



Facultad de Ciencias  
Universidad de la República



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

---

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

**Comportamiento reproductivo en los  
peces anuales *Austrolebias affinis*  
Amato 1986**



*Felipe Librán*

*Orientadora: Dra. Bettina Tassino*

*Tribunal: Dr. Marcelo Loureiro y Msc. Carlos Passos.*

*Diciembre, 2011*

## Índice

<b>1</b>	<b>Resumen</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Agradecimientos</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Introducción</b>	<b>5</b>
3.1	Los peces anuales del género <i>Austrolebias</i> : Un modelo versátil	5
3.2	Selección sexual y cortejo en peces anuales	6
3.3	<i>Austrolebias affinis</i>	8
3.4	Objetivo general	10
3.5	Objetivo específico	10
<b>4</b>	<b>Materiales y Métodos</b>	<b>11</b>
<b>5</b>	<b>Resultados</b>	<b>14</b>
5.1	Caracterización del patrón comportamental	15
5.2	Análisis cuantitativo del comportamiento	19
5.3	Análisis temporal del comportamiento	21
<b>6</b>	<b>Discusión</b>	<b>24</b>
6.1	Cortejo y apareamiento en <i>A. affinis</i>	24
6.2	Análisis temporal	25
6.3	Canales comunicativos involucrados en el cortejo	26
6.4	La compleja taxonomía de las <i>Austrolebias</i>	28
<b>7</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>30</b>

## Resumen

El estudio del comportamiento reproductivo es fundamental a la hora de comprender la historia de vida de las especies. En peces anuales la caracterización de los patrones de cortejo aporta a la comprensión de su particular ciclo de vida. El mantenimiento de la variación cromática y de diseño que caracteriza a los machos de las especies del género *Austrolebias* podría ser producto de la selección sexual mediante la elección de las hembras. El comportamiento sexual adquiere valor desde el punto de vista evolutivo ya que las fuerzas generadoras de cambios en los patrones de conducta, especialmente los relacionados al sistema de señales de apareamiento, juegan un rol importante en el origen y mantenimiento de las especies. En este trabajo se describen cualitativa y cuantitativamente los patrones de comportamiento reproductivo de machos y hembras de *A. affinis*. En videograbaciones de 11 parejas macho-hembra, se reconocieron y definieron unidades comportamentales. Se secuenciaron 27 min de registro y se obtuvo la duración y frecuencia de cada unidad, así como las asociaciones y transiciones entre ellas. Se observó un núcleo de transiciones más frecuente en machos que involucra despliegues sigmoides (DS) y laterales (DL), invitación al enterramiento (IE) y apareamiento (AP) acoplados en el ciclo  $DS \leftarrow \rightarrow DL \rightarrow IE \rightarrow AP$ . Del análisis de frecuencia y duración relativas se desprende que la quietud (Q) en hembras y DL en machos, fueron las categorías más frecuentes y con mayor duración. El cortejo y apareamiento de *A. affinis* difiere en el núcleo de transiciones más frecuente en machos y el grado de enterramiento, respectivamente, del descrito para otras especies estudiadas como *A. charrua* y *A. reicherti*. Este abordaje podría aportar a dilucidar la compleja taxonomía de este género confrontando filogenias preexistentes construidas en base a datos morfológicos y genéticos en función de la alta constancia intraespecífica y variación interespecífica del cortejo y el apareamiento.

## **Agradecimientos**

A mi tutora Bettina por su tiempo, sus aportes y su orientación en todo este tiempo. Por estar siempre ahí para ayudarme con toda la paciencia, gracias!

A Daniel García por enseñarme los primeros pasos dentro del mundo de las *Austrolebias*, por los consejos y toda la buena onda.

A Marcelo Loureiro y Carlos Passos por sus valiosos aportes, correcciones y observaciones que ayudaron a mejorar el trabajo. También por la rapidez y dedicación en la lectura y corrección.

A Seba Serra por las fotos y las enseñanzas en La Charqueada.

A mi hermano Josema de 12 por ayudarme largas horas a pasar planillas de Excel solo para que tuviera tiempo de jugar con él! Sos único Jo! El mejor hermano del mundo!

A mi hermana Ani por ayudarme con la Biblio! Gracias An!!

A mi madre por el apoyo incondicional de siempre, por ayudarme en todas y por siempre darme para adelante. Te amo Ma!

A mis abuelos Esperanza y Aurelio por hacerme quien soy, por tenerme siempre fe. Sin ustedes nada tendría sentido...se que están orgullosos desde arriba...

## **Introducción**

### **Los peces anuales del género *Austrolebias*: Un modelo versátil**

La familia Rivulidae constituye uno de los taxones con mayor número de especies del neotrópico (Vari & Malabarba, 1998). Dentro de ésta, el género *Austrolebias* Costa 1998 comprende un clado muy diversificado de peces anuales que se distribuye a lo largo de la cuenca Paraná-La Plata y el sistema Patos-Merín. La mayoría de las especies del género son endémicas de las áreas subtropicales de América del Sur. Habitan charcos temporales que se forman en invierno y luego se secan en verano (Costa, 2006). Se caracterizan por poseer altas tasas metabólicas (Cardozo, 1999) y un elaborado comportamiento de cortejo (Belote & Costa, 2004; García *et al.*, 2008), que culmina en la deposición de huevos resistentes a la desecación en el sustrato, que eclosionan en la siguiente temporada reproductiva luego de atravesar estadios de diapausa (Wourms, 1972). Dado su ciclo de vida anual, no ocurre solapamiento de generaciones, y por tanto, tampoco cuidado parental. La fragmentación de hábitat generada por los charcos de agua temporales, limita la dispersión de estos organismos resultando en una escasa vagilidad, lo que favorece el aislamiento entre las poblaciones.

El grupo se ha utilizado recientemente como modelo en estudios de diferenciación intraespecífica y especiación (D'Anatro & Loureiro, 2005); genética de la especiación (García *et al.*, 2004); ecología (García-Rodríguez *et al.*, 2002; Arim *et al.*, 2010); biología del desarrollo (Arezo *et al.*, 2007; García *et al.*, 2009); neurogénesis (Fernández *et al.*, 2011); sistemática y biogeografía (Loureiro, 2004); así como también para el estudio del comportamiento (Belote & Costa, 2004; García *et al.*, 2008).

La taxonomía del género *Austrolebias* es una de las más problemática de todos los peces neotropicales (Costa, 2006). En 2006 se reconocían unas 38 especies del género *Austrolebias* (Costa, 2006) cifra que va en aumento debido a nuevos hallazgos (Ferrer *et al.*, 2008; Loureiro *et al.*, 2011). Se cree que este género ha experimentado un proceso

de especiación explosiva de origen reciente (pleistoceno-holoceno) asociado a la compleja dinámica geológica de la región (Loureiro & García, 2006).

### Selección sexual y cortejo en peces anuales

El género *Austrolebias* se caracteriza por su marcado dimorfismo sexual. Los machos de muchas especies exhiben coloración brillante en la región opercular y aletas impares con un patrón de barras verticales o puntos negros en los flancos corporales que es característico de cada especie. Los machos de *A. affinis* en particular, presentan filas de puntos celestes iridiscentes que suelen alinearse para formar estrechas bandas verticales en los flancos de los machos de mayor tamaño. Las hembras en cambio, son amarronadas con matices amarillos o verdosos en la región opercular con puntos de diferente forma esparcidos en los flancos del cuerpo y aletas (Fig. 1). El pronunciado dimorfismo sexual que se observa en todas las especies del género, sugiere la existencia de mecanismos de selección sexual actuando en la diferenciación de este diverso taxón.



**Figura 1.** Macho (izq.) y hembra (der.) de *A. affinis* (Fotos de S. Serra y M. Loureiro)

D'Anatro & Loureiro (2005) encontraron que los machos *A. luteoflamulatus* de distintas poblaciones presentan diferencias morfológicas que permiten discriminarlos claramente entre sí, mientras que las hembras se muestran más uniformes. Esta evidencia respalda la hipótesis de que la selección sexual (probablemente a través de la elección de pareja) podría ser una de las presiones selectivas más importantes a la hora de explicar, por ejemplo, el origen de los divergentes patrones de coloración de los machos.

La selección sexual surge de la competencia por apareamientos, donde, en general, los machos intentan maximizar el acceso a las parejas (Andersson & Iwasa, 1996). Por lo tanto, los llamativos despliegues de cortejo y conspicuos colores podrían ser caracteres sexualmente seleccionados aun significando una posible mayor exposición a predadores. El mantenimiento de los variados patrones de puntos y bandas, así como la variación cromática, podría ser producto de la selección sexual a través de las preferencias de las hembras.

A pesar de las diferencias morfológicas interespecíficas mencionadas, los criterios basados en patrones cromáticos y morfométricos no son suficientes para resolver con claridad la taxonomía del grupo. Aun combinando abordajes morfológicos y genéticos no se ha logrado llegar a consenso particularmente en el caso de especies cercanamente emparentadas (Costa, 2006; Loureiro, 2004; García, 2006).

Este complejo escenario, y las mencionadas limitaciones de los métodos morfológicos y genéticos, hacen necesaria la incorporación de un método adicional, que se sume a los ya citados, y ayude a resolver la filogenia del grupo. Dada la alta constancia intraespecífica y variación interespecífica del cortejo, los estudios sobre el comportamiento reproductivo pueden aportar al esclarecimiento de taxonomías (Gittleman & Decker, 1994). El comportamiento sexual es muy relevante desde el punto de vista evolutivo ya que las fuerzas generadoras de cambios en los patrones de conducta, especialmente los relacionados al sistema de señales de apareamiento, juegan un rol muy importante en el origen y mantenimiento de las especies (Butlin & Richie, 1994).

El cortejo es definido como los elementos de conducta involucrados en la formación de la pareja (Heymer, 1982). Es una forma de comunicación cuyos roles principales son la sincronización, estimulación y orientación espacial de la pareja, así como la inhibición de los comportamientos agresivos (Krebs & Davies, 1993). Es modelado a través de la selección sexual, permite el reconocimiento de coespecíficos y establece por lo tanto un

mecanismo de aislamiento reproductivo. Tanto el cortejo como el apareamiento se caracterizan por ser comportamientos estables y altamente estereotipados dentro de la especie (Tassino & Berois, 2010). Estas características permiten realizar estudios comparativos mediante definiciones de unidades comportamentales y análisis de secuenciación (Lehner, 1979). Por todo esto, se presenta como una herramienta extremadamente útil para resolver filogenias en casos donde la variación morfológica es muy sutil (por ejemplo especies crípticas) y/o cuando fenómenos naturales, como una región de compleja dinámica geológica, producen escenarios que hacen difícil la interpretación de la información genética. En las aves de la familia Pipridae, por ejemplo, se observó una alta congruencia entre filogenias basadas en caracteres morfológicos (características de la siringe) y aquellas construidas en base a características comportamentales (Gittleman & Decker, 1994).

Vaz-Ferreira et al. (1964) realizaron una breve descripción del comportamiento reproductor de algunas especies del género *Austrolebias*. En un estudio posterior Vaz-Ferreira & Sierra (1971) definieron unidades componentes de actividades socio-reproductivas para las especies *A. melanotaenia*, *A. viarius*, *A. luteoflammulatus*, *A. bellotii* y *A. nigripinnis*. Belote & Costa (2004) analizaron el comportamiento reproductivo de *A. cyaneus*, *A. nigripinnis*, *A. charrua*. Finalmente, García et al. (2008) realizaron un análisis del comportamiento reproductivo de *A. reicherti*. Estos trabajos han reportado conservación en el cortejo y apareamiento de las especies del grupo. Sin embargo, de los trabajos mencionados, sólo el último analizó el comportamiento reproductivo desde un punto de vista cuantitativo, además de los estudios cualitativos.

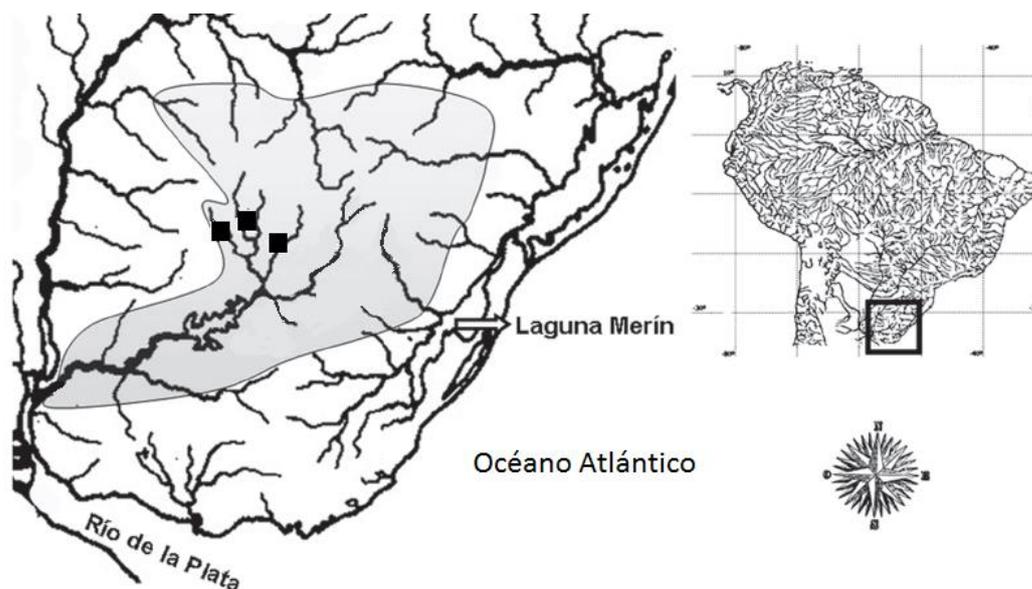
### ***Austrolebias affinis***

La especie *Austrolebias affinis* Amato 1986 se incluye dentro del grupo de especies *A. alexandri* Costa 2002. Los machos, más grandes que las hembras, pueden superar los 30mm de longitud, (Costa, 2006). Desde el punto de vista morfométrico, difiere del resto de las especies de este grupo en la marcada convexidad del perfil anterodorsal del

tronco de las hembras y porque el margen posterior de cada aleta pectoral alcanza la vertical entre la papila urogenital y la base del segundo radio de de la aleta anal en machos, al igual que *A. juanlangi* y *A. duraznensis*. Difiere de estos últimos por tener más neuromastos en las series infraorbitales y por poseer puntos claros en la totalidad de las aletas impares (y no restringidos a la porción basal) (Costa, 2006).

Si bien el área de distribución de *A. affinis* está acotada a la cuenca del Río Tacuarembó (Loureiro, 2004; Costa, 2006), recientemente se ha propuesto un área de distribución más extensa para el llamado “grupo *affinis*” que incluye las de algunas especies cercanamente emparentadas con *A. affinis* como *A. juanlangi*, *A. duraznensis*, *A. cyaneus*, *A. periodicus* y *A. litzi* (Loureiro et al., 2011). Esta propuesta se basa en que no existen diferencias morfológicas suficientes que permitan, con el estado actual del conocimiento, distinguir entre ejemplares colectados en distintas localidades del país atribuidos a las especies antes mencionadas y *A. affinis*. Sugieren por tanto, que podría tratarse de parte de la variación intraespecífica propia de *A. affinis* y no necesariamente de especies distintas en todos los casos (Fig. 2). Clavijo (2008), mediante un detallado análisis morfométrico, concluyó que *A. juanlangi* y *A. duraznensis* no serían especies válidas sino que deberían considerarse sinónimos de *A. affinis*. En este trabajo consideraremos a los ejemplares utilizados (atribuidos a la especie *A. duraznensis* por Costa, 2006 según el lugar de colecta) como *A. aff. affinis*, nombrada de aquí en adelante como *A. affinis*.

Nos encontramos claramente frente a un caso en el que los abordajes morfológicos han llevado a conclusiones divergentes. El estudio de las características del cortejo y el apareamiento en poblaciones de *A. affinis* de distintas localidades del país aportaría a resolver si se trata de una especie única (como proponen Clavijo, 2008 y Loureiro et al., 2011), o de varias especies (Costa, 2006), utilizando un criterio etológico basado en el concepto biológico de especie.



**Figura 2.** Mapa de distribución de la especie en estudio. Los cuadrados muestran la ubicación de *A. affinis* según Costa, 2006 y la zona sombreada indica la distribución del grupo de especies *A. affinis* (modificado de Loureiro et al., 2011)

### Objetivo general

El objetivo de este trabajo es la descripción y análisis de los patrones de comportamiento reproductivo de machos y hembras de una población del departamento de Durazno de la especie *Austrolebias affinis*, desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo, a través de unidades comportamentales asociadas al mismo.

### Objetivo específico

Proponer un nuevo método para el análisis del comportamiento reproductivo de los peces anuales del género *Austrolebias*, que permita realizar comparaciones fiables entre especies, y que eventualmente permita el uso del mismo como herramienta taxonómica.

## **Materiales y Métodos**

Los peces fueron colectados mediante pesca con red de mano, en un bañado aldeaño al Arroyo Sarandí en el Departamento de Durazno (32°41'S 55°31'W, fig. 3), en el mes de octubre de 2010 y trasladados al acuario de la Facultad de Ciencias.



**Figura 3.** Zona de colecta (foto de S. Serra)

Los peces se mantuvieron hasta el momento de la experimentación, en peceras con agua a temperatura ambiente constante de 19°C y fotoperíodo natural en el acuario de la Facultad de Ciencias. Se alimentaron con *Tubifex sp.*, y estuvieron separados por sexo hasta el momento de la experimentación: los machos en peceras individuales y las hembras en una pecera común, en todos los casos con oxigenación constante.

Las experiencias se realizaron en una pecera de 12,5 x 39,5 x 16 cm con el fondo cubierto de fibra de coco (8-10cm de altura), como sustrato necesario para el apareamiento y la oviposición. Se realizaron 11 enfrentamientos macho-hembra, en cada uno de los cuales se colocó primero una hembra y a los 2 min. un macho, registrándose la interacción entre ambos durante 27 min. con una cámara Sony Handycam DCR-SR68. Cada individuo se utilizó en una sola prueba. Una vez finalizados los registros las parejas fueron trasladadas nuevamente al acuario de la Facultad de

Ciencias donde permanecieron separadas en peceras individuales para futuras experiencias.

A partir de las observaciones *ad libitum* de los registros, se identificaron las unidades del comportamiento reproductivo. Se homologaron algunas ya descritas para otras especies del género (García et al., 2008) y se definieron nuevas categorías (Cuadro 1). Se realizó la secuenciación de las unidades registradas en machos y hembras. A partir de esa información se cuantificó la frecuencia y duración de las unidades y se analizó la transición de las unidades de comportamiento para ambos sexos. Se elaboraron matrices de transición entre las unidades efectuadas por cada individuo, a partir de las cuales se construyeron diagramas de flujo entre unidades para cada sexo, donde se representan las transiciones de mayor frecuencia. Las transiciones poco frecuentes (menores a 20) fueron excluidas del diagrama para una mejor visualización de los circuitos relevantes. La asociación entre las unidades comportamentales se analizó mediante una modificación del coeficiente de asociación de Dice (siguiendo a Costa & González, 1986), obteniéndose dendogramas mediante media aritmética no ponderada y ligamiento promedio (UPGMA) (Crisci & Armengol, 1983). También se registraron las latencias de apareamiento e invitación al enterramiento para las 11 parejas.

Además se realizó un análisis temporal de las secuencias al reconocer diversas fases mutuamente excluyentes:

- Fase 1** (inicial): Desde el comienzo del enfrentamiento hasta la aparición de la primera unidad activa de cortejo (DS o IS generalmente).
- Fase 2** (de cortejo): Desde el final de la fase inicial hasta la ocurrencia del primer apareamiento exitoso.
- Fase 3** (de apareamiento): Desde el primer apareamiento hasta la espera posterior al último apareamiento exitoso.
- Fase 4** (tardía): Comprendió todas las unidades desde la espera antes mencionada hasta la finalización del registro.

Las frecuencias relativas se obtuvieron dividiendo el número de apariciones de cada unidad sobre el total de unidades de cada fase. Del mismo modo se obtuvieron las

duraciones relativas dividiendo el tiempo total dedicado a cada unidad en cada fase sobre la duración total de la fase.

## **Resultados**

**Cuadro 1.** Descripción de unidades de comportamiento. (#) Unidades previamente descritas para el comportamiento sexual de *A. reicherti* (García et al. 2008). (\*) Nuevas unidades.

### **Machos:**

#Despliegue lateral (DL): Quieto, extiende las aletas impares. Puede presentar distinta intensidad, dependiendo de si vibra o no las aletas.

#Despliegue sigmoide (DS): Realiza ondulaciones del cuerpo.

#Invitación al seguimiento (IS): Nada una corta distancia y espera que la hembra lo siga. Si ésta lo hace entonces continúa el nado. Si no lo hace vuelve a su lado y comienza un nuevo despliegue.

#Invitación al enterramiento (IE): Se coloca casi vertical, con la cabeza sobre el sustrato y hace vibrar las aletas impares. Puede presentar distinta intensidad dependiendo del ángulo de inclinación del cuerpo.

#Quietud (Q): Permanece inmóvil sin extender las aletas.

#Espera (E): Se queda un tiempo quieto sobre el sustrato con las aletas replegadas. Se da siempre luego del apareamiento.

#Nado orientado (NO): Nada en dirección a la hembra.

#Apareamiento (AP): Macho y hembra se entierran completamente. Generalmente sucedido por una espera.

\*Despliegue sigmoide circular (DSC): Realiza ondulaciones del cuerpo rodeando a la hembra.

\*Intento de apareamiento (IAP): Enterramiento parcial. Sucedido generalmente por unidades activas de cortejo como DL o DS.

\*Indeterminado (I): Movimiento errático en contacto con las paredes de la pecera a más de dos cuerpos de distancia de la hembra.

\*Indeterminado cercano (ICE): Movimiento errático en contacto con las paredes de la pecera a menos de dos cuerpos de distancia de la hembra.

\*Nado errático (NE): Nada sin orientación aparente.

\*Enterrado (EN): Permanece bajo el sustrato sin la hembra. Generalmente se da luego de un apareamiento o un intento de apareamiento.

**Hembras:**

#Quietud (Q): Diferente a la quietud del macho. No permanece necesariamente inmóvil, ni con las aletas replegadas. Aparece cuando la hembra no realiza ninguna de las otras unidades.

#Aceptación al seguimiento (AS): Sigue al macho luego de que este realiza IS.

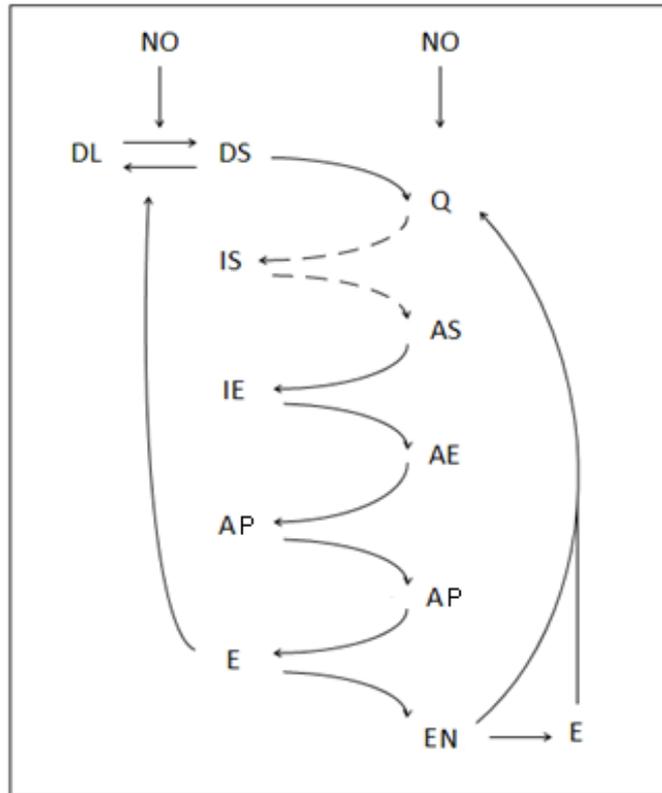
#Aceptación al enterramiento (AE): Se coloca al costado del macho y lo toca con su cuerpo, luego de que éste realiza IE.

\*Alejamiento (A): Nada en dirección opuesta a la ubicación del macho.

EN, E, NO, I, ICE, AP y NE son unidades compartidas y homólogas a las de los machos.

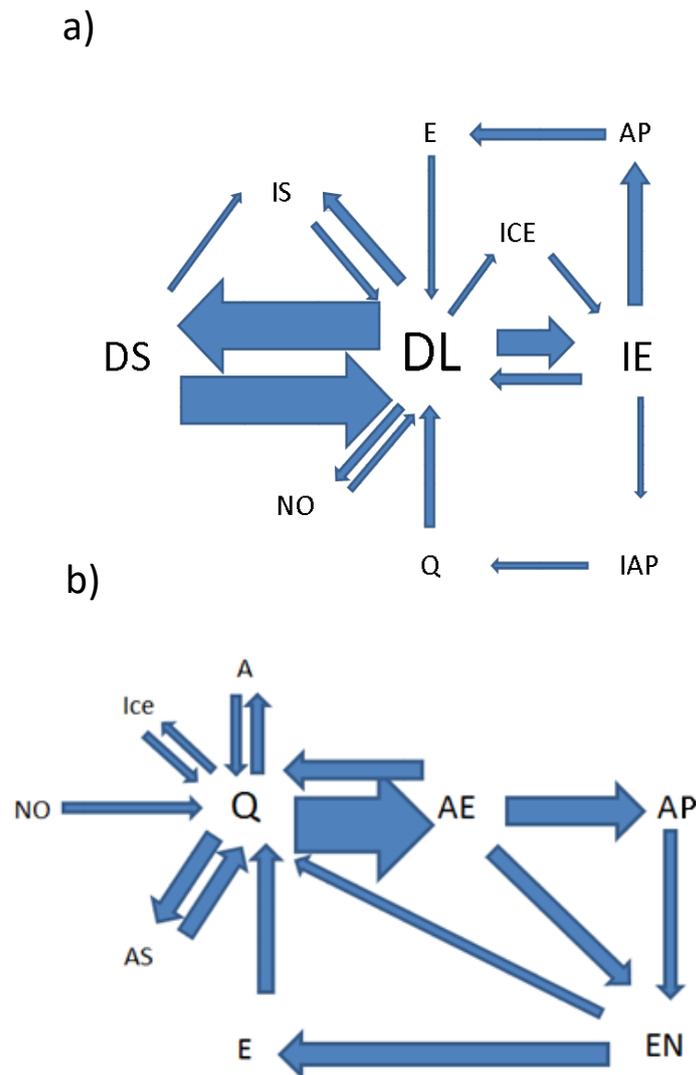
**Caracterización del patrón comportamental**

Los encuentros comenzaron generalmente con ambos individuos en quietud (Q) hasta que se produjo el nado orientado (NO) de alguno de ellos. Luego el macho intensificó paulatinamente sus colores y adoptó una postura activa de cortejo, en la que fue frecuente la aparición de despliegues laterales (DL) y sigmoides (DS), así como invitaciones al seguimiento (IS). Dada la receptividad de la hembra se produjo una invitación al enterramiento (IE). A su vez, las hembras receptivas realizaron una aceptación al enterramiento (AE). Finalmente se produjo el apareamiento (AP) que involucró el enterramiento total de ambos individuos generalmente por un tiempo mayor a 20 s, terminando con una espera del macho (E) y una permanencia de la hembra enterrada bajo el sustrato (EN) (Fig. 4). Las líneas punteadas representan unidades que pueden aparecer o no en la secuencia comportamental.



**Figura 4.** Representación en esquema de la secuencia de apareamiento en *A. affinis*, a la izquierda las unidades de los machos y a la derecha las de las hembras. Modificado de Garcia et al., 2008.

El análisis de las secuencias de unidades comportamentales revela un importante núcleo de transiciones, que se representa en los diagramas de flujo (Fig. 5). En el caso de los machos, las transiciones más frecuentes fueron de DS a DL y viceversa, seguidas del pasaje de esta última hacia IE (Fig. 5a) A su vez la unidad de salida más frecuente desde IE fue el apareamiento. De esta forma se observa un ciclo **DS $\leftrightarrow$ DL $\rightarrow$ IE $\rightarrow$ AP $\rightarrow$ E $\rightarrow$ DL**. En varias oportunidades la unidad IE derivó en un intento de apareamiento (IAP) que culminó a su vez generalmente en quietud del macho y en un nuevo DL conformando el ciclo **DL $\rightarrow$ IE $\rightarrow$ IAP $\rightarrow$ Q $\rightarrow$ DL**.

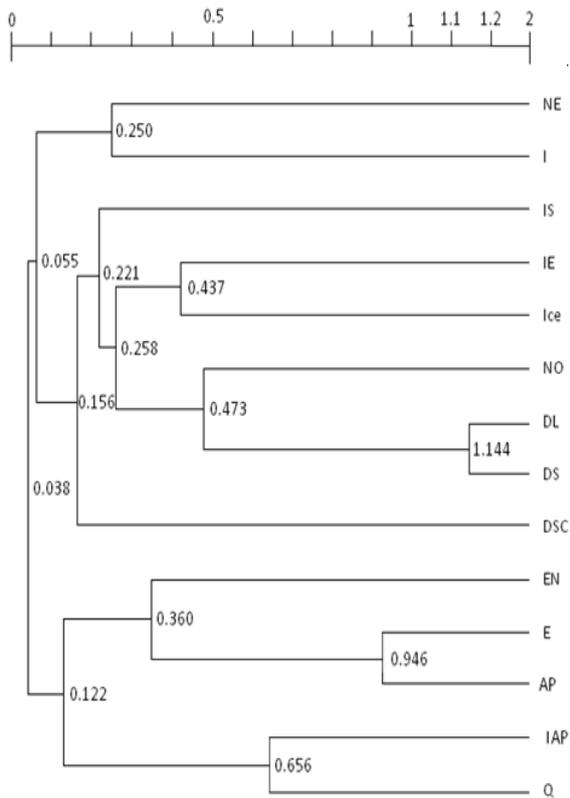


**Figura 5.** Diagramas de flujo de las unidades de los machos (a) y hembras (b) de *A. affinis*.

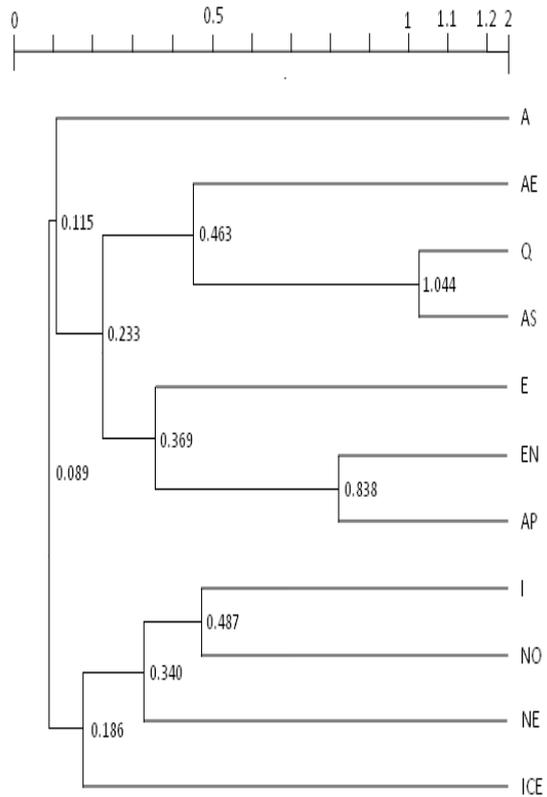
En las hembras (Fig. 5b) destaca el circuito que va de la quietud al apareamiento pasando por la aceptación al enterramiento, en el ciclo  $Q \rightarrow AE \rightarrow AP \rightarrow EN \rightarrow E \rightarrow Q$ . Es notoria la posición central de la quietud en el esquema de comportamiento de la hembra durante el cortejo, donde dicha unidad media la mayoría de las transiciones.

La asociación entre unidades, independientemente de la direccionalidad, se manifiesta complementariamente en los valores del coeficiente de asociación de Dice (Fig. 6). Los dendrogramas revelan que en los machos la mayor asociación aparece entre DL y DS, seguido por E y AP (1,144 y 0.946 respectivamente). En el caso de las hembras las unidades más asociadas son Q y AS con un valor de 0,994.

a)



b)



**Figura 7.** Dendrogramas por ligamiento promedio (UPGMA) para machos (a) y hembras (b) obtenidos a partir de una modificación del coeficiente de Dice (Costa y Gonzalez, 1986).

Todos los parámetros de cortejo y apareamiento considerados se mostraron altamente variables entre parejas (Tabla 1).

**Tabla 1.** Parámetros del comportamiento de cortejo y apareamiento

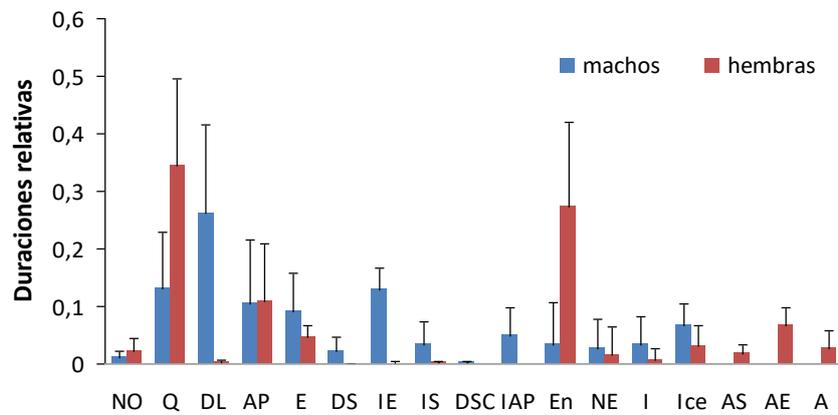
Pareja	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Latencia IE (seg)	339	358	187	352	218	189	276	346	469	257	206
Latencia AP(seg)	345	747	189	534	1013	210	---	600	1142	262	547
Frecuencia de apareamientos (seg)	7	3	3	3	1	7	0	4	2	3	4
Duración de apareamientos (seg)											
1	309	30	29	10	23	100		33	99	132	18
2	34	35	21	23		20		20	46	127	23
3	75	26	20	29		103		25		44	20
4	38					62		30			26
5	30					20					
6	60					23					
7	36					23					
Media	83	30	23	21	23	50		27	73	101	22
Mediana	38	30	21	23	23	23		28	73	127	22
Desvío	101	5	5	10	0	38		6	37	49	4
T total (seg)	582	91	70	62	23	351	0	108	145	303	87

La latencia a la IE presentó un rango entre 187 y 469 seg. (media  $\pm$  desvío estándar = 291  $\pm$  90 seg.) Por otro lado las latencias al AP varían en un rango de entre 189 y 1142 seg. (media  $\pm$  desvío estándar = 559  $\pm$  329 seg.). También mostraron una alta variabilidad el número de apareamientos (de 0 a 7) y el tiempo total dedicado al apareamiento con un rango entre 0 y 582 seg. (media  $\pm$  desvío estándar = 167  $\pm$  177 seg.).

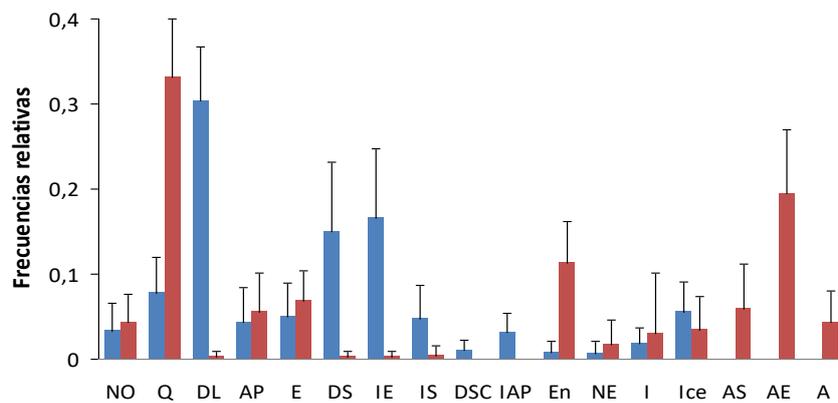
### **Análisis cuantitativo del comportamiento**

En las hembras, la unidad que presentó mayor frecuencia fue Q (>30%), seguida por AE (con casi un 20%) y EN (>10%), mientras que en los machos, la unidad que presentó los valores más altos de frecuencia fue DL (30%), seguida por IE (>15%) y DS (>15%), como indica el histograma de frecuencias relativas (Fig. 9).

a)



b)



**Figura 9.** Duraciones (a) y frecuencias (b) relativas de las distintas UC para machos y hembras.

Respecto a la duración relativa de las unidades analizadas en hembras (Fig. 9b), Q aparece como la unidad más representada ocupando 1/3 del tiempo total. Otra unidad destacada es EN con más del 25% y finalmente AP con cerca del 10%. En los machos destaca nuevamente DL con más del 25%, seguida por IE y Q ambas con más del 10%.

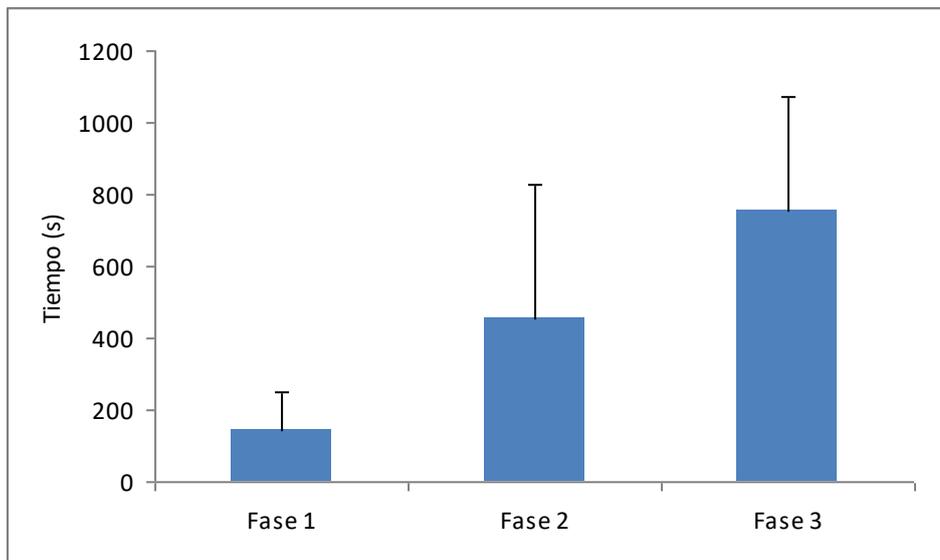
## Análisis temporal del comportamiento

La duración de las distintas fases, así como la frecuencia de aparición de las categorías DSC e IAP fue muy variable en las 11 parejas (Tabla 2).

**Tabla 2.** Parámetros considerados en el análisis temporal

Pareja	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Duración fase 1 (seg)	236	72	19	63	60	178	154	298	336	87	96
Duración fase 2 (seg)	109	1067	170	475	955	32	-	332	808	175	455
Duración fase 3 (seg)	920	-	963	940	98	927	-	604	-	-	847
Frecuencia de DSC	0	2	0	0	0	0	3	0	1	3	2
Frecuencia de IAP	3	5	8	1	6	2	1	0	4	1	2

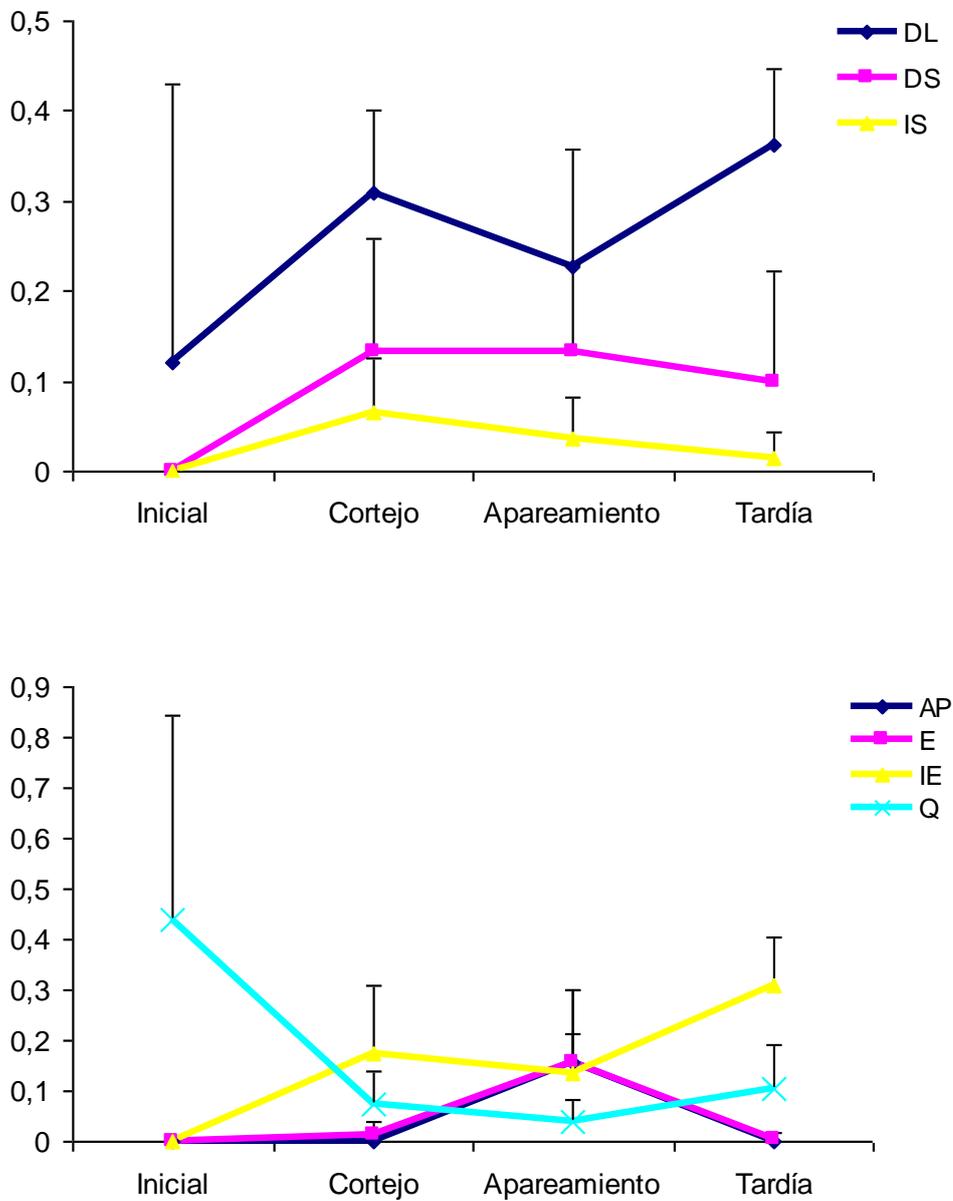
A pesar de la variabilidad en la duración de las fases entre las 11 parejas, la media de la fase inicial fue la de menor duración y la media de la fase de apareamiento la de mayor (Fig. 11).



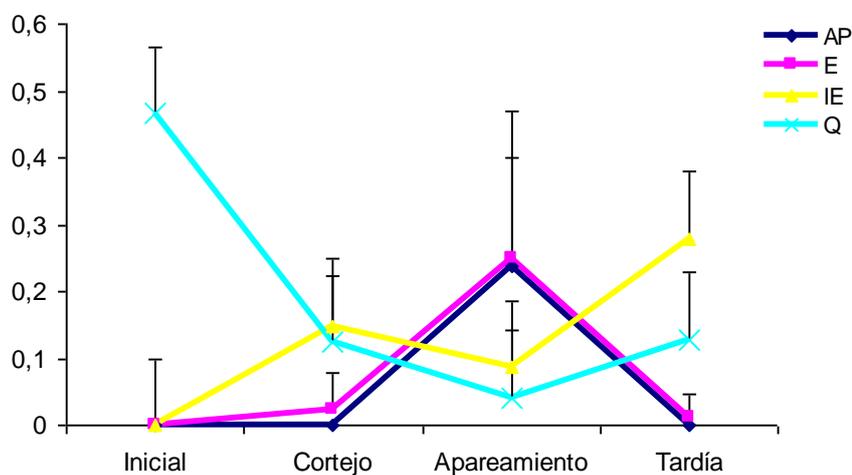
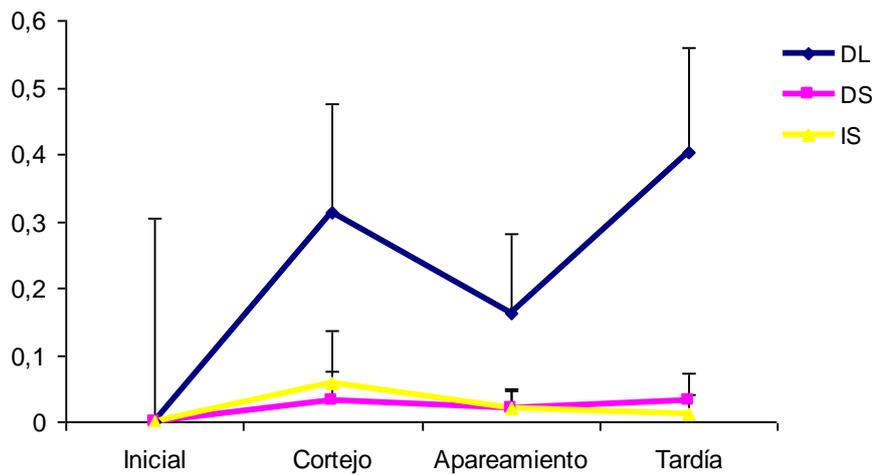
**Figura 11.** Histogramas de duraciones absolutas de las tres primeras fases.

Con respecto al análisis temporal de las unidades en machos, la unidad Q presentó mayor frecuencia y duración relativa durante la fase inicial. En la fase de cortejo se

observó un importante aumento de la frecuencia y tiempo dedicado a las categorías DL, IE, DS e IS así como un importante descenso de la quietud (Fig. 12 y 13).



**Figura 12.** Frecuencia relativa de algunas categorías significativas en machos para las cuatro fases definidas en este estudio.



**Figura 13.** Duración relativa de algunas categorías significativas para las cuatro fases definidas en este estudio.

En la fase de apareamiento los machos invirtieron la mayor parte del tiempo en las unidades AP y E, que a su vez se encontraron en alta frecuencia. La fase tardía se caracterizó por el aumento en la frecuencia y duración de Q, DL e IE acompañado del descenso de las unidades DS e IS (Fig. 12 y 13).

## **Discusión**

### **Cortejo y apareamiento en *A. affinis***

El comportamiento reproductivo de *A. affinis*, analizado a través de la secuenciación y cuantificación de unidades comportamentales, involucró intensos despliegues del macho y un rol evaluador de la hembra. Se evidenció la aparición de unidades ya descritas para otras especies del género y se identificaron nuevas unidades: Despliegue sigmoide circular (DSC) e Intento de apareamiento (IAP). El comportamiento reproductivo de *A. affinis* puede dividirse en: una fase inicial, que incluye parcial o totalmente el período de aclimatación; una fase de cortejo, donde se da la sincronización conductual de la pareja; una fase de apareamiento caracterizada por la aparición de períodos reiterados de enterramiento; y finalmente una fase tardía donde disminuyen los despliegues de cortejo y no se registran apareamientos.

El cortejo y apareamiento de *A. affinis* se corresponde en términos generales con el patrón cualitativo propuesto para el género *Austrolebias* por Belote & Costa (2004): se observaron despliegues de cortejo (lateral, sigmoide y sigmoide circular), invitación al enterramiento y un período variable bajo el sustrato. La definición de unidades comportamentales, sin embargo, habilita los análisis cuantitativos y resulta más adecuada para el estudio del comportamiento reproductivo del género ya que los “despliegues de cortejo” de Belote & Costa (2004) tienen frecuencias diferentes y pueden aparecer en distintas secuencias (García et al., 2008). En este marco conceptual, el abordaje del presente estudio permitió la identificación más precisa y detallada de los patrones comportamentales, y a su vez, facilitó la comparación con otras especies.

El cortejo y apareamiento de *A. affinis* difiere en el núcleo de transiciones más frecuente en machos y el grado de enterramiento, respectivamente, del descrito para *A. reicherti*. Las categorías DSC, EN e IAP no están descritas para *A. reicherti* por lo tanto no es posible comparar entre especies en este sentido.

## Análisis temporal

El reconocimiento de cuatro fases mutuamente excluyentes a lo largo del desarrollo del comportamiento reproductivo, en todas las parejas observadas, condujo a un análisis temporal de las secuencias. En un estudio previo García et al. (2008) analizaron temporalmente el comportamiento reproductivo de la especie *A. reicherti* dividiendo el tiempo de registro total (30 min.) en 3 períodos iguales. Sin embargo, la alta variabilidad encontrada en el presente estudio tanto en la aparición de los despliegues activos de cortejo (lateral y sigmoide), como en las latencias a la invitación al enterramiento y al apareamiento en las distintas parejas, justifica la adopción de una división temporal del comportamiento reproductivo de *A. affinis* en base a la aparición de unidades comportamentales. Esta división en fases permite identificar en que momento aparece cada categoría o grupo de unidades a lo largo de una secuencia comportamental. Esto hace posible, por un lado, describir el cortejo con mayor precisión, y por otro, brinda valiosa información para análisis comparativos entre especies. De haber utilizado una división temporal arbitraria el solapamiento de información entre parejas en distintas fases hubiese obstruido la visualización de los patrones comportamentales durante el cortejo. De todas maneras, al final del registro, 4 de las 11 parejas no habían concluido la fase de apareamiento, lo cual podría indicar que el tiempo de registro considerado no fue suficiente.

Actualmente, se desconoce si existe variación significativa en el grado de enterramiento entre las especies del género *Austrolebias*, pero se investiga al respecto (García, com. pers.). Es posible que, de existir tal variación, se encuentre asociada a las diferencias en la consistencia y penetrabilidad del sustrato en las distintas regiones de la zona de distribución del género. Dado la alta frecuencia de intentos de apareamiento registrados (fig. 9b), el sustrato utilizado en este estudio (fibra de coco) pudo no tener la profundidad o consistencia más apropiada para el desarrollo del comportamiento reproductivo de estos peces. El diseño experimental en futuros análisis comparativos deberá tomar en cuenta esta variable.

Dos de las 11 hembras analizadas realizaron despliegues sigmoides (DS), laterales (DL), invitación al enterramiento (IE) o invitación al seguimiento (IS), categorías observadas durante la fase inicial. En estas parejas la duración de la fase inicial superó los 200 seg. siendo la media para esta fase de 140 seg. Es posible que la hembra realice estas categorías a modo de estímulo para que el macho comience un cortejo activo. En ambos casos el macho fue receptivo a estos despliegues de la hembra y pasó a cortejar activamente dando inicio a la fase de cortejo, lo cual respalda esta sugerencia. Este comportamiento de las hembras ya había sido descrito en otras especies del género (García, 2005).

Respecto a las características de las fases determinadas en este estudio, es probable que la duración de la fase inicial esté sobreestimada en algunos casos debido al estrés producido por la manipulación previa de los animales al pasar de una pecera individual a la pecera experimental. En la fase de cortejo el macho realiza un despliegue activo, intenso y costoso energéticamente que contrasta con lo ocurrido en la fase de apareamiento donde bajan los despliegues activos de cortejo. El cambio en el flujo de asignación de energía entre fases, desde los despliegues de cortejo, al enterramiento y la fertilización de los óvulos, podría deberse a la finalización de la fase evaluatoria. Algunas parejas alcanzaron la fase tardía donde se produjo un aumento de la quietud en los machos y una disminución de los despliegues de cortejo, excepto de IE y DL.

### **Canales comunicativos involucrados en el cortejo**

Además del canal visual analizado en este estudio, se ha demostrado la existencia de señales de refuerzo a través del canal químico y/o acústico, en el cortejo de peces (Hankison & Morris, 2003; Belote & Costa 2002). Las hembras de la especie *Xiphophorus pygmaeus*, por ejemplo, prefieren las señales químicas de machos de su misma especie a las enviadas por machos de la especie simpátrida *X. cortezi* (Hankison & Morris, 2003).

Los charcos donde habitan los peces anuales presentan distinto grado de turbidez, por lo cual es posible que algunas especies de *Austrolebias* utilicen otras vías comunicativas

durante el cortejo además de la visual. Recientemente se demostró la existencia de señales químicas en el cortejo de *A. reicherti* (C. Passos, com. pers.). Éstas podrían actuar a una mayor distancia y durante más tiempo que las señales visuales. En estudios futuros sería importante analizar la posible comunicación por esta vía que no fue tomada en cuenta en el presente.

Belote & Costa (2002) encontraron que los machos de *Cynolebias albipunctatus* (género cercanamente emparentado con *Austrolebias*) producen, mediante movimientos cefálicos, sonidos que atraen a la hembra. En el caso de *A. affinis* es posible que las vibraciones de las aletas impares realizadas por el macho, estimulen los mecanorreceptores ubicados a lo largo del sistema de la línea lateral de las hembras. Particularmente sería interesante analizar las consecuencias vibratorias del despliegue sigmoide circular (DSC), de alta intensidad, solo descrito hasta ahora para *A. affinis*. Actualmente, se está llevando a cabo un estudio que utiliza hidrófonos para explorar el canal acústico en *A. affinis* (Ziegler & Serra, com. pers.). Profundizar los estudios sobre este canal comunicativo podría arrojar información sobre la importancia de estas vibraciones y ondulaciones durante los despliegues de cortejo.

La utilización de señales multimodales permitiría una evaluación más precisa de la calidad de los machos (Jhonstone, 1996). Las elevadas frecuencias y duraciones relativas de la quietud de las hembras de *A. affinis* sugiere un importante rol evaluatorio en el cortejo, lo mismo sucede en las hembras de *A. reicherti* (García et al., 2008). La quietud de las hembras podría asegurar el reconocimiento de machos coespecíficos y/o su calidad, aumentando así las probabilidades de éxito reproductivo, esto podría estar asociado al escaso número de óvulos que producen las hembras en un día. El claro rol evaluatorio de las hembras durante el cortejo podría estar asociado al procesamiento de la estimulación multimodal de los machos a través de los canales visual, químico y acústico (mecánico-vibratorio).

El importante dimorfismo encontrado en el comportamiento sexual de *A. affinis*, con machos que realizan activos despliegues de cortejo y hembras que evalúan, podría asociarse con un sistema de apareamiento poligínico donde el mayor esfuerzo de apareamiento lo hace el macho. Dada la inversión energética diferencial asociada a la anisogamia y el sistema de apareamiento poligínico, la correcta elección de los machos por parte de las hembras es fundamental para maximizar el éxito reproductivo (Halliday, 1994).

### **La compleja taxonomía de las *Austrolebias***

La taxonomía del grupo ha sido estudiada en base a datos morfológicos, cromosómicos y de ADN mitocondrial (Costa, 2006; García et al., 2000; García, 2006; Loureiro, 2004). Sin embargo estos trabajos arrojan resultados contradictorios en muchos casos, haciendo de la reconstrucción filogenética una ardua tarea.

La alta constancia intraespecífica y variación interespecífica de los comportamientos de cortejo y apareamiento los hace caracteres valiosos para ser utilizados en estudios taxonómicos. Profundizar el estudio de estos comportamientos podría arrojar luz sobre la sistemática del grupo confrontando filogenias preexistentes construidas en base a datos morfológicos y genéticos.

Este estudio propone la utilización de un nuevo método de análisis del comportamiento reproductivo del género *Austrolebias* que involucra abordajes cuali y cuantitativos junto con una división temporal del comportamiento en fases no arbitrarias mutuamente excluyentes basadas en aparición o ausencia de unidades. Este método presenta importantes ventajas desde el punto de vista comparativo debido a que permite una descripción detallada del comportamiento adecuada para observar diferencias interespecíficas.

El análisis comparativo del comportamiento reproductivo de distintas especies podría ser una valiosa herramienta filogenética, que sumada a los datos genéticos y morfológicos permitiría consensuar la filogenia del grupo. Particularmente en el caso del “grupo *affinis*” el criterio etológico que aquí se propone permitiría determinar si existen diferencias vinculadas a los mecanismos de aislamiento reproductivo que justifiquen la identificación de numerosas especies como propone Costa (2006), o si alguna, o varias de ellas, deberían considerarse sinónimos de *A. affinis* (Clavijo, 2008; Loureiro et al., 2011),

Una perspectiva que surge de este trabajo es analizar cualitativa y cuantitativamente el comportamiento reproductivo de ejemplares colectados en toda la zona de distribución del “grupo *affinis*” definida por Loureiro et al. (2011) para determinar si las especies *A. litzi*, *A. periodicus*, *A. duraznensis*, *A. juanlangi* y *A. cynaeus* son especies válidas o deben considerarse sinónimos de *A. affinis*. Para ello será necesario analizar no sólo las señales visuales sino también estudiar los canales comunicativos químico y acústico. Además será conveniente llevar a cabo enfrentamientos heteroespecíficos, analizando la viabilidad de los híbridos, ya que hay evidencia de cruzamiento entre especies cercanamente emparentadas de *Austrolebias* como *A. charrua* y *A. reicherti* (Passos, com. pers.).

La complejidad asociada a la definición de las especies es un problema de larga data asociada a las limitaciones de los conceptos de especie. Se hace por tanto fundamental la colaboración entre los análisis comportamentales, morfológicos y genéticos para abordar este tema con éxito, especialmente en un grupo tan particular y tan importante para la investigación científica como los peces del género *Austrolebias*.

## **Bibliografía**

- Amato, L. H. 1986. Seis especies nuevas del género *Cynolebias* Steindachner. 1876, del Uruguay y Paraguay (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo 162: 1-27.
- Andersson, M. & Y. Iwasa 1996. Sexual selection. Trends in Ecology & Evolution 11(2):53-58.
- Arezo, M. J., S. D'Alessandro, N. Papa, R. Sá & N. Berois 2007. Sex differentiation pattern in the annual fish *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Tissue Cell, 39: 89-98.
- Arim, M., S.B. Abades, G. Laufer, M. Loureiro & P. Marquet 2010. Food web structure and body size trophic position and resource acquisition. Oykos 119: 147-153.
- Belote, D. F. & W. J. E. M. Costa 2002. Reproductive behavior patterns in the neotropical annual fish genus *Sympsonichthys* Carvalho, 1959 (Cyprinodontiformes, Rivulidae): description and phylogenetic implications. Boletim do Museu Nacional, Nova Série, Rio de Janeiro. 489:1-10.
- 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). Boletim do Museu Nacional, Nova Série, Rio de Janeiro, 514: 1-7.
- Butlin, R. K. & M. G. Ritchie 1994. Behaviour and speciation. In: Slater PJB, Halliday TR, eds. Behaviour and Evolution. Camb: Cambridge University Press, 43–79.ridge
- Cardozo, V. 1999. Tasa Metabólica y excreción del nitrógeno en peces anuales *Cynolebias viarius* (Cyprinodontiformes). Unpublished M.Sc. Thesis, PEDECIBA, Universidad de la República, Montevideo.
- Clavijo-Baquet, S. 2008. Sistemática del grupo de especies *affinis* (Rivulidae: *Austrolebias*). Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas (UDELAR-PEDECIBA).
- Costa, F. G. y L. A. González 1986. Estructura del comportamiento del macho de *Lycosa maliciosa* (Aranea, Lycosidae) en presencia de feromona sexual. Revista Brasileira de Biología 46: 477-487.
- 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. J. E. M. 2002. Monophyly and phylogenetic relationships of the neotropical annual fish genera *Austrolebias* and *Megalebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Copeia* 4: 916-927.
- Costa, W. J. E. M. 2006. The South American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, descriptive morphology and taxonomic revision. *Zootaxa*, 1213: 1-162.
- Crisci, J. V. & M. F. Lopez Armengol 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Monografías de la OEA, Serie Biología 26: 1-129.
- D'Anatro, A. & M. Loureiro 2005. Geographic variation in the annual killifish *Austrolebias luteoflamulatus* Vaz Ferreira, Sierra & Scaglia (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Journal of Fish Biology*. 67: 849-865.
- Fernandez, A., S. Rosillo J. C., Casanova G., Olivera-Bravo S. 2011. Proliferation zones in the brain of adult fish *Austrolebias* (Cyprinodontiform: Rivulidae): A comparative study. *Neuroscience* 2011, 189, 12 – 24.
- Ferrer, J., L. R. Malabarba & W. J. E. M. Costa. 2008. *Austrolebias paucisquama* (Cyprinodontiformes: Rivulidae), a new species of annual killifish from southern Brazil. *Neotropical Ichthyology* 6(2): 175-180.
- García, D. 2005. Análisis del comportamiento reproductivo de dos especies del género *Austrolebias* Costa (Cyprinodontiformes, Rivulidae). Informe de pasantía.
- García, G., G. Wlasiuk & E. Lessa. 2000. High levels of mitochondrial cytochrome b divergence in annual killifishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 129: 93-110.
- García, G., S. Claramunt & A. I. Lalanne. 2004. Genetic differentiation among annual fishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) in a Biosphere Reserve site from Uruguay. *Environmental Biology of Fishes*, 70: 247-256.
- García, G. 2006. Multiple simultaneous speciation in killifishes of the *Cynolebias adloffii* species complex (Cyprinodontiformes, Rivulidae) from phylogeography and chromosome data. *JZS*, 44, 75–87.
- García, G., M. Loureiro, N. Berois, M. J. Arezo, G. Casanova, G. Clivio & A. Olivera. 2009. Pattern of differentiation in the annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes; Rivulidae) from a biosphere reserve site in South America: a multidisciplinary approach. *Biological Journal of the Linnean Society*, 98: 620-635.

- 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.* 1: 27-47.
- García, D., M. Loureiro & B. Tassino 2008. Reproductive behavior in the annual fish *Austrolebias reicherti* Loureiro & García 2004 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Neotropical Ichthyology*, 6(2): 243-248.
- Gittleman, J. L. & D. M. Decker 1994. Behaviour and speciation. In: Slater PJB, Halliday TR, eds. *Behaviour and Evolution*. Camb: Cambridge University Press, 43–79.ridge
- Grant, P. R. 1986. *Ecology and evolution of Darwin's finches*. Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Halliday, T. R. 1994. Sex and Evolution. In: Slater PJB, Halliday TR, eds. *Behaviour and Evolution*. Camb: Cambridge University Press, 150–192.ridge
- Hankison, S. J. & M. R. Morris 2003. Avoiding a compromise between sexual selection and species recognition: female swordtail fish assess multiple species-specific cues. *Behavioral Ecology* 14 (2): 282-287.
- Heymer, A. 1982. *Diccionario etológico*. Omega, Barcelona.
- Johnstone, R. A. 1996. Multiple displays in animal communication: “backup signals” and “multiple missages”. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 351:329-338.
- Krebs, J. y N. Davies 1993. *An introduction to Behavioural Ecology*. Blackwell Press, Oxford.
- Lehner, P. N. 1979. *Handbook of ethological methods*. Garland STPM, New York.
- Lessa, E. P. & J. A. Cook 1998. The molecular phylogenetics of tuco-tucos (genus P1: FQP September 25, 2000 9:59 Annual Reviews AR113-08 Ctenomys, Rodentia: Octodontidae) suggests an early burst of speciation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 9:88–9
- Loureiro, M. 2004. *Sistemática y biogeografía de los peces anuales de la subtribu Cynolebiatina (Cyprinodontiformes: Rivulidae: Cynolebiatinae)*. Tesis de doctorado. PEDECIBA Área Biología-Sub área Zoología.
- Loureiro, M. & G. García 2004. *Cynolebias reicherti*, a new annual fish species (Rivulidae: Cynolebiatinae) from southern Laguna Merín basin. *Acta zoológica Lilloana.* 42 (1-2):11-23.
- Loureiro, M. & G. García 2006. Transgresiones y regresiones marinas en la costa atlántica y lagunas costeras del Uruguay: efectos sobre los peces continentales. En *Bases para*

la conservación y el manejo de la costa uruguaya. Menafrá, Rodríguez, Scarabino & Conde Eds.

Loureiro, M. Duarte, A. Zarucki, M. 2011. A new species of *Austrolebias* Costa (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from northeastern Uruguay, with comments on distribution patterns. *Neotropical Ichthyology*, 9(2):335-342.

Ringo, J. M. 1977. Why 300 species of Hawaiian *Drosophila*? The sexual selection hypothesis. *Evolution* 31, 694-696.

Simpson B. R. C. 1979. The phenology of annual killifishes. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 44:243-261.

Tassino, B., Berois N. 2010. El sexo y sus misterios evolutivos. En: Tassino B, Silva A, eds. *Biología Unidad en la Diversidad*. Montevideo: Universidad de la República, Facultad de Ciencias, Edición DIRAC, 141-156.

Vari, R. P., L. R. Malabarba 1998. Neotropical Ichthyology: an overview. In *Phylogeny and classification of Neotropical Fishes* (Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZM, Lucena CAS Eds.), pp. 1-11. Porto Alegre: EDIPUCRS.

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.

Vaz-Ferreira, R. & B. Sierra 1971. Caracteres etológicos genéricos y específicos en los peces del género *Cynolebias* Steindachner. *Bol. Soc. Zool. del Uruguay*. 2: 22-35.

Wourms, J. P. 1972. The developmental biology of the annual fishes. Pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *Journal of Experimental Zoology*. 182: 389-414.