporación del agua favorecida por el progresivo aumento de la temperatura reduce drásticamente el área total del charco y de las zonas aptas para la reproducción, mientras la amplitud térmica aumenta y se extreman las condiciones ambientales. Estas circunstancias, más el decaimiento inflexible de las expectativas de vida y de las oportunidades de apareamiento, sugieren que las preferencias de apareamiento de las hembras pueden modificarse a medida que avanza la primavera. Además, la elección de pareja podría verse afectada también por cambios demográficos ocurridos a lo largo del ciclo, específicamente por variaciones de la proporción sexual. Las especies del género *Austrolebias* presentan un marcado dimorfismo sexual en morfología y comportamiento (Costa 2006, García *et al.* 2009). Los machos son de mayor tamaño, exhiben coloraciones vistosas, cortejan activamente a las hembras y presentan elevados niveles de agresividad intrasexual. Por el contrario, las hembras son pequeñas, de coloración relativamente críptica, tienen un rol pasivo durante el cortejo y no son agresivas (Vaz-Ferreira *et al.* 1964, Loureiro 2004, Costa 2006, García *et al.* 2008). Estas características posiblemente ocasionen mayor nivel de mortalidad en los machos, debido al agotamiento causado por los enfrentamientos agonísticos y los despliegues de cortejo, así como mayor susceptibilidad a la predación. Las características del hábitat, combinadas con el particular ciclo de vida de los peces anuales, ofrecen novedosas y propicias condiciones para investigar causas y consecuencias de la plasticidad adaptativa de los niveles de selectividad y preferencias de apareamiento, y por lo tanto en las oportunidades para la selección sexual.

Este estudio propone determinar la proporción sexual en poblaciones (charcos) de *A. charrua* y *A. reicherti*, y evaluar experimentalmente la preferencia de apareamiento de las

hembras de *A. reicherti* a lo largo de la estación reproductiva. La hipótesis propuesta es que la proporción de machos disminuye en las etapas tardías de la temporada y que, en concierto con los cambios en la disponibilidad de pareja, la selectividad de las hembras desciende en el transcurso del ciclo reproductivo. Debido a que la proporción sexual no fue manipulada en las experiencias de laboratorio, este trabajo evalúa si las decisiones comportamentales de las hembras son afectadas por la experiencia previa de disponibilidad de parejas en el campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1- Proporción sexual en poblaciones naturales

La proporción sexual fue estimada en 10 poblaciones de *A. charrua* y 10 poblaciones de *A. reicherti* a lo largo de la temporada reproductiva 2011 (Tabla 3.1, Anexo 1). Muestreos sistemáticos en los distintos ambientes, y registros locales de pluviosidad (www.meteorología.gub.uy), permitieron estimar que la eclosión de los peces ocurrió en el periodo comprendido entre la última semana de abril y la segunda semana de mayo.

En 15 poblaciones se colectaron individuos al inicio (semana 14-16 luego de la eclosión; agosto) y al final (semana 25-27 luego de la eclosión; octubre) de la estación reproductiva. Las 5 poblaciones restantes fueron muestreadas solamente en un momento de la estación (Tabla 3.1). En cada muestreo, tres personas capturaron peces con red de mano a lo largo de un recorrido aleatorio por el charco durante un período de 10 a 30 minutos, dependiendo de la densidad de individuos y del tamaño del charco. Se registró el sexo de todos los peces colectados y luego, los individuos fueron simultáneamente devueltos al charco.

La desviación de la proporción sexual esperada 1:1 fue analizada mediante la prueba Chi-cuadrado. La variación estacional en la proporción de machos en poblaciones muestreadas al inicio y final de la estación, fue estimada mediante la prueba t para muestras relacionadas. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA de dos factores) para evaluar diferencias en la proporción de machos (variable dependiente) entre las especies y la fecha de colecta (factores fijos independientes).

2- Preferencias de apareamiento de las hembras

Colecta y mantenimiento

Se colectaron individuos de *A. reicherti* con red de mano en tres poblaciones localizadas en el Departamento de Treinta y Tres, al comienzo (agosto) y al final (noviembre) de la estación reproductiva 2012. Durante las colectas se registró la proporción sexual en dos de las poblaciones, tal como se detalló en la sección anterior (Tabla 3.1, Anexo 1). Los peces capturados para los ensayos comportamentales en cada instancia fueron trasladados a la

Facultad de Ciencias y mantenidos de 2 a 5 días bajo un régimen de temperatura constante (19°C), fotoperiodo natural, y alimentación *ad libitum* con *Tubifex* sp. Los machos se alojaron en acuarios individuales (20 x 9 x 15 cm, largo x ancho x altura) mientras que las hembras se mantuvieron en acuarios comunales (40 x 13 x 15 cm) en grupos de hasta 5 individuos. Luego de la experimentación, los peces fueron retornados a los mismos acuarios de mantenimiento constituyendo el stock de cría en cautiverio.

Acuario experimental y ensayos comportamentales

Luego de un período mínimo de 48 horas de aclimatación a las condiciones de cautividad, se realizaron pruebas de preferencia de apareamiento durante los tres días siguientes (10 ensayos cada día). Los ensayos comportamentales se llevaron a cabo en acuarios de 60 x 20 x 20 cm divididos transversalmente en tres compartimentos mediante tabiques de acrílico transparente con perforaciones de 4 mm de diámetro: un compartimento central de 40 cm y dos compartimentos estímulo laterales de 10 cm cada uno. El espacio central fue a su vez subdividido mediante marcas externas en tres sectores: un sector central de 30 cm (zona neutra) y dos sectores laterales de 5 cm cada uno (zonas de elección) (Figura 3.1). A fin de asemejar las condiciones naturales, el piso del acuario fue cubierto con turba y se colocó *Myriophyllum* sp., una planta especialmente abundante en los charcos temporales, en los compartimentos de elección y en la zona neutra. La vegetación brindó refugio a los peces e impidió parcialmente el contacto visual y por tanto la interferencia entre los individuos colocados en los extremos del acuario. Para reducir cualquier fuente de disturbio externo y proveer un fondo uniforme, tanto las paredes laterales como la pared trasera del acuario fueron recubiertas con láminas plásticas de color negro. Todos los experimentos fueron realizados entre las 8:00 y las 14:00 horas.

Para establecer el patrón temporal de la elección de las hembras, se evaluó la preferencia al comienzo y al final de la estación reproductiva de 30 hembras frente a 30 pares distintos de machos tomados al azar, para cada caso. En ambos momentos de la estación, los individuos fueron sometidos a las mismas condiciones de cautividad y experimentación. La hembra focal fue colocada en el compartimento central y se le permitió nadar libremente durante 20 minutos de aclimatación y reconocimiento del acuario experimental. Posteriormente la hembra fue recluida en el centro de la zona neutra en un prisma de acrílico opaco (10 X 10 X 20, largo x ancho x altura) y se colocó un macho en cada compartimento lateral. Los machos fueron asignados aleatoriamente al compartimento estímulo derecho o izquierdo. Luego de 10 minutos de aclimatación de los machos al acuario experimental, el

prisma de acrílico fue removido y se obtuvo un video-registro de cuatro períodos de 15 minutos espaciados por un intervalo de 1 hora.

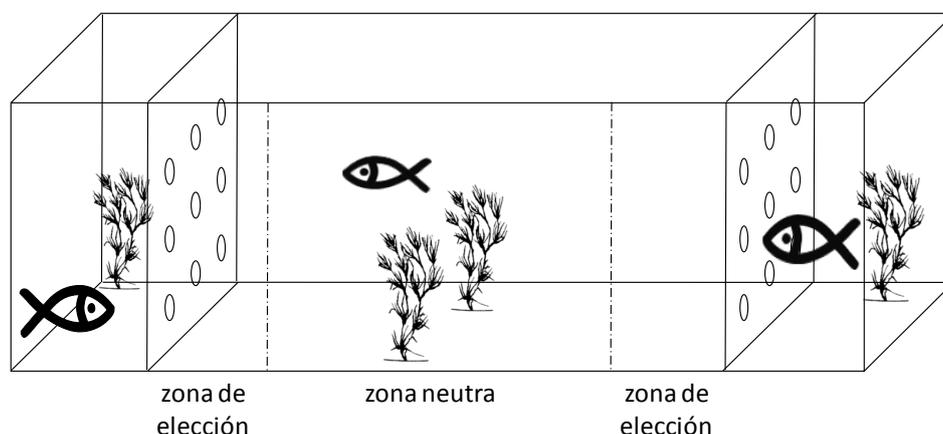


FIGURA 3.1 Acuario experimental para pruebas de preferencia de apareamiento. Divisiones transversales mediante tabiques de acrílico transparente con perforaciones dividieron al acuario en tres compartimentos. Un compartimento central donde se alojó a la hembra focal y dos compartimentos laterales donde se colocaron los machos estímulo. El compartimento central fue subdividido mediante marcas externas (líneas punteadas) en una zona neutra y dos zonas de elección. En la zona neutra y en los compartimentos de los machos se colocaron plantas *Myriophyllum* sp a modo de refugio.

Variables y análisis estadístico

Luego de finalizados los ensayos comportamentales, el flanco izquierdo de todos los individuos fue fotografiado (ver detalles metodológicos en el capítulo 1). A partir de las imágenes digitales se registró el largo estándar en ambos sexos (desde el margen anterior de la cabeza hasta el margen distal del pedúnculo caudal), y número y ancho de las bandas verticales oscuras en los machos, utilizando el software *tpsDig2*. El ancho de las bandas verticales fue considerado como la relación entre el área pigmentada y el espacio inter-banda a lo largo de la línea que va desde el margen anterior de la cabeza hasta el margen distal del pedúnculo caudal (Figura 3.2). Se registró la masa corporal de todas las hembras en una balanza digital de precisión ± 0.01 g. Para ello, las hembras fueron retiradas del acuario y dispuestas sobre una hoja de papel absorbente para extraer el agua superficial, e inmediatamente colocadas sobre la balanza. Este procedimiento no tardó más de 10 segundos y la manipulación no tuvo efectos detectables en el comportamiento subsecuente.

La preferencia de las hembras fue estimada como el tiempo de interacción con cada uno de los machos en las zonas de elección. El comportamiento de interacción incluye la orientación de la hembra a los machos estímulo, la natación conjunta, la aceptación al seguimiento y al enterramiento (ver capítulo 1). El tiempo de interacción con los machos en las distintas etapas de la temporada reproductiva fue comparado mediante la prueba t para muestras independientes. Debido a que la disposición general a interactuar con los machos podría estar afectada por el tamaño de la hembra, se evaluó la relación entre el tiempo de permanencia en ambas zonas de elección (motivación) y el largo estándar, y peso de las hembras, mediante la correlación de Pearson.



FIGURA 3.2 Fotografía de un macho *A. reicherti*. En el esquema inferior se muestra el ancho de las bandas verticales a nivel de la línea que va desde el margen anterior de la cabeza hasta el margen distal del pedúnculo caudal.

Un macho particular fue considerado preferido si la hembra interactuó con él más del 50% del tiempo de interacción total (Wong 2004). Un criterio más exigente, considerando preferencia solamente cuando la hembra permaneció más del 60% del tiempo de interacción con uno de los machos, excluye del análisis 5 ensayos del inicio y 6 del final de la estación. Sin embargo, debido a que los resultados no se modificaron con el uso de este criterio, todas las pruebas fueron finalmente consideradas. Para cada momento de la estación, se comparó el tamaño corporal y el número y ancho de las bandas entre los machos preferidos y no preferidos mediante la prueba Wilcoxon. Además, se realizó una regresión lineal entre la preferencia neta de las hembras (tiempo con el macho preferido – tiempo con el macho no preferido; variable dependiente), el tamaño promedio de ambos machos, y la diferencia de los machos en el tamaño, número y ancho de las bandas verticales (variables independientes). La preferencia neta de las hembras y la asimetría en el tamaño de los machos estímulo al inicio y

al final de la estación reproductiva, fue comparada mediante la prueba t para muestras independientes y la prueba Mann-Whitney, respectivamente.

Para que un ensayo fuera incluido en el análisis, se estableció como criterio que la hembra focal interactuara con ambos machos y permaneciera más del 20% del tiempo en las zonas de elección. Todos los datos fueron evaluados para la normalidad usando el test de Kolmogorov-Smirnov. A menos que se indique, los valores reportados son la media \pm error estándar. Para los análisis estadísticos se utilizó el software SPSS, versión 15.0 para Windows. La significancia estadística fue considerada a $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS

1- Proporción sexual

Se colectaron 4246 individuos de *A. charrua* y *A. reicherti* (1639 machos y 2607 hembras) durante la estación reproductiva 2011. La razón sexual varió a lo largo de la estación en ambas especies, observándose una disminución en la proporción de machos al final del ciclo (prueba t para muestras relacionadas: $t_{14} = 6.33$, $P < 0.001$). En la mayoría de las poblaciones la proporción sexual no fue diferente de 1:1 en agosto, pero estuvo sesgada a favor de las hembras en octubre (Tabla 3.1).

De las 10 poblaciones de *A. charrua* estudiadas, 7 fueron muestreadas en diferentes momentos del año. El número de machos y hembras capturados en agosto no fue significativamente diferente en ningún caso. Sin embargo, en octubre, la proporción sexual estuvo sesgada a favor de las hembras en 6 poblaciones. En la población restante, si bien se colectaron más hembras que machos, la proporción no fue significativamente distinta de 1:1. Otras 3 poblaciones fueron muestreadas solamente en la etapa tardía de la estación, y la proporción de machos fue menor a la de las hembras, aunque la diferencia fue significativa solamente en 2 casos (Tabla 3.1).

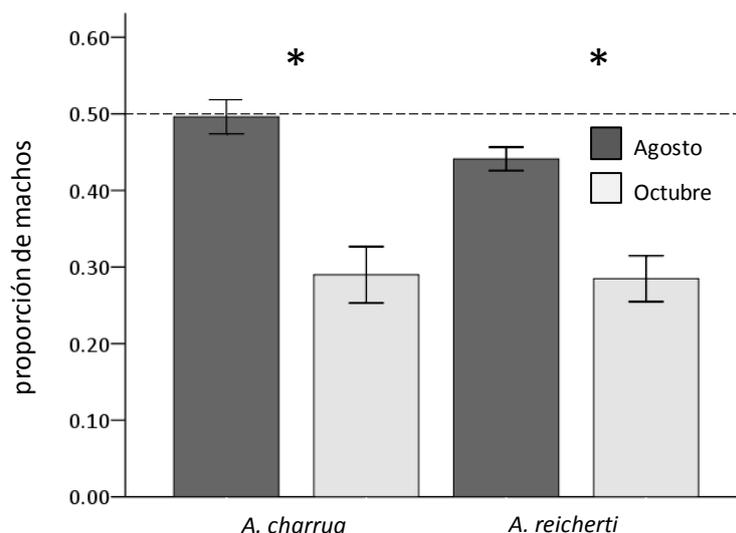
De las 10 poblaciones de *A. reicherti* consideradas, 8 fueron muestreadas al inicio y al final de la estación reproductiva. En agosto, solamente en una de las poblaciones la proporción sexual fue significativamente distinta de 1:1 y sesgada hacia las hembras. Por el contrario, en octubre, la proporción estuvo desviada hacia las hembras en 7 casos. En la población restante, si bien se colectaron más hembras que machos, la proporción no se apartó significativamente de 1:1. Dos poblaciones más fueron muestreadas solamente en una etapa del ciclo reproductivo. Mientras que la población muestreada en agosto no mostró diferencias significativas en la proporción de sexos, la población muestreada en octubre presentó un sesgo significativo a favor de las hembras (Tabla 3.1).

La fecha de colecta afectó significativamente la proporción de machos en las poblaciones, pero la proporción sexual no fue distinta entre las especies, y no hubo interacción entre la fecha de colecta y la identidad de la especie (ANOVA de dos factores: fecha de colecta:

$F_{1,26} = 45.30, P < 0.001$; especie: $F_{1,26} = 1.24, P = 0.275$; fecha de colecta*especie: $F_{1,26} = 0.86, P < 0.363$; Figura 3.3).

TABLA 3.1 Proporción sexual en poblaciones de *A. charrua* y *A. reicherti*, al inicio (agosto) y al final (octubre) de la estación reproductiva 2011. Se muestra el número de machos, el número de hembras, la proporción de machos, el valor del estadístico Chi-cuadrado y su significancia. ^(a) Ver Anexo 1; ^(b) valores correspondientes a la temporada 2012 de los charcos considerados durante las pruebas de preferencia (ver texto).

charco ^(a)	especie	inicio de estación					final de estación				
		♂	♀	♂/total	χ^2	P	♂	♀	♂/total	χ^2	P
NCH1	<i>A. charrua</i>	109	125	0.47	1.09	0.30	66	130	0.34	20.9	<.01
NCH5	<i>A. charrua</i>	69	70	0.50	0.01	0.93	43	92	0.32	17.79	<.01
NCH21	<i>A. charrua</i>	42	46	0.48	0.18	0.67	23	54	0.30	12.48	<.01
NCH4	<i>A. charrua</i>	6	6	0.50	0.00	1.00	14	50	0.22	20.25	<.01
NCH17	<i>A. charrua</i>	16	10	0.62	1.39	0.24	2	13	0.13	8.07	<.01
SCH12	<i>A. charrua</i>	11	15	0.42	0.62	0.43	17	44	0.28	11.95	<.01
SCH2	<i>A. charrua</i>	51	52	0.50	0.01	0.92	40	50	0.44	1.11	0.29
SCH16	<i>A. charrua</i>						42	80	0.34	11.84	<.01
SCH7	<i>A. charrua</i>						24	53	0.31	10.92	<.01
SCH14	<i>A. charrua</i>						20	30	0.40	2.00	0.16
A1	<i>A. reicherti</i>	117	134	0.47	1.15	0.28	42	109	0.28	29.73	<.01
A6	<i>A. reicherti</i>	56	73	0.43	2.24	0.13	59	153	0.28	41.68	<.01
A7	<i>A. reicherti</i>	47	62	0.43	2.06	0.15	37	85	0.30	18.89	<.01
A18	<i>A. reicherti</i>	66	75	0.47	0.57	0.45	34	93	0.27	27.41	<.01
A14	<i>A. reicherti</i>	25	31	0.45	0.64	0.42					
T4	<i>A. reicherti</i>	116	124	0.48	0.27	0.61	32	79	0.29	19.9	<.01
T5	<i>A. reicherti</i>	152	167	0.48	0.71	0.40	52	119	0.30	26.25	<.01
T3	<i>A. reicherti</i>	57	79	0.42	3.56	0.06	68	88	0.44	2.56	0.11
T10	<i>A. reicherti</i>	67	124	0.35	17.01	<.01	7	50	0.12	32.44	<.01
T12	<i>A. reicherti</i>						10	42	0.19	19.69	<.01
A6 ^(b)	<i>A. reicherti</i>	49	51	0.49	0.04	0.84	13	28	0.32	5.49	0.02
A7 ^(b)	<i>A. reicherti</i>	53	69	0.43	2.10	0.15	17	39	0.30	8.64	<.01
A14 ^(b)	<i>A. reicherti</i>										



FIGUEA 3.3 Proporción de machos (media \pm ES) en poblaciones de *A. charrua* (N = 7) y *A. reicherti* (N = 8) al inicio (agosto) y final (octubre) de la estación reproductiva. La línea punteada representa igual número de machos y hembras. (*) $p < 0.001$

2- Preferencias de apareamiento

La proporción sexual en las poblaciones donde se colectaron los individuos para los ensayos comportamentales fue similar a lo reportado en los muestreos de 2011 (Tabla 3.1).

Cinco ensayos fueron excluidos del análisis porque las hembras (3 del inicio y 2 del final de la estación reproductiva) permanecieron asociadas con un solo macho sin visitar el otro sector del acuario. Otras 3 hembras (2 del inicio y 1 del final de la estación reproductiva) pasaron más del 80% del tiempo refugiadas entre las plantas de la zona neutra. Entonces, de las 60 pruebas de preferencia realizadas, 52 fueron finalmente consideradas para el análisis (25 de inicio y 27 de final de temporada).

Las hembras pasaron el $71.5 \pm 2.6\%$ del tiempo en las zonas de elección orientadas e interactuando con los machos, y no presentaron diferencias en la motivación al inicio y final de la temporada (prueba t para muestras independientes: $t_{50} = -0.146$, $N1 = 25$, $N2 = 27$, $P = 0.884$). El tiempo de interacción con los machos no se relacionó significativamente con el tamaño ni con el peso de las hembras (correlación de Pearson: tamaño: $r_{52} = 0.144$, $P = 0.310$; peso: $r_{52} = -0.017$, $P = 0.907$). El tiempo de interacción de la hembra con el macho preferido (el macho con el que interactuó más tiempo), no fue significativamente diferente en los distintos momentos de la estación reproductiva (inicio de estación: 996.5 ± 128.4 ; final de estación:

1102.6 ± 170.9; prueba t para muestras independientes: $t_{50} = -0.490$, $N1 = 25$, $N2 = 27$, $P = 0.626$).

Al inicio de la estación reproductiva, los machos preferidos fueron significativamente más grandes que los machos no preferidos, pero no difirieron en el número ni en el ancho de las bandas verticales (Tabla 3.2). La preferencia neta en este momento de año se relacionó positivamente con la asimetría en el tamaño corporal de los machos, pero no exhibió relación con el tamaño promedio, con la diferencia en el número de bandas, ni con la diferencia en el ancho de las bandas verticales de los machos ($R^2 = 0.382$, $F_{4,20} = 3.085$, $P = 0.039$; Tabla 3.3). En la etapa tardía de la temporada, los machos preferidos y no preferidos no se diferenciaron en ninguna de las variables analizadas (Tabla 3.2). Además, la preferencia neta en esta etapa no se relacionó con la diferencia en el tamaño, ni con la diferencia en el número y ancho de las bandas, así como tampoco con el tamaño promedio de los machos ($R^2 = 0.116$, $F_{4,22} = 0.724$, $P = 0.585$; Tabla 3.3).

Entre las estaciones, no se evidenciaron diferencias significativas en la asimetría absoluta ni en la diferencia proporcional (macho mayor/macho menor) de tamaño de los machos estímulo (diferencia absoluta: prueba t para muestras independientes: $t_{50} = 1.299$, $N1 = 25$, $N2 = 27$, $P = 0.200$; diferencia proporcional: prueba Mann-Whitney: $U = 254$, $N1 = 25$, $N2 = 27$, $P = 0.126$).

TABLA 3.2 Comparación entre caracteres de los machos preferidos y no preferidos por las hembras de *A. reicherti* en pruebas de elección al inicio (agosto) y al final (noviembre) de la estación reproductiva. ^(a) Media ± DE; ^(b) valores de la prueba Wilcoxon.

Estación (N)	Carácter	Macho preferido ^(a)	Macho no preferido ^(a)	Z ^(b)	P
Agosto (25)	Tamaño	36.5 ± 4.3	34.1 ± 3.9	-2.71	0.007
	Nº de bandas	6.9 ± 1.1	6.8 ± 1.1	-0.34	0.731
	Ancho de bandas	0.66 ± 0.11	0.68 ± 0.16	-0.84	0.399
Noviembre (27)	Tamaño	39.1 ± 4.3	38.7 ± 4.1	-0.28	0.782
	Nº de bandas	7.1 ± 1.3	7.1 ± 1.2	-0.46	0.963
	Ancho de bandas	0.68 ± 0.17	0.68 ± 0.15	-0.17	0.866

TABLA 3.3 Valores del análisis de regresión múltiple, al inicio y al final de la estación reproductiva de *A. reicherti*, entre la preferencia neta de las hembras (tiempo con el macho preferido – tiempo con el macho no preferido), y la diferencia de los machos en el tamaño, número y ancho de las bandas verticales, y el tamaño promedio de ambos machos.

	Coefficiente beta estandarizado	<i>t</i>	<i>P</i>
<i>Inicio de estación</i>			
Diferencia en tamaño	0.628	3.352	0.003
Diferencia en n° de bandas	0.067	0.367	0.718
Diferencia en ancho de bandas	-0.036	-0.201	0.843
Tamaño promedio	-0.066	-0.368	0.717
<i>Final de estación</i>			
Diferencia en tamaño	-0.198	-0.978	0.339
Diferencia en n° de bandas	0.293	1.406	0.174
Diferencia en ancho de bandas	-0.131	-0.632	0.534
Tamaño promedio	-0.012	-0.061	0.952

DISCUSIÓN

Este trabajo evidencia variación tanto en la proporción sexual como en la elección de pareja de las hembras a lo largo de la estación reproductiva en peces anuales del género *Austrolebias*. La proporción de machos disminuyó hacia el final de la temporada en poblaciones naturales de *A. charrua* y *A. reicherti*. A comienzos de la temporada (agosto) las hembras de *A. reicherti* interactuaron más con los machos de mayor tamaño en pruebas de elección simultánea; sin embargo, los machos preferidos por las hembras al final de la estación reproductiva (noviembre) no fueron significativamente de mayor tamaño que los machos no preferidos.

De acuerdo a la hipótesis, en la mayoría de las poblaciones la proporción de sexos estuvo sesgada hacia las hembras al final del ciclo. La proporción sexual difirió significativamente en los distintos momentos de la estación, y la variación no estuvo afectada por la identidad de la especie. Los peces exhiben gran variabilidad respecto a los mecanismos de determinación del sexo, y tanto la determinación ambiental o genética han evolucionado múltiples veces de manera independiente (Mank *et al.* 2006). En *A. charrua*, recientemente se ha sugerido que el sexo es determinado por vía genética (Arezo 2012). En condiciones de cautiverio no se han detectado diferencias sexuales en la tasa de mortalidad (observación personal), por lo tanto los resultados provenientes de los muestreos de campo sugieren mortalidad extrínseca superior de los machos en las poblaciones naturales. Similares resultados han sido reportados en otros Cyprinodontiformes anuales del género *Nothobranchius* (Hass 1976, Reichard *et al.* 2009). La competencia entre los machos en ambas especies es elevada, y a menudo los enfrentamientos agonísticos provocan lesiones a los machos subordinados (ver capítulo 1, Fabra 2011). Además, durante el comportamiento reproductivo los machos cortejan activamente a las hembras mediante despliegues visuales y locomotores (Belote & Costa 2004, García *et al.* 2008). Probablemente, las interacciones sociales que ocurren en la naturaleza suponen a los machos un mayor desgaste físico, niveles más elevados de estrés y consecuente disminución de la inmunocompetencia, lo que podría dar cuenta de la mortalidad diferencial observada en el campo, tal como ha sido documentado en numerosas especies de vertebrados (Zuk 1994). Por otra parte, al igual que el resto de las especies del género, *A. charrua* y *A. reicherti* presentan un marcado dimorfismo sexual, donde los machos son de mayor tamaño y poseen un patrón de coloración que consiste en un diseño de bandas oscuras contrastantes con un fondo azulado iridiscente en el flanco, mientras que

las hembras son pequeñas y de coloración relativamente críptica (Loureiro & García 2008, García *et al.* 2009). La conspicua coloración combinada con la mayor exposición desplegada durante las interacciones sociales, posiblemente convierta a los machos en individuos más vulnerables a la predación, tal como fue determinado en *N. guentheri* (Hass 1976).

Al comienzo de la estación reproductiva las hembras de *A. reicherti* prefirieron a machos de mayor tamaño corporal, y el nivel de preferencia estuvo relacionado positivamente con la diferencia en el tamaño de los machos. El tamaño es un determinante importante del *fitness* en muchas especies de diversos grupos taxonómicos (Andersson 1994), y la preferencia de las hembras por machos de mayor tamaño ha sido ampliamente documentada en peces (Ryan & Wagner 1987, Ryan *et al.* 1990, Rosenthal & Evans 1998, ver capítulo 1). La preferencia de las hembras por el mayor tamaño corporal de los machos podría ser causada por varias razones (ver capítulo 1). Por ejemplo, dado que el tamaño se asocia con la dominancia (capítulo 1), al aparearse con machos grandes las hembras podrían acceder a refugios y mejores sitios para desovar, ambos factores limitantes para la reproducción y viabilidad de los huevos. Sin embargo, al final de la estación las hembras no prefieren a los machos de mayor tamaño, y la diferencia en el tiempo de interacción no se relacionó con la asimetría en el tamaño de los machos.

Debido a que el tiempo que las hembras interactuaron con los machos no fue diferente al inicio y final de la estación, la variación entre estas etapas respecto a la preferencia de las hembras por el tamaño corporal de los machos no puede atribuirse a cambios en la motivación reproductiva en distintos momentos del año. Las diferencias registradas a lo largo de la estación tampoco se relacionaron con el fenotipo de las hembras ya que éstas no ajustaron su comportamiento de acuerdo a su propio tamaño y peso corporal. Por otra parte, el tamaño de los machos en los distintos momentos de la estación tampoco da cuenta del patrón encontrado, ya que ni la diferencia absoluta ni la diferencia relativa entre las díadas de machos estímulos utilizados en los ensayos fue distinta al inicio y al final de la estación. Además, si el tamaño de los machos que conforman la díada de estímulo afectase las decisiones comportamentales de las hembras, se esperaría una relación entre el tamaño de los machos (por ejemplo el promedio de la díada) y las preferencias de las hembras; y esto no fue observado.

Dos alternativas, no excluyentes, podrían explicar la variación encontrada respecto a la preferencia de las hembras en los distintos momentos del año (Borg *et al.* 2006). Primero, tal como predice la hipótesis, la selectividad de las hembras disminuye a medida que avanza la

estación como resultado de la menor disponibilidad de parejas (Johnstone *et al.* 1996; Kokko & Johnstone 2002, Borg *et al.* 2006). El cambio en la proporción sexual en las poblaciones naturales podría aumentar el costo de rechazar un macho debido a la disminución de la tasa de encuentro de parejas potenciales (Kokko & Mappes 2005). Además, como ha sido demostrado en otras especies de peces, la disminución en la proporción de machos disponibles puede causar un aumento en la competencia entre las hembras así como en la selectividad de los machos (Forsgren *et al.* 2004), ambos factores de incidencia negativa sobre las oportunidades de las hembras de ser selectivas durante la etapa tardía de la estación reproductiva. Por otra parte, factores intrínsecos pueden causar cambios en las decisiones de apareamiento de las hembras sobre el curso del ciclo de vida (Kodric-Brown & Nicoletto 2001, Moore & Moore 2001, Lynch *et al.* 2005). En este sentido, la desaparición de las masas de agua temporales donde habitan las *Austrolebias* durante los períodos de desecación, se acompaña de la muerte masiva de las formas adultas. Este particular ciclo biológico donde las expectativas de vida y las concomitantes oportunidades de apareamiento decrecen a medida que avanza la estación, habilita a su vez a la disminución en la selectividad de las hembras en las etapas tardías de la temporada. En muchos casos se ha evidenciado que las hembras ajustan temporalmente su selectividad en relación a los costos y beneficios de un momento dado (Jennions & Petrie 1997, Qvarnström 2001). Por ejemplo, en los peces *gobies* han sido reportados cambios en la selectividad de las hembras a medida que avanza la estación reproductiva. Mientras que en *Pomatoschistus minutes*, la selectividad aumenta en etapas tardías de la estación, posiblemente debido a la reducción en el costo de búsqueda (riesgo de predación) y a la mayor variabilidad en la calidad de las parejas (intensidad de cortejo; Forsgren 1997), en *Gobiusculus flavescens*, la selectividad de las hembras disminuye al final de la estación, posiblemente debido a cambios en los beneficios respecto al cuidado parental de los huevos (Borg *et al.* 2006).

Una segunda alternativa para explicar la variación observada al inicio y final de la estación, es que las hembras modifican su preferencia en los distintos momentos de año. Tanto la calidad de los machos como los caracteres que mejor la reflejen, podrían cambiar durante la estación (Jennions & Petrie 1997, Qvarnström 2001). Por ejemplo, al comienzo de la temporada reproductiva, las hembras de *A. reicherti* se beneficiarían al aparearse con machos dominantes (atributo relacionado al tamaño corporal, capítulo 1), al acceder a refugios y mejores sitios para desovar. Sin embargo, el tamaño de los machos podría no ser un buen indicador de calidad en las etapas tardías de la estación. La disminución en la proporción de machos al final de la temporada posiblemente resulta en un descenso en el nivel de

competencia macho-macho, y por lo tanto las hembras ya no obtendrían beneficios al aparearse con los machos de mayor tamaño. En este sentido, la ausencia de elección en base al tamaño corporal de los machos al final de la estación podría estar respondiendo a un cambio en las preferencias de las hembras. A menudo, la preferencia de las hembras se basa en múltiples caracteres de los machos (Candolin 2003). Diferentes características reflejan distintos aspectos de la calidad de la pareja, y las hembras podrían valorar diferencialmente estas características según el contexto o modificar la cantidad de atributos evaluados en un momento dado (Jennions & Petrie 1997, Qvarnström *et al.* 2000, Candolin 2003).

En apoyo a esta última alternativa, la preferencia neta (la diferencia en el tiempo de interacción con el macho preferido y el no preferido) de las hembras de *A. reicherti* no difirió al inicio y al final de la estación reproductiva. En este sentido, la ausencia de preferencia por tamaño corporal en la etapa tardía de la estación podría deberse a un cambio en el valor relativo de distintos caracteres de los machos en el transcurso de la estación. Muchos estudios en peces han documentado elección de pareja en base al diseño de pigmentación del cuerpo (por ej. Seehausen *et al.* 1997, Seehausen & van Alphen 1998), y específicamente al patrón de bandas verticales (Morris *et al.* 1995, 2003). En este trabajo sin embargo, no se detectaron diferencias en el número de bandas ni el ancho de las mismas (ancho relativo al espacio interbanda) entre los machos que resultaron preferidos y no preferidos. Además, la diferencia en el tiempo que las hembras interactuaron con los machos no se relacionó con las diferencias en la pigmentación de los mismos. Los resultados negativos respecto a la relación entre los caracteres de pigmentación y la preferencia de las hembras en diferentes momentos de la estación, podrían deberse a la complejidad de la interacción entre los distintos rasgos considerados. Además, otras modalidades sensoriales podrían estar involucradas en el comportamiento reproductivo de *A. reicherti*. La señalización química durante el comportamiento reproductivo en *A. reicherti* ha sido evidenciada (capítulo 2) y su contribución relativa en las decisiones de apareamiento de las hembras podría variar a lo largo de la estación reproductiva.

Aun cuando cualquiera de estos dos escenarios explicativos (disminución en la selectividad o cambio en las preferencias) sea el apropiado, los resultados sugieren que las hembras de *A. reicherti* muestran plasticidad en la elección de pareja. De todas maneras son necesarios estudios adicionales para poner a prueba las distintas alternativas. Además, aunque la plasticidad estacional indica que las decisiones de apareamiento pueden ser flexibles, el

nexo adaptativo entre el cambio en las preferencias y los beneficios adquiridos para las hembras permanece incierto.

El estudio de la plasticidad en las decisiones de apareamiento ha tenido un importante auge en los últimos años. Variaciones en las preferencias afecta al proceso de selección sexual y provee un mecanismo por el cual evolucionan múltiples ornamentos y se mantiene la variación genética subyacente (Chaine & Lyon 2008). Las características generales de los peces anuales, especialmente las vinculadas a su ciclo de vida sujeto a grandes transformaciones ambientales y demográficas, hacen que el género *Austrolebias* sea un modelo excepcional y novedoso para contribuir a la comprensión general de la variación estacional en la intensidad de la selección sexual.

CAPÍTULO 4.

Hibridación entre dos especies hermanas de distribución
parapátrida: *A. reicherti* y *A. charrua*

INTRODUCCIÓN

La visión tradicional de la hibridación como un fenómeno raro en la naturaleza, y de las zonas híbridas como sumideros evolutivos que enlentecen o inhiben la diversificación, ha cambiando sustancialmente en los últimos años (Smith *et al.* 2003, Mallet 2005, Abbott *et al.* 2010, Arnold & Martin 2010). Actualmente, la hibridación está bien documentada en muchos grupos animales y existe una evidencia creciente de especies que divergen en presencia de flujo genético o que experimentan intercambio de genes luego de ocurrida la especiación sin colapsar su aislamiento reproductivo. En este sentido, las especies de algunos de los grupos que han diversificado más rápidamente, tal como los cíclidos de los grandes lagos del oriente de África (Seehausen 2004, Schwarzer *et al.* 2012) y las mariposas del género *Heliconius* (Mallet 2005), presentan escaso aislamiento post-apareamiento e hibridan con frecuencia. Recientemente, la hibridación ha sido considerada como una pieza clave en varios fenómenos evolutivos, como el origen de novedades evolutivas, la radiación adaptativa y la especiación (Seehausen 2004, Arnold & Martin 2010, Tobler & Carson 2010, Abbott *et al.* 2013). El conocimiento del grado de hibridación en la naturaleza y su rol en los procesos evolutivos, constituye un tópico en la investigación evolutiva actual (Cui *et al.* 2013).

Una zona híbrida es una región donde dos o más poblaciones de individuos, distinguibles en base a uno o más caracteres heredables, se superponen espacial y temporalmente, y se cruzan produciendo descendencia viable y, al menos, parcialmente fértil (Arnold 1997). En teoría, las zonas híbridas pueden ser originadas a partir del contacto primario o secundario de poblaciones que hayan divergido en simpatria o alopatría respectivamente (Futuyma 2005). Las zonas híbridas primarias se originan *in situ* donde la selección natural altera la frecuencia alélica en una serie de poblaciones distribuidas contiguamente (Futuyma 2005). En este sentido, la adaptación local es generalmente invocada para explicar la estructura de la zona híbrida, aunque la evidencia empírica es relativamente escasa (Culumber *et al.* 2012). Por otra parte, las zonas híbridas secundarias se forman cuando las poblaciones que han divergido en alopatría expanden sus rangos de distribución y entran en contacto (Futuyma 2005). La mezcla de genomas divergentes puede generar nuevas combinaciones genéticas y producir fenotipos novedosos donde la selección pueda actuar (Bell & Travis 2005). Alternativamente, el entrecruzamiento entre poblaciones divergentes puede provocar una desventaja de los híbridos respecto a los taxa parentales. En este caso, la

selección favorecerá la evolución de potentes barreras reproductivas preapareamiento que conducirán la culminación del proceso de especiación (Coyne & Orr 2004). Por lo tanto, el *fitness* relativo de estas nuevas variedades fenotípicas determinará, en última instancia, la estabilidad y el destino de la zona híbrida (Barton 2001). Desde el punto de vista de la biología evolutiva, las zonas híbridas son áreas consideradas como "laboratorios naturales" (Hewitt 1988) que proveen oportunidades únicas para estudiar un amplio rango de fenómenos evolutivos, que van desde la especiación hasta la base genética de caracteres relacionados al *fitness* (Jones *et al.* 2006, Culumber *et al.* 2012).

El género *Austrolebias* comprende aproximadamente 40 especies distribuidas en los ambientes temporales de las cuencas del Río Paraná medio y bajo, el Río Uruguay y el sistema Los Patos-Merín (Costa 2006, Loureiro *et al.* 2011). Este último sistema es una de las áreas con mayor número de especies endémicas de peces anuales de la región subtropical del Neotrópico (Costa 2002), en donde destaca el complejo de especies "*A. adloffii*", un grupo monofilético formado por 6 especies (Costa 2002, García 2006). De acuerdo a García (2006) el complejo de especies "*A. adloffii*" se habría diferenciado recientemente, quizá mediante un proceso de especiación simultánea y múltiple. Dentro de este complejo, *A. charrua* y *A. reicherti* son dos especies hermanas de divergencia reciente que presentan distribución parapátrida con una zona de contacto en la parte baja de la cuenca del Río Cebollatí, en el Departamento de Treinta y Tres (García *et al.* 2009) (Figura 4.1). Al igual que el resto de las especies del complejo, *A. charrua* y *A. reicherti* se diferencian básicamente en la coloración de los machos mientras el comportamiento reproductivo es cualitativamente similar (García *et al.* 2008). Los machos de ambas especies presenta un patrón diferente de pigmentación de las aletas impares y contrastan en el diseño de bandas verticales oscuras sobre un fondo claro en el flanco (Loureiro & García 2008).

Recientemente, García *et al.* (2009) propusieron como el escenario más plausible de diferenciación entre *A. charrua* y *A. reicherti*, la fragmentación alopátrica durante transgresiones marinas, la divergencia y posterior expansión de la distribución involucrando quizá un contacto secundario entre estos taxa. Ambas especies probablemente hayan emergido desde un evento cladogenético durante el Pleistoceno tardío (1.25 MA a 450.000 años), de acuerdo con las estimaciones del reloj molecular basado en secuencias del citocromo b y con el escenario geológico de la región (García *et al.* 2009). Esta hipótesis es a la vez congruente con análisis moleculares previos del complejo de especies "*A. adloffii*" (García *et al.* 2004, García 2006). Aunque no se han encontrado evidencias de flujo genético entre *A.*

charrua y *A. reicherti* a partir del análisis con secuencias del citocromo b (García *et al.* 2009), el potencial de hibridación así como la caracterización del área de contacto no ha sido suficientemente abordado.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la posible existencia de hibridación entre *A. charrua* y *A. reicherti* y su potencial efecto sobre la variabilidad morfológica intraespecífica, y aportar a la comprensión de los procesos involucrados en la especiación. Específicamente se propone 1) caracterizar la morfología y el patrón de pigmentación de los individuos en el área de contacto; 2) evaluar la variación geográfica de la morfología y la pigmentación de ambas especies; 3) evaluar la hibridación en cautiverio; 4) comparar el fenotipo de los híbridos obtenidos en cautiverio con el de las especies parentales, así como con los ejemplares colectados en el área de contacto.

MATERIALES Y MÉTODOS

En primera instancia, se evaluó la existencia de hibridación en la naturaleza entre *A. reicherti* y *A. charrua*, mediante la comparación morfológica de poblaciones localizadas en la zona de contacto (ZC) con poblaciones “puras” de las especies parentales. El análisis se basó en caracteres morfométricos, evaluados a través de la morfometría geométrica, y en caracteres relacionados a la pigmentación de las aletas y del cuerpo, ya que son diagnóstico de las especies parentales (Loureiro & García 2008). En una segunda instancia, se determinó la variación geográfica de la morfología y la pigmentación, a través de la comparación de poblaciones cercanas a la zona de contacto (cercanas a ZC) y centrales de la distribución de ambas especies parentales. Por último, se evaluó la morfología y la pigmentación de la descendencia resultante de cruzamientos homo y heteroespecíficos realizados en cautiverio.

Colecta de animales y condiciones de mantenimiento

Se colectaron 193 hembras y 225 machos adultos de *A. charrua*, *A. reicherti*, y de ZC, con red de mano en charcos temporales localizados en los Departamentos de Rocha y Treinta y Tres (agosto-octubre de 2011). Para cada especie, se realizaron colectas en poblaciones centrales de la distribución y en poblaciones cercanas a ZC (Tabla 4.1, Figura 4.1, Anexo 1). Los peces capturados fueron trasladados a la Facultad de Ciencias y mantenidos a temperatura constante de 19° C, fotoperiodo natural, y alimentación *ad libitum* con *Tubifex* sp. Los machos fueron alojados en acuarios individuales (20 x 9 x 15 cm, largo x ancho x altura) para reducir el estrés provocado por las interacciones agonísticas y prevenir el establecimiento de jerarquías. Las hembras fueron alojadas en acuarios comunales (40 x 13 x 15 cm), en grupos de hasta 5 individuos.

Reproducción en cautiverio

En el año 2009 se realizaron experiencias de reproducción en cautiverio con individuos de *A. charrua* y *A. reicherti* colectados en poblaciones cercanas a ZC (Figura 4.1, Anexo 1). Para ello se formaron grupos homo y heteroespecíficos de 5 parejas reproductoras cada uno (♀ *A. charrua* x ♂ *A. charrua*; ♀ *A. reicherti* x ♂ *A. reicherti*; ♀ *A. charrua* x ♂ *A. reicherti*; ♀ *A. reicherti* x ♂ *A. charrua*). Los cruzamientos fueron realizados siguiendo un protocolo establecido para la cría de peces anuales (Berois *et al.* 2012). Cada pareja fue colocada en un

acuario (40 x 13 x 15 cm) acondicionado con un recipiente conteniendo turba orgánica, durante 3 a 5 días. Luego de cada cruzamiento la turba fue extraída, secada y almacenada en bolsas plásticas, y posterior a un período de desecación de 5 meses se procedió con la eclosión de los huevos. Los alevines fueron alimentados con *Artemia salina*, y una vez alcanzada la diferenciación sexual, los machos y las hembras fueron separados y mantenidos bajo las condiciones detalladas anteriormente.

Morfometría geométrica y diseño de pigmentación

El flanco izquierdo de todos los peces fue fotografiado con una cámara digital Canon *EOS REBEL* montada en un trípode. Para ello, los peces fueron cuidadosamente inmovilizados entre una esponja blanca y la pared de un acuario diseñado para este fin (15 x 10 x 12 cm). La cámara fotográfica fue colocada a una distancia fija de 15 cm con una inclinación de 0°. Este procedimiento no tardó más de 20 segundos y la manipulación no tuvo efectos detectables en el subsecuente comportamiento de los animales. Luego del registro fotográfico los peces fueron retornados a los acuarios de mantenimiento constituyendo parte del stock de animales utilizados durante las pruebas de aislamiento reproductivo (capítulo 5).

La variación en la forma fue analizada mediante morfometría geométrica utilizando 13 marcos anatómicos homólogos (*landmarks*) definidos de acuerdo a D'Anatro & Loureiro (2005) (Figura 4.2). Los marcos anatómicos fueron digitalizados a partir de las fotografías mediante el software *tpsDig*, versión 2.16 (Rohlf 2003). La configuración de los marcos anatómicos de todos los individuos fue alineada a través del procedimiento de superposición de Procrustes (Bookstein 1991). La aproximación *Thin Plate Spline* fue utilizada para la proyección de los ejemplares en un espacio tangente lineal con el fin de analizar variación y covariación de los datos con técnicas estadísticas multivariadas lineales (Bookstein 1991, Monteiro & dos Reis 2000). Estos análisis fueron realizados con el software *tpsRegr*, versión 1.38 (Rohlf 2003). Sobre las matrices de deformaciones parciales obtenidas (matrices de peso), se realizaron análisis discriminantes para examinar el agrupamiento de los individuos según cada caso. Para evaluar el efecto del tamaño de los individuos sobre la discriminación basada en la matriz de peso, se realizó un análisis multivariante de la covarianza (MANCOVA), utilizando el tamaño del centroide como covariable, el cual representa una medida robusta del tamaño general (Bookstein 1991). Debido al marcado dimorfismo sexual en las especies analizadas, los datos de machos y hembras fueron estudiados por separado (D'Anatro & Loureiro 2005).

Por otra parte, se analizó el patrón de pigmentación del cuerpo y de las aletas impares de los machos. Los caracteres considerados fueron el número de bandas verticales en el flanco, el largo del diseño de bandas (longitud relativa al largo estándar), el ancho de las bandas (relación ancho de banda/espacio inter-banda, a lo largo de la línea media del cuerpo), y la pigmentación de las aletas dorsal, anal y caudal. Las comparaciones sobre el patrón de pigmentación entre los distintos grupos de machos fueron realizadas mediante la prueba Mann-Whitney. Para los análisis estadísticos se utilizó el software SPSS, versión 15.0 para Windows. La significancia estadística fue considerada a $\alpha = 0.05$.

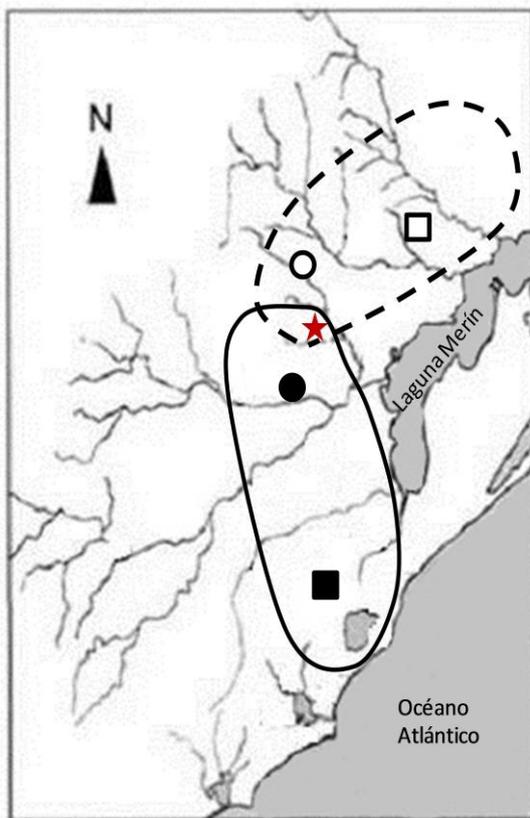


FIGURA 4.1 Sitios de colecta de *A. reicherti* (figuras blancas), *A. charrua* (figuras negras) y zona de contacto entre ambas especies (estrella roja). Los cuadrados simbolizan las poblaciones centrales de la distribución de ambas especies, y los círculos las poblaciones cercanas al área de contacto. La líneas sólida y punteada representan la distribución aproximada de *A. charrua* y *A. reicherti*, respectivamente.

TABLA 4.1 Colecta de ejemplares de *A. reicherti*, *A. charrua* y de la zona de contacto entre ambas especies. Para cada una de las especies se colectaron individuos de poblaciones centrales de la distribución geográfica y de poblaciones cercanas a la zona de contacto.

	Localidad	♂	♀
<i>A. reicherti</i>	central	28	31
	cercana a ZC	54	60
<i>A. charrua</i>	central	49	32
	cercana a ZC	35	28
ZC		59	42

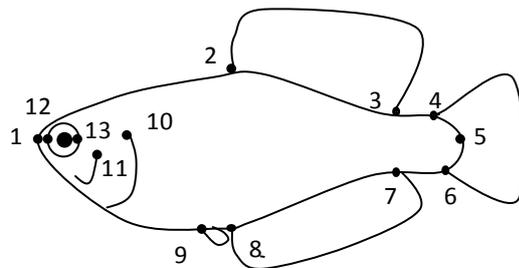


FIGURA 4.2 Marcos anatómicos homologos utilizados en los análisis de morfometría geométrica. 1: punta del hocico; 2: origen de la base de la aleta dorsal; 3: final de la base de la aleta dorsal; 4: origen dorsal de la aleta caudal; 5: final del pedúnculo caudal; 6: origen ventral de la aleta caudal; 7: final de la base de la aleta anal; 8: origen de la base de la aleta anal; 9: origen de la aleta pélvica; 10: inserción de la membrana opercular en la cabeza; 11: extremo dorsal de la serie de neuromastos preoperculares; 12: margen anterior de la órbita ocular; 13: margen posterior de la órbita ocular (desde D'Anatro & Loureiro 2005).

RESULTADOS

Caracterización de la zona de contacto

El análisis discriminante en base a caracteres morfométricos de las hembras permitió diferenciar a *A. charrua* de *A. reicherti* y de ZC a lo largo de la raíz 1 (71% de la variación total), mientras que las hembras de los últimos dos grupos difirieron ligeramente entre sí a lo largo de la raíz 2 (29% de la variación total) (Figura 4.3). Los cambios en la forma asociados a los valores positivos de la raíz 1 del análisis discriminante (*A. charrua*), involucraron principalmente la disminución relativa del tamaño de la cabeza, el acortamiento del hocico y el desplazamiento posterior del final del pedúnculo caudal (Figura 4.3). El principal cambio en la forma asociado a los valores positivos de la raíz 2 fue la disminución en la altura relativa del cuerpo (Figura 4.3). Las distancias de Mahalanobis (distancia al cuadrado) entre los centroides de los grupos de hembras corroboraron esta segregación con diferencias significativas en todos los casos (Tabla 4.2). El mayor valor correspondió a la distancia entre *A. charrua* y *A. reicherti*, mientras que la distancia más pequeña fue entre este último grupo y las hembras de ZC. La mayor proporción de individuos correctamente clasificados se observó en el grupo *A. reicherti* (82.4%), mientras que el porcentaje total de hembras correctamente asignadas a su grupo fue de 70.5% (Tabla 4.3).

En los machos, la mayor diferenciación ocurrió a lo largo de la raíz 1 del análisis discriminante (81% de la variación total) entre *A. charrua* y los otros dos grupos. *Austrolebias reicherti* y los machos de ZC fueron ligeramente diferentes a lo largo de la raíz 2 (19 % de la variación total) (Figura 4.3). Los cambios en la forma asociados a los valores positivos de la raíz 1 (*A. charrua*) incluyeron principalmente el desplazamiento posterior y anterior del origen de la aleta dorsal y anal respectivamente, la disminución relativa del tamaño de la cabeza, el acortamiento del hocico, y el desplazamiento posterior del final de las aletas dorsal y anal y del pedúnculo (Figura 4.3). El principal cambio asociado a los valores positivos de la raíz 2 fue el acortamiento de la base de las aletas dorsal y anal desde sus extremos posteriores (Figura 4.3). Las distancias de Mahalanobis entre los centroides de los grupos de machos confirmaron la segregación encontrada, mostrando diferencias significativas en todos los casos (Tabla 4.2). El mayor valor correspondió a la distancia entre los machos de *A. charrua* y de ZC, mientras que la menor distancia fue entre estos últimos y *A. reicherti*. Los machos de ZC mostraron el menor

porcentaje de asignación correcta (72.9%), mientras el porcentaje total de individuos correctamente clasificados fue de 79.6% (Tabla 4.3).

El análisis MANCOVA mostró diferencias significativas entre los grupos de machos y de hembras considerados ($\lambda = 0.36$, $F = 6.74$, $P < 0.01$, $\lambda = 0.44$, $F = 4.26$, $P < 0.01$, respectivamente).

TABLA 4.2 Matriz de las distancias de Mahalanobis entre los centriodes de *A. reicherti*, *A. charrua* y ejemplares de la zona de contacto (ZC), basada en caracteres morfométricos. Todas las diferencias fueron significativas a $\alpha < 0.05$. Los valores correspondientes a las hembras se encuentran por debajo de la diagonal, mientras los valores de los machos por encima de la diagonal.

	<i>A. charrua</i>	<i>A. reicherti</i>	ZC
<i>A. charrua</i>	0	5.64	7.79
<i>A. reicherti</i>	3.28	0	2.34
ZC	3.04	1.86	0

TABLA 4.3 Matriz de clasificación del análisis discriminante realizado en base a caracteres morfométricos de *A. reicherti*, *A. charrua* y ejemplares de la zona de contacto (ZC) colectados en el campo.

	hembras				machos			
	% de asignación correcta	<i>A. charrua</i>	<i>A. reicherti</i>	ZC	% de asignación correcta	<i>A. charrua</i>	<i>A. reicherti</i>	ZC
<i>A. charrua</i>	66.7	40	18	2	82.1	69	10	5
<i>A. reicherti</i>	82.4	8	75	8	81.7	5	67	10
ZC	50	8	13	21	72.9	0	16	43
Total	70.5	56	106	31	79.6	74	93	58

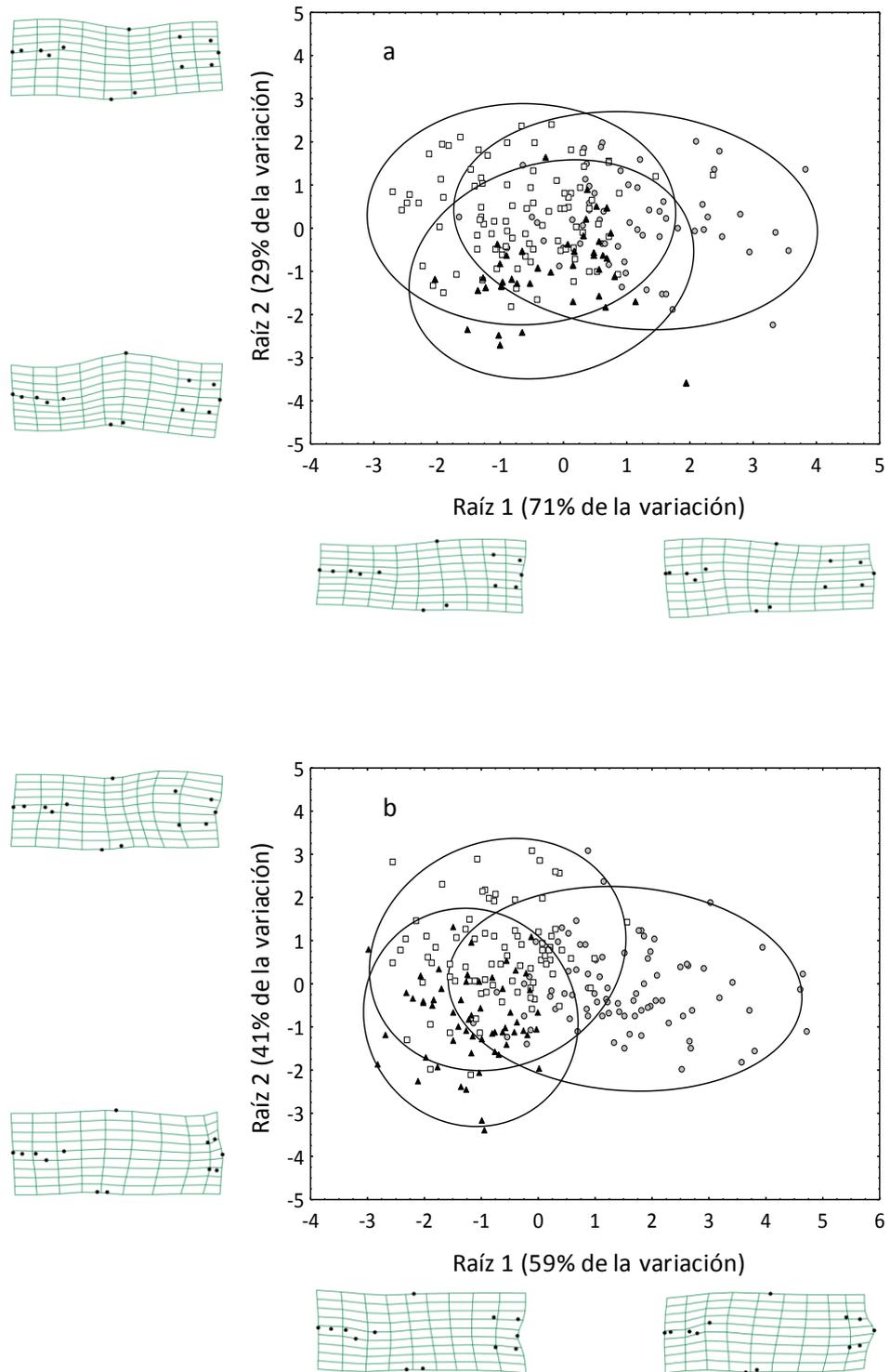


FIGURA 4.3 Proyección de las coordenadas de los individuos sobre las raíces canónicas del Análisis Discriminante de las hembras (a) y los machos (b) colectados en el campo, en base a los caracteres morfométricos; junto a la representación de las deformaciones correspondientes a los valores positivos y negativos de cada raíz con relación a la configuración consenso. Cuadrados: *A. reicherti*; círculos: *A. charrua*; triángulos: ejemplares de la zona de contacto. Las elipses representan el IC 95%. Las deformaciones fueron magnificadas x 3 para una mejor representación del desplazamiento de los marcos anatómicos.

En cuanto al patrón de pigmentación de los machos, se observaron diferencias significativas entre los tres grupos (Tabla 4.4). Los machos de *A. charrua* fueron los que presentaron más bandas verticales, mayor largo del diseño de pigmentación y bandas más anchas, mientras que los machos de ZC mostraron valores intermedios en todas las variables consideradas (Figura 4.4). Los grupos también evidenciaron diferencias en base a la pigmentación de las aletas impares. En los machos de *A. charrua*, el diseño consistió en puntos claros sobre un fondo oscuro en la aleta dorsal, anal y caudal (carácter diagnóstico de *A. charrua*, Loureiro & García 2008), mientras que los machos de *A. reicherti* presentaron aletas uniformemente pigmentadas con una línea oscura vertical en la parte posterior de la aleta dorsal y anal (carácter diagnóstico de *A. reicherti*, Loureiro & García 2008). Sin embargo, en el 48% de los machos de ZC el diseño consistió en puntos difusos sobre un fondo oscuro en las aletas impares, mientras algunos ejemplares presentaron los caracteres diagnósticos de *A. charrua* y *A. reicherti*, de manera aislada o conjunta (Tabla 4.5, Figura 4.5).

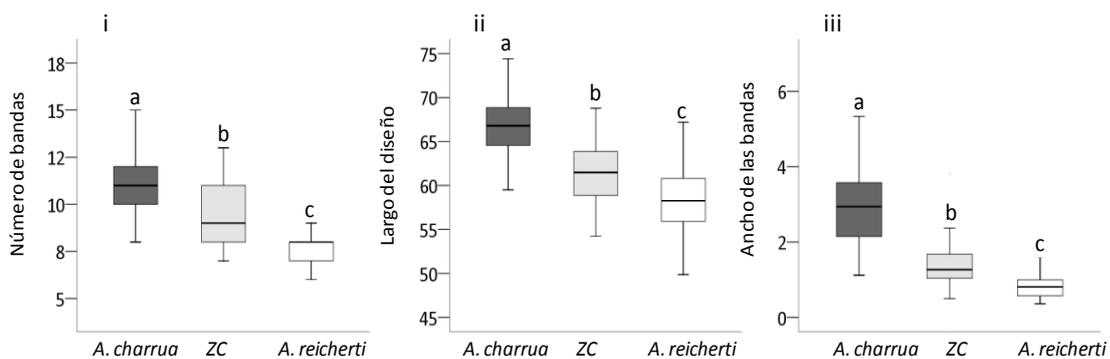


FIGURA 4.4 Pigmentación del cuerpo de machos colectados en el campo: i) Número de bandas verticales; ii) largo del diseño de bandas; iii) ancho de las bandas verticales. *A. charrua* (gris oscuro, N = 84), *A. reicherti* (blanco, N = 82) y los machos de la zona de contacto (gris claro, N = 59). Letras distintas significan $p < 0.05$

TABLA 4.4 Valores Z de la prueba de Mann-Whitney para las variables de pigmentación del cuerpo de los machos de *A. charrua*, *A. reicherti*, y de la zona de contacto (ZC) entre ambas especies. Todas las comparaciones son significativas a $p < 0.05$.

	<i>A. charrua</i> vs. ZC	<i>A. reicherti</i> vs. ZC	<i>A. charrua</i> vs. <i>A. reicherti</i>
Número de bandas	-5.47	-6.38	-10.34
Largo del diseño	-7.41	-4.49	-10.22
Ancho de las bandas	-8.08	-6.33	-10.89

TABLA 4.5 Diseño de pigmentación de las aletas impares de machos *A. charrua*, *A. reicherti*, y ejemplares de la zona de contacto (ZC) colectados en el campo; (N).

	Puntos claros	Línea vertical oscura	Puntos difusos	Ninguna
<i>A. charrua</i> (84)	93% (78)	0% (0)	0% (0)	7% (6)
<i>A. reicherti</i> (82)	0% (0)	89% (73)	0% (0)	11% (9)
ZC (59)	12% (7)	27% (16)	48% (28)	31% (18)

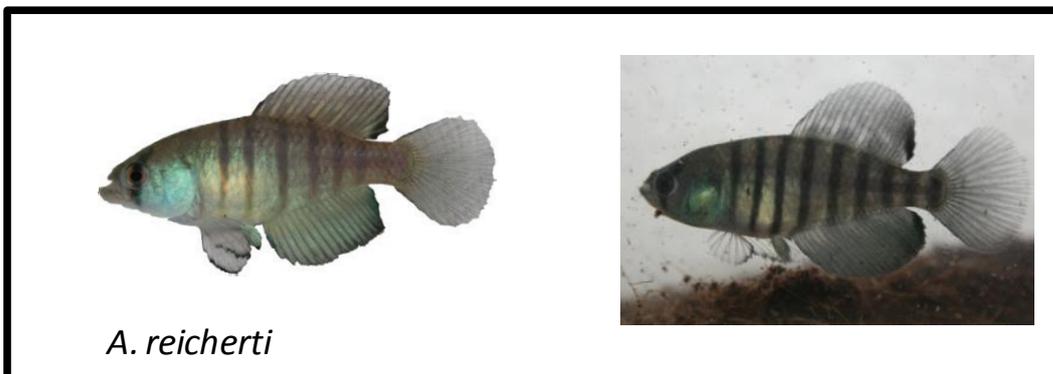
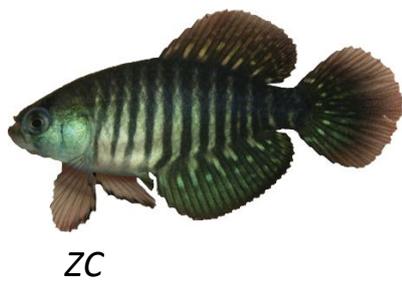


FIGURA 4.5 Diseño de pigmentación de las aletas de *A. charrua*: puntos claros sobre un fondo oscuro en las aletas impares; machos colectados en la zona de contacto (ZC): puntos difusos sobre un fondo oscuro en las aletas impares; y de *A. reicherti*: aletas impares uniformemente pigmentadas y una línea vertical oscura en el borde posterior de la aleta dorsal y anal.

Variación geográfica en *A. charrua* y *A. reicherti*

El análisis discriminante en base a caracteres morfométricos de individuos de *A. charrua* y de *A. reicherti* pertenecientes a poblaciones centrales y a poblaciones cercanas a ZC evidenció que, tanto en hembras como en machos, las poblaciones centrales de ambas especies fueron los grupos que mostraron mayores diferencias a lo largo de la raíz 1 (64% y 75% de la variación total para hembras y machos, respectivamente) (Figura 4.6). Las distancias de Mahalanobis entre los centroides de los cuatro grupos poblacionales corroboraron la diferenciación observada (Tabla 4.6).

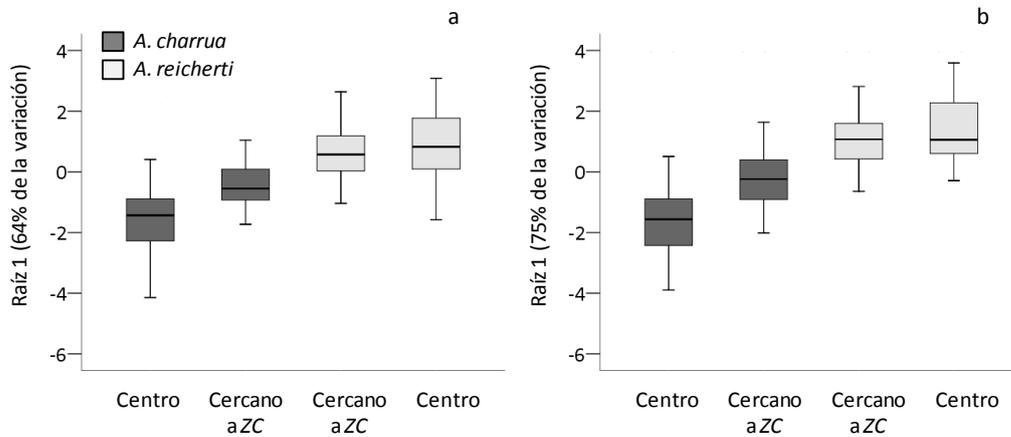


FIGURA 4.6 Coordenadas sobre la raíz 1 del análisis discriminante en base a caracteres morfométricos de los machos (a) y las hembras (b) de *A. charrua* (gris oscuro) y *A. reicherti* (gris claro), colectados en poblaciones centrales de la distribución de ambas especies (centro) y cercanas a la zona de contacto (cercano a ZC).

TABLA 4.6 Matriz de las distancias de Mahalanobis entre los centroides de poblaciones de *A. reicherti* y *A. charrua*, centrales de la distribución (centro) y cercanas a la zona de contacto (cercano al ZC), basada en caracteres morfométricos. Todas las diferencias fueron significativas a $\alpha < 0.05$, excepto *. Los valores correspondientes a las hembras se encuentran por debajo de la diagonal, mientras los valores de los machos están por encima de la diagonal.

		<i>A. charrua</i>		<i>A. reicherti</i>	
		Centro	Cercano a ZC	Cercano a ZC	Centro
<i>A. charrua</i>	Centro	0	5.05	7.43	9.96
	Cercano a ZC	3.23	0	4.05	6.13
<i>A. reicherti</i>	Cercano a ZC	5.06	2.87	0	1.73*
	Centro	6.74	3.55	1.95*	0

Por otra parte, el número de bandas verticales y el largo del diseño no difirieron significativamente entre las poblaciones centrales y cercanas a ZC para ninguna de las especies (prueba Mann-Whitney: $P > 0.496$ en todos los casos). Sin embargo, el ancho de bandas en las poblaciones de *A. charrua* cercanas a ZC fue significativamente superior que en las poblaciones centrales de esta especie (prueba Mann-Whitney: $Z = -2.98$, $N1 = 49$, $N2 = 35$, $P < 0.05$), mientras que las poblaciones de *A. reicherti* cercanas a ZC presentaron bandas significativamente más finas que las poblaciones centrales de esta especie (prueba Mann-Whitney: $Z = -6.09$, $N1 = 54$, $N2 = 28$, $P < 0.05$) (Figura 4.7). Por lo tanto, la mayor diferencia en el patrón de pigmentación entre las especies se produjo en las poblaciones cercanas a ZC.

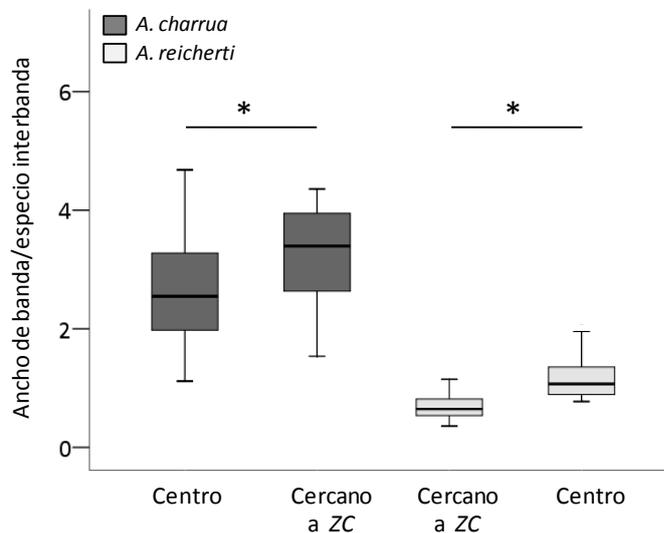


FIGURA 4.7 Ancho de las bandas verticales (ancho de banda/espacio interbanda) de machos *A. charrua* (gris oscuro) y *A. reicherti* (gris claro), colectados en poblaciones centrales (centro) de la distribución de ambas especies y cercanas a la zona de contacto (cercano a ZC). (*) $p < 0.05$.

Análisis de animales nacidos en cautiverio

Se realizaron comparaciones de la morfología y la pigmentación de 61 hembras y 99 machos descendientes de cruzamientos homo y heteroespecíficos realizados en cautiverio (Tabla 4.7). Los descendientes de los cruzamientos ♀ *A. charrua* x ♂ *A. reicherti* y ♀ *A. reicherti* x ♂ *A. charrua* no mostraron diferencias a nivel morfométrico ni de pigmentación, por lo cual se conformó un único grupo híbrido para cada sexo.

TABLA 4.7 Ejemplares nacidos en cautiverio utilizados para el análisis de la morfología y la pigmentación. Híbrido 1: descendientes del cruzamiento ♀ *A. charrua* x ♂ *A. reicherti*; híbrido 2: descendientes del cruzamiento ♀ *A. reicherti* x ♂ *A. charrua*.

	<i>A. charrua</i>	<i>A. reicherti</i>	Híbrido 1	Híbrido 2	Híbridos totales
Macho	27	22	24	26	50
Hembras	15	15	14	17	31

En las hembras, el análisis discriminante en base a caracteres morfométricos permitió diferenciar a *A. charrua* de *A. reicherti* y del grupo híbrido a lo largo de la raíz 1 (51% de la variación total), mientras que las hembras de *A. reicherti* y del grupo híbrido se diferenciaron entre sí a lo largo de la raíz 2 (49% de la variación total) (Figura 4.8). Los cambios en la forma de los individuos con valores negativos en la raíz 1 del análisis discriminante (*A. charrua*) involucraron principalmente la disminución relativa del tamaño de la cabeza, el aumento de la altura del cuerpo, y el desplazamiento anterior del final del pedúnculo (Figura 4.8). Los cambios en la forma asociados a los valores positivos de la raíz 2 fueron la disminución relativa de la altura del cuerpo, el aumento del tamaño de la cabeza y la disminución del largo del pedúnculo caudal (Figura 4.8). Las distancias de Mahalanobis entre los centroides de los tres grupos confirmaron esta segregación, con diferencias significativas en todos los casos (Tabla 4.8). La mayor distancia fue entre *A. charrua* y *A. reicherti*, mientras que el menor valor correspondió a la distancia entre este último grupo y las hembras híbridas. Las hembras de *A. charrua* mostraron el menor porcentaje de asignación correcta (86.7%), mientras el porcentaje total de individuos clasificados correctamente fue de 91.8% (Tabla 4.9).

En los machos, la mayor diferenciación a lo largo de la raíz 1 del análisis discriminante (65% de la variación total) se observó entre *A. charrua* y los machos híbridos, mientras *A. reicherti* se distinguió de los otros dos grupo a lo largo de la raíz 2 (35 % de la variación total) (Figura 4.8). Los cambios en la forma asociados con los valores positivos de la raíz 1 incluyeron la disminución relativa del largo del pedúnculo, el desplazamiento posterior del origen de la base de la aleta anal, y la prolongación del hocico (Figura 4.8). En la raíz 2, los principales cambios asociados a los valores positivos fueron el desplazamiento posterior y anterior del origen de la base de la aleta dorsal y anal respectivamente, así como la disminución del tamaño relativo de la cabeza (Figura 4.8). La discriminación entre los grupos fue corroborada con las distancias de Mahalanobis entre los centroides, evidenciando diferencias significativas en todos los casos (Tabla 4.8). El mayor valor correspondió a la distancia entre los machos de *A. charrua* y los machos híbridos, mientras que estos últimos y los machos de *A. reicherti*

fueron los grupos que presentaron menor distancia. Los machos híbridos resultaron con el mayor porcentaje de asignación correcta (96.0%), mientras el porcentaje total de individuos correctamente clasificados fue de 91.9% (Tabla 4.9).

El análisis MANCOVA mostró diferencias significativas entre los grupos de machos y de hembras analizados ($\lambda = 0.19$, $F = 4.70$, $P < 0.01$, $\lambda = 0.22$, $F = 2.15$, $P < 0.01$).

TABLA 4.8 Matriz de las distancias de Mahalanobis entre los centriodes de *A. reicherti*, *A. charrua* y ejemplares híbridos, basada en caracteres morfométricos. Todas las diferencias fueron significativas a $\alpha < 0.05$. Los valores correspondientes a las hembras se encuentran por debajo de la diagonal, mientras los valores de los machos por encima de la diagonal.

	<i>A. charrua</i>	<i>A. reicherti</i>	Híbridos
<i>A. charrua</i>	0	9.8	9.9
<i>A. reicherti</i>	12.7	0	6.6
Híbridos	9.7	9.0	0

TABLA 4.8 Matriz de clasificación del análisis discriminante realizado en base a caracteres morfométricos de *A. reicherti*, *A. charrua* y ejemplares híbridos nacidos en cautiverio.

	% de asignación correcta	Hembras			% de asignación correcta	Machos		
		<i>A. charrua</i>	<i>A. reicherti</i>	Híbridos		<i>A. charrua</i>	<i>A. reicherti</i>	Híbridos
<i>A. charrua</i>	86.7	13	0	2	92.6	25	0	2
<i>A. reicherti</i>	93.34	0	14	1	81.1	0	18	4
Híbridos	93.5	0	2	29	96.0	0	2	48
Total	91.8	13	16	32	91.9	25	20	54

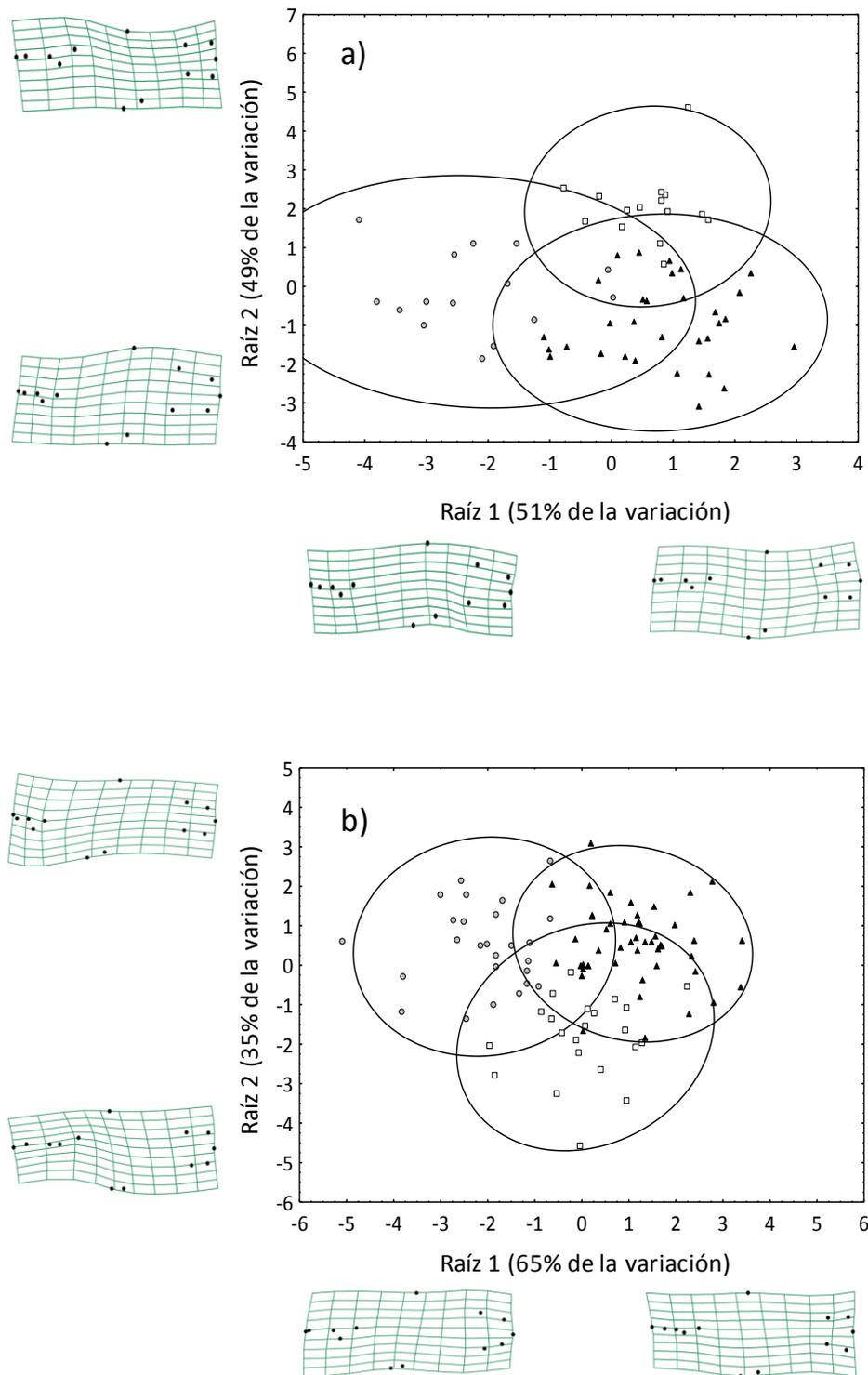


FIGURA 4.8 Proyección de las coordenadas de los individuos sobre las raíces canónicas del Análisis Discriminante de las hembras (a) y los machos (b) nacidos en cautiverio, en base a los caracteres morfométricos; junto a la representación de las deformaciones correspondientes a los valores positivos y negativos de cada raíz con relación a la configuración consenso. Cuadrados: *A. reicherti*; círculos: *A. charrua*; triángulos: híbridos. Las elipses representan el IC 95%. Las deformaciones fueron magnificadas x 3 para una mejor representación del desplazamiento de los marcos anatómicos.

Respecto a la pigmentación, se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos de machos (Tabla 4.10). Los machos de *A. charrua* presentaron más bandas verticales, mayor largo del diseño de pigmentación y bandas más anchas, mientras que los híbridos mostraron valores intermedios en todas las variables consideradas (Figura 4.9). La pigmentación de las aletas impares también permitió diferenciar a los grupos. Los machos de *A. charrua* presentaron puntos claros sobre un fondo oscuro, mientras los de *A. reicherti* mostraron pigmentación uniforme con una línea oscura vertical en la parte posterior de las aletas dorsal y anal. Por otro lado, el diseño consistió en puntos difusos en la mayoría de los machos híbridos (66%). Algunos ejemplares híbridos presentaron una línea oscura vertical en la parte posterior de las aletas dorsal y anal, de manera aislada o conjuntamente con puntos difusos, y solamente en 2 individuos la pigmentación consistió en puntos claros (Tabla 4.11).

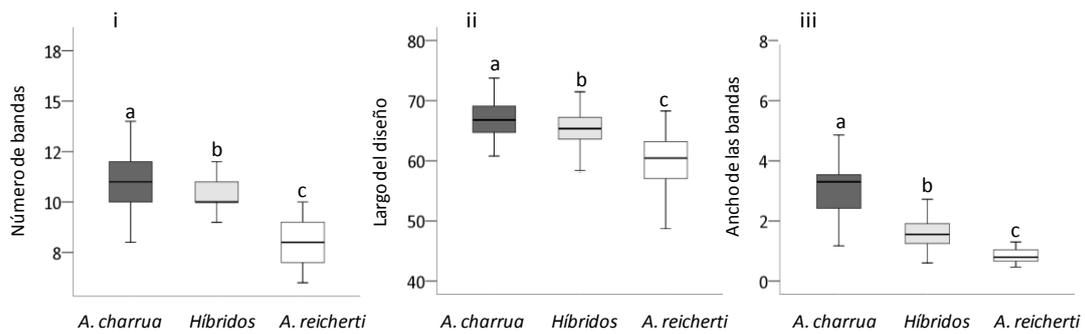


FIGURA 4.9 Pigmentación del cuerpo de machos nacidos en cautiverio: i) Número de bandas verticales; ii) largo del diseño de bandas; iii) ancho de las bandas verticales. *A. charrua* (gris oscuro, N = 27), *A. reicherti* (blanco, N = 22) y los machos híbridos (gris claro, N = 50). Letras distintas significan $p < 0.05$.

TABLA 4.10 Valores Z de la prueba de Mann-Whitney para las variables de pigmentación del cuerpo de los machos de *A. charrua*, *A. reicherti*, y ejemplares híbridos. Todas las comparaciones son significativas a $p < 0.05$.

	<i>A. charrua</i> vs. Híbridos	<i>A. reicherti</i> vs. Híbridos	<i>A. charrua</i> vs. <i>A. reicherti</i>
Número de bandas	-1.95	-5.51	-5.21
Largo del diseño	-2.48	-4.49	-5.11
Ancho de las bandas	-5.74	-5.51	-6.03

TABLA 4.11 Diseño de pigmentación de las aletas impares de machos *A. charrua*, *A. reicherti*, y ejemplares híbridos nacidos en cautiverio; (N).

	Puntos claros	Línea vertical oscura	Puntos difusos	Ninguna
<i>A. charrua</i> (27)	96% (26)	0% (0)	0% (0)	4% (1)
<i>A. reicherti</i> (22)	0% (0)	100% (22)	0% (0)	0% (0)
ZC (50)	4% (2)	26% (13)	66% (33)	24% (12)

DISCUSIÓN

En primer término, este trabajo evidencia la viabilidad de la descendencia obtenida en cautiverio a partir de cruzamientos entre *Austrolebias charrua* y *A. reicherti*. Además, la morfología y la pigmentación de estos híbridos coinciden con los patrones fenotípicos encontrados en el área de contacto de la distribución de estas especies y por lo tanto sugieren la ocurrencia de hibridación en la naturaleza.

La ocurrencia de hibridación es relativamente común en la naturaleza (Seehausen 2004, Abbott *et al.* 2010, Arnold & Martin 2010, Rosenthal 2012). Un ejemplo clásico en peces Cyprinodontiformes lo constituye el género *Xiphophorus*, donde se han encontrado zonas híbridas entre múltiples pares de especies (Rosenthal *et al.* 2003, Culumber *et al.* 2010, Schartl 2008). Los eventos de hibridación han sido un factor importante durante historia evolutiva de este género (Cui *et al.* 2013). En *Austrolebias*, ha sido reportada la hibridación en cautiverio entre especies del complejo "*A. adloffii*", específicamente entre *A. adloffii* y *C. adloffii-2* (actualmente *A. charrua*) (García *et al.* 2002). Por otra parte, García (1996) propuso el origen híbrido de *C. adloffii-2* mediante la ocurrencia de algún evento de introgresión post-pleistocénico entre *A. adloffii* y *A. viarius* (especies localizadas alopátridamente al norte y al sur de *A. charrua*, respectivamente). Además, descendencia híbrida entre *A. charrua* y *A. reicherti* ha sido obtenida previamente en cautiverio mediante un cruzamiento entre un macho de *A. charrua* y una hembra de *A. reicherti* (Oviedo 2009).

Respecto a la morfología, los híbridos nacidos en cautiverio así como los peces colectados en ZC, fueron diferentes de los individuos de las especies parentales. En los machos, los principales cambios morfológicos que permitieron distinguir a los grupos, fueron el tamaño de la cabeza y la posición relativa del origen de la aleta dorsal y anal. Como fue reportado previamente (Loureiro & García 2008), los machos de *A. charrua* poseen cabeza relativamente más chica que los machos de *A. reicherti*, y contrario a estos últimos, el origen de la aleta dorsal es posterior respecto al origen de la aleta anal. Los machos que presentaron mayores semejanzas morfológicas en cautiverio fueron *A. reicherti* y los híbridos, mientras que en la naturaleza la mayor semejanza fue encontrada entre *A. reicherti* y los machos colectados en ZC. Además, los resultados obtenidos a partir del análisis con individuos nacidos en cautiverio y colectados en el campo, también coincidieron en que la mayor diferencia morfológica fue observada entre los machos de *A. charrua* y los híbridos nacidos en cautiverio

y los colectados en ZC. En las hembras, las principales diferencias morfológicas entre los grupos resultaron ser la altura del cuerpo, y el tamaño de la cabeza y del pedúnculo caudal. Al igual que en los machos, las diferencias observadas entre los grupos de peces colectados en el campo fueron consistentes con las diferencias observadas entre los grupos de peces criados en cautiverio. La mayor semejanza morfológica entre los grupos de hembras fue encontrada entre *A. reicherti* y las híbridas nacidas en cautiverio y las colectadas en ZC, mientras que la mayor diferencia fue la observada entre las especies parentales, tanto en cautiverio como en la naturaleza. Las incongruencias entre los valores de las distancias de Mahalanobis entre los grupos de peces colectados en el campo y los grupos criados en cautiverio (en general, valores mayores en los peces de cautiverio) podrían ser causadas por alguna de las siguientes razones no excluyentes entre sí: 1) a diferencia de la colecta realizada en el área de contacto, en cautiverio la certeza respecto a la identidad del grupo híbrido fue absoluta; 2) las relaciones de parentesco entre algunos de los individuos nacidos en cautiverio (ver materiales y métodos) podrían afectar la identidad de los grupos; 3) la variación morfológica encontrada entre distintas localidades geográficas podría opacar la discriminación de los grupos en el campo.

En cuanto a la pigmentación de los machos, Loureiro & García (2008) reportaron diferencias en el diseño de bandas verticales y en la pigmentación de las aletas impares entre *A. charrua* y *A. reicherti*. La presencia de puntos claros en las aletas fue determinado como carácter diagnóstico de *A. charrua*, mientras que la aparición de una banda oscura vertical en el borde posterior de la aletas dorsal y anal lo fue para *A. reicherti*. Además, la relación banda/espacio interbanda en el flanco del cuerpo es menor para esta última especie (Loureiro & García 2008). En este estudio se reportan nuevas diferencias entre estas especies respecto a la pigmentación del cuerpo, donde los machos de *A. charrua* presentaron mayor número de bandas verticales y mayor largo relativo del diseño que los machos de *A. reicherti*. Por otro lado, los machos híbridos obtenidos en cautiverio así como los machos colectados en ZC presentaron valores significativamente diferentes, e intermedios entre ambas especies, en el largo relativo del diseño y en el número y ancho de las bandas verticales. Además, en la mayoría de los casos, los híbridos y los machos colectados en ZC presentaron un diseño particular de las aletas impares que permitió distinguirlos de las especies parentales.

Finalmente, los patrones de variación intraespecíficos sugieren que las presiones selectivas a las que está sometida la morfología difieren de las ejercidas sobre la pigmentación de los machos. Las diferencias morfológicas entre las poblaciones fueron mayores a medida que aumentó la distancia geográfica, por lo que la variación morfológica se ajusta a un patrón

de diferenciación neutra. Sin embargo, la mayor diferencia respecto a la pigmentación del cuerpo de los machos fue encontrada entre las poblaciones de *A. charrua* y de *A. reicherti* cercanas a la región de contacto. Este patrón de variación sugiere desplazamiento de caracteres reproductivos, y que otras fuerzas evolutivas, tal como la selección sexual vía preferencia de las hembras y mecanismos de reforzamiento del aislamiento reproductivo, podrían estar afectando los patrones de diferenciación encontrados en el diseño de pigmentación de los machos (Dobzhansky 1940, Howard 1993, Servedio & Noor 2003). Bajo el modelo de reforzamiento del aislamiento reproductivo, las diferencias en los caracteres sexuales en el área de contacto entre poblaciones divergentes son consideradas como el resultado de la selección contra apareamientos híbridos desventajosos. Una condición necesaria de la hipótesis de reforzamiento es que haya evolucionado algún grado de incompatibilidad en alopatria antes de que las poblaciones divergentes solapen sus rangos de distribución a través de un contacto secundario (Servedio & Noor 2003). Por lo tanto, resta por evaluar el efecto de la pigmentación de los machos sobre el reconocimiento específico y la eficacia reproductiva de los individuos híbridos entre estas dos especies.

En suma, la constatación de que las especies hibridan en condiciones de cautiverio junto a las semejanzas encontradas en la morfometría y pigmentación de los híbridos nacidos en el laboratorio y los individuos colectados en el área de contacto, sugieren fuertemente la existencia de una zona híbrida entre *A. charrua* y *A. reicherti* localizada en la parte inferior de la cuenca del Río Cebollatí (Departamento de Treinta y Tres). Sin embargo, análisis genéticos con secuencias mitocondriales no han detectado flujo genético entre las especies (García *et al.* 2009). Este hecho podría deberse a que la zona híbrida se haya formado recientemente, o a la existencia de algún grado de infertilidad de los individuos híbridos o al aislamiento sexual (ver capítulo 5). Además, la transmisión mitocondrial entre las especies puede ser prevenida cuando la eficacia diferencial de los distintos cruzamientos híbridos causa un flujo unisexual (Mallet 2005).

Las zonas híbridas naturales proveen oportunidades únicas para comprender los mecanismos de diferenciación genética y morfológica y por lo tanto esclarecer factores que pueden promover la especiación (Vallianatos *et al.* 2001, Jones *et al.* 2006). En *Austrolebias*, las especies hermanas generalmente ocupan áreas adyacentes alopátridas (Loureiro 2004), y la hibridación en condiciones naturales no ha sido reportada en ningún otro caso. Por lo tanto, la singularidad del sistema *A. charrua* - *A. reicherti* enfatiza la inclusión de estas especies y

particularmente de la zona de contacto, un área sujeta a un fuerte impacto debido a la intensa actividad arrocera, en un programa de conservación prioritario.

CAPÍTULO 5.

Naturaleza del aislamiento reproductivo entre
Austrolebias reicherti y *A. charrua*

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, una importante controversia en biología evolutiva se centra en las discrepancias generadas en torno a los principios generales y los mecanismos involucrados en la formación y el mantenimiento de entidades biológicas discretas, a partir de un proceso continuo de cambio evolutivo. A la luz del concepto biológico de especie (Mayr 1963), éstas son definidas como grupos de organismos que real o potencialmente se reproducen entre sí, y que están aislados reproductivamente de otros en condiciones naturales. El aislamiento se manifiesta a través de barreras reproductivas que afectan la probabilidad de que individuos de diferentes acervos genéticos se reproduzcan entre sí. Por lo tanto, el problema central de la especiación es el origen de las barreras de aislamiento reproductivo que previenen el actual o potencial flujo de genes entre las poblaciones (Coyne & Orr 2004, Mallet 2008), y la solución requiere tanto la identificación de los caracteres involucrados en el aislamiento como la comprensión de las fuerzas evolutivas que han actuado sobre esos caracteres. El aislamiento reproductivo involucra factores que afectan tanto el establecimiento de la pareja y el apareamiento (aislamiento preapareamiento), como la formación del cigoto y la eficacia de los híbridos en sus distintas etapas del desarrollo (aislamiento post-apareamiento) (Dobzhansky 1951).

Una cuestión central en la investigación sobre los mecanismos que conducen la especiación, se refiere al orden cronológico en que surgen y se acumulan las barreras reproductivas en poblaciones divergentes. En particular, son relevantes tanto la identificación de la primera barrera reproductiva que hace posible que los linajes divergentes permanezcan aislados reproductivamente como la determinación de los principios generales que gobiernan este proceso (Coyne & Orr 2004). Por ejemplo, una barrera reproductiva podría evolucionar antes que otras, contribuyendo de manera capital a la divergencia inicial de las especies incipientes. La identificación de la contribución relativa de las distintas barreras reproductivas en especies que hayan derivado recientemente (antes de que hayan evolucionado múltiples barreras reproductivas) proporciona una ventana en el proceso de especiación a través de la cual pueden hacerse evidentes pautas generales (Mendelson *et al.* 2007).

Recientemente, la selección sexual ha sido foco de investigación en el marco de la discusión moderna sobre los procesos de especiación (Panhuis *et al.* 2001, Ritchie 2007, van Doorn *et al.* 2009, Kraaijeveld *et al.* 2011, Maan & Seehausen 2011, Reding *et al.* 2013). Las

fuerzas evolutivas capaces de producir cambios vinculados a los sistemas de señales de apareamiento, juegan un rol importante en el establecimiento de barreras reproductivas e inciden por lo tanto en el proceso de especiación (Butlin & Ritchie 1994). En particular, la selección sexual tiene un alto potencial para la formación de nuevas especies porque afecta directamente caracteres que influyen en el éxito reproductivo y en el sistema de reconocimiento de pareja (West-Eberhard 1983, Sampson 1999). Aunque estudios teóricos (Lande 1981, West-Eberhard 1983, Higashi *et al.* 1999) y empíricos (Shaw 1999, Arnqvist *et al.* 2000, Gray & Cade 2000, Uy & Borgia 2000, Masta & Maddison 2002) enfatizan la vinculación del comportamiento reproductivo y la especiación, la determinación de la direccionalidad de dicho vínculo es aún foco de controversia (Gray 2004). La cuestión clave sigue siendo: ¿la selección contra apareamientos híbridos desventajosos conduce la evolución del comportamiento reproductivo (modelo clásico de especiación y reforzamiento), o el aislamiento comportamental evoluciona a través de un proceso intraespecífico de selección sexual que precede y contribuye significativamente a la subsiguiente especiación (modelo de especiación por selección sexual)? (Ritchie 2007).

El modelo clásico de especiación y reforzamiento (Mayr 1963, Dobzhansky 1940, Howard 1993, Servedio & Noor 2003, Coyne & Orr 2004) sugiere que el aislamiento sexual tiene un rol secundario en el proceso de especiación, el cual evoluciona luego de la divergencia gradual de los linajes en alopatría. Una vez que las poblaciones alopátridas divergentes solapan sus rangos de distribución, el reforzamiento provoca un incremento en el aislamiento precopulatorio en respuesta a la selección contra apareamientos interespecíficos (Dobzhansky 1940, Servedio & Noor 2003). Modelos teóricos basados en la elección de pareja de las hembras, demuestran que la covariación entre los caracteres sexuales y las preferencias de apareamiento inicialmente generada por un proceso de reforzamiento puede conducir la finalización del proceso de especiación (Liou & Price 1994). Una condición necesaria de la hipótesis de reforzamiento es que haya evolucionado algún grado de incompatibilidad en alopatría antes de que las poblaciones divergentes solapen sus rangos de distribución a través de un contacto secundario. Bajo este modelo, las diferencias en los caracteres y preferencias sexuales son consideradas como el resultado de la selección contra apareamientos híbridos desventajosos. Por lo tanto, de acuerdo al modelo de reforzamiento se generan las siguientes predicciones: 1) mayor divergencia de los caracteres y las preferencias sexuales en la zona de contacto entre las especies que en las poblaciones alopátridas (desplazamiento de caracteres reproductivos) (Howard 1993, Noor 1999, Pfennig & Pfennig 2009); 2) existencia de cierto grado de aislamiento post-copulatorio; 3) a su vez, si el aislamiento sexual evoluciona a causa

de la selección contra apareamientos desventajosos, podemos también predecir que este mecanismo de aislamiento será muy fuerte, permitiendo solamente un nivel mínimo de flujo génico (Coyne *et al.* 2002).

En contraste con el modelo clásico de especiación, el cual propone una divergencia genética suficientemente grande para producir aislamiento post-apareamiento, algunos modelos recientes sugieren que el aislamiento reproductivo puede evolucionar rápidamente con muy poco cambio genético (Turner & Burrows 1995, Higashi *et al.* 1999, Dieckmann & Doebeli 1999, Kondrashov & Kondrashov 1999, Kirkpatrick & Ravigné 2002). La rápida divergencia puede ser facilitada a través del desarrollo de una correlación genética entre las preferencias y los caracteres sexuales, donde la selección sexual será directamente responsable de la especiación. De esta forma, la restricción del flujo génico interespecífico puede ser una consecuencia incidental de la selección sexual operando dentro de las especies (Lande 1981). Si la selección sexual conduce la divergencia poblacional, las predicciones serán las siguientes: 1) los caracteres y las preferencias sexuales no difieren de forma significativa entre áreas de contacto y áreas alopátricas; 2) el aislamiento post-apareamiento está ausente o es muy leve; 3) la eficacia del comportamiento sexual en restringir el flujo génico puede ser variable, y podría reflejar niveles de divergencia en un continuo que va desde poblaciones a subespecies y especies (Gray 2004).

La predicción que mejor distingue ambos modelos de especiación concierne al desplazamiento de caracteres reproductivos. Mientras que el modelo clásico de reforzamiento predice mayor divergencia de los caracteres y las preferencias sexuales en la zona de contacto entre las especies, el modelo de especiación por selección sexual no. Las restantes predicciones, aunque no proveen un completo contraste, ayudan a distinguir entre ambos modelos. Por ejemplo, un resultado que demuestre que el comportamiento reproductivo es altamente efectivo en restringir el flujo génico no distingue entre ambos modelos, pero un resultado que demuestre que el comportamiento reproductivo tiene un efecto leve en impedir el flujo génico es claramente inconsistente con el modelo clásico de reforzamiento (Gray 2004).

En este estudio, se evaluó el rol de la selección sexual en el proceso de especiación poniendo a prueba los modelos de reforzamiento y de especiación por selección sexual en los peces anuales *Austrolebias reicherti* y *A. charrua*, especies hermanas de divergencia reciente. Al igual que el resto de los integrantes del complejo de especies "*A. adloffii*", estas especies se diferencian principalmente por el patrón de coloración de los machos, mientras que las

hembras son similares entre sí y relativamente crípticas (Loureiro 2004, Costa 2006). De acuerdo a García (2006) el complejo de especies “*A. adloffii*” se habría diferenciado recientemente, posiblemente mediante un proceso de especiación simultánea y múltiple. Este escenario de diferenciación, junto con la diversidad en los patrones de pigmentación en los machos y el marcado dimorfismo sexual en morfología y comportamiento reproductivo de estas especies, sugiere que la selección sexual pudo estar en la base de la rápida diferenciación fenotípica y especiación de este grupo. *Austrolebias charrua* y *A. reicherti* presentan distribución parapátrida con una zona de contacto en la parte baja de la cuenca del Río Cebollatí (García *et al.* 2009, capítulo 4). Ambas especies probablemente hayan emergido desde un evento cladogenético durante el Pleistoceno tardío (1.25 MA a 450.000 años), de acuerdo con las estimaciones del reloj molecular basado en secuencias del citocromo b y con el escenario geológico de la región (García *et al.* 2009) El escenario más plausible de diferenciación entre *A. charrua* y *A. reicherti*, es la ocurrencia de fragmentación alopátrica durante transgresiones marinas, la divergencia y posterior expansión de la distribución involucrando un contacto secundario (García *et al.* 2009). Aunque estudios morfológicos han evidenciado hibridación en la zona de contacto (capítulo 4), análisis con secuencias del citocromo b no han detectado flujo genético entre las especies (García *et al.* 2009). En este sentido, es esperable que mecanismos de reconocimiento de pareja hayan evolucionado para mantener el aislamiento reproductivo. Estas especies brindan una excelente oportunidad para examinar la naturaleza del aislamiento reproductivo y contribuir entonces al entendimiento de los mecanismos de especiación en el grupo de peces anuales “*A. adloffii*”. Los estudios en las zonas de contacto entre especies/poblaciones divergentes son de especial interés para contribuir a la comprensión general de los procesos que mantienen la diferenciación genética y morfológica, y los factores que podrían promover la especiación (McMillan *et al.* 1997, Bailey *et al.* 2004, Cruz *et al.* 2004, Patten *et al.* 2004, Jones *et al.* 2006).

En este estudio se investigó el grado de aislamiento reproductivo entre *A. reicherti* y *A. charrua*, evaluando en el laboratorio el sistema de señales de apareamiento como mecanismo de aislamiento reproductivo y la existencia las barreras post-apareamiento mediante estimaciones de *performance* reproductiva. Específicamente, se evaluó si: a) existe discriminación entre parejas homo y heteroespecíficas en ensayos de elección simultánea entre dos estímulos y en ensayos de libre elección de interacción múltiple; b) la discriminación difiere entre áreas de contacto y áreas alopátricas; c) ambos sexos son igualmente selectivos; d) los apareamientos homoespecíficos, los heteroespecíficos, los ♀ híbrida x ♂ híbrido, y los

retrocruzamientos difieren en la tasa de fecundación, en el éxito de eclosión, y en la viabilidad y tasa de crecimiento de la descendencia en condiciones controladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de animales y mantenimiento

Se colectaron individuos adultos de *A. charrua* y de *A. reicherti* con red de mano en charcos temporales distribuidos en los Departamentos de Rocha y Treinta y Tres, durante la estación reproductiva (agosto-octubre 2011). Para cada especie se realizaron colectas en poblaciones localizadas en regiones centrales de la distribución y en áreas cercanas a la zona de contacto (Figura 4.1, Anexo 1). Los peces capturados fueron trasladados a la Facultad de Ciencias y mantenidos en cautividad bajo condiciones de temperatura constante (19°C) y fotoperiodo natural, alimentados *ad libitum* con *Tubifex sp.* Los machos fueron alojados en acuarios individuales (20 x 9 x 15 cm, largo x ancho x altura) mientras que las hembras se mantuvieron en acuarios comunales (40 x 13 x 15 cm) en grupos de hasta 5 individuos.

Pruebas de elección entre dos estímulos

Las pruebas de elección de pareja se llevaron a cabo en acuarios de 60 x 20 x 20 cm divididos transversalmente en tres compartimentos mediante tabiques de acrílico transparente perforado: un compartimento central de 40 cm y dos compartimentos estímulo laterales de 10 cm cada uno. El espacio central fue a su vez repartido en tres sectores mediante marcas externas: un sector central de 30 cm (zona neutra) y dos sectores laterales de 5 cm cada uno (zonas de elección). El piso del acuario fue cubierto con turba y se colocó *Myriophyllum sp.*, una planta especialmente abundante en los charcos temporales, en los compartimentos de elección y en la zona neutra. La vegetación brindó refugio a los peces e impidió parcialmente el contacto visual y por tanto la interferencia entre los individuos colocados en los extremos del acuario. Para reducir cualquier fuente de disturbio externo y proveer un fondo uniforme, tanto las paredes laterales como la pared trasera del acuario fueron recubiertas con láminas plásticas de color negro (ver detalles en el capítulo 3). Todos los experimentos fueron realizados entre las 8:00 y las 14:00 horas.

Para determinar el grado de aislamiento sexual entre las especies, se evaluó la habilidad de las hembras en seleccionar machos homoespecíficos en pruebas de elección simultánea. Además, para evaluar si el aislamiento sexual difiere significativamente en áreas de contacto y en áreas de alopatría, para cada especie se estableció un grupo de 20 hembras

provenientes de poblaciones centrales de la distribución y otro grupo de 20 hembras provenientes de poblaciones cercanas a la zona de contacto, las cuales fueron puestas a prueba de elección entre un macho homoespecífico de su propia población y un macho heteroespecífico. Los machos fueron seleccionados para minimizar la diferencia de tamaño en cada día de estímulos (diferencia de tamaño = 1.3 ± 0.8 mm). Se utilizaron 30-35 machos de cada localidad (60 de *A. charrua* y 65 de *A. reicherti*) y, aunque las días nunca fueron repetidas, fue necesaria la reutilización de machos para completar 80 pruebas de preferencia. Al comienzo de cada ensayo, la hembra focal fue colocada en el compartimento central y se le permitió nadar libremente durante 20 minutos de aclimatación y reconocimiento del acuario experimental. Posteriormente, la hembra fue recluida en la zona neutra en un prisma de acrílico opaco (10 x 10 x 20 cm) y se colocó un macho en cada compartimento lateral. Los machos fueron asignados aleatoriamente al compartimento estímulo derecho o izquierdo. Luego de 10 minutos de aclimatación de los machos al acuario experimental, el prisma de acrílico fue removido y se obtuvo un video-registro de cuatro períodos de 15 minutos espaciados por intervalos de 1 hora. Inmediatamente a la prueba de elección, la hembra focal y un macho estímulo tomado al azar, fueron colocados juntos en un acuario (40 x 13 x 15 cm) con un recipiente (10 x 10 x 3 cm) conteniendo sustrato adecuado para el desove y extracción de los huevos (perlas de vidrio de 0.4-0.6 mm) por un período de 20 horas. Luego, los peces fueron retornados a los acuarios de mantenimiento y el contenido del recipiente de desove fue filtrado a través de una malla de aproximadamente 1 mm que permitió la retención de los huevos depositados en el sustrato.

El grado de aislamiento sexual de las especies fue también valorado a través de la evaluación de las habilidades de los machos en seleccionar hembras homoespecíficas. Para cada especie se estableció un grupo de 20 machos provenientes de poblaciones cercanas a la zona de contacto, los cuales fueron puestos a prueba para evaluar preferencias de apareamiento entre una hembra homoespecífica proveniente de su propia población y una hembra heteroespecífica. Las hembras fueron seleccionadas para minimizar la diferencia de tamaño en cada día de estímulos (diferencia de tamaño = 1.4 ± 0.2 mm), y asignadas aleatoriamente al compartimento estímulo derecho o izquierdo. Cada individuo fue utilizado solamente una vez. Todos los machos fueron empleados exclusivamente en este experimento, mientras que algunas hembras fueron también utilizadas en las pruebas de elección anteriores. Se empleó el mismo protocolo experimental que en la evaluación de las preferencias de apareamiento de las hembras, excepto que en este caso no fueron realizados los ensayos de desove.

Al finalizar los ensayos comportamentales, el flanco izquierdo de todos los individuos fue fotografiado en un acuario de 15 x 10 x 12 cm, donde los peces fueron cuidadosamente inmovilizados entre una esponja y la pared del acuario. A partir de las imágenes digitales se realizaron medidas de largo estándar (desde el margen anterior de la cabeza hasta el margen distal del pedúnculo caudal) utilizando el software *tpsDig2*.

Pruebas de interacción libre de múltiple elección

El aislamiento sexual entre las especies fue también evaluado mediante un diseño experimental que permitió la libre interacción de los individuos en una red social. Las pruebas de interacción libre fueron realizadas en acuarios de 60 x 20 x 20 cm, mantenidos a temperatura constante (19°C) y fotoperíodo de 12/12hs. El piso de cada acuario fue cubierto con una capa homogénea de 3 cm de turba como sustrato adecuado para el desove, y separado transversalmente en 4 sectores mediante tabiques plásticos de 7 cm de altura. Para reducir cualquier fuente de disturbio externo y proveer un fondo uniforme, tanto las paredes laterales como la pared trasera del acuario fueron recubiertas con láminas de color negro. En cada acuario se colocaron 2 hembras y 2 machos de cada una de las especies (8 individuos en total), y se permitió la interacción de los animales durante 3 días consecutivos. Los machos fueron identificados mediante caracteres del patrón de pigmentación del cuerpo, mientras que las hembras fueron individualizadas mediante la implantación subcutánea de marcas visibles de elastómeros (las hembras de ambas especies son indistinguibles morfológicamente) previa anestesia por inmersión en 2-fenoxietanol al 0.01%. (Figura 5.1). La manipulación y la inyección de los implantes de elastómero no tuvieron efectos detectables en el comportamiento posterior del animal. Se realizaron observaciones de registro continuo en 4 intervalos diarios de 20 minutos cada uno, durante las primeras 4 horas de luz de cada día (de 8 a 12 hs). En cada intervalo de observación se registró la ocurrencia de eventos de apareamiento, los despliegues de cortejo de los machos, y las conductas de ataque durante las interacciones agonísticas macho-macho (ver capítulo 1), con identificación de los individuos involucrados. Para evaluar si el aislamiento sexual difiere significativamente en áreas de contacto y en áreas de alopatría, se realizaron 12 ensayos con individuos provenientes de poblaciones cercanas a la zona de contacto y otros 12 con individuos provenientes de poblaciones centrales de la distribución de ambas especies. Una vez finalizadas las experiencias, la turba de cada acuario experimental fue extraída, secada y almacenada en bolsas plásticas, y luego de un período de desecación obligada de 3 meses se procedió a la eclosión de los huevos. Todos los individuos utilizados así como los alevines nacidos fueron

sacrificados mediante sobredosis de 2-fenoxietanol 0.01% y conservados en alcohol al 95% para futuros análisis de asignación de paternidad.



FIGURA 5.1 Hembra de *A. reicherti* con implantación subcutánea de elastómero (línea anaranjada)

Pruebas de aislamiento post-apareamiento

Para evaluar el aislamiento reproductivo post-apareamiento, se utilizó la descendencia de 32 cruzamientos homo y heteroespecíficos realizados en el laboratorio durante la temporada 2009 (♀ *A. reicherti* x ♂ *A. reicherti*, N = 7; ♀ *A. charrua* x ♂ *A. charrua*, N = 8; ♀ *A. reicherti* x ♂ *A. charrua*, N = 8; ♀ *A. charrua* x ♂ *A. reicherti*, N = 9). Los descendientes de estos cruzamientos fueron criados en el laboratorio, y aproximadamente a los 3 meses de vida se formaron 12 grupos experimentales integrados por un macho y una hembra descendientes de cada una de las 4 categorías de cruzamientos originales (8 individuos en cada grupo). El experimento consistió en cruzamientos sucesivos entre todas las combinaciones posibles dentro de cada uno de los grupos (16 cruzamientos por grupo, estableciendo un total de 192 ensayos reproductivos). Los cruzamientos se realizaron en acuarios (40 x 13 x 15 cm) con un recipiente (10 x 10 x 3 cm) conteniendo sustrato adecuado para el desove y extracción de los huevos (perlas de vidrio de 0.4-0.6 mm). Para estandarizar la condición reproductiva de las hembras, al comienzo del experimento se habilitó el desove con machos no experimentales. Luego, las hembras fueron aisladas y el experimento comenzó a las 56 hs (a partir de un estudio piloto se determinó que dicho intervalo de tiempo es suficiente para la completa recuperación de la masa total de huevos). Cada hembra fue colocada junto a un macho experimental por un período de 16 hs, seguido por un intervalo de reposo de 56 hs antes del segundo período de desove junto a otro macho experimental. Durante los subsecuentes

ensayos, cada hembra fue asignada a un diferente macho dentro del grupo, siguiendo un orden aleatorio predeterminado (ranking de puesta) (Figura 5.2).

a)

Cruzamientos originales	Descendencia	
♀ <i>A. reicherti</i> x ♂ <i>A. reicherti</i>	♂1	♀1
♀ <i>A. charrua</i> x ♂ <i>A. charrua</i>	♂2	♀2
♀ <i>A. reicherti</i> x ♂ <i>A. charrua</i>	♂3	♀3
♀ <i>A. charrua</i> x ♂ <i>A. reicherti</i>	♂4	♀4

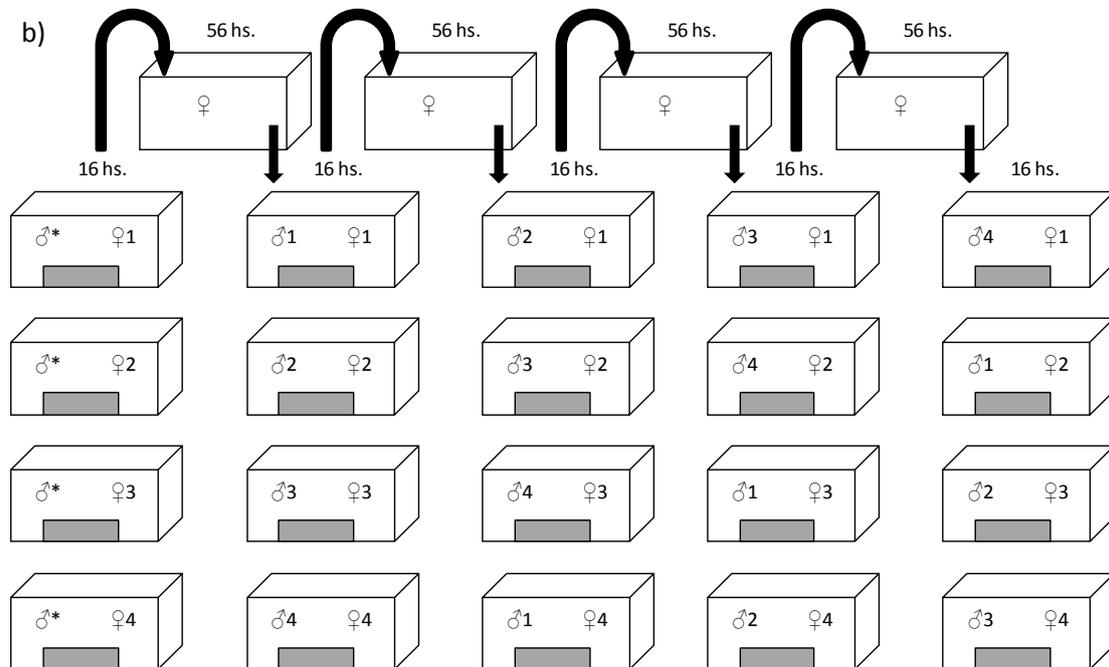


FIGURA 5.2 Esquema de cruzamientos realizados durante las pruebas de aislamiento post-apareamiento: a) se representan los 8 integrantes que conforman cada grupo experimental; b) se representa un ejemplo de cruzamientos sucesivos realizados dentro de un grupo experimental. ♂* simboliza un macho externo al experimento colocado junto a la hembra durante la etapa de estandarización reproductiva (ver texto).

Luego de cada ensayo, el sustrato fue filtrado con una malla tal como se describe más arriba, y se registró el número de huevos obtenidos en cada caso. Los huevos fueron almacenados en cajas de Petri con agua declorinada por 48 horas. Luego, se estimó el éxito de

fertilización para cada ensayo contabilizando el número de huevos en desarrollo. Para ello, todos los huevos fueron individualmente observados bajo microscopio y clasificados como fecundados (anillo perivitelino presente) o no fecundados (sin anillo perivitelino, de coloración blanquecina, a menudo infectados con hongos). Con este criterio no es posible descartar la posibilidad de que algunos huevos registrados como no fecundados hayan sido inicialmente fecundados, pero muertos durante las etapas tempranas del desarrollo. Los huevos fertilizados de cada cruzamiento fueron colocados en recipientes individuales de plástico (10 x 10 x 3 cm) conteniendo turba, y almacenados a temperatura ambiente y en oscuridad. Después de 4 meses, la turba fue humedecida y se contabilizó el número de alevines nacidos a las 48 hs. La tasa de eclosión fue estimada como la proporción de huevos fecundados que eclosionaron con éxito. Luego de las dos primeras semanas de vida, los alevines fueron alojados en grupos de 3 individuos en acuarios de 20 x 9 x 15 cm, y se registró la supervivencia de todos los peces hasta los 95 días de la eclosión.

Para estimar la tasa de crecimiento, descendientes de cruzamientos homoespecíficos (♀ *A. reicherti* x ♂ *A. reicherti*, N = 10; ♀ *A. charrua* x ♂ *A. charrua*, N = 10), heteroespecíficos (♀ *A. reicherti* x ♂ *A. charrua*, N = 10; ♀ *A. charrua* x ♂ *A. reicherti*, N = 10), híbrido x híbrido (N = 20) y de retrocruzamientos (N = 20), fueron mantenidos en acuarios individuales (20 x 9 x 15 cm) y fotografiados a intervalos aproximados de 20 días, hasta los 110 días de vida. A partir de las imágenes digitales se registró el tamaño corporal. Para evitar sesgos relacionados al sexo, en esta instancia fueron considerados solamente los machos.

Variables y análisis estadístico

Durante los ensayos de elección simultánea entre dos estímulos, la preferencia de apareamiento fue estimada como el tiempo de interacción con cada uno de los estímulos en las zonas de elección (Basolo 1990, Kingston *et al.* 2003, Lehtonen & Lindström 2008, Walling *et al.* 2010). El criterio establecido para incluir un ensayo en los análisis se basó en la interacción del individuo focal con ambos estímulos y en la permanencia de más del 20% del tiempo en las zonas de elección. En el caso de las hembras, las conductas de interacción incluyen la orientación hacia los machos estímulo, la natación conjunta, la aceptación al seguimiento y al enterramiento; mientras que en el caso de los machos involucran despliegues laterales, despliegues sigmoides, invitación al seguimiento y al enterramiento, como se detalla en Belote & Costa (2004), y García *et al.* (2008). El grado de motivación o interacción con los estímulos durante las pruebas de elección fue comparado entre los distintos grupos experimentales de hembras y machos con la prueba t. El tiempo de interacción de los

individuos focales con los diferentes estímulos fue evaluado mediante la prueba de Wilcoxon. Para comparar el grado de preferencia homoespecífica entre las especies o entre los individuos de una misma especie provenientes de distintas localidades, se utilizó la prueba de Mann-Whitney. Para evaluar la cantidad de huevos depositados en el sustrato durante los ensayos de desove se utilizó ANOVA con tres factores (macho preferido/macho no preferido, hembras de la zona de contacto/hembras de regiones centrales, y cruzamiento homoespecífico/cruzamiento heteroespecífico). Un macho particular fue considerado preferido si la hembra interactuó con él más del 50% del tiempo total de interacción (Wong 2004).

En cuanto a las pruebas de interacción libre de múltiple elección, la frecuencia de despliegues de cortejo, de interacciones agonísticas y de apareamientos homo y heteroespecíficos, fue comparada dentro y entre los distintos tratamientos mediante la prueba *t* y la prueba de Wilcoxon. Como las poblaciones experimentales fueron formadas con 2 machos de cada especie, para establecer comparaciones de la frecuencia de interacciones agonísticas el número de ataques heteroespecíficos fue dividido a la mitad.

El análisis del aislamiento reproductivo post-apareamiento fue realizado en dos niveles. Primero se establecieron comparaciones entre 4 grupos de cruzamientos: cruzamientos homoespecíficos (N = 24), cruzamientos heteroespecíficos (N = 24), cruzamientos ♀híbrida x ♂híbrido (N = 48) y retrocruzamientos (N = 96). Segundo, se realizaron comparaciones entre los cruzamientos homo y heteroespecíficos, entre las distintas combinaciones de cruzamientos ♀híbrida x ♂híbrido, y entre las distintas combinaciones de retrocruzamiento. Para evaluar la cantidad de huevos depositados se utilizó ANOVA de dos factores (identidad del grupo, y ranking de puesta). La proporción de huevos fecundados y la tasa de eclosión fueron evaluadas mediante ANOVA de un factor (identidad del grupo). El éxito reproductivo final fue estimado como la proporción de huevos que dio lugar a peces adultos que sobrevivieron hasta los 95 días, y fue evaluado mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Por último, la tasa de crecimiento de los machos fue evaluada mediante ANOVA de medidas repetidas.

Todos los datos fueron evaluados para la normalidad usando el test de Kolmogorov-Smirnov. Para satisfacer las asunciones de normalidad durante las comparaciones del número de huevos desovados se utilizó la transformación de la raíz cuadrada. A menos que se indique, los valores reportados son la media \pm error estándar. Todos los análisis estadísticos fueron

realizados con el software SPSS, versión 15.0 para Windows. La significancia estadística fue considerada a $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS

Aislamiento sexual: elección de las hembras entre dos estímulos

De las 80 pruebas de preferencia realizadas, 70 fueron consideradas para el análisis. Las exclusiones se debieron a que las hembras se mantuvieron refugiadas entre las plantas de la zona neutra más del 80% del tiempo ($N = 7$) o que permanecieron asociadas con un solo macho sin visitar el otro sector del acuario ($N = 2$). Además, un ensayo fue excluido porque uno de los machos murió durante el experimento.

Al comparar los grupos de hembras de las distintas especies y localidades, no se evidenciaron diferencias significativas en el tiempo total de interacción con los machos (ANOVA de un factor: $F_{3,66} = 1.889$, $P = 0.140$). En ambas especies, las hembras provenientes de poblaciones cercanas a la zona de contacto interactuaron significativamente más tiempo con el macho homoespecífico (*A. reicherti*: mediana con homoespecífico = 1943 s, mediana con heteroespecífico = 787 s, prueba de Wilcoxon: $Z = -3.148$, $N = 17$, $P = 0.002$; *A. charrua*: mediana con homoespecífico = 1972 s, mediana con heteroespecífico = 742.5, prueba de Wilcoxon: $Z = -2.809$, $N = 18$, $P = 0.005$). Respecto a las hembras provenientes de poblaciones centrales de la distribución, mientras que *A. reicherti* no evidenció diferencias en el tiempo de interacción con los machos homo y heteroespecíficos (mediana con homoespecífico = 1306.5 s, mediana con heteroespecífico = 782.5 s, prueba de Wilcoxon: $Z = -0.980$, $N = 18$, $P = 0.327$), las hembras de *A. charrua*, interactuaron más tiempo con los machos homoespecíficos, aunque la diferencia fue marginalmente significativa (mediana con homoespecífico = 1120 s, mediana con heteroespecífico = 771 s, prueba de Wilcoxon: $Z = -1.870$, $N = 17$, $P = 0.062$). La preferencia de las hembras por machos de su propia especie (tiempo de interacción con el macho homoespecífico - tiempo de interacción con el macho heteroespecífico) fue mayor en las poblaciones cercanas a la zona de contacto que en las poblaciones centrales de la distribución, aunque los valores fueron significativos solamente en *A. reicherti* (prueba de Mann-Whitney: *A. reicherti*: $U = 65.5$, $N1 = 17$, $N2 = 18$, $P = 0.004$; *A. charrua*: $U = 115$, $N1 = 18$, $N2 = 17$, $P = 0.210$; Figura 5.3).

Durante los ensayos de desove, la cantidad de huevos depositados en el sustrato fue mayor cuando las hembras se aparearon con el macho que resultó preferido en la prueba de elección previa (ANOVA factorial: $F_{1,62} = 14.15$, $P < 0.001$; Figura 5.4). Sin embargo no se

detectó efecto del cruzamiento homo o heteroespecífico ($F_{1,62} = 0.267$, $P = 0.607$) ni de la localidad de la hembra ($F_{1,62} = 0.057$, $P = 0.812$), ni de cualquier interacción entre estas variables (todas $P > 0.277$).

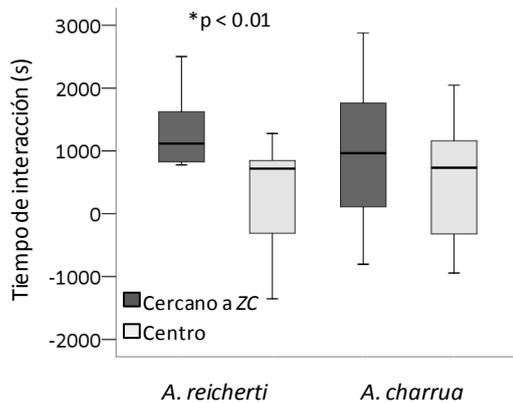


FIGURA 5.3. Preferencia de las hembras de *A. reicherti* y *A. charrua* por machos homoespecíficos (tiempo de interacción con el machos homoespecífico - tiempo de interacción con el machos heteroespecífico) en poblaciones cercanas a la zona de contacto y centrales de la distribución, en un experimento de elección simultánea.

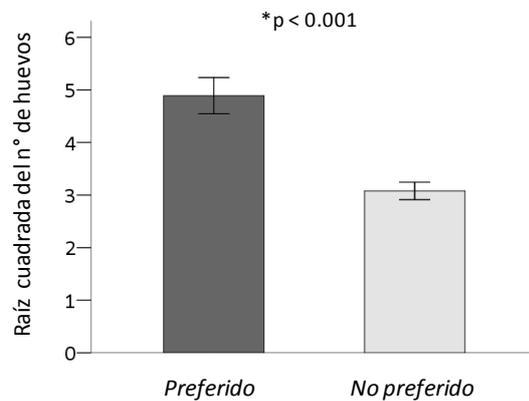


FIGURA 5.4 Cantidad de huevos (raíz cuadrada del número de huevos; media \pm ES) depositados por las hembras en los ensayos reproductivos con machos que resultaron preferidos y no preferidos durante la prueba de elección simultánea previa.

Aislamiento sexual: elección de los machos entre dos estímulos

Al evaluar la elección de los machos entre hembras homo y heteroespecíficas se consideraron todos los ensayos experimentales realizados. El tiempo total de interacción con las hembras no fue significativamente diferente entre los machos de ambas especies (prueba t para muestras independientes: $t_{38} = -1.193$, $N1 = N2 = 20$, $P = 0.240$). El tiempo que los machos interactuaron con hembras homo y heteroespecíficas no mostró diferencias significativas para ninguna de las especies (prueba de Wilcoxon: *A. reicherti*: $Z = -0.896$, $N = 20$, $P = 0.370$; *A. charrua*: $Z = -0.859$, $N = 20$, $P = 0.390$; Figura 5.5). Por otro lado, la preferencia de los machos por hembras de su propia especie (tiempo de interacción con la hembra homoespecífica – tiempo de interacción con la hembra heteroespecífica) no difirió entre los machos de ambas especies (*A. reicherti*: mediana = 417.5 s, *A. charrua*: mediana = 22.5 s; prueba de Mann-Whitney: $U = 192.5$, $N1 = N2 = 20$, $P = 0.839$).

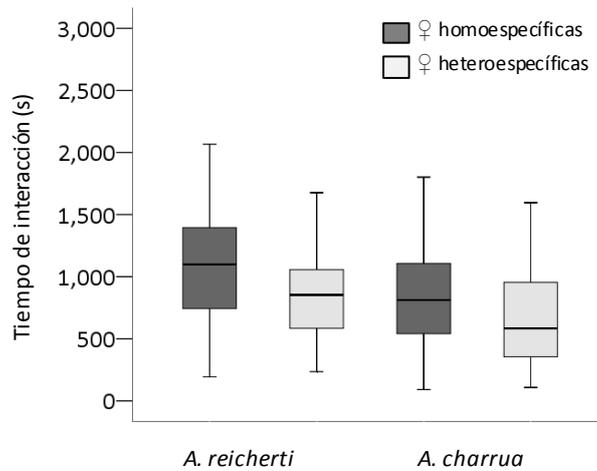


FIGURA 5.6 Tiempo de interacción de machos de *A. reicherti* y *A. charrua*, provenientes poblaciones cercanas a la zona de contacto, con hembras homoespecífica (gris oscuro) y heteroespecíficas (gris claro) en un experimento de elección simultánea.

Aislamiento sexual: interacción libre de múltiple elección

La frecuencia de apareamientos homoespecíficos superó significativamente a la frecuencia de apareamientos heteroespecíficos en las poblaciones experimentales de individuos provenientes de regiones próximas a la zona de contacto (apareamientos homoespecíficos = 20.92 ± 3.01 , apareamientos heteroespecíficos = 13.00 ± 1.96 ; prueba t para muestras relacionadas: $t_{11} = 3.39$, $P = 0.006$), pero no difirió en las poblaciones de individuos provenientes de localidades centrales de la distribución de ambas especies (apareamientos homoespecíficos = 18.58 ± 2.86 , apareamientos heteroespecíficos = 18.17 ± 2.05 ; prueba t para muestras relacionadas: $t_{11} = 0.16$, $P = 0.875$). Además, la diferencia en el número de apareamientos homo y heteroespecíficos fue significativamente mayor en las poblaciones formadas con individuos provenientes de zonas cercanas al área de contacto (prueba t para muestras independientes: $t_{22} = 2.16$, $N1 = N2 = 12$, $P = 0.042$; Figura 5.7). Por otra parte, no se detectaron diferencias en la frecuencia de los apareamientos heteroespecíficos ♂*A. reicherti*-♀*A. charrua* y ♂*A. charrua*-♀*A. reicherti* (prueba t para muestras relacionadas: zona de contacto: $t_{11} = 0.072$, $P = 0.944$; zona central: $t_{11} = 0.642$, $P = 0.534$).

En cuanto a la frecuencia de despliegues de cortejo, los machos cortejaron indistintamente a las hembras homo y heteroespecíficas tanto en las poblaciones de individuos

de regiones cercanas a la zona de contacto (cortejos homoespecíficos = 11.17 ± 1.76 , cortejos heteroespecíficos = 13.33 ± 2.58 ; prueba t para muestras relacionadas: $t_{11} = -1.12$, $P = 0.286$) como de regiones centrales de la distribución de ambas especies (cortejos homoespecíficos = 9.67 ± 1.53 , cortejos heteroespecíficos = 8.17 ± 1.39 ; prueba t para muestras relacionadas: $t_{11} = 0.842$, $P = 0.418$). Además, la diferencia en la frecuencia de cortejos a hembras homo y heteroespecíficas no difirió entre ambos grupos experimentales (prueba t para muestras independientes: $t_{22} = -1.394$, $N1 = N2 = 12$, $P = 0.177$).

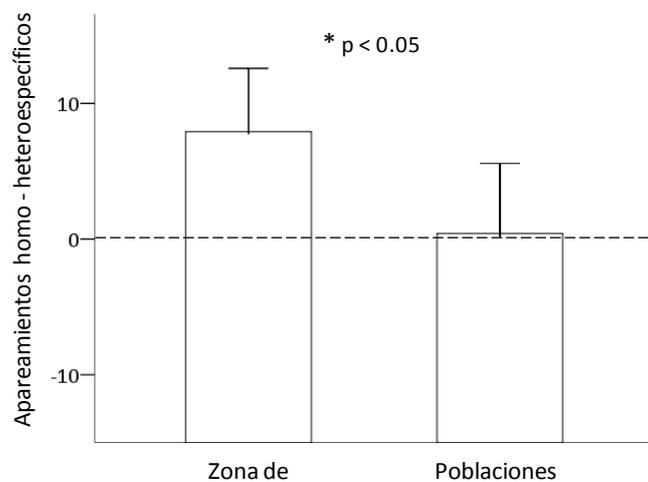


FIGURA 5.7. Diferencia en el número de apareamientos homo y heteroespecíficos en poblaciones experimentales formadas con individuos de *A. reicherti* y *A. charrua* provenientes de regiones cercanas a la zona de contacto y de la zona central de la distribución de ambas especies. Se representa la media \pm ES; la línea punteada marca igual número de apareamientos homo y heteroespecíficos.

Respecto a las interacciones entre los machos, la frecuencia de conductas agresivas homo y heteroespecíficas no mostró diferencias significativas (ataques homoespecíficos = 10.29 ± 1.26 , ataques heteroespecíficos = 8.44 ± 0.74 ; prueba t para muestras relacionadas: $t_{23} = 1.286$, $P = 0.211$), y el comportamiento agresivo de los machos no difirió entre las distintas localidades (frecuencia de ataques homoespecíficos – frecuencia de ataque heteroespecíficos: zona de contacto = 0.63 ± 2.01 , zona central = 3.08 ± 2.09 , prueba t para muestras independientes: $t_{22} = -0.847$, $N1 = N2 = 12$, $P = 0.406$). Tampoco se detectaron diferencias en la frecuencia con que los machos de *A. reicherti* y de *A. charrua* atacaron a machos heteroespecíficos (*A. reicherti* = 9.00 ± 1.28 , *A. charrua* = 7.88 ± 1.66 , prueba t para muestras relacionadas: $t_{23} = -0.439$, $P = 0.665$).

Aislamiento postapareamiento

Los 16 posibles cruzamientos realizados entre individuos de *A. reicherti*, de *A. charrua* y de la F1 híbrida, produjeron descendencia viable. El mayor porcentaje de cruzamientos exitosos (cruzamientos que dieron lugar al menos un descendiente adulto) fue observado en las diadas homoespecíficas (91.7%), seguido por los cruzamientos entre híbridos (72.9%), los cruzamientos heteroespecíficos (70.8%), y los retrocruzamientos (53.1%). Las hembras desovaron en 180 de los 192 ensayos experimentales realizados (93.8%). En promedio, el $9.6 \pm 0.8\%$ de los huevos dieron origen a peces adultos, con valores significativamente más altos en los cruzamientos homoespecíficos que en los retrocruzamientos (prueba Mann-Whitney: $U = 600$, $P = 0.001$) y que en los cruzamientos entre individuos híbridos (prueba Mann-Whitney: $U = 372$, $P = 0.025$) (Figura 5.8a). El número promedio de huevos en cada ensayo fue 20.6 ± 1.2 ($N = 192$), sin que se observaran diferencias significativas entre los grupos de cruzamientos homoespecíficos, heteroespecíficos, ♀híbrida x ♂híbrido, y el grupo de retrocruzamientos (ANOVA: $F_{3,176} = 1.904$, $P = 0.131$; Figura 5.8b), ni diferencias en el ranking de puesta ($F_{3,176} = 0.531$, $P = 0.662$) ni efectos de la interacción entre ambos factores ($F_{9,176} = 0.848$, $P = 0.573$). La tasa promedio de fertilización fue $57.0 \pm 2.3\%$ ($N = 180$), con diferencias significativas entre estos 4 grupos de cruzamientos (ANOVA: $F_{3,176} = 5.406$, $P = 0.001$; Figura 5.8c). Mediante comparaciones *post hoc* (HSD de Tukey) se evidenció mayor tasa de fertilización en el grupo de cruzamientos ♀híbrida x ♂híbrido respecto a los cruzamientos heteroespecíficos y al grupo de retrocruzamientos. En general, el éxito promedio de eclosión fue de $24.9 \pm 1.3\%$ ($N = 163$), y no se evidenciaron diferencias significativas entre los grupos anteriormente mencionados (ANOVA: $F_{3,159} = 1.403$, $P = 0.244$; Figura 5.8d).

La comparación entre las 4 combinaciones posibles de cruzamientos homo y heteroespecíficos, así como la comparación entre las 4 combinaciones posible de cruzamientos ♀híbrida x ♂híbrido, no evidenciaron diferencias significativas para ninguna de las variables analizadas. Sin embargo, las distintas combinaciones de retrocruzamientos mostraron diferencias en el número de huevos y en el éxito de eclosión (Tabla 5.1).

Por otro parte, no se detectaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento corporal entre los machos de *A. reicherti*, de *A. charrua*, y de los híbridos obtenidos al cruzar ambas especies (ANOVA de medidas repetidas: tamaño corporal*edad: $F = 1.031$, $P = 0.158$; Figura 5.9) así como tampoco en el tamaño corporal alcanzado por estos individuos a los 115 días de vida (ANOVA: $F_{3,36} = 0.961$, $P = 0.422$).

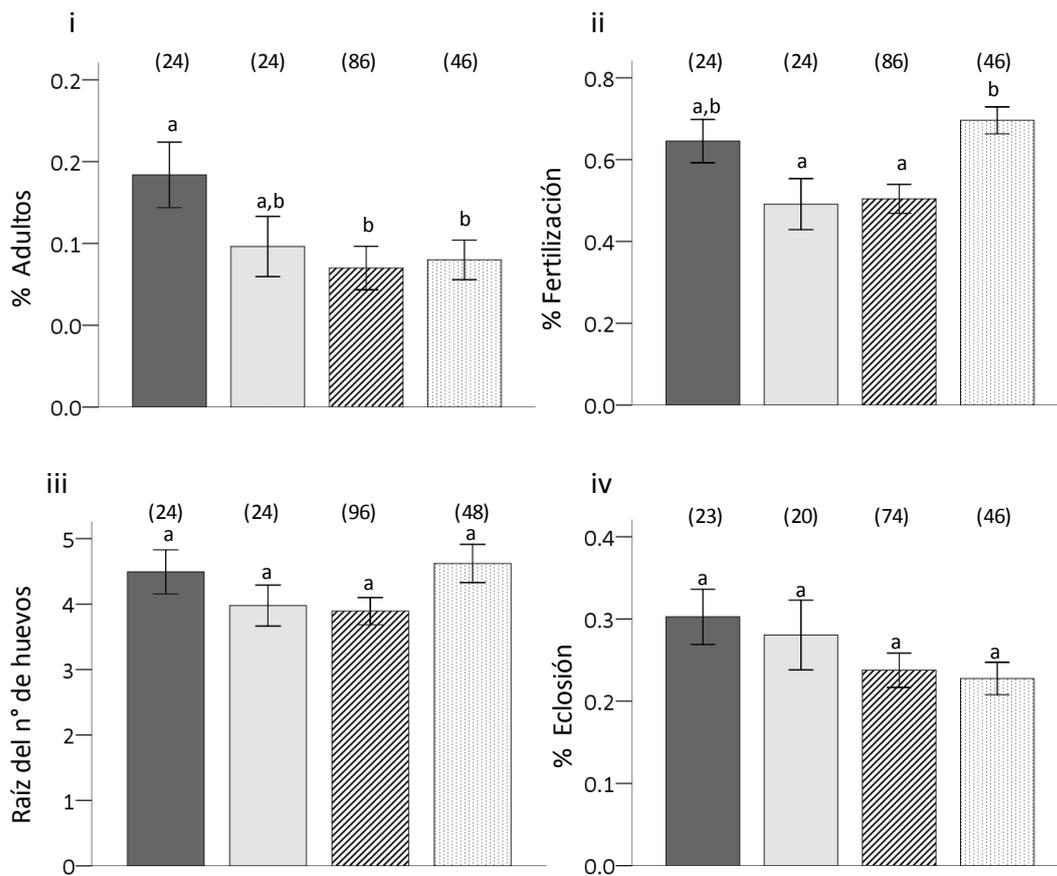


FIGURA 5.8 Resultados de los cruzamientos experimentales, mostrando (i) el porcentaje promedio de huevos que dieron origen a peces adultos, (ii) el número de huevos (transformado por la raíz cuadrada), (iii) la tasa de fertilización, y (iv) el éxito de eclosión en el grupo de cruzamientos homoespecíficos (gris oscuro), heteroespecíficos (gris claro), retorcruzamientos (rayas), y híbridos (puntos). Se representa la media \pm ES (N). Letras distintas significan $p < 0.05$.

Además, la comparación realizada entre los machos descendientes de cruzamientos homoespecíficos (N=20), heteroespecíficos (N=20), ♀híbrida x ♂híbrido (N=20), y de retrocruzamientos (N=20), no evidenció diferencias en la tasa de crecimiento corporal (ANOVA de medidas repetidas: tamaño corporal*edad: $F = 1.732$, $P = 0.098$) ni en el tamaño alcanzado a los 115 días de vida entre las distintas categorías de descendencia (ANOVA: $F_{3,68} = 0.449$, $P = 0.719$).

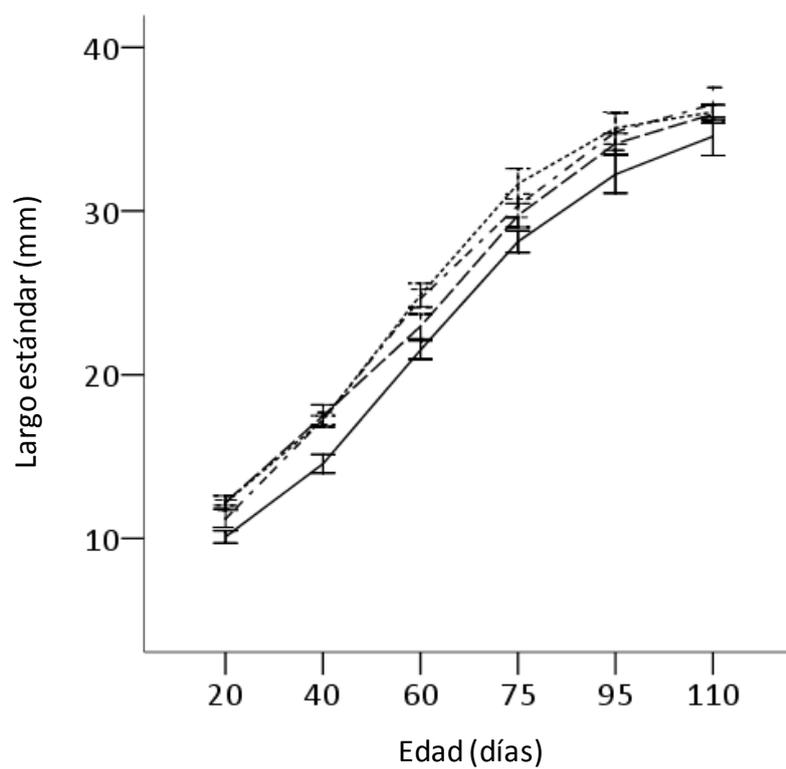


FIGURA 5.9 Crecimiento de machos descendientes de cruzamientos ♀ *A. reichertii* x ♂ *A. reichertii* (línea entera), ♀ *A. charrua* x ♂ *A. charrua* (línea segmentada), ♀ *A. reichertii* x ♂ *A. charrua* (línea punteada) y ♀ *A. charrua* x ♂ *A. reichertii* (línea segmentada y punteada). Se representa la media \pm ES para cada grupo de individuos (N = 10 en todos los casos).

TABLA 5.1 Resultados de los ensayos reproductivos experimentales del grupo de cruzamientos homo y heteroespecíficos (I), del grupo de cruzamientos entre los individuos híbridos (II), y del grupo de retrocruzamientos (III).

Grupo Cruzamiento	♀	♂	Número de huevos (#)				% Fecundación				% Eclosión				% Adultos		
			Media ± ds (n)	Estadístico F	P	Media ± ds (n)	Estadístico F	P	Media ± ds (n)	Estadístico F	P	Media ± ds (n)	Estadístico F	P	Media ± ds (n)	Estadístico H	P
I	1	<i>A. charrua</i>	<i>A. charrua</i>	3.96 ± 1.21 (12)			0.58 ± 0.21 (12)			0.35 ± 0.15 (12)			0.15 ± 0.08 (12)				
	2	<i>A. reicherti</i>	<i>A. reicherti</i>	5.3 ± 1.55 (12)			0.78 ± 0.19 (12)			0.25 ± 0.15 (11)			0.15 ± 0.10 (12)				
	3	<i>A. reicherti</i>	<i>A. charrua</i>	4.87 ± 1.38 (12)			0.67 ± 0.20 (12)			0.26 ± 0.13 (10)			0.12 ± 0.10 (12)				
	4	<i>A. charrua</i>	<i>A. reicherti</i>	3.69 ± 1.19 (12)	2.08	0.117	0.49 ± 0.22 (12)	2.36	0.084	0.31 ± 0.15 (10)	0.83	0.486	0.12 ± 0.08 (12)	3.98	0.263		
II	1	híbrido 1	híbrido 1	4.27 ± 1.44 (12)			0.61 ± 0.27 (11)			0.23 ± 0.12 (11)			0.08 ± 0.10 (11)				
	2	híbrido 2	híbrido 2	4.77 ± 2.10 (12)			0.71 ± 0.25 (12)			0.17 ± 0.12 (12)			0.10 ± 0.07 (12)				
	3	híbrido 1	híbrido 2	4.55 ± 2.13 (12)			0.74 ± 0.21 (12)			0.29 ± 0.17 (12)			0.10 ± 0.09 (12)				
	4	híbrido 2	híbrido 1	5.58 ± 1.72 (12)	0.73	0.541	0.72 ± 0.15 (12)	0.74	0.532	0.22 ± 0.09 (11)	1.56	0.212	0.08 ± 0.07 (12)	0.76	0.859		
III	1	<i>A. charrua</i>	híbrido 1	3.60 ± 1.48 (24) ^{a,b}			0.48 ± 0.18 (20)			0.30 ± 0.21 (16)			0.10 ± 0.11 (24)				
		<i>A. charrua</i>	híbrido 2														
	2	<i>A. reicherti</i>	híbrido 1	5.13 ± 1.07 (24) ^a			0.59 ± 0.32 (23)			0.15 ± 0.13 (20)			0.05 ± 0.06 (24)				
		<i>A. reicherti</i>	híbrido 2														
	3	híbrido 1	<i>A. charrua</i>	4.98 ± 1.98 (24) ^b			0.58 ± 0.29 (23)			0.22 ± 0.15 (20)			0.09 ± 0.12 (24)				
		híbrido 2	<i>A. charrua</i>														
	4	híbrido 1	<i>A. reicherti</i>	4.54 ± 1.72 (24)	4.11	0.009	0.69 ± 0.27 (20)	1.77	0.159	0.30 ± 0.19 (18)	3.14	0.031	0.16 ± 0.18 (24)	5.28	0.152		
		híbrido 2	<i>A. reicherti</i>														

(#) Raíz cuadrada del número de huevos; (a) y (b) diferencias significativas evidenciadas por análisis post hoc (HSD de Tukey)
híbrido 1 = ♀ *A. charrua* x ♂ *A. reicherti*
híbrido 2 = ♀ *A. reicherti* x ♂ *A. charrua*

DISCUSIÓN

Este estudio demuestra la existencia de mecanismos de aislamiento reproductivo pre y post-apareamiento entre *Austrolebias reicherti* y *A. charrua*. El aislamiento preapareamiento se estableció exclusivamente a través de la elección de pareja de las hembras, y fue más pronunciado en áreas de contacto que en áreas alopátridas. Además, se evidenció una disminución en la *performance* reproductiva de los individuos híbridos, dado que la proporción de huevos que dio lugar a peces adultos fue inferior en los cruzamientos ♀ híbrida x ♂ híbrido y en los retrocruzamientos respecto a los cruzamientos homoespecíficos. En conjunto, estos resultados apoyan el modelo de reforzamiento en estas especies de peces anuales.

Aislamiento preapareamiento

Las hembras de áreas cercanas a la zona de contacto interactuaron más con el macho homoespecífico que las hembras de poblaciones alopátridas en un clásico paradigma de elección simultánea. Este tipo de ensayo es una aproximación experimental utilizada ampliamente para investigar el grado de aislamiento reproductivo entre poblaciones divergentes (Kullmann & Klemme 2007, Reichard & Polacik 2010, Rosenthal & Ryan 2011). Durante las experiencias de desove, las hembras pusieron más huevos cuando fueron colocadas junto a los machos que previamente habían resultado preferidos en los ensayos de elección entre dos estímulos. Por lo tanto, el tiempo de interacción con los estímulos en un ensayo de elección simultánea fue un indicador confiable de preferencia de apareamiento y valida la utilización de esta metodología en *Austrolebias*.

Las pruebas de elección dicotómica permiten evaluar la contribución de la elección de pareja al aislamiento reproductivo bajo condiciones que excluyen los efectos de otras posibles barreras precopulatorias. En este sentido, la elección dicotómica permite valorar la mera existencia de preferencias de apareamiento, más allá de su importancia relativa en la naturaleza (Jones *et al.* 2008). Sin embargo, la particular barrera reproductiva en consideración podría estar opacada por interacciones competitivas y la elección en un sistema dicotómico quizá no refleje con exactitud la fuerza de la preferencia de apareamiento en condiciones naturales (Knight *et al.* 1998, Reichard *et al.* 2005). Por lo tanto, las barreras preapareamiento entre *A. reicherti* y *A. charrua* también fueron evaluadas a partir de un diseño experimental que permitió la interacción en una red social, donde la defensa del territorio y los mecanismos

de acceso a las parejas pueden afectar el grado de aislamiento reproductivo. En este caso, los eventos de apareamiento exitoso fueron considerados indicadores de preferencia de las hembras, mientras que la elección de los machos fue valorada mediante la frecuencia de despliegues de cortejo.

Ambas aproximaciones experimentales evidenciaron divergencia en las preferencias de apareamiento de las hembras entre poblaciones cercanas a la zona de contacto y centrales de la distribución. Sin embargo, en el caso de elección entre dos estímulos, el comportamiento de las hembras *A. charrua* no fue significativamente distinto entre las diferentes localidades. Este resultado podría reflejar una diferencia entre las especies respecto a los mecanismos que conducen el aislamiento reproductivo. El incremento en el aislamiento sexual en la zona de contacto podría no haber existido en *A. charrua*, o el flujo de genes intraespecífico podría haber causado la transmisión de alelos para la preferencia homoespecífica a las poblaciones alopátridas (Ortiz-Barrientos *et al.* 2009). Aunque estas opciones no pueden descartarse, probablemente el comportamiento diferencial de las hembras de *A. charrua* de distintas localidades puede no haber sido detectado debido al bajo número de ensayos. En apoyo a esta última alternativa, durante las pruebas de interacción libre el aislamiento sexual fue más pronunciado en áreas de contacto que en áreas alopátridas, y no se encontraron diferencias en la discriminación contra heteroespecíficos entre las hembras de *A. reicherti* y *A. charrua*.

Si bien los resultados reportados en este trabajo son congruentes con el modelo de reforzamiento, existen otros mecanismos que podrían causar un incremento en el reconocimiento específico en las zonas de contacto (para una revisión ver Pfennig & Pfennig 2009, Hoskin & Higgie 2010). Por ejemplo, una explicación alternativa para el desplazamiento de caracteres reproductivos observado, es que las diferencias ecológicas entre poblaciones simpátridas y alopátridas, más que el reforzamiento, sean responsables del cambio en la preferencia de apareamiento de las hembras (Howard 1993). En este sentido, Brazner & Etges (1993) demostraron que la discriminación heteroespecífica puede ser incrementada u obliterada meramente criando animales en diferentes ambientes. Aunque factible, esta alternativa es poco probable en este sistema, dada la inexistencia de grandes diferencias ambientales entre las distintas localidades estudiadas (hasta donde las podemos evaluar).

Dentro de una zona híbrida, algunos individuos son más propensos que otros a aparearse con heteroespecíficos (Rosenthal 2012), y generalmente, la discriminación contra individuos heteroespecíficos es mayor en las hembras (Svensson *et al.* 2007, Kozak *et al.* 2009, Espinedo *et al.* 2010, O'Rourke & Mendelson 2010, Swenton 2011, pero ver Gregorio *et al.*

2012). En este estudio, los machos provenientes de la zona de contacto cortejaron vigorosamente sin discriminar entre hembras homo y heteroespecíficas, y el aislamiento reproductivo preapareamiento ocurrió exclusivamente debido a las preferencias sexuales de las hembras. Además, el hecho de que la frecuencia de apareamientos en los ensayos de interacción libre refleje la elección de las hembras encontrada en las pruebas dicotómicas, sugiere que la preferencia de apareamiento de las hembras es un factor determinante en la ocurrencia de un apareamiento particular.

Recientemente, ha sido reconocido el rol de la competencia entre machos por territorios de cría en el proceso de especiación (van Doorn *et al.* 2004, Mikami *et al.* 2004, Seehausen & Schluter 2004, Dijkstra *et al.* 2005, 2006). Mientras que en las pruebas de elección entre dos estímulos podrían observarse preferencias bidireccionales divergentes entre las poblaciones, en condiciones naturales las preferencias podrían tornarse unidireccionales debido a la exclusión territorial de un morfo sobre el otro. Sin embargo, los experimentos de múltiple elección permitieron valorar las interacciones competitivas entre los machos de ambas especies y no se evidenciaron diferencias significativas en los niveles de agresión intra e interespecífica.

Aislamiento post-copulatorio.

En este trabajo se evidenció una desventaja en la *performance* reproductiva de los híbridos. La proporción de huevos totales que dieron lugar a peces adultos fue significativamente inferior en los cruzamientos que involucraron individuos híbridos (♀híbrida x ♂híbrido y retrocruzamientos) respecto a los cruzamientos homoespecíficos. Sin embargo, no se detectaron diferencias en el número de huevos, en la tasa de fecundación, ni en el éxito de eclosión, sugiriendo que los efectos negativos de la hibridación son causados por acumulación de desventajas desde la puesta de huevos hasta el desarrollo del adulto.

Es de esperar que los cruzamientos heteroespecíficos sean relativamente infértiles y/o que produzcan descendencia de menor viabilidad, y que las incompatibilidades gaméticas o genotípicas se acumulen a través de la deriva genética a medida que las poblaciones divergen (Coyne & Orr 2004). Sin embargo, en este estudio no se revelaron desventajas en los cruzamientos heteroespecíficos. Aunque la disminución en la viabilidad y fertilidad de los cruzamientos entre taxones cercanamente relacionados ha sido observada como resultado de la especiación incipiente (por ejemplo, Macholán *et al.* 2007), muchas veces la desventaja de los cruzamientos heteroespecíficos se evidencia durante la *performance* reproductiva de la

descendencia híbrida, tal como fue observado en este caso, o incluso en generaciones más tardías (Turner *et al.* 2001, Price & Bouvier 2002, Fuller 2008, Russell & Magurran 2006, Vigueira *et al.* 2008). La ocurrencia de mayor tasa de fecundación en los cruzamientos ♀ híbrida x ♂ híbrido respecto a los cruzamientos heteroespecíficos y a los retrocruzamientos resulta difícil de explicar. Este hecho podría responder a un mayor desempeño de las parejas híbridas durante el apareamiento. En este grupo de peces, la fecundación es externa y el apareamiento consiste en una serie de comportamientos sincronizados entre el macho y la hembra que culminan con la deposición de huevos en el sustrato y la fecundación de los mismos (Belote & Costa 2004, García *et al.* 2008). Por lo tanto, las diferencias observadas podrían deberse a que la sincronización en la liberación de gametos se vea afectada solamente en los apareamiento heteroespecíficos y en los retrocruzamientos, a través de un mecanismo de esterilidad comportamental parcial (Russell & Magurran 2006). Experimentos de fertilización *in vitro* y la caracterización detallada del comportamiento de apareamiento de los distintos cruzamientos, son necesarios para dilucidar el mecanismo involucrado en la fecundidad diferencial observada.

La tasa de crecimiento corporal en el laboratorio fue similar entre los distintos grupos de descendientes. Sin embargo, la desventaja híbrida podría expresarse solamente bajo condiciones naturales y en ambientes particulares, y por lo tanto es menos probable detectar efectos en la eficacia de los híbridos en condiciones de cautiverio (Coyne & Orr 2004). La mayoría de la investigación sobre hibridación ha estado enfocada en el aislamiento reproductivo post-copulatorio intrínseco, donde la incompatibilidad genética afecta la eficacia híbrida a través de la reducción de la supervivencia o la fertilidad (para una revisión ver Burke & Arnold 2001). Estudios recientes, sin embargo, enfatizan la importancia del aislamiento post-copulatorio extrínseco, donde la eficacia híbrida es determinada por la interacción entre el genotipo y el ambiente (Schluter 2009, Schluter & Conte 2009, Johannesson *et al.* 2010, Wolf *et al.* 2010). El aislamiento extrínseco podría evolucionar cuando los híbridos presentan fenotipos intermedios no aptos para competir en el hábitat utilizado por sus parentales (Rundle 2002, Forister 2005, McBride & Singer 2010). Un ejemplo clásico de aislamiento post-copulatorio extrínseco se observa en los peces espinosos *Gasterosteus aculeatus* (Hatfield & Schluter 1999, Rundle 2002, Gow *et al.* 2007). En el laboratorio, los híbridos de los morfotipos límnicos y bentónicos de esta especie son fenotípicamente intermedios, viables, fértiles y crecen a la misma tasa que los individuos parentales. Sin embargo, experimentos donde los individuos fueron transportados al ambiente natural revelaron que la F1 híbrida es competitivamente inferior y presenta menor tasa de crecimiento corporal (Hatfield & Schluter

1999). El aislamiento extrínseco también puede manifestarse a través de la selección sexual. Vamosi & Schluter (1999) demostraron que, mientras las hembras de *G. aculeatus* no discriminaron contra híbridos en experimentos realizados en el laboratorio, en condiciones naturales los machos híbridos no lograron acceder a buenos territorios y por lo tanto no fueron seleccionados por las hembras.

Muchos estudios han reportado asimetría en las preferencias de apareamiento en acuerdo con asimetría en la reducción de la fertilidad de la descendencia híbrida (Berdan & Fuller 2012, Yukilevich 2012). En este trabajo sin embargo, no se han detectado diferencias en la *performance* reproductiva de los distintos cruzamientos heteroespecíficos ni asimetría en la discriminación durante las pruebas de elección de pareja. Si bien este experimento de cruzamientos sucesivos no fue diseñado para evaluar aislamiento preapareamiento, el número de huevos depositados en cada cruzamiento puede ser utilizado como indicador de preferencia de apareamiento de las hembras. En este sentido, y en acuerdo con la similitud en las distintas medidas de *performance* reproductiva, no hubo diferencias en el número de huevos entre las distintas combinaciones de cruzamientos ♀híbrida x ♂híbrido. Sin embargo, no todos los retrocruzamientos presentaron la misma cantidad de huevos ni son igualmente exitosos (éxito de eclosión). Futuros estudios son necesarios para evaluar la selección sexual sobre los descendientes de los distintos cruzamientos.

Conclusión

Aunque su influencia en la evolución intrapoblacional ha sido largamente reconocida, la selección sexual ha sido recientemente invocada como una fuerza conductora de la especiación (Panhuis *et al.* 2001, Ritchie *et al.* 2007, Kraaijeveld *et al.* 2011). Por ejemplo, se ha sugerido a la selección sexual como el principal mecanismo generador de la enorme diversidad existente de cíclidos encontrados en los grandes lagos del este africano (Seehausen *et al.* 1997, Knight & Turner 2004). La especiación por selección sexual ocurre cuando un cambio paralelo en las preferencias y caracteres sexuales dentro de una población conduce al aislamiento precigótico entre poblaciones y cuando esto es la causa primaria del aislamiento reproductivo (Panhuis *et al.* 2001). A pesar de la existencia de varios modelos teóricos (Lande 1981, West-Eberhard 1983, Turner & Burrows 1995, van Doorn *et al.* 1998, Lande *et al.* 2001), los estudios empíricos sobre el papel de la selección sexual en la especiación son todavía relativamente recientes (Panhuis *et al.* 2001). Por otra parte, el modelo clásico de especiación y reforzamiento (Mayr 1963) sugieren que el aislamiento sexual tiene un rol secundario en el

proceso de especiación, el cual evoluciona luego de la divergencia gradual de los linajes en alopatría.

En este trabajo se evidenció una disminución en la eficacia reproductiva de los híbridos de *A. reicherti* y *A. charrua*, y se sugiere desplazamiento de caracteres reproductivos por divergencia en la preferencias de apareamiento de las hembras. Por lo tanto, la naturaleza del aislamiento reproductivo entre estas especies es congruente con el modelo de reforzamiento. Existe una variedad de ejemplos de reforzamiento operando en la naturaleza (Noor 1995, Coyne & Orr 1997, Sætre *et al.* 1997, Rundle & Schluter 1998, Nosil *et al.* 2003, Pfennig 2003, Haavie *et al.* 2004, Hoskin *et al.* 2005, Silvertown *et al.* 2005, Jaenike *et al.* 2006, Kronforst *et al.* 2007, Nosil *et al.* 2007, Urbanelli & Porretta 2008, Lemmon 2009, Gregorio *et al.* 2012), y este mecanismo parece haber contribuido al origen de diversos linajes de mariposas, peces, moscas de la fruta, aves, anfibios y plantas con flor (Noor 1997, Lukhtanov *et al.* 2005, Kay & Schemske 2008, Ortiz-Barrientos *et al.* 2009). Además, el reforzamiento ha sido también un tópico en estudios teóricos de biología evolutiva (Servedio & Noor 2003, Coyne & Orr 2004, Telshcow *et al.* 2005, Lemmon & Kirkpatrick 2006, Hall & Kirkpatrick 2006, Yukelivich & True 2006).

Los resultados del presente trabajo son congruentes con el escenario de diferenciación entre *A. charrua* y *A. reicherti* sugerido por García *et al.* (2009), que consiste en la fragmentación alopátrica durante transgresiones marinas, la divergencia y posterior expansión de la distribución involucrando un contacto secundario. Estudios morfológicos sugieren la ocurrencia de hibridación en la zona de contacto (capítulo 4), mientras que análisis genéticos con secuencias mitocondriales no han detectado flujo genético entre las especies (García *et al.* 2009). Este hecho podría deberse a diversas causas no excluyentes: (1) la zona híbrida es de carácter actual; (2) selección intrínseca (y posiblemente extrínseca) contra los individuos híbridos; (3) aislamiento sexual entre las especies; (4) diferencias en la eficacia de los distintos cruzamientos híbridos pueden causar un flujo unisexual y prevenir la transmisión mitocondrial entre las especies (aunque en este estudio no se evidenciaron diferencias en la *performance* reproductiva de las distintas combinaciones híbridas, tal vez las haya en condiciones naturales).

El reforzamiento es un proceso que requiere contacto secundario de poblaciones que hayan divergido previamente en alopatría. Dado que las especies hermanas de *Austrolebias* generalmente ocupan áreas adyacentes alopátricas (Loureiro 2004), ¿es razonable pensar que el reforzamiento tuvo un rol importante en la diversificación del género? La visión general de

que la distribución de estos peces es alopátrida podría ser engañosa ya que el contacto secundario entre las diferentes especies potencialmente es más frecuente que lo observado en el momento actual. Específicamente, el sistema Los Patos-Merín, donde se encuentra la mayor diversidad de especies del género, es una región que ha estado sujeta a frecuentes cambios debido a transgresiones y regresiones marinas que han ocurrido al menos desde el Mioceno (Sprechmann 1978). No es difícil imaginar por lo tanto, que la frecuencia de eventos de contacto secundario haya sido relativamente alta como para que el reforzamiento sea un mecanismo importante en el proceso de especiación de este grupo de peces.

Conclusiones generales y perspectivas

En la presente tesis fueron abordadas diferentes áreas de investigación actual en el marco de la selección sexual desde una perspectiva experimental en un modelo biológico novedoso. El marcado dimorfismo sexual en el tamaño corporal, la pigmentación del cuerpo y el comportamiento, la particular historia de vida, la variabilidad espacio-temporal del hábitat en diversos ejes ambientales, junto con al escenario de especiación simultánea y múltiple en las especies del complejo “*A. adloffii*”, convierten a este grupo de peces en un modelo interesante para el estudio de la selección sexual. Además, la existencia de un protocolo de cría y mantenimiento (Berois *et al.* 2012), el pequeño tamaño y la facilidad de experimentación, hacen de este sistema un candidato prometedor para el estudio empírico de la ecología del comportamiento.

A lo largo de la tesis, la elección de pareja fue evaluada principalmente mediante pruebas de preferencia de asociación. Esta metodología frecuentemente empleada en estudios de selección sexual se basa en la concepción de que la tendencia de una hembra a asociarse con un macho determinado se corresponde con su intención de apareamiento. El tiempo en proximidad, el número de visitas, o el tiempo de interacción con cada estímulo en este tipo de ensayo, son medidas comúnmente utilizadas para evaluar la preferencia de apareamiento en peces (Basolo 1990, Kingston *et al.* 2003, Lehtonen & Lindström 2008, Walling *et al.* 2010). Sin embargo, la utilización de esta metodología pocas veces ha sido validada (pero ver Goncalves & Oliveira 2003, Wong 2004, Reichard & Polacik 2010), y en muchos casos se ha demostrado que la asociación con un estímulo no es necesariamente un indicador real de preferencia de apareamiento (Gabor 1999, Egger *et al.* 2008). Una crítica frecuente se funda en que los patrones de asociación pueden producirse por una variedad de razones independientes de las intenciones reproductivas, como por ejemplo la conducta de cardumen o la evasión de predación (Gabor 1999, Östlund-Nilsson & Nilsson 2000). A lo largo de esta tesis, múltiples evidencias demuestran que el tiempo de interacción con los estímulos en un ensayo de elección simultánea es un indicador confiable de preferencia de apareamiento en *Austrolebias*. Primero, el porcentaje de tiempo que las hembras permanecieron orientadas e interactuando con los machos y el tiempo invertido de los machos en despliegues de cortejo durante las pruebas de elección, refleja la motivación reproductiva de los peces (capítulo 1). Segundo, la consistencia en la elección de las hembras a lo largo de distintos ensayos avala la existencia de preferencia por un estímulo (capítulo 1). Tercero, la preferencia de asociación de las hembras cuando los machos fueron confinados detrás de divisores transparentes se correspondió con las decisiones reales cuando se les dio la oportunidad de apareamiento (capítulo 5). Por último, la relación observada entre la

preferencia de asociación y la cantidad de huevos puestos durante los ensayos de desove (capítulo 5) valida la utilización de la metodología en este grupo de peces.

Dado que diversos caracteres están involucrados en las decisiones de apareamiento de las hembras así como en el resultado de las contiendas entre los machos, la elección de las hembras y la competencia de los machos pueden actuar en concierto para intensificar la selección sexual sobre los caracteres del macho, o en oposición para debilitarla. En el capítulo 1 se evaluó el efecto del tamaño corporal de los machos de *A. charrua* en la selección intra e intersexual, y la interacción entre ambas fuerzas. Los machos de mayor tamaño fueron preferidos por las hembras y socialmente dominantes durante las interacciones agresivas. Estos resultados evidencian que ambas componentes de la selección sexual actúan en concierto respecto al tamaño corporal de los machos. Además las hembras fueron consistentes en su elección independientemente de si observaron o no la contienda entre los machos, sugiriendo que la competencia no afecta la preferencia de las hembras. Sin embargo, dada la dificultad de distinguir entre estos dos rasgos altamente correlacionados (el tamaño corporal y la dominancia), no es posible descartar que la percepción del estatus social del macho incida en la elección de la hembra. Una perspectiva a futuro por lo tanto, es la realización de estudios adicionales que permitan discernir entre el efecto del tamaño corporal y de la jerarquía social. Una posible aproximación sería modificar la percepción de las hembras, haciendo que el macho de menor tamaño sea percibido como dominante y el de mayor tamaño como subordinado. Esto podría lograrse a través del efecto de la experiencia social previa sobre la conducta agonística, donde los individuos modifican su comportamiento en base al resultado de sus contiendas anteriores. Existe evidencia de que los individuos que resultan ganadores en una pelea aumentan sus chances de ganar en el futuro (efecto ganador), mientras que, los individuos perdedores disminuyen sus probabilidades de vencer en otras contiendas (efecto perdedor) (Hsu *et al.* 2006). Por lo tanto, la realización de ensayos agonísticos previos podría invertir el resultado de la interacción entre los pretendientes de la hembra, haciendo que el macho de menor tamaño resulte dominante.

En el capítulo 2 se evaluó la multimodalidad de las señales durante el comportamiento reproductivo de *A. reicherti*. Los despliegues de cortejo y la pigmentación de los machos indican que las señales visuales juegan un rol importante en la elección de pareja. Sin embargo, la elevada turbidez que caracteriza a los charcos donde habitan estos peces dificulta el contacto visual, y por tanto otras modalidades sensoriales podrían también estar involucradas en el comportamiento reproductivo. En este estudio se demostró que los machos

liberan señales químicas durante el cortejo que provocan cambios comportamentales en las hembras. Además, se sugiere que las señales podrían estar constituidas por compuestos orgánicos de polaridad media, tales como esteroides, prostaglandinas y ácidos biliares. Análisis químicos adicionales se requieren para dilucidar la naturaleza química de las señales. La elección de pareja depende de la evaluación e integración de múltiples señales producidas por las parejas potenciales, y el canal químico podría ser particularmente importante en los charcos de elevada turbidez que habitan estos peces. Por lo tanto, el potencial de la comunicación química en este grupo de peces demanda futuros análisis. Por otra parte, el hábitat extremadamente frágil de los charcos en combinación con los recientes resultados sobre proliferación neural en regiones del cerebro involucradas con la visión y el olfato (Fernández *et al.* 2011), hacen de *Austrolebias* un modelo interesante y novedoso para explorar el efecto de los cambios ambientales en el uso de diferentes modalidades sensoriales.

Generalmente, las preferencias de apareamiento han sido consideradas como caracteres estáticos y sin variación. Sin embargo, la intensidad de la selección sexual puede variar en el tiempo y/o espacio si cambian las condiciones ambientales, demográficas o las propiedades intrínsecas de los individuos (Jennions & Petrie 1997, Qvarnström 2001). Los charcos temporales constituyen un ambiente susceptible a sufrir grandes variaciones estacionales en diversos factores ecológicos que se acompañan de cambios demográficos. Por lo tanto, los costos y beneficios de ejercer elección de pareja podrían variar a medida que avanza la estación y la consecuente senescencia de los individuos. Este contexto ofrece una excelente oportunidad para investigar el patrón temporal de selección sexual. En el capítulo 3 se evidenció variación en la proporción sexual y en las preferencias de las hembras a lo largo de la estación reproductiva. La proporción de machos en las poblaciones naturales disminuyó hacia el final de la temporada. A comienzos de la estación las hembras prefirieron machos de mayor tamaño en pruebas de elección simultánea, sin embargo, al final de la misma, no fueron evidentes preferencias asociadas al tamaño corporal de los machos. Por lo tanto, los resultados de este estudio sugieren que cuando se evalúan las preferencias de apareamiento, deben ser considerados el contexto ambiental y el momento de la estación. Si la elección de las hembras es estimada ignorando estas variables, existen riesgos de realizar una interpretación errónea de los resultados. Este trabajo evaluó si las decisiones comportamentales de las hembras son afectadas por la experiencia previa de disponibilidad de parejas en el campo. Sin embargo, muchos otros factores podrían estar afectando la intensidad de selección sexual a lo largo de la temporada, como por ejemplo la disponibilidad de territorio, la concentración de oxígeno, la temperatura, la densidad poblacional. Por otra

parte, los cambios en el comportamiento reproductivo podrían responder a factores intrínsecos de las hembras. Para identificar otras posibles causas de la plasticidad encontrada en la elección de pareja así como para inferir posibles consecuencias evolutivas a nivel poblacional, es necesario realizar experiencias adicionales, tanto en la naturaleza como en condiciones controladas. Actualmente se está llevando a cabo una investigación en *A. charrua* que pretende dilucidar el efecto de la temperatura y de la senescencia sobre la elección de las hembras, mediante la evaluación de la preferencia de apareamiento en distintos momentos de la estación reproductiva en poblaciones seminaturales mantenidas bajo dos regímenes de temperatura: temperatura ambiente y temperatura constante (19°C).

El rol de la selección sexual en el proceso de especiación es fuente de controversia en biología evolutiva (Panhuis *et al.* 2001, Ritchie 2007). La selección sexual tiene un alto potencial para la formación de nuevas especies porque afecta directamente caracteres que influyen en el éxito reproductivo y el reconocimiento entre sexos (Sampson 1999). La teoría proporciona una variedad de mecanismos mediante los cuales la selección sexual puede provocar o facilitar la especiación (revisado en Servedio *et al.* 2011), aunque también proporciona fundamentos sólidos sobre la dificultad de que la selección sexual sea la fuerza conductora del proceso de especiación (revisado en Ritchie 2007). Por otro lado, existen pocos estudios empíricos que respalden los modelos (Boughman 2001, Seehausen *et al.* 2008, revisado en Mann & Seehausen 2011) y no es posible evaluar la frecuencia con que la especiación por selección sexual ocurre realmente en la naturaleza. La identificación de la contribución relativa de las distintas barreras reproductivas en especies que hayan derivado recientemente, proporciona una ventana en el proceso de especiación a través de la cual pueden hacerse evidentes pautas generales (Mendelson *et al.* 2007). En este sentido, estudios en las zonas de contacto de especies de divergencia reciente son de especial interés para contribuir a la comprensión general de los procesos que mantienen la diferenciación genética y morfológica (Jones *et al.* 2006, McMillan *et al.* 1997, Bailey *et al.* 2004, Cruz *et al.* 2004, Patten *et al.* 2004). En esta tesis se evaluó el rol de la selección sexual en la especiación poniendo a prueba los modelos de reforzamiento y de especiación por selección sexual en las especies hermanas *A. reicherti* y *A. charrua*.

Los resultados del capítulo 4 demostraron que ambas especies hibridan en condiciones de cautividad y sugieren la existencia de una zona híbrida localizada en la parte inferior de la cuenca del Río Cebollatí. Si bien la comparación de la morfología y pigmentación del cuerpo entre los híbridos nacidos en cautiverio y los individuos localizados en la zona de contacto

sustenta fuertemente la ocurrencia de hibridación en la naturaleza, estudios genéticos son necesarios para confirmar este hallazgo. Por otra parte, los patrones de variación intraespecíficos sugieren que las presiones selectivas a las que está sometida la morfología difieren de las ejercidas sobre la pigmentación de los machos. Las diferencias morfológicas entre las poblaciones fueron mayores a medida que aumentó la distancia, por lo que la variación morfológica se ajusta a un patrón de diferenciación neutral. Sin embargo, respecto a la pigmentación del cuerpo de los machos, la mayor diferencia fue encontrada entre las poblaciones de *A. charrua* y de *A. reicherti* cercanas a la zona de contacto. Dado que la diferencia más notoria entre los machos de ambas especies es el patrón de pigmentación, este hecho sugiere desplazamiento de caracteres reproductivos: el patrón de mayor divergencia de un carácter de reconocimiento específico en áreas de contacto entre especies cercanamente relacionadas que en áreas alopátridas (Howard 1993). Sin embargo, resta por evaluar si las hembras prefieren los caracteres extremos de pigmentación y si la divergencia en el patrón de bandas es conducida por la elección de las hembras.

En el capítulo 5 se evidenció la existencia de mecanismos de aislamiento reproductivo entre las especies. El aislamiento sexual fue más pronunciado en áreas de contacto que en áreas alopátridas. Además, se evidenció una disminución en la *performance* reproductiva de los individuos híbridos. Estos resultados son consistentes con el mecanismo de reforzamiento y por lo tanto sugieren que la divergencia entre las especies no fue conducida directamente por la selección sexual. En los últimos años se ha acumulado evidencia empírica de reforzamiento en una variedad de taxones (por ejemplo, Coyne & Orr 1997, Rundle & Schluter 1998, Nosil *et al.* 2003, Pfennig 2003, Lemmon 2009). El reforzamiento ha sido también un tópico en estudios teóricos (por ejemplo, Servedio & Noor 2003, Coyne & Orr 2004). Experimentos adicionales son necesarios para dilucidar los mecanismos próximos que originan las preferencias observadas. Aunque las diferencias en la pigmentación de los machos de ambas especies sugieren que la visión juega un rol importante en la elección de pareja, probablemente otros caracteres estén también involucrados en el reconocimiento de pareja. Entonces, las diferencias fenotípicas entre las dos especies podrían ser más pronunciadas de lo que sugiere la coloración. En este sentido, durante el reforzamiento y el proceso de desplazamiento de caracteres reproductivos, las señales químicas probablemente sean importantes dada su elevada tasa de mutación y el alto potencial evolutivo (Wyatt 2003, Rafferty & Boughman 2006). Por lo tanto, es de principal interés la elaboración de un diseño experimental que permita valorar la importancia relativa de las distintas modalidades sensoriales en el aislamiento precopulatorio. Por otra parte, en este estudio la investigación ha estado enfocada

en el aislamiento reproductivo post-apareamiento intrínseco. Para una comprensión más certera del aislamiento post-apareamiento son necesarios estudios de campo que permitan la valoración de la eficacia híbrida en la naturaleza así como el efecto de la elección de pareja en los individuos híbridos (Schluter & Conte 2009, Johannesson *et al.* 2010, Wolf *et al.* 2010).

Los peces anuales del género *Austrolebias* constituyen un modelo biológico en el campo de la biología del desarrollo (por ejemplo, Berois *et al.* 2011, Arezo 2012) y han sido objeto de estudio en el área de la filogeografía (por ejemplo, García 2006, Costa 2010, García *et al.* 2012), de la sistemática (por ejemplo, Loureiro 2004), de la etología (por ejemplo, Belote & Costa 2002, García *et al.* 2008), de la neurobiología (por ejemplo, Fernández *et al.* 2011), y de la ecología (Arim *et al.* 2010). Los resultados de esta tesis ponen de manifiesto la importancia de consolidar a estos peces anuales como modelo para el estudio de la selección sexual.

Por último, en asociación con el particular ciclo de vida, el hábitat de *Austrolebias* es un ambiente frágil y muy fragmentado. Como resultado de esto existe una alta diversidad de especies y se han encontrado varios endemismos dentro del género. Las especies del complejo "*A. adloffii*" se distribuyen en las tierras bajas asociadas al sistema Laguna Patos-Merín, incluyendo a los Bañados de Este, zona declarada Sitio de Reserva de la Biosfera y Sitio Ramsar (Probides 1999), identificado a su vez como *hot spot* de especiación (García *et al.* 2000). Por lo tanto, el conocimiento sobre la biología y los procesos que afectan la generación y el mantenimiento de la diversidad de peces anuales, son fundamentales para el establecimiento de planes de conservación y manejo.

CONTRIBUCIONES

Esta tesis propone y consolida a los peces anuales del género *Austrolebias* como modelo novedoso para el estudio de la selección sexual. Los conocimientos generados dieron origen a un artículo publicado, a un artículo aceptado para su publicación y a tres manuscritos en vías de ser sometidos a revisión.

Passos C., B. Tassino, M. Loureiro & G. G. Rosenthal 2013. Intra- and intersexual selection on male body size in the annual killifish *Austrolebias charrua*. *Behavioural Processes* 96: 20-26.

Passos C., F. Reyes, B. Tassino, G. G. Rosenthal & A. González. Female annual killifish *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) attend to male chemical cues. *Ethology*: aceptado para su publicación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott R. J., M. J. Hegarty, S. J. Hiscock & A. C. Brennan 2010. Homoploid hybrid speciation in action. *Taxon* 59: 1375-1386.
- Abbott R., D. Albach, S. Ansell, J. W. Arntzen, S. J. E. Baird *et al.* 2013. Hybridization and speciation. *J. Evol. Biol.* 26: 229-246.
- Aeschlimann P. B., M. A. Häberli, T. B. H. Reusch, T. Boehm & M. Milinski 2003. Female sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* use self-reference to optimize MHC allele number during mate selection. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 54: 119-126.
- Almeida O. G., A. Miranda, P. C. Hubbard, P. Frade, E. N. Barata *et al.* 2005. Urine as a social signal in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Chem. Senses* 30: i309-i310.
- Amundsen T. & E. Forsgren 2003. Male preference for colourful females affected by male size in a marine fish. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 54: 55-64.
- Andersson M. 1994. Sexual Selection. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Andersson M. & L. W. Simmons 2006. Sexual selection and mate choice. *Trends Ecol. Evol.* 21: 296-302.
- Arezo 2012. Análisis de los mecanismos de determinación y diferenciación del sexo en *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Disertación de Tesis de doctorado, PEDECIBA, Facultad de Ciencias, UDELAR, Uruguay.
- Arim M., S. R. Abades, G. Laufer, M. Loureiro & P. A. Marquet 2010. Food web structure and body size: trophic position and resource acquisition. *Oikos* 119: 147-153.
- Arnold M. L. 1997. Natural Hybridization and Evolution. Oxford University Press, Oxford.
- Arnold M. L. & N. H. Martin 2010. Hybrid fitness across time and habitats. *Trends Ecol. Evol.* 25: 530-536.
- Arnott G. & R. Elwood 2009. Assessment of fighting ability in animal contests. *Anim. Behav.* 77: 991-1004.
- Arnqvist G. & L. Rowe 2005. Sexual Conflict. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Arnqvist G., M. Edvardsson, U. Friberg & T. Nilsson 2000. Sexual conflict promotes speciation in insects. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10460-10464.
- Backwell P. R. Y. & N. I. Passmore 1996. Time constraints and multiple choice criteria in the sampling behaviour and mate choice of the fiddler crab, *Uca annulipes*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 38: 407-416.
- Bailey R. I., C. D. Thomas & R. K. Butlin 2004. Premating barriers to gene exchange and their implications for the structure of a mosaic hybrid zone between *Chorthippus brunneus* and *C. jacobsi* (Orthoptera: Acrididae). *J. Evol. Biol.* 17: 108-119.
- Balshine-Earn S. 1996. Reproductive rates, operational sex ratios and mate choice in St. Peter's fish. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 39: 107-116.
- Barata E. N., P. C. Hubbard, O. G. Almeida, A. Miranda & A. V. M. Canário 2007. Male urine signals social rank in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*, Peters 1852). *BMC Biol.* 5: 54.
- Barton N. H. 2001. The role of hybridization in evolution. *Mol. Ecol.* 10: 551-568.

- Basolo A. L. 1990. Female preference predates the evolution of the sword in swordtail fish. *Science* 250: 808-810.
- Bateman A. J. 1948. Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity* 2: 349-368.
- Beaugrand J. P., D. Payette & C. Goulet 1996. Conflict outcome in male green swordtail fish dyads (*Xiphophorus helleri*): interaction of body size, prior dominance/subordination experience, and prior residency. *Behaviour* 133: 303-319.
- Bell M. A. & M. P. Travis 2005. Hybridization, transgressive segregation, genetic covariation, and adaptive radiation. *Trends Ecol. Evol.* 20: 358-361.
- Belote D. F. & W. J. E. M. Costa 2002. Reproductive behavior patterns in the neotropical annual fish genus *Simpsonichthys* Carvalho, 1959 (Cyprinodontiformes, Rivulidae): description and phylogenetic implications. *Bol. Mus. Nac. (Rio de J.)* 489: 1-10.
- Belote D. F. & W. J. E. M. Costa 2003. Reproductive behavior of the Brazilian annual fish *Cynolebias albipunctatus* Costa & Brasil, 1991 (Teleostei, Cyprinodontiformes, Rivulidae): a new report of sound production in fishes. *Arq. Mus. Nac. (Rio de J.)* 61: 241-244.
- Belote D. F. & W. J. E. M. Costa 2004. Reproductive behavior patterns in three species of the South American annual fish genus *Austrolebias* Costa, 1998 (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Bol. Mus. Nac. (Rio de J.)* 514: 1-7.
- Benson K. & A. L. Basolo 2006. Male–male competition and the sword in male swordtails, *Xiphophorus helleri*. *Anim. Behav.* 71: 129-137.
- Berdan E. L. & R. C. Fuller 2012. A test for environmental effects on behavioral isolation in two species of killifish. *Evolution* 66: 3224-3237.
- Berglund A. 1993. Risky sex: male pipefishes mate at random in the presence of a predator. *Anim. Behav.* 46: 169-175.
- Berglund A. 1994. The operational sex ratio influences choosiness in a pipefish. *Behav. Ecol.* 5: 254-258.
- Berglund A. & G. Rosenqvist 2001. Male pipefish prefer dominant over attractive females. *Behav. Ecol.* 12: 402-406.
- Berglund A., A. Bisazza & A. Pilastro 1996. Armaments and ornaments: an evolutionary explanation of traits of dual utility. *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 58: 385-399.
- Bergstrom C. T. & L. A. Real 2000. Towards a theory of mutual mate choice: lessons from two-sided matching. *Evol. Ecol. Res.* 2: 493-508.
- Berois N., M. J. Arezo, N. G. Papa & G. A. Clivio 2012. Annual fish: development adaptations for an extreme environment. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 1: 595-602.
- Boake C. 2000. Flying apart: mating behavior and speciation. *BioScience* 50: 501-508.
- Bookstein F. L. 1991. *Morphometric Tools for Landmark Data*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Borg Å. A., E. Forsgren & T. Amundsen 2006. Seasonal change in female choice for male size in the two-spotted goby. *Anim. Behav.* 72: 763-771.
- Bougham J. W. 2001. Divergent sexual selection enhances reproductive isolation in sticklebacks. *Nature* 411: 944-947.
- Brazner J. C. & W. J. Etges 1993. Premating isolation is determined by larval substrates in cactophilic *Drosophila mojavensis*. II. Effects of larval substrates on time to copulation, mate choice, and mating propensity. *Evol. Ecol.* 7: 605-624.

- Briffa M. & L. U. Sneddon 2010. Contest behaviour. En: *Evolutionary Behavioral Ecology* (Westneat D. E. & C. W. Fox, Eds.). Oxford University Press, Oxford.
- Burke J. M. & M. L. Arnold 2001. Genetics and the fitness of hybrids. *Annu. Rev. Genet.* 35: 31-52.
- Burley N. T. & V. S. Foster 2006. Variation in female choice of mates: condition influences selectivity. *Anim. Behav.* 72: 713-719.
- Butlin R. & M. Ritchie 1994. Behaviour and speciation. En: *Behaviour and Evolution* (Slater P. J. & T. R. Halliday, Eds.). Cambridge University Press, Cambridge.
- Candolin U. 1997. Predation risk affects courtship and attractiveness of competing threespine stickleback males. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 41: 81-87.
- Candolin U. 1999. Male–male competition facilitates female choice in sticklebacks. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 266: 785-789.
- Candolin U. 2000. Male-male competition ensures honest signaling of male parental ability in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 49: 57-61.
- Candolin U. 2003. The use of multiple cues in mate choice. *Biol. Rev.* 78: 575-595.
- Candolin U. 2004. Opposing selection on a sexually dimorphic trait through female choice and male competition in a water boatman. *Evolution* 58: 1861-1864.
- Cardozo V. 1999. Tasa Metabólica y excreción del nitrógeno en peces anuales *Cynolebias viarius* (Cyprinodontiformes). Disertación de Tesis de maestría, PEDECIBA, Facultad de Ciencias, UDELAR, Uruguay.
- Chaine A. S. & B. E. Lyon 2008. Adaptive plasticity in female mate choice dampens sexual selection on male ornaments in the lark bunting. *Science* 319: 459-462.
- Chapman B. B., L. J. Morrell, C. R. Tosh & J. Krause 2010. Behavioural consequences of sensory plasticity in guppies. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 277: 1395-1401.
- Crapon de Caprona M. D. & M. J. Ryan 1990. Conspecific mate recognition in swordtails, *Xiphophorus nigrensis* and *X. pygmaeus*: olfactory and visual cues. *Anim. Behav.* 39: 290-296.
- Cockburn A., H. L. Osmond & M. C. Double 2008. Swingin' in the rain: condition dependence and sexual selection in a capricious world. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 275: 605-612.
- Collins S. A. & S. T. Luddem 2002. Degree of male ornamentation affects female preference for conspecific versus heterospecific males. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 269: 111-117.
- Cornwallis C. K. & T. Uller 2010. Towards an evolutionary ecology of sexual traits. *Trends Ecol. Evol.* 25: 145-152.
- Costa W. J. E. M. 1998. Phylogeny and classification of Rivulidae revisited: origin and evolution of annualism and miniaturization in rivulid fishes (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei). *J. Comp. Biol.* 3: 33-92.
- Costa W. E. J. M. 2002. Monophyly and phylogenetic relationships of the neotropical annual fish genera *Austrolebias* and *Megalebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Copeia* 4: 916-927.
- Costa W. E. J. M. 2006. The South American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, descriptive morphology and taxonomic revision. *Zootaxa* 1213: 1-162.
- Costa W. J. E. M. 2010. Historical biogeography of cynolebiasine annual killifishes inferred from dispersal–vicariance analysis. *J. Biogeogr.* 37: 1995-2004.

- Costa W. E. J. M. & M. M. Cheffe 2001. Three new annual fishes of the genus *Austrolebias* from the Laguna Dos Patos system, southern Brazil, and a redescription of *A. Adloffii* (Ahl) (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Comun. Mus. Cienc. Tecnol. PUCRS (Ser Zoologia)* 14: 179-200.
- Costa W. J. E. M., T. P. A. Ramos, L. C. Alexandre & R. T. C. Ramos 2010. *Cynolebias parnaibensis*, a new seasonal killifish from the Caatinga, Parnaíba River basin, northeastern Brazil, with notes on sound producing courtship behavior (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Neotrop. Ichthyol.* 8: 283-288.
- Coyne J. A. & H. A. Orr 1997. "Patterns of speciation in *Drosophila*" revisited. *Evolution* 51: 295-303.
- Coyne J. A. & H. A. Orr 2004. Speciation. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Coyne J. A., S. Y. Kim, A. S. Chang, D. Lachise, & S. Elwyn 2002. Sexual isolation between two sibling species with overlapping ranges: *Drosophila santomea* and *Drosophila yakuba*. *Evolution* 56: 2424-2434.
- Cox C. R. & B. J. LeBoeuf 1977. Female incitation of male competition: a mechanism in sexual selection. *Am. Nat.* 111: 317-335.
- Cruz R., M. Carballo, P. Conde-Padin & E. Rolan-Alvarez 2004. Testing alternative models for sexual isolation in natural populations of *Littorina saxatilis*: indirect support for by-product ecological speciation? *J. Evol. Biol.* 17: 288-293.
- Cui R., M. Schumer, K. Kruesi, R. Walter, P. Andolfatto, *et al.* 2013. Phylogenomics reveals extensive reticulate evolution in *Xiphophorus* fishes. *Evolution* doi: 10.1111/evo.12099.
- Culumber Z. W., H. S. Fisher, M. Tobler, M. Mateos, P. H. Barber, *et al.* 2010. Replicated hybrid zones of *Xiphophorus* swordtails along an elevational gradient. *Mol. Ecol.* 20: 342-356.
- Culumber Z. W., D. B. Shepard, S. W. Coleman, G. G. Rosenthal & M. Tobler 2012. Physiological adaptation along environmental gradients and replicated hybrid zone structure in swordtails (Teleostei: *Xiphophorus*). *J. Evol. Biol.* 25: 1800-1814.
- Cunningham E. J. A. & T. R. Birkhead 1998. Sex roles and sexual selection. *Anim. Behav.* 56: 1311-1321.
- D'Anatro A. & M. Loureiro 2005. Geographic variation in *Austrolebias luteoflamulatus* Vaz-Ferreira, Sierra & Scaglia (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *J. Fish Biol.* 67: 849-865.
- Darwin C. 1871. The descent of man, and selection in relation to sex. Murray, London.
- Dieckmann U. & M. Doebeli 1999. On the origin of species by sympatric speciation. *Nature* 400: 354-357.
- Dijkstra P. D., O. Seehausen & T. G. G. Groothuis 2005. Direct male–male competition can facilitate invasion of new colour types in Lake Victoria cichlids. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 58: 136-143.
- Dijkstra P. D., O. Seehausen, B. L. A. Gricar, M. E. Maan & T. G. G. Groothuis 2006. Can male–male competition stabilize speciation? A test in Lake Victoria cichlids. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 59: 704-713.
- Dobzhansky T. 1940. Speciation as a stage in evolutionary divergence. *Am. Nat.* 74: 312-321.
- Dobzhansky T. 1951. Genetics and the Origin of Species. Columbia University Press, New York.
- Doutrelant C. & P. K. McGregor 2000. Eavesdropping and mate choice in female fighting fish. *Behaviour* 137: 1655-1669.
- Edward D. A. & T. Chapman 2011. The evolution and significance of male mate choice. *Trends Ecol. Evol.* 26: 647-654.

- Egger B., B. Obermüller, E. Eigner, C. Sturmbauer & K. M. Sefc 2008. Assortative mating between allopatric colour morphs of the endemic Lake Tanganyika cichlid species *Tropheus moorii*. *Hydrobiologia* 615: 37-48.
- Emlen S. T. & L. W. Oring 1977. Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science* 197: 215-223.
- Endler J. A. & A. L. Basolo 1998. Sensory ecology, receiver biases and sexual selection. *Trends Ecol. Evol.* 13: 415-420.
- Enquist M. & S. Jakobsson 1986. Decision making and assessment in the fighting behaviour of *Nannacara anomala* (Cichlidae, Pisces). *Ethology* 72: 143-153.
- Errea A. & E. Danulat 2001. Growth of the annual fish, *Cynolebias viarius* (Cyprinodontiformes), in the natural habitat compared to laboratory conditions. *Environ. Biol. Fishes* 61: 261-268.
- Espinedo C. M., C. R. Gabor & A. S. Aspbury 2010. Males, but not females, contribute to sexual isolation between two sympatric species of *Gambusia*. *Evol. Ecol.* 24: 865-878.
- Evans J. P., A. Bisazza & A. Pilastro 2004. Female mating preferences for colourful males in a population of guppies subject to high predation. *J. Fish Biol.* 65: 1154-1159.
- Fabra 2011. Comportamiento agonístico en machos de *Austrolebias reicherti*. Tesis de grado, Facultad de Ciencias, UDELAR, Uruguay.
- Fernández A. S., J. C. Rosillo, G. Casanova & S. Olivera-Bravo 2011. Proliferation zones in the brain of adult fish *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae): a comparative study. *Neuroscience* 189: 12-24.
- Fisher H. S. & G. G. Rosenthal 2006. Hungry females show stronger mating preferences. *Behav. Ecol.* 17: 979-981.
- Fisher H. S., B. B. M. Wong & G. G. Rosenthal 2006. Alteration of the chemical environment disrupts communication in a freshwater fish. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci* 273: 1187-1193.
- Fisher H. S., S. Mascuch & G. G. Rosenthal 2009. Multivariate male traits misalign with multivariate female preferences in the swordtail fish, *Xiphophorus birchmanni*. *Anim. Behav.* 78: 265-269.
- Fisher R. A. 1930. *The Genetical Theory of Natural Selection*. Clarendon Press, Oxford.
- Fitze P. S. & J. F. Le Galliard 2008. Operational sex ratio, sexual conflict and the intensity of sexual selection. *Ecol. Lett.* 11: 432-439.
- Forister M. L. 2005. Independent inheritance of preference and performance in hybrids between host races of *Mitoura* butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Evolution* 59: 1149-1155.
- Forsgren E. 1997. Female sand gobies prefer good fathers over dominant males. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci* 264: 1283-1286.
- Forsgren E., T. Amundsen, Å. A. Borg & J. Bjelvenmark 2004. Unusually dynamic sex roles in a fish. *Nature* 429: 551-554.
- Fuller R. C. 2008. Genetic incompatibilities in killifish and the role of environment. *Evolution* 62: 3056-3068.
- Futuyma D. J. 2005. *Evolution*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Gabor C. R. 1999. Association patterns of sailfin mollies (*Poecilia latipinna*): alternative hypotheses. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 46: 333-340.
- Gagliardi-Seeley J. & M. Itzkowitz 2006. Pairs with large male are better at parental defence than pairs with small males in the convict cichlid (*Archocentrus nigrofasciatus*). *J. Fish Biol.* 69: 1239-1244.

- Gammon D. B., W. Li, A. P. Scott, B. S. Zielinski & L. D. Corkum 2005. Behavioural responses of female *Neogobius melanostomus* to odours of conspecifics. *J. Fish Biol.* 67: 615-626.
- García D., M. Loureiro & B. Tassino 2008. Reproductive behavior in the fish *Austrolebias reicherti* Loureiro & García 2004 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Neotrop. Ichthyol.* 6: 243-248.
- García G. 1996. Reconstrucción de las relaciones filogenéticas de los eventos de cladogénesis en el género *Cynolebias* Steindachner 1876, en base a datos cromosómicos y de ADN mitocondrial. Disertación de Tesis de doctorado, UDELAR, Montevideo, Uruguay.
- García G. 2006. Multiple simultaneous speciation in killifishes of the *Cynolebias adloffii* species complex (Cyprinodontiformes, Rivulidae) from phylogeography and chromosome data. *J. Zool. Syst.* 44: 75-87.
- García G., G. Wlasiuk & E. P. Lessa 2000. High levels of mitochondrial cytochrome B divergence in the annual killifishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Zool. J. Lin. Soc.* 129: 93-110.
- García G., A. I. Lalanne, G. Aguirre & M. Cappetta 2001. Chromosome evolution in annual killifish genus *Cynolebias* and mitochondrial phylogenetic analysis. *Chrom. Res.* 9: 93-100.
- García G., A. Pereira, I. Carrera & A. Marquez 2002. Genetic relationships in a complex of *Cynolebias* species (Cyprinodontiformes, Rivulidae) from Eastern Uruguay and Southern Brazil. *Bol. Soc. Zool.* 13: 1-11.
- García G., S. Claramunt & A. Lalanne 2004. Genetic differentiation among annual fish of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) in a biosphere reserve site from Uruguay. *Environ. Biol. Fishes* 70: 247-256.
- García G., M. Loureiro, N. Berois, M. J. Arezo, G. Casanova *et al.* 2009. Pattern of differentiation in the annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from a biosphere reserve site in South America: a multidisciplinary approach. *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 98: 620-635.
- García G., V. Gutiérrez, J. Vergara, P. Calviño, A. Duarte *et al.* 2012. Patterns of population differentiation in annual killifishes from the Paraná–Uruguay–La Plata Basin: the role of vicariance and dispersal. *J. Biogeogr.* 39: 1707-1719.
- García-Rodríguez F. & A. Witkowiak 2003. Inferring sea level variation from relative percentages of *Pseudopodosira kosugii* in Rocha Lagoon, SE Uruguay. *Diatom. Res.* 18: 49-59.
- García-Rodríguez F., C. Castiñeira, B. Scharf & P. Sprechmann 2002. The relationship between trophic state and sea level variation in the Rocha Lagoon, Uruguay. *N. Jb. Geol. Paläont. Mh* 2002: 27- 47.
- Gerhardt H. C. 2001. Acoustic communication in two groups of closely related treefrogs. *Adv. Study Behav.* 30: 99-167.
- Godin J. J. & S. E. Briggs 1996. Female mate choice under predation risk in the guppy. *Anim. Behav.* 51: 117-130.
- Gow J. L., C. L. Peichel & E. B. Taylor 2007. Ecological selection against hybrids in natural populations of sympatric threespine sticklebacks. *J. Evol. Biol.* 20: 2173-2180.
- Gray D. A. 2004. Does courtship behavior contribute to species-level reproductive isolation in field crickets? *Behav. Ecol.* 16: 201-206.
- Gray D. A. & W. H. Cade 2000. Sexual selection and speciation in field crickets. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14449-14454.
- Gregorio O., E. L. Berdan, G. M. Kozak & R. C. Fuller 2012. Reinforcement of male mate preferences in sympatric killifish species *Lucania goodei* and *Lucania parva*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 66: 1429-1436.

- Goncalves D. M. & R. F. Oliveira 2003. Time spent close to a sexual partner as a measure of female mate preference in a sex-role-reversed population of the blenny *Salaria pavo* (Risso) (Pisces: Blenniidae). *Acta Ethol.* 6: 1-5.
- Haavie J., T. Borge, S. Bures, L. Z. Garamszegi, H. M. Lampe *et al.* 2004. Flycatcher song in allopatry and sympatry — convergence, divergence and reinforcement. *J. Evol. Biol.* 17: 227-237.
- Häberli M. A. & P. B. Aeschlimann 2004. Male traits influence odour-based mate choice in the three-spined stickleback. *J. Fish Biol.* 64: 702-710.
- Hall D. W & Kirkpatrick M. 2006. Reinforcement and sex linkage. *Evolution* 60: 908-921.
- Hankison S. J. & M. R. Morris 2003. Avoiding a compromise between sexual selection and species recognition: female swordtail fish assess multiple species-specific cues. *Behav. Ecol.* 14: 282-287.
- Hass R. 1976. Sexual selection in *Nothobranchius guentheri* (pisces: cyprinodontidae). *Evolution* 30: 614-622.
- Hatfield T. & D. Schluter 1999. Ecological speciation in sticklebacks: environment dependent hybrid fitness. *Evolution* 53: 866-873.
- Hebets E. A. & D. R. Papaj 2005. Complex signal function: developing a framework of testable hypotheses. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 57: 197-214.
- Heubel K. U. & I. Schlupp 2008. Seasonal plasticity in male mating preferences in sailfin mollies. *Behav. Ecol.* 19: 1080-1086.
- Heuschele J., M. Mannerla, P. Gienapp & U. Candolin 2009. Environment-dependent use of mate choice cues in sticklebacks. *Behav. Ecol.* 20: 1223-1227.
- Hewitt G. M. 1988. Hybrid zones — natural laboratories for evolutionary studies. *Trends Ecol. Evol.* 3: 158-167.
- Higashi M., G. Takimoto & N. Yamamura 1999. Sympatric speciation by sexual selection. *Nature* 402: 523-526.
- Hoskin C. J. & M. Higgie 2010. Speciation via species interactions: the divergence of mating traits within species. *Ecol. Lett.* 13: 409-420.
- Hoskin C. L., M. Higgie, K. R. McDonald & C. Moritz 2005. Reinforcement drives rapid allopatric speciation. *Nature* 437: 1353-1356.
- Houle D. & A. S. Kondrashov 2002. Coevolution of costly mate choice and condition-dependent display of good genes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 269: 97-104.
- Howard D. J. 1993. Reinforcement: Origin, dynamics, and fate of an evolutionary hypothesis. En: Hybrid zones and the evolutionary process (Harrison R. G., Ed.). Oxford University Press, Oxford.
- Howard R. D. & J. R. Young 1998. Individual variation in male vocal traits and female mating preferences in *Bufo americanus*. *Anim. Behav.* 55: 1165-1179.
- Hrbek T. & A. Larson 1999. The evolution of diapause in the killifish family Rivulidae (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): A molecular phylogenetic and biogeographic perspective. *Evolution* 53: 1200-1216.
- Hsu Y., R. L. Earley & L. L. Wolf 2006. Modulation of aggressive behavior by fighting experience: mechanisms and contest outcomes. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 81: 33-74.
- Hunt J., R. Brooks & M. D. Jennions 2005. Female mate choice as a condition-dependent life-history trait. *Am. Nat.* 166: 79-92.
- Jaenike J., K. A. Dyer, C. Cornish & M. H. Minhas 2006. Asymmetrical reinforcement and Wolbachia infection in *Drosophila*. *PLoS Biol* 4: 1852-1862.

- Jann P., W. U. Blanckenhorn & P. I. Ward 2000. Temporal and microspatial variation in the intensities of natural and sexual selection in the yellow dung fly *Scathophaga stercoraria*. *J. Evol. Biol.* 13: 927-938.
- Järvenpää M. & K. Lindström 2004. Water turbidity by algal blooms causes mating system breakdown in a shallow-water fish, the sand goby *Pomatoschistus minutus*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 271: 2361-2365.
- Jennions M. D. & M. Petrie 1997. Variation in mate choice and mating preferences: a review of causes and consequences. *Biol. Rev.* 72: 283-327.
- Jirotkul M. 1999a. Operational sex ratio influences female preference and male-male competition in guppies. *Anim. Behav.* 58: 287-294.
- Jirotkul M. 1999b. Population density influences male-male competition in guppies. *Anim. Behav.* 58: 1169-1175.
- Johannesson K, M. Panova, P. Kemppainen, C. Andre, E. Rolan-Alvarez E *et al.* 2010. Repeated evolution of reproductive isolation in a marine snail: unveiling mechanisms of speciation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 365: 1735-1747.
- Johnstone R. A. 1997. The evolution of animal signals. En Behavioural Ecology. An Evolutionary Approach (Krebs J. R. & N. B. Davies, Eds.). Blackwell Science, Oxford.
- Johnstone R. A., J. D. Reynolds & J. C. Deutsch 1996. Mutual mate choice and sex differences in choosiness. *Evolution* 50: 1382-1391.
- Jones F. C., C. Brown, J. M. Pemberton & V. A. Braithwaite 2006. Reproductive isolation in a threespine stickleback hybrid zone. *J. Evol. Biol.* 19: 1532-1544.
- Jones F. C., C. Brown & V. A. Braithwaite 2008. Lack of assortative mating between incipient species of stickleback from a hybrid zone. *Behaviour* 145: 463-484.
- Kangas N. & K. Lindström 2001. Male interactions and female mate choice in the sand goby, *Pomatoschistus minutus*. *Anim. Behav.* 61: 425-430.
- Kasumovic M. M., M. J. Bruce, M. C. B. Andrade & M. E. Herberstein 2008. Spatial and temporal demographic variation drives within-season fluctuations in sexual selection. *Evolution* 62: 2316-2325.
- Kay K. M. & D. W. Schemske 2008. Natural selection reinforces speciation in a radiation of neotropical rainforest plants. *Evolution* 62: 2628-2642.
- Kingston J., G. G. Rosenthal & M. J. Ryan 2003. The role of sexual selection in maintaining a colour polymorphism in the pygmy swordtail *Xiphophorus pygmaeus*. *Anim. Behav.* 65: 735-743.
- Kirkpatrick M. & M. J. Ryan 1991. The evolution of mating preferences and the paradox of the lek. *Nature* 350: 33-38.
- Kirkpatrick M. & V. Ravigné 2002. Speciation by natural and sexual selection: models and experiments. *Am. Nat.* 159: S22-S35.
- Knight M. E. & G. F. Turner 2004. Laboratory mating trials indicate incipient speciation by sexual selection among populations of the cichlid fish *Pseudotropheus zebra* from Lake Malawi. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 271: 675-680.
- Knight M. E., G. F. Turner, C. Rico, M. J. H. van Oppen & G. M. Hewitt 1998. Microsatellite paternity analysis on captive Lake Malawi cichlids supports reproductive isolation by direct mate choice. *Mol. Ecol.* 7: 1605-1610.
- Kodric-Brown A. & P. F. Nicoletto 2001. Age and experience affect female choice in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Am. Nat.* 157: 316-323.

- Kodric-Brown A. & U. Strecker 2001. Responses of *Cyprinodon maya* and *C. labiosus* females to visual and olfactory cues of conspecific and heterospecific males. *Biol. J. Linn. Soc.* 74: 541-548.
- Kokko H. & P. Monaghan 2001. Predicting the direction of sexual selection. *Ecol. Lett.* 4: 159-165.
- Kokko H. & R. A. Johnstone 2002. Why is mutual mate choice not the norm? Operational sex ratios, sex roles, and the evolution of sexually dimorphic and monomorphic signalling. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 357: 319-330.
- Kokko H. & J. Mappes 2005. Sexual selection when fertilization is not guaranteed. *Evolution* 59: 1876-1885.
- Kokko H. & D. J. Rankin 2006. Lonely hearts or sex in the city? Density-dependent effects in mating systems. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 361: 319-334.
- Kokko H., R. Brooks, M. D. Jennions & J. Morley 2003. The evolution of mate choice and mating biases. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270: 653-664.
- Kokko H., M. D. Jennions & R. Brooks 2006. Unifying and testing models of sexual selection. *Annu. Rev. Ecol. Evol. S.* 37: 43-66.
- Kondrashov A. S. & F. A. Kondrashov 1999. Interactions among quantitative traits in the course of sympatric speciation. *Nature* 400: 351-354.
- Kortet R. & A. Hedrick 2005. The scent of dominance: female field crickets use odour to predict the outcome of male competition. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 59: 77-83.
- Kotiaho J. S., L. W. Simmons & J. L. Tomkins 2001. Towards a resolution of the lek paradox. *Nature* 410: 684-686.
- Kozak G. M., M. Reiland, J. W. Boughmann 2009. Sex differences in mate recognition and conspecific preference in species with mutual mate choice. *Evolution* 63: 353-365.
- Kraaijeveld K., F. J. Kraaijeveld-Smit & M. E. Maan 2011. Sexual selection and speciation: the comparative evidence revisited. *Biol. Rev.* 86: 367-377.
- Kronforst M. R., L. G. Young & L. E. Gilbert 2007. Reinforcement of mate preference among hybridizing *Heliconius* butterflies. *J. Evol. Biol.* 20: 278-285.
- Kullmann H. & B. Klemme 2007. Female mating preference for own males on species and population level in *Chromaphyseion* killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae). *Zoology* 110: 377-386.
- Kvarnemo C. & I. Ahnesjö 1996. The dynamics of operational sex ratios and competition for mates. *Trends Ecol. Evol.* 11: 404-408.
- Kvarnemo C. & E. Forsgren 2000. The influence of potential reproductive rate and variation in mate quality on male and female choosiness in the sand goby, *Pomatoschistus minutus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 48: 378-384.
- Kvarnemo C., E. Forsgren & C. Magnhagen 1995. Effects of sex ratio on intra- and inter-sexual behaviour in guppies. *Anim. Behav.* 50: 1455-1461.
- Lande R. 1981. Models of speciation by sexual selection on polygenic traits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 3721-3725.
- Lande R., O. Seehausen & J. J. M. van Alphen 2001. Mechanisms of rapid sympatric speciation by sex reversal and sexual selection in cichlid fish. *Genetica* 112: 435-443.
- Lehtonen T. K. & K. Lindström 2008. Repeatability of mating preferences in the sand goby. *Anim. Behav.* 75: 55-61.
- Lehtonen T. K., B. B. M. Wong & K. Lindström 2010. Fluctuating mate preferences in a marine fish. *Biol. Lett.* 6: 21-23.

- Lemmon E. M. 2009. Diversification of conspecific signals in sympatry: geographic overlap drives multidimensional reproductive character displacement in frogs. *Evolution* 63: 1155-1170.
- Lemmon A. R. & M. Kirkpatrick 2006. Reinforcement and the genetics of hybrid incompatibilities. *Genetics* 173: 1145-1155.
- Levesque H. M., D. Scaffid, C. N. Polkinghorne & P. W. Sorensen 2011. A multi-component species identifying pheromone in the goldfish. *J. Chem. Ecol.* 37: 219-227.
- Liou L. W. & T. D. Price 1994. Speciation by reinforcement of premating isolation. *Evolution* 48: 1451-1459.
- Loureiro M. 2004. Sistemática y biogeografía de los peces anuales de la subtribu Cynolebiatina (Cyprinodontiformes: Rivulidae: Cynolebiatinae). Disertación de Tesis de doctorado, PEDECIBA, Facultad de Ciencias, UDELAR, Uruguay.
- Loureiro M. & R. O. de Sá 1996. External morphology of the chorion of the annual fishes *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Copeia*, 1996: 1016-1022.
- Loureiro M. & R. O. de Sá 2000. Ornamentación del corion en los huevos de especies de *Austrolebias* y *Simpsonichthys* (Rivulidae: Cynolebiatinae). *FACENA* 16: 85-91.
- Loureiro M. & G. García 2004. *Cynolebias reicherti*, a new annual fish species (Rivulidae: Cynolebiatinae) from southern Laguna Merín basin. *Acta Zool. Lilloana* 42: 11-23.
- Loureiro, M., & G., García, 2006. Transgresiones y regresiones marinas en la costa atlántica y lagunas costeras de Uruguay: efectos sobre los peces continentales. En: Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya (Manefra R., L. Rogriguez-Gallego, F. Scarabino & D. Conde, Eds.). Vida Silvestre, Montevideo.
- Loureiro M. & G. García 2008. *Austrolebias reicherti* Loureiro & García, a valid species of annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from southwestern Laguna Merín basin. *Zootaxa* 1940: 1-5.
- Loureiro M., A. Duarte & A. Zarucki 2011. A new species of *Austrolebias* Costa (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from northeastern Uruguay, with comments on distribution patterns. *Neotrop. Ichthyol.* 9: 335-342.
- Lozano G. A. 1994. Carotenoids, parasites, and sexual selection. *Oikos* 70: 309-311.
- Lukhtanov V. A., N. P. Kandul, J. B. Plotkin, A. V. Dantchenko, D. Haig *et al.* 2005. Reinforcement of pre-zygotic isolation and karyotype evolution in *Agrodiaetus* butterflies. *Nature* 436: 385-389.
- Lynch K. S., A. S. Rand, M. J. Ryan & W. Wilczynski 2005. Plasticity in female mate choice associated with changing reproductive states. *Anim. Behav.* 69: 689-699.
- Macholán M, P. Munclinger, M. Šugerková, P. Dufková, B. Bímová *et al.* 2007. Genetic analysis of autosomal and X-linked markers across a mouse hybrid zone. *Evolution* 61: 746-771.
- Mallet J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol. Evol.* 20: 229-237.
- Mallet J. 2008. Hybridization, ecological races, and the nature of species: empirical evidence for the ease of speciation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 363: 2971-2986.
- Mank J. E, D. E. L. Promislow & J. C. Avise 2006. Evolution of alternative sex-determining mechanisms in teleost fishes. *Biol J Linnean Soc.* 87: 83-93.
- Mann M. E. & O. Seehausen 2011. Ecology, sexual selection and speciation. *Ecol. Lett.* 14: 591-602.
- Maruska K. P. & R. D. Fernald 2012. Contextual chemosensory urine signaling in an African cichlid fish. *J. Exp. Biol.* 215: 68-74.

- Masta S. E. & W. P. Maddison 2002. Sexual selection driving diversification in jumping spiders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 4442-4447.
- Maynard-Smith J. & D. G. C. Harper 2003. Animal signals. Oxford University Press, Oxford.
- Mayr E. 1963. Animal Species and Evolution. Harvard University Press, Cambridge
- Mcbride C. S. & M. C. Singer 2010. Field studies reveal strong postmating isolation between ecologically divergent butterfly populations. *PLoS Biol.* 8: e1000529.
- McLennan D. A. 2003. The importance of olfactory signals in the gasterosteid mating system: sticklebacks go multimodal. *Biol J Linnean Soc.* 80: 555-572.
- McLennan D. A. 2004. Male brook sticklebacks' (*Culaea inconstans*) response to olfactory cues. *Behaviour* 141: 1411-1424.
- McLennan D. A. & M. J. Ryan 1997. Responses to conspecific and heterospecific olfactory cues in the swordtail *Xiphophorus cortezi*. *Anim. Behav.* 54: 1077-1088.
- McLennan D. A. & M. J. Ryan 1999. Interspecific recognition and discrimination based upon olfactory cues in northern swordtails. *Evolution* 53: 880-888.
- McMillan W. O., C. D. Jiggins & J. Mallet 1997. What initiates speciation in passion-vine butterflies? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8628-8633.
- Mendelson T. C., V. E. Imhoff & J. J. Venditti 2007. The accumulation of reproductive barriers during speciation: postmating barriers in two behaviorally isolated species of darters (Percidae: *Etheostoma*). *Evolution* 61: 2596-2606.
- Mikami O. K., M. Kohda & M. Kawata 2004: A new hypothesis for species co-existence: male–male repulsion promotes co-existence of competing species. *Pop. Ecol.* 46: 213-217.
- Milinski M., S. Griffiths, K. M. Wegner, T. B. H. Reusch, A. Haas-Assenbaum *et al.* 2005. Mate choice decisions of stickleback females predictably modified by MHC peptide ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 4414-4418.
- Milner R. N. C., T. Detto, M. D. Jennions & P. R. Y. Backwell 2010. Experimental evidence for a seasonal shift in the strength of a female mating preference. *Behav. Ecol.* 21: 311-316.
- Møller A. P. & A. Pomiankowski 1993. Why have birds got multiple sexual ornaments ? *Behav. Ecol. Sociobiol.* 32: 167-176.
- Møller A. P., N. Saino, G. Taramino, P. Galeotti & S. Ferrario 1998. Paternity and multiple signaling: effects of a secondary sexual character and song on paternity in the barn swallow. *Am. Nat.* 151: 236-242.
- Monteiro L. R. & S. F. dos Reis 2000. Principios de morfometria geométrica. Holos, Ribeirão Preto.
- Montgomerie R. & R. Thornhill 1989. Fertility advertisement in birds: a means of inciting male-male competition. *Ethology* 81: 209-220.
- Moore A. J. & P. J. Moore 1999. Balancing sexual selection through opposing mate choice and male competition. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 266: 711-716.
- Moore P. J. & Moore A. J. 2001. Reproductive aging and mating: the ticking of the biological clock in female cockroaches. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9171-9176.
- Moretz J. A. 2003. Aggression and RHP in the northern swordtail fish, *Xiphophorus cortezi*: the relationship between size and contest dynamics in male–male competition. *Ethology* 109: 995-1008.

- Morris R. M., L. Gass & M. J. Ryan 1995. Assessment and individual recognition of opponents in the pygmy swordtails *Xiphophorus nigrensis* and *X. multilineatus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 37: 303-310.
- Morris R. M., Nicoletto P. F. & Hesselman E. 2003. A polymorphism in female preference for a polymorphic male trait in the swordtail fish *Xiphophorus cortezi*. *Anim. Behav.* 65: 45-52.
- Moskalik B. & G. W. Uetz 2011. Female hunger state affects mate choice of a sexually selected trait in a wolf spider. *Anim. Behav.* 81: 715-722.
- Murphy W. J., T. N. P. Nguyen, E. B. Taylor & G. E. Collier 1999. Mitochondrial DNA phylogeny of West African Aplocheiloid killifishes (Cyprinodontiformes, Aplocheilidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 11: 343-350.
- Noor M. A. 1995. Speciation driven by natural selection in *Drosophila*. *Nature* 375: 674-675.
- Noor M. A. 1997. How often does sympatry affect sexual isolation in *Drosophila*? *Am. Nat.* 149: 1156.
- Noor M. A. F. 1999. Reinforcement and other consequences of sympatry. *Heredity* 83: 503-508.
- Nosil P., B. J. Crespi & C. P. Sandoval 2003. Reproductive isolation driven by the combined effects of ecological adaptation and reinforcement. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270: 1911-1918.
- Nosil P., B. J. Crespi, R. Gries & G. Gries 2007. Natural selection and divergence in mate preference during speciation. *Genetica* 129: 309-327.
- Olson V. A. & I. P. F. Owens 1998. Costly sexual signals: are carotenoids rare, risky or required? *Trends Ecol. Evol.* 13: 510-514.
- O'Rourke C. F. & T. C. Mendelson 2010. Male and female preference for conspecifics in a fish with male parental care (Percidae:Catostomus). *Behav. Process.* 85: 157-162.
- O'Rourke C. F. & T. C. Mendelson 2012. Behavioural responses to season and adult sex ratio in the fantail darter *Etheostoma flabellare*. *Anim. Behav.* 85: 43-49.
- Ortiz-Barrientos D., A. Grealy & P. Nosil 2009. The genetics and ecology of reinforcement. Implications for the evolution of prezygotic isolation in sympatry and beyond. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1168: 156-182.
- Östlund S. 1995. Female 15-spined sticklebacks detect males with empty nests by non-visual cues. *J. Fish Biol.* 47: 1106-1109.
- Östlund-Nilsson S. & G. E. Nilsson 2000. Free choice by female sticklebacks: lack of preference for male dominance traits. *Can. J. Zool.* 78: 1251-1258.
- Oviedo S. 2009. Posibles mecanismos genómicos de aislamiento postcigótico en especies del género *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). Tesis de grado, Facultad de Ciencias, UDELAR, Uruguay.
- Owens I. P. F. & D. B. A. Thompson 1994. Sex differences, sex ratios and sex roles. *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.* 258: 93-99.
- Panhuis T. M., R. Butlin, M. Zuk & T. Tregenza 2001. Sexual selection and speciation. *Trends Ecol. Evol.* 16: 364-371.
- Patten M. A., J. T. Rotenberry & M. Zuk 2004. Habitat selection, acoustic adaptation, and the evolution of reproductive isolation. *Evolution* 58: 2144-2155.
- Pfennig K. S. 2000. Female spadefoot toads compromise on mate quality to ensure conspecific matings. *Behav. Ecol.* 11: 220-227.
- Pfennig K. S. 2003. A test of alternative hypotheses for the evolution of reproductive isolation between spadefoot toads: support for the reinforcement hypothesis. *Evolution* 57: 2842-2851.

- Pfennig K. S. 2007. Facultative mate choice drives adaptive hybridization. *Science* 318: 965-967.
- Pfennig K. S. & D. W. Pfennig 2009. Character displacement: ecological and reproductive responses to a common evolutionary. *Q Rev Biol.* 84: 253-276.
- Plenderleith M., C. van Oosterhout, R. L. Robinson & G. F. Turner 2005. Female preference for conspecific males based on olfactory cues in a Lake Malawi cichlid fish. *Biol. Lett.* 1: 411-414.
- Preziosi R. F. & D. J. Fairbairn 2000. Lifetime selection on adult body size and components of body size in a waterstrider: opposing selection and maintenance of sexual size dimorphism. *Evolution* 54: 585-566.
- Price T. D., M. M. Bouvier 2002. The evolution of F-1 postzygotic incompatibilities in birds. *Evolution* 56: 2083-2089.
- PROBIDES 1999. Plan Director Reserva de Biosfera Bañados del Este/Uruguay-Rocha.
- Pröhl H. 2002. Population differences in female resource abundance, adult sex ratio, and male mating success in *Dendrobates pumilio*. *Behav. Ecol.* 13: 175-181.
- Pryke S. R. & S. Andersson 2008. Female preferences for long tails constrained by species recognition in short-tailed red bishops. *Behav. Ecol.* 19: 1116-1121.
- Qvarnström A. 1999. Different reproductive tactics in male collared flycatchers signalled by size of secondary sexual character. *Proc R Soc B Biol Sci.* 266: 2089-2093.
- Qvarnström A. 2001. Context-dependent genetic benefits from mate choice. *Trends Ecol. Evol.* 16: 5-7.
- Qvarnström A. & E. Forsgren 1998. Should females prefer dominant males? *Trends Ecol. Evol.* 13: 498-501.
- Qvarnström A., T. Pärt & B. Sheldon 2000. Adaptive plasticity in mate preference linked to differences in reproductive effort. *Nature* 405: 344-347.
- Rafferty N. E. & J. W. Boughma 2006. Olfactory mate recognition in a sympatric species pair of threespined sticklebacks. *Behav. Ecol.* 17: 965-970.
- Reaney L. T. & P. R. Y. Backwell 2007. Temporal constraints and female preference for burrow width in the fiddler crab, *Uca mjoebergi*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 61: 1515-1521.
- Reding L. P., J. P. Swaddle & H. A. Murphy 2013. Sexual selection hinders adaptation in experimental populations of yeast. *Biol. Lett.* 9: 20121202.
- Reichard M. & M. Polacik 2010. Reproductive isolating barriers between colour-differentiated populations of an African annual killifish, *Nothobranchius korthausae* (Cyprinodontiformes). *Biol. J. Linn. Soc.* 100: 62-72.
- Reichard M., Bryja J., M. Ondracková, M. Dávidová, P. Kaniewska *et al.* 2005. Sexual selection for male dominance reduces opportunities for female mate choice in the European bitterling (*Rhodeus sericeus*). *Mol. Ecol.* 14: 1533-1542.
- Reichard M., C. Smith & J. Bryja 2008. Seasonal change in the opportunity for sexual selection. *Mol. Ecol.* 17: 642-651.
- Reichard M., M. Polacik & O. Sedláček 2009. Distribution, colour polymorphism and habitat use of the African killifish *Nothobranchius furzeri*, the vertebrate with the shortest life span. *J. Fish Biol.* 74: 198-212.
- Reusch T. B. H., M. A. Häberli, P. B. Aeschlimann & M. Milinski 2001. Female sticklebacks count alleles in a strategy of sexual selection explaining MHC polymorphism. *Nature* 414: 300-302.

- Reynolds J. D. & J. C. Jones 1999. Female preference for preferred males is reversed under low oxygen conditions in the common goby (*Pomatoschistus microps*). *Behav. Ecol.* 10: 149-154.
- Rick I. P., R. Modarressie & T. C. Bakker 2006. UV-wavelengths affect female mate choice in three spined sticklebacks. *Anim. Behav.* 71: 307-313.
- Ritchie M. G. 2007. Sexual Selection and Speciation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 38: 79-102.
- Robinson D. M., M. S. Tudor & M. R. Morris 2011. Female preference and the evolution of an exaggerated male ornament: the shape of the preference function matters. *Anim. Behav.* 81: 1015-1021.
- Roff D. 1997. Evolutionary quantitative genetics. Chapman & Hall, New York.
- Rohlf F. J. 2003. Morphometrics at SUNY Stony Brook. <http://life.bio.sunysb.edu/morph>
- Rosenthal G. G. 2012. Individual mating decisions and hybridization. *J. Evol. Biol.* 26: 252-255.
- Rosenthal G. G. & C. S. Evans 1998. Female preference for swords in *Xiphophorus helleri* reflects a bias for large apparent size. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 4431-4436.
- Rosenthal G. G. & M. J. Ryan 2011. Conflicting preferences within females: sexual selection versus species recognition. *Biol. Lett.* 7: 525-527.
- Rosenthal G. G., X. F. de la Rosa Reyna, S. Kazianis, M. J. Stephens, D. C. Morizot *et al.* 2003. Dissolution of sexual signal complexes in a hybrid zone between the swordtails *Xiphophorus birchmanni* and *Xiphophorus malinche* (Poeciliidae). *Copeia* 2: 299-307.
- Rosenthal G. G., J. N. Fitzsimmons, K. U. Woods, G. Gerlach & H. S. Fisher 2011. Tactical release of a sexually-selected pheromone in a swordtail fish. *PLoS ONE* 6: e16994.
- Rowe L. & D. Houle 1996. The lek paradox and the capture of genetic variance by condition dependent traits. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 263: 1415-1421.
- Rundle H. D. 2002. A test of ecologically dependent postmating isolation between sympatric sticklebacks. *Evolution* 56: 322-329.
- Rundle H. D. & D. Schluter 1998. Reinforcement of stickleback mate preferences: sympatry breeds contempt. *Evolution* 52: 200-208.
- Russell S. T. & A. E. Magurran 2006. Intrinsic reproductive isolation between Trinidadian populations of the guppy, *Poecilia reticulata*. *J. Evol. Biol.* 19: 1294-1303.
- Ryan M. J. & W. E. J. Wagner 1987. Asymmetries in mating preferences between species: female swordtails prefer heterospecific males. *Science* 236: 595-597.
- Ryan M. J., D. K. Hewes & W. E. J. Wagner 1990. Sexual selection on alleles that determine body size in the swordtail *Xiphophorus nigrensis*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 26: 231-237.
- Sætre G-P, T. Moum, S. Bures, M. Král, M. Adamjan & J. Moreno 1997. A sexually selected character displacement in flycatchers reinforces premating isolation. *Nature* 387: 589-591.
- Sampson S. D. 1999. Sex and destiny: the role of mating signals in speciation and macroevolution. *Hist. Biol.* 13: 173-197.
- Schartl M. 2008. Evolution of Xmrk: an oncogene, but also a speciation gene? *BioEssays* 30: 822-832.
- Schluter D. 2009. Evidence for ecological speciation and its alternative. *Science* 323: 737-741.

- Schluter D. & G. L. Conte 2009. Genetics and ecological speciation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 9955-9962.
- Schwarzer J., B. Misof & U. K. Schlieven 2012. Speciation within genomic networks: a case study based on *Steatocranus* cichlids of the lower Congo rapids. *J. Evol. Biol.* 25: 138-148.
- Seehausen O. 2004. Hybridization and adaptive radiation. *Trends Ecol. Evol.* 19: 198-207.
- Seehausen O. & J. J. M. van Alphen 1998. The effect of male coloration on female mate choice in closely related Lake Victoria cichlids (*Haplochromis nyererei* complex). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 42: 1- 8.
- Seehausen O. & D. Schluter 2004. Male–male competition and nuptial-colour displacement as a diversifying force in Lake Victoria cichlid fishes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 271: 1345-1353.
- Seehausen O., J. J. M. van Alphen & F. Witte 1997. Cichid fish diversity threatened by eutrophication that cubs sexual selection. *Science* 277: 1808-1811.
- Seehausen O., Y. Terai, I. S. Magalhaes, K. L. Carleton, H. D. J. Mrosso *et al.* 2008. Speciation through sensory drive in cichlid fish. *Nature* 455: 620-626.
- Servedio M. R. 2007. Male versus female mate choice: sexual selection and the evolution of species recognition via reinforcement. *Evolution* 61: 2772-2789.
- Servedio M. R. & M. A. F. Noor 2003. The role of reinforcement in speciation: theory and data. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34: 339-364.
- Servedio M. R., G. S. Van Doorn, M. Kopp, A. Frame & P. Nosil 2011. Magic traits: ‘magic’ but not rare? *Trends Ecol. Evol.* 26: 389-397.
- Shaw K. L. 1999. A nested analysis of song groups and species boundaries in the Hawaiian cricket genus *Laupala*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 11: 332-341.
- Silva K., M. N. Vieira, V. C. Almadas & N. M. Monteiro 2007. The effect of temperature on mate preferences and female-female interactions in *Syngnathus abaster*. *Anim. Behav.* 74: 1525-1533.
- Silvertown J., C. Servaes, P. Biss & D. Macleod 2005. Reinforcement of reproductive isolation between adjacent populations in the Park Grass Experiment. *Heredity* 95: 198-205.
- Simpson B. R. C. 1979. The phenology of annual killfishes. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 44: 243-261.
- Smith P. F., A. Konings & I. Kornfield 2003. Hybrid origin of a cichlid population in Lake Malawi: implications for genetic variation and species diversity. *Mol. Ecol.* 12: 2497-2504.
- Sorensen P. W. & T. R. Hoye 2010. Pheromones in Vertebrates. En: *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology* (Mander L. & H. W. Lui, Eds.). Elsevier, Oxford.
- Spence R. & C. Smith 2005. Male territoriality mediates density and sex ratio effects on oviposition in the zebrafish, *Danio rerio*. *Anim. Behav.* 69: 1317-1323.
- Sprechman P. 1978. The paleoecology and paleogeography and stratigraphy of the Uruguayan coastal area during the neogene and quaternary. *Zitteliana* 4: 3-72.
- Stacey N. 2003: Hormones, pheromones and reproductive behavior. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 229-235.
- Stacey N. E. & P. W. 2005. Hormones, pheromones, and reproductive behaviors. En: *Behaviour: Interactions with Fish Physiology* (Sloman K. A., S. Balshine & R. W. Wilson, Eds.). Academic Press, New York.
- Svensson E. I., K. Karlsson, M. Friberg & F. Eroukhanoff 2007. Gender differences in species recognition and the evolution of asymmetric sexual isolation. *Curr. Biol.* 17: 1943-1947.

- Swenton D. M. 2011. Sex differences in mate preference between two hybridizing species of poeciliid fish. *Ethology* 117: 208-216.
- Taff C. C., D. Steinberger, C. Clark, K. Belinsky, H. Sacks *et al.* 2012. Multimodal sexual selection in a warbler: plumage and song are related to different fitness components. *Anim. Behav.* 84: 813-821.
- Telschow A., P. Hammerstein & J. H. Werren 2005. The effect of *Wolbachia* versus genetic incompatibilities on reinforcement and speciation. *Evolution* 59: 1607-1619.
- Tobler M. & E. W. Carson 2010. Environmental variation, hybridization, and phenotypic diversification in Cuatro Ciénegas pupfishes. *J. Evol. Biol.* 23: 1475-1489.
- Turner G. F. & M. T. Burrows 1995. A model of sympatric speciation by sexual selection. *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.* 260: 287-292.
- Turner G. F., O. Seehausen, E. Knight, C. J. Allender & R. L. Robinson 2001. How many species of cichlid fishes are there in African lakes? *Mol. Ecol.* 10: 793-806.
- Urbanelli S. & D. Porretta 2008. Evidence of reinforcement of premating isolation between two species of the genus *Ochthebius* Coleoptera: Hydraenidae. *Evolution* 62: 1520-1527.
- Uy J. A. C. & G. Borgia 2000. Sexual selection drives rapid divergence in bowerbird display traits. *Evolution* 54: 273-278.
- Uy J. A. C. & R. J. Safran 2013. Variation in the temporal and spatial use of signals and its implications for multimodal communication. *Behav Ecol Sociobiol.* doi 10.1007/s00265-013-1492-y.
- Uyeda J. C., S. J. Arnold, P. A. Hohenlohe & L. S. Mead 2009. Drift promotes speciation by sexual selection. *Evolution* 63: 583-594.
- Vallianatos M, S. C. Loughheed & P. T. Boag 2001. Phylogeography and genetic characteristics of a putative secondary-contact zone of the loggerhead shrike in central and eastern North America. *Can. J. Zool.* 79: 2221-2227.
- Vamosi S. M. & D. Schluter 1999. Sexual selection against hybrids between sympatric stickleback species: evidence from a field experiment. *Evolution* 53: 874-879.
- van Doorn G. S. & F. J. Weissing 2004. The evolution of female preference for multiple indicators of quality. *Am. Nat.* 164: 173-186.
- van Doorn G. S., A. J. Noest & P. Hogeweg 1998. Sympatric speciation and extinction driven by environment dependent sexual selection. *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.* 265: 1915-1919.
- van Doorn G. S., U. Dieckmann & F. J. Weissing 2004. Sympatric speciation by sexual selection: a critical reevaluation. *Am. Nat.* 163: 709-725.
- van Doorn G. S., P. Edelaar & F. J. Weissing 2009. On the origin of species by natural and sexual selection. *Science* 326: 1704-1707.
- Vaz-Ferreira R., B. Sierra, S. Scaglia 1964. Eco-etología de la reproducción en los peces del género *Cynolebias* Steindachner, 1876. *Apartados de los Archivos de la Sociedad de Biología de Montevideo* 26: 44-49.
- Velez M. J. & H. J. Brockmann 2006. Seasonal variation in selection on male calling song in the field cricket, *Gryllus rubens*. *Anim. Behav.* 72: 439-448.
- Vigueira P. A., J. F. Schaefer, D. D. Duvernell & B. R. Kreiser 2008. Tests of reproductive isolation among species in the *Fundulus notatus* (Cyprinodontiformes: Fundulidae) species complex. *Evol. Ecol.* 22: 55-70.

- Waas J. R. & P. W. Colgan 1992. Chemical cues associated with visually elaborate aggressive displays of 3-spine sticklebacks. *J. Chem. Ecol.* 18: 2277-2284.
- Wacker S., K. Mobley, E. Forsgren, L. C. Myhre, K. de Jong *et al.* 2013. Operational sex ratio but not density affects sexual selection in a fish. *Evolution* doi:10.1111/evo.12092
- Walling C. A., N. J. Royle, J. Lindström & N. B. Metcalfe 2010. Do female association preferences predict the likelihood of reproduction? *Behav. Ecol. Sociobiol.* 64: 541-548.
- Weir L. K., J. W. A. Grant & J. A. Hutchings 2011. The influence of operational sex ratio on the intensity of competition for mates. *Am. Nat.* 177: 167-176.
- West-Eberhard M. J. 1983. Sexual selection, social competition and speciation. *Quart. Rev. Biol.* 58: 155-183.
- Wickett R. G. & L. D. Corkum 1998. You have to get wet: a case study of the nonindigenous Great Lakes fish, round goby. *Fisheries* 23: 26-27.
- Widemo F. & S. A. Sæther 1999. Beauty is in the eye of the beholder: causes and consequences of variation in mating preferences. *Trends Ecol. Evol.* 14: 26-31.
- Wiley R. H. & J. Poston 1996. Indirect mate choice, competition for mates, and coevolution of the sexes. *Evolution* 50: 1371-1381.
- Williams D. D. 2006. The biology of temporary waters. Oxford University Press, Oxford.
- Willis P. M., G. G. & M. J. Ryan 2012. An indirect cue of predation risk counteracts female preference for conspecifics in a naturally hybridizing fish *Xiphophorus birchmanni*. *PLoS ONE* 7: e34802.
- Wilson E. O. 1980. Sociobiología: La Nueva Síntesis. Omega, Barcelona.
- Wisenden B. D. & N. E. Stacey 2005. Fish semiochemicals and the evolution of communication networks. En: Animal Communication Networks (McGregor P. K., Ed.). Cambridge University Press, Cambridge.
- Wolf J. B. W., J. Lindell & N. Backstrom 2010. Speciation genetics: current status and evolving approaches Introduction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 365: 1717-1733.
- Wong B. B. M. 2004. Superior fighters make mediocre fathers in the Pacific blue-eye fish. *Anim. Behav.* 67: 583-590.
- Wong B. B. M. & U. Candolin 2005. How is female mate choice affected by male competition? *Biol Rev.* 80: 559-571.
- Wong B. B. M., H. S. Fisher & G. G. Rosenthal 2005. Species recognition by male swordtails via chemical cues. *Behav. Ecol.* 16: 818-822.
- Wourms J. P. 1964. Comparative observations on the early embryology of *Nothobranchius taeniopygus* and *Aplocheilichthys pumilis* with special reference to the problem of naturally occurring embryonic diapause in Teleost fishes. Eastafrican Freshwater Fish. Res. Org. Appendix H 68-73.
- Wourms J. P. 1967. Annual Fishes. En Methods in Developmental Biology (Wilt F. H. & N. Wessels, Eds.). Thomas and Crowell Company, New York.
- Wourms J. P. 1972a. The developmental biology of annual fishes. I. Stages in the normal development of *Austrofundulus myersi*. *J. Exp. Zool.* 182: 143-168.
- Wourms J. P. 1972b. The developmental biology of annual fishes. II. Naturally occurring dispersion and reaggregation of blastomeres during the development of annual fish eggs. *J. Exp. Zool.* 182: 169-200.
- Wourms J. P. 1972c. The developmental biology of fishes. III. Pre-embryonic diapauses of variable duration in the eggs of annual fishes. *J. Exp. Zool.* 182: 389-414.

Wyatt T. D. 2003: Pheromones and Animal Behavior. Cambridge University Press, Cambridge.

Yukilevich R. 2012. Asymmetrical patterns of speciation uniquely support reinforcement in *Drosophila*. *Evolution* 66: 1430-1446.

Yukilevich R. & J. R. True 2006. Divergent outcomes of reinforcement speciation: the relative importance of assortative mating and migration modification. *Am. Nat.* 167: 638-654.

Zahavi A. 1975. Mate selection – a selection for a handicap. *J. Theor. Biol.* 53: 205-214.

Zuk M. 1994. Immunology and the evolution of behavior. En Behavioral mechanisms in evolutionary ecology (Real L. A., Ed.). Chicago University Press, Chicago.

APÉNDICE 1. Lista detallada de las localidades y las referencias geográficas de los todos los sitios de colecta para los análisis de: (1) Selección intra e intersexual sobre el tamaño corporal de machos en *Austrolebias charrua* –capítulo 1–; (2) variación en la preferencia de apareamiento y en la proporción de sexos a lo largo de la estación reproductiva en *A. reicherti* –capítulo 3–; (3) morfología de individuos provenientes de la zona de contacto y de las especies parentales – capítulo 4–; (4) morfología de individuos nacidos en cautiverio –capítulo 4–; (5) naturaleza del aislamiento reproductivo entre *A. reicherti* y *A. charrua* –capítulo 5–

Especie	Localidad	Charco	Latitud; Longitud	Análisis	
<i>Austrolebias charrua</i>	Depto. Rocha	SCH2	33°30'08"S; 53°53'03"O	2	
		SCH3	33°51'38"S; 53°54'10"O	1, 3, 5	
		SCH4	33°58'53"S; 53°48'48"O	1, 3, 5	
		SCH5	34°03'37"S; 53°51'19"O	5	
		SCH7	33°54'16"S; 53°42'00"O	1, 2, 3, 5	
		SCH8	33°55'12"S; 53°32'39"O	1, 5	
		SCH12	33°35'18"S; 54°04'50"O	2	
		SCH14	33°35'55"S; 53°44'28"O	2	
		SCH15	33°59'28"S; 53°48'57"O	3, 5	
		SCH16	34°00'16"S; 53°49'01"O	1, 2	
		Depto. Treita y Tres	NCH1	33°15'37"S; 53°53'29"O	2, 3, 4, 5
			NCH3	33°15'31"S; 54°11'01"O	3, 4, 5
			NCH4	33°15'51"S; 54°10'56"O	2, 3, 5
			NCH5	33°15'26"S; 53°53'50"O	2, 3, 5
			NCH17	33°11'01"S; 53°47'42"O	2, 3, 5
			NCH19	33°14'46"S; 53°50'50"O	5
NCH21	33°11'21"S; 53°48'06"O		2, 5		
<i>Austrolebias reicherti</i>	Depto. Treita y Tres	A1	32°55'21"S; 53°54'49"O	2, 3, 4, 5	
		A3	32°56'01"S; 53°53'35"O	3, 4, 5	
		A6	32°58'57"S; 53°52'10"O	2, 3, 4, 5	
		A7	32°58'57"S; 53°52'11"O	2, 5	
		A9	32°55'09"S; 53°55'02"O	3, 5	
		A14	33°01'16"S; 53°50'27"O	2	
		A18	33°01'18"S; 53°50'30"O	2	
		A22	32°57'13"S; 53°55'19"O	3, 5	
		T2	32°46'54"S; 53°38'50"O	3, 5	
		T3	32°46'60"S; 53°38'22"O	2, 5	
		T4	32°46'33"S; 53°39'38"O	2, 3, 5	
		T5	32°46'29"S; 53°44'23"O	2, 5	
		T8	32°45'02"S; 53°36'03"O	3, 5	
		T10	32°46'31"S; 53°44'18"O	2	
T12	32°46'17"S; 53°38'44"O	2, 3, 5			
Zona de contacto	Depto. Treita y Tres	ZC2	33°08'13"S; 53°52'12"O	3	
		ZC5	33°04'02"S; 53°50'35"O	3	
		ZC7	33°04'04"S; 53°50'50"O	3	
		ZC12	33°05'45"S; 53°50'47"O	3	
		ZC14	33°05'32"S; 53°50'37"O	3	
		ZC28	33°10'17"S; 53°46'56"O	3	