



# **Señales de cortejo como caracteres filogenéticos en peces anuales**

**Tesis de Maestría**

**Daniel García**

**Orientador: Dr. Marcelo Loureiro**

**Tribunal: Dr. Fernando Pérez-Miles**

**Dra. Ana Silva**

**Dra. Bettina Tassino**

**PEDECIBA, Biología**

**Universidad de la República**

*“Cada uno es un ser individual.”*

Ligia Rígoli

*“En parte la opinión académica dominante sobre la proteica variabilidad general del comportamiento animal ha sido la causa de que a la mayoría le pareciera inútil andar a la caza de caracteres hereditarios, individualmente invariables y por ello susceptibles de un estudio filogenético.”*

Konrad Lorenz

## Resumen

Los peces anuales del orden Cyprinodontiformes presentan un ciclo de vida único entre los Vertebrados. Estos peces habitan ambientes de agua temporales con desecación estival y esta fase de extremo estrés hídrico es superada por huevos de resistencia a la desecación, depositados por los adultos dentro del sustrato de los charcos. Su comportamiento reproductivo está estrechamente asociado a este ciclo de vida. El cortejo consiste en una serie de señales entre macho y hembra que conduce a la pareja a enterrarse en el sustrato de los ambientes que habitan y depositar allí los huevos. Sin embargo, hay carencias en dos aspectos básicos para la comprensión de su evolución: i) una filogenia robusta del grupo y ii) los mecanismos de aislamiento reproductivo que operan en el mismo (pre y postcigóticos). El objetivo de esta tesis fue explorar la relación entre la evolución del cortejo y la filogenia en el grupo de peces anuales del género *Austrolebias*. A través del estudio del comportamiento reproductivo de 13 especies, se pusieron a prueba dos hipótesis: a) las características del comportamiento reproductivo están fuertemente asociadas a la filogenia del grupo y b) las diferencias en los componentes del cortejo entre especies se deben a la coexistencia en simpatría (reforzamiento o desplazamiento del carácter); es decir que el cortejo ha evolucionado bajo la presión de evitar los apareamientos interespecíficos y sus posibles consecuencias. El cortejo del género *Austrolebias* presenta ciertas características generales que se comparten entre todos los subgrupos, pero cada uno presenta a su vez características propias. Estas diferencias pueden ser tanto cualitativas como diferencias en frecuencias y duraciones de los distintos componentes. En este trabajo se comprobó mediante métodos estadísticos que existen características del cortejo de este grupo de peces que tienen una profunda relación con la filogenia, y otras características que tienden a divergir más

en especies relacionadas cuando se encuentran cohabitando en simpatria. Futuros estudios poblacionales del cortejo arrojarán luz acerca de si estas diferencias son producto de un desplazamiento de caracteres o simplemente se trata de diferencias por evolución divergente.

## **Agradecimientos**

### *Formales*

Al Pedeciba por haberme aguantado como estudiante por tanto tiempo

A la ANII por finalmente haberme otorgado una beca que me permitiera concretar la realización de esta tesis

Al tribunal: Fernando, Ana y Bettina, por haber aceptado corregir la tesis

A mi orientador por haberme aguantado por todo este tiempo

Al Ale y el Seba que ayudaron en muestreos, cuidado de peces y experimentación

A la Sección Etología por prestar el lugar de experimentación

A Bettina por prestar la cámara para las experimentaciones

### *Del corazón*

A mis padres y mi hermana, que me apoyaron todo el tiempo

A Pat que es mi bastón y se aguanta a mi lado todos los días

A Emi, un pedacito mío

Al gusano que sin quererlo fue parte de todo esto

Al Jolgory-Lab que me recibió de gran manera en mi regreso a las canchas

Al Mapy por haberme aguantado todo este tiempo

Al Passer por la piratería. Dios bendiga este país

A los Buenos Muchachos, Bersuit Vergarabat, Arnaldo Antunes, y a todos los otros que con su música me permitieron avanzar a pesar de que las tertulias jolgorianas se instalaran a mi alrededor

# Índice

INTRODUCCIÓN.....	pág. 7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	pág. 14
RESULTADOS.....	pág. 21
DISCUSIÓN.....	pág. 44
CONCLUSIONES.....	pág. 53
PERSPECTIVAS.....	pág. 55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	pág. 56
APÉNDICES.....	pág. 63

## Introducción

### *El comportamiento y la filogenia*

Todos los organismos están conectados por una genealogía común (Darwin, 1872). La sistemática filogenética asume que todos los organismos, extintos y vivientes, ocupan una única posición en un árbol filogenético cuya raíz es el origen de la vida en el planeta. Por lo tanto, los caracteres que muestran verdadera afinidad entre dos o más especies, son los que han sido heredados de un ancestro común. Los caracteres son rasgos observables de los organismos, por lo que deben ocupar una posición en el árbol que se corresponda con el punto en el cual aparecieron durante la historia evolutiva del organismo (Brooks & Mc Lennan, 1991). En este contexto, muchas características del comportamiento, como ser sistemas de apareamiento, despliegues comportamentales y otros aspectos de la reproducción, muestran una fuerte relación con la filogenia (Gittleman & Decker, 1994).

La etología como ciencia, surgió en una tradición de investigar el comportamiento dentro de un marco explícitamente filogenético. Heinroth (1910) y Whitman (1899) propusieron la existencia de patrones comportamentales discretos los cuales, como los rasgos morfológicos, podían ser usados como indicadores de ancestralidad común. Más adelante se argumentó a favor del uso del comportamiento como un carácter taxonómico tan viable como el morfológico y se sugirió que los esquemas de clasificación podrían ser inconsistentes e incorrectos hasta que se incorporara el comportamiento dentro de la Sistemática (Emerson, 1938). Durante los 40s y los 50s hubo un florecimiento de los estudios etológicos comparados bajo la dirección de Konrad Lorenz y Niko Tinbergen. Ambos etólogos enfatizaron sobre dos puntos relacionados: que los patrones comportamentales son tan útiles como la morfología para evaluar relaciones filogenéticas y que el comportamiento no evoluciona en forma independiente de la filogenia (Lorenz 1950, 1958; Tinbergen 1951, 1953). En la práctica, un estudio comparado de índices de consistencia entre caracteres morfológicos y comportamentales a partir de 22 conjuntos de datos no mostraron diferencias significativas entre los dos tipos de datos (de Queiroz & Wimberger, 1993). Asimismo, en un trabajo de filogenia de peces de la familia Gasterosteidae, en el cual se combinan datos morfológicos y comportamentales, la información brindada por los datos morfológicos se asemeja a la que surge de los comportamentales. Cuando fueron

analizados por separado, los datos comportamentales y los morfológicos arrojaron la misma topología, mientras que el índice de consistencia de los datos comportamentales fue mayor al de los morfológicos (Mc Lennan & Mattern, 2001).

Entre las posibles razones por las cuales especies muy relacionadas tienden a comportarse en forma similar, se destacan: (1) tienden a evolucionar en nichos similares, (2) tienen varianza genética similar para que actúe la selección y/o (3) tienen fenotipos similares y así, tienden a responder a los cambios ambientales en forma similar (Harvey & Pagel, 1991; Futuyma, 1992).

### *La Inercia filogenética y las Señales filogenéticas*

Antes de la Síntesis Evolutiva, el término “inercia filogenética” era asociado con teorías que postulaban que los organismos tenían una tendencia endógena hacia la perfección (Mayr, 1982). El término era usado en forma análoga a la inercia en la física: una vez que los organismos comienzan a evolucionar en una dirección en particular, tienden a seguir evolucionando en esa dirección. Simpson (1944) refutó estas teorías, resaltando que, si bien el registro fósil en ocasiones exhibe patrones que sugieren que la evolución procede en una dirección particular, estos patrones muestran muchas irregularidades. Nunca se encontró evidencia de ningún mecanismo endógeno y el invocar este tipo de mecanismos era innecesario, ya que los patrones del registro fósil pueden ser explicados perfectamente por selección natural. Para Simpson (1944) la “inercia filogenética” representa un patrón de evolución rectilínea que lleva a tendencias direccionales del registro fósil, generado por selección natural.

Luego de la síntesis, el término “inercia filogenética” fue asociado con diversos factores además de la selección natural, que pueden afectar la evolución fenotípica. El término fue introducido por Wilson (1975), quien definió la inercia filogenética como una serie de propiedades profundas de una población, que determina cuánto se puede desviar su evolución en forma diferencial. Wilson (1975) reseña cuatro mecanismos que crean inercia filogenética en el comportamiento social de animales: la *Variabilidad Genética* indica que los organismos sólo responden a la selección en forma proporcional al componente genético de variabilidad fenotípica que posean; los *Factores Antisociales* son efectos específicos de los linajes que pueden afectar la dirección de la evolución; la *Complejidad del Comportamiento Social* indica que cuanto más complicado sea el

fenotipo comportamental, soportando mayor maquinaria fisiológica, habrá mayor inercia; por último, el *Efecto de la Evolución sobre Otros Caracteres*, indica que la inercia de los fenotipos comportamentales aumenta si está correlacionada con otros caracteres que pueden afectar el *fitness*.

El concepto de inercia filogenética de Wilson (1975) (factores que tienden a resistir a la selección natural), es opuesto al de Simpson (1944) (factores que son resultado de la selección natural). Ridley (1983) define la inercia filogenética simplemente como un carácter que es compartido entre especies relacionadas, una definición que resulta poco clara. Por otra parte, Edwards & Naeem (1993) definen la inercia filogenética, en el contexto de la evolución del cooperativismo alimentario en aves, explicando que ésta ocurre cuando ciertos caracteres persisten en linajes luego del cese de las fuerzas selectivas que los produjeron o mantuvieron o a través de episodios de oscilaciones ambientales selectivamente importantes. Esta definición implica una tendencia de los caracteres a resistir el cambio a pesar de las perturbaciones ambientales. En otro intento de aclarar el concepto, Burt (2001) lo define en forma análoga a la inercia física, postulando que un carácter con un estado incambiado, tiende a permanecer incambiado, y otro que sufre cambios constantes direccionales, tiende a mantener este patrón entre las ramas de un árbol filogenético, a menos que una fuerza externa actúe sobre él. Esta definición parece remontarnos a la época de la pre-síntesis evolutiva. Todas estas definiciones sobre el término, dificultan el saber qué es realmente la “inercia filogenética” y cuándo se observa en la naturaleza. Las definiciones de “patrones” de inercia (Simpson, 1944; Burt, 2001) pueden ser cuantificados mediante métodos filogenéticos comparativos (Maddison & Slatkin, 1991; Gittleman *et al.*, 1996; Abouheif, 1999). En cualquier caso, si la inercia filogenética debe ser una explicación a fenómenos biológicos, se debe tener mucho cuidado con su definición.

Más recientemente, Blomberg & Garland (2002) definieron las “señales filogenéticas” como la tendencia de especies relacionadas a parecerse más entre ellas que a especies puestas aleatoriamente en el árbol filogenético. Algo a destacar es que, en promedio, para cualquier árbol jerárquico, especies más relacionadas tenderán a parecerse bajo modelos evolutivos tan simples como el Movimiento Browniano. Esta semejanza es la señal filogenética y su presencia no necesita el invocar procesos como la selección natural, incluso la presencia de selección natural puede servir para oscurecer la señal filogenética (Blomberg & Garland, 2002).

## *Las señales del cortejo y los mecanismos de aislamiento reproductivo*

Una importante fuente de discusión en biología moderna son las discrepancias generadas en torno a los principios generales y mecanismos involucrados en la formación de entidades biológicas discretas, a partir de un proceso continuo de evolución. Bajo el concepto biológico de especie (Mayr, 1942, 1963), las especies son definidas como grupos de organismos que real o potencialmente se reproducen entre sí, y que están aislados reproductivamente de otros en condiciones naturales. Entonces, los procesos de especiación necesariamente involucran la evolución de barreras reproductivas (Harrison, 1998).

La reproducción está involucrada en varias etapas de la vida de un organismo, desde la elección del hábitat y tiempo de la actividad reproductora, hasta la puesta de los gametos, cuidado de los huevos y cría. Los sistemas de señales sexuales tienen un rol preponderante en el reconocimiento de potenciales parejas y la divergencia de algún patrón del comportamiento sexual entre poblaciones puede actuar como una barrera para el intercambio de genes. Incluso las diferencias en las señales de apareamiento entre especies, a menudo conforman la mayor barrera para el intercambio génico (Butlin & Ritchie, 1994). Estas barreras, al impedir el flujo génico, definen las fronteras de la comunidad reproductiva y preservan la integridad del sistema genético de las especie (Templeton, 1989). El aislamiento reproductivo involucra factores que afectan tanto el establecimiento de la pareja y la cópula, como la formación del cigoto y la viabilidad de los híbridos en sus distintas etapas del desarrollo.

Por otra parte, a menudo las diferencias de las señales de apareamiento entre las especies son más marcadas que las diferencias morfológicas. El cortejo es de hecho un ejemplo de barrera de aislamiento. Si dos especies no se cruzan porque difiere su cortejo, entonces el comportamiento de cortejo de al menos una de esas especies debe haber sufrido un cambio evolutivo que la diferencie (Ridley, 2004). Es por esto que, cada vez más las señales de apareamiento son usadas para identificar especies (Butlin & Ritchie, 1994). Existen estudios teóricos (West-Eberhard, 1983; Higashi *et al.*, 1999) y empíricos (Uy & Borgia, 2000; Masta & Maddison, 2002) que remarcan la vinculación del comportamiento reproductivo con la especiación, sin embargo no se logró aclarar la direccionalidad de dicho vínculo (Gray, 2004). Aún no está claro si es la selección contra apareamientos desventajosos la que lleva a la evolución del comportamiento reproductivo (especiación alopátrida y desplazamiento de caracteres reproductivos

luego de contacto secundario) o es el aislamiento comportamental de cortejo el que evoluciona a través de un proceso intraespecífico de selección sexual que precede y contribuye significativamente a la siguiente especiación (especiación por selección sexual) (Ritchie, 2007). Entendiendo al reforzamiento como un caso particular de desplazamiento de caracteres sexuales en el cual los mismos evolucionan para minimizar la hibridación entre especies (Servedio & Noor, 2003), tendremos en este contexto mayor divergencia de los caracteres y preferencias sexuales en simpatria que en alopatria (Howard, 1993; Noor, 1999).

### *Los peces anuales y las señales de cortejo*

Los peces anuales del orden Cyprinodontiformes presentan un ciclo de vida único entre los Vertebrados. Habitan ambientes de agua temporales de desecación estival. Esta fase de extremo estrés hídrico es superada por huevos con resistencia a la desecación que son depositados por los adultos dentro del sustrato de los charcos. La resistencia está dada por una capa coriónica externa muy gruesa y ornamentada que los aísla del medio externo adverso (Simpson, 1979; Loureiro & de Sá, 1996, 2000; Arezo *et al.*, 2005). Los embriones también se han adaptado a estos largos periodos de condiciones ambientales adversas a través de la ocurrencia de tres períodos de diapausa (Wourms, 1972 a, b), lo que les permite retrasar el tiempo de desarrollo hasta el momento en que las condiciones ambientales son propicias para la eclosión de los alevines y su posterior desarrollo. Estas adaptaciones en el desarrollo embrionario se complementan con una alta tasa metabólica (Cardozo, 1999) que les permite a los juveniles alcanzar la madurez sexual pocas semanas después de la eclosión. Se ha observado en condiciones de laboratorio, que luego de la eclosión los individuos alcanzan la madurez sexual en 8-12 semanas. Las hembras ponen entre 20 y 100 huevos por día hasta su senescencia (Berois *et al.*, 2012).

Su comportamiento reproductivo está estrechamente asociado a este ciclo de vida. El cortejo consiste en una serie de señales entre macho y hembra que lleva a la pareja a enterrarse en el sustrato de los ambientes que habitan y depositar allí sus gametos (Vaz-Ferreira *et al.*, 1964 y 1972; Belote & Costa, 2004a; García *et al.*, 2008). Muchas especies de peces anuales presentan un marcado dimorfismo sexual, con machos de colores vivos y brillantes y con un patrón de bandas o puntos que los hacen más

llamativos y hembras con colores amarrados, lo que sugiere que la selección sexual podría jugar un rol importante en la evolución del grupo.

El género de peces anuales *Austrolebias* es uno de los taxa más diversos de la cuenca del Plata y el Sistema Patos-Merín. Se reconocen en la actualidad más de 35 especies y presentan distribuciones geográficas muy restringidas (Costa, 2006; Loureiro *et al.*, 2011). Las posibles causas de la alta diversidad específica en el grupo podrían estar asociadas al corto tiempo generacional (menor a un año), el hábitat fragmentado que favorece la poca vagilidad y el aislamiento poblacional, la inestabilidad genómica (García *et al.*, 2001) y la acción de la selección sexual. Además, debido a su alto nivel de endemismo y su frágil hábitat, se puede considerar a estas especies como vulnerables a procesos antrópicos como el cambio climático y uso de la tierra que podrían amenazar la persistencia de sus poblaciones (Loureiro *et al.*, 2007; Reis & Lima, 2008). Estas características, sumadas a la facilidad de mantenimiento de los peces en laboratorio, hacen de estos animales un excelente modelo biológico para estudios acerca de diferenciación intraespecífica y especiación.

Sin embargo, a pesar de la gran importancia evolutiva de este grupo, la información es escasa en dos aspectos básicos para desarrollar un programa de investigación en esta temática: una hipótesis robusta de las relaciones de parentesco entre las especies (filogenia) y los mecanismos de aislamiento reproductivo que operan en este grupo, tanto precigóticos (cortejo y selección sexual) como postcigóticos. Desde su descripción original, las relaciones de parentesco dentro del género *Austrolebias* han sido controversiales (Parenti, 1981; Costa, 1998, 2006, 2010; Loureiro, 2004; García *et al.*, 2000; García, 2006). El comportamiento reproductor en el género *Austrolebias* ha sido estudiado en 10 especies (Vaz-Ferreira *et al.*, 1964 y 1972; Belote & Costa, 2004a; García *et al.*, 2008). En todos los análisis se describen las mismas unidades comportamentales básicas, en las cuales los machos despliegan una serie de señales visuales hacia la hembra. Si ésta es receptiva, la pareja culmina depositando los huevos dentro del sustrato de los charcos. Sin embargo, solamente uno de los estudios previos incluyó un abordaje cuantitativo y cualitativo (García *et al.*, 2008) por lo que la comparación detallada entre especies no era posible hasta el momento.

En este trabajo se aborda el análisis del cortejo de este grupo de peces anuales en forma cualitativa y cuantitativa, de forma de poder lograr una comparación entre las especies. De esta forma se pueden identificar unidades que presenten “señales

filogenéticas” (Blomberg *et al.*, 2003) y detectar unidades que posean más labilidad en sus características cuantitativas, pudiendo divergir entre especies emparentadas con más facilidad. Las especies simpátridas, sobre todo cuando su parentesco es muy cercano, tienen que adoptar barreras a la reproducción. De otra forma no pueden subsistir como especies distintas (Lorenz & Leyhausen, 1985). Así, se puede determinar el aporte de las diferentes unidades componentes del cortejo a la filogenia del grupo y la utilidad de este tipo de caracteres cuando se quiere esclarecer las relaciones de parentesco entre las especies.

### *Hipótesis y Objetivos*

La primera hipótesis a poner a prueba es que las características del comportamiento reproductivo están fuertemente asociadas a la filogenia del grupo, es decir, presentan variables que tienden a ser más similares en especies emparentadas que en especies de distintos clados, basados en lo propuesto por Blomberg *et al.* (2003). La predicción principal es que las especies pertenecientes a un mismo clado dentro del género presentan señales de cortejo más similares entre sí que con especies de otros clados.

La segunda hipótesis a poner a prueba es que existen diferencias en componentes del cortejo entre especies debido a la coexistencia en simpatría; es decir que el cortejo ha evolucionado bajo la presión de evitar los apareamientos interespecíficos y sus posibles consecuencias negativas (como por ej. bajo *fitness* de los híbridos). Se espera que especies simpátridas de un mismo clado tengan diferencias en el cortejo mayores entre sí que con otras especies del mismo clado.

El objetivo de esta tesis es analizar la evolución del cortejo en peces anuales en contexto filogenético y evaluar la influencia de la coexistencia en simpatría en la generación de diferencias interespecíficas. Para poder cumplir con este objetivo se plantearon 4 objetivos específicos:

I: analizar los patrones de cortejo. De esta manera se obtienen los parámetros básicos como frecuencia, duración y secuencia de las unidades que caracterizan el cortejo.

II: comparar datos cualitativos y cuantitativos del cortejo de las distintas especies.

III: determinar si existe asociación entre el comportamiento de cortejo y la filogenia. Se utilizarán como referencia dos árboles filogenéticos basados en caracteres morfológicos (Loureiro 2004, Costa 2010) y un árbol filogenético basado en caracteres moleculares (García *et al.*, 2002). Mapear los datos comportamentales obtenidos en filogenias existentes del grupo basadas en otros caracteres.

IV: buscar caracteres que diferencien especies simpátricas del mismo grupo.

## **Materiales y métodos**

### *Actividades Experimentales*

Una parte de los peces fueron obtenidos a partir de recolecciones de campo en las áreas de distribución de las especies (fig. 1) mediante pesca con red de mano. Los individuos fueron mantenidos y trasladados al laboratorio en recipientes aptos para viaje. El resto de los ejemplares se obtuvieron a partir de cría en cautiverio (tabla 1). Los individuos adultos en cautiverio fueron alimentados con *Tubifex* sp. y mantenidos en acuarios de parejas (macho-hembra) hasta una semana antes de la experimentación con temperatura constante a 19°C y ciclos de luz-oscuridad natural. La semana previa a la realización de los experimentos, se mantuvieron separados en acuarios individuales hasta el momento de la experimentación. Esta metodología resultó ser la mejor para evitar enfrentamientos no exitosos.

Para las experiencias se colocaron un macho y una hembra de la misma especie tomados al azar a partir del grupo de individuos adultos, en peceras con fondo de cáscara de coco molida con una altura suficiente para permitir el enterramiento de la pareja (promedio de 7cm). Se colocó primero la hembra en el acuario e inmediatamente el macho. Cada individuo fue utilizado una sola vez para la prueba, lo que permitió que todas las muestras analizadas fueran independientes. Para todas las especies utilizadas se realizó un mínimo de 6 réplicas válidas, bajo el criterio de que se produjera al menos un enterramiento de la pareja (tabla 1). Al colocar los individuos en el acuario, se registró en video la interacción durante 30 minutos. Para la elección de las especies se intentó abarcar la mayor cantidad de subgrupos posible dentro del género (tabla 1).

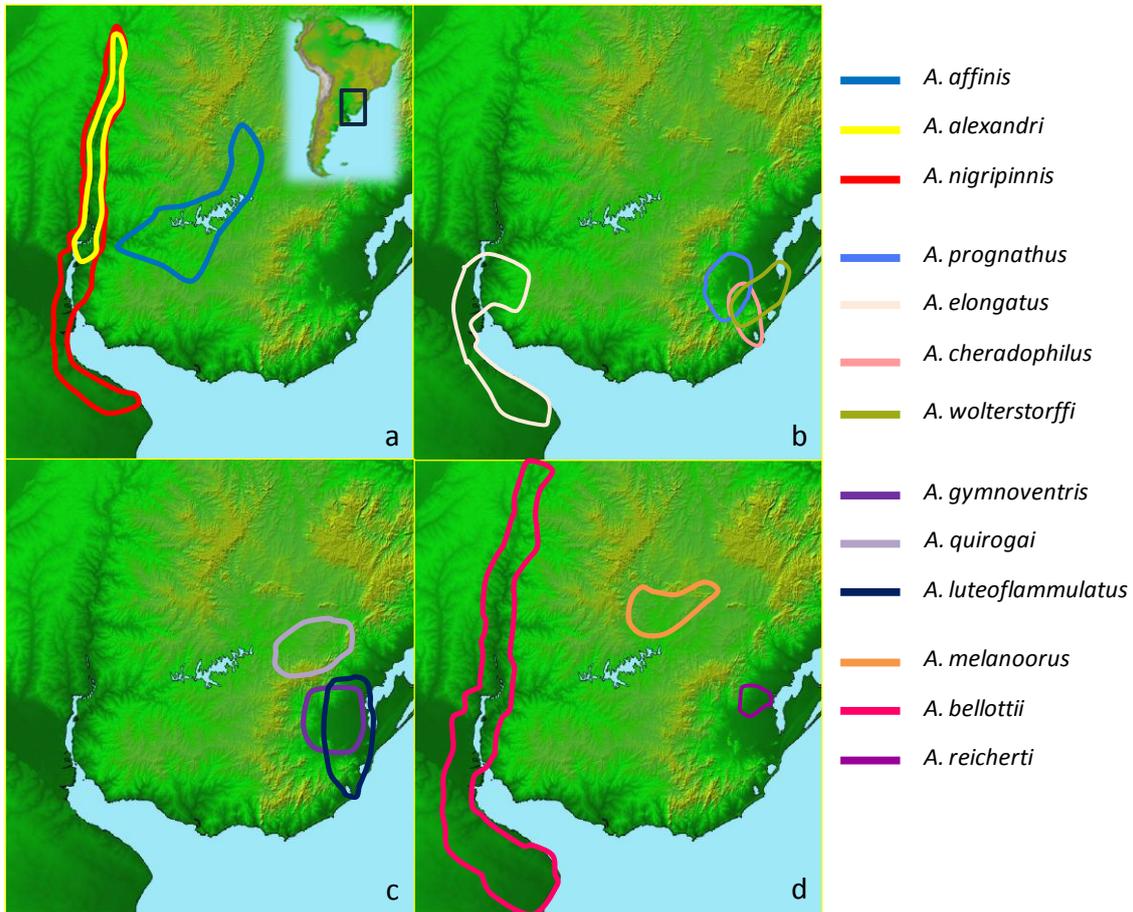


Figura 1. Mapa de distribución de las especies analizadas. a) grupo *A. affinis*; b) grupo “Megalebias”; c) grupo *A. luteoflammulatus*; d) grupo *A. bellottii*+ *A. reicherti*

### *Estrategia de Investigación*

Las unidades definidas por García *et al.* (2008) para *A. reicherti* (Loureiro & García, 2004) (apéndice 1) fueron subdivididas para darle un mayor detalle a la cuantificación. También se definieron las unidades que no habían sido descritas anteriormente, logrando un etograma más completo del grupo. Posteriormente se realizó la secuenciación completa del comportamiento en forma simultánea para macho y hembra sobre la base de las unidades definidas.

Tabla 1. Especies utilizadas para la experimentación. Se indica subgrupo al que pertenece, número de réplicas (n) y si se trató de ejemplares traídos del campo (C) o criados en laboratorio (L)

Subgrupo	Especie	n	C/L
Megalebias	<i>A. prognathus</i>	8	C
	<i>A. elongatus</i>	10	C
	<i>A. cheradophilus</i>	6	L
	<i>A. wolterstorffi</i>	9	C
Affinis	<i>A. nigripinnis</i>	7	L/C
	<i>A. alexandri</i>	11	C
Bellottii	<i>A. affinis</i>	10	C
	<i>A. bellottii</i>	9	C
	<i>A. melanoorus</i>	7	L
Luteoflammulatus	<i>A. luteoflammulatus</i>	6	C
	<i>A. quirogai</i>	7	C
	<i>A. gymnoventris</i>	6	C
Charrua	<i>A. reicherti</i>	8	C

De los datos obtenidos a partir de la secuenciación, se registró la frecuencia y la duración de cada unidad en la totalidad del enfrentamiento. De este modo, se obtuvo para cada unidad un dato de duración de la unidad (utilizando la mediana como medida de centralidad), un dato de frecuencia absoluta de aparición de la unidad, otro dato de proporción de duración relativa de la unidad en el total del enfrentamiento y otro dato de frecuencia relativa de aparición de la unidad respecto al total de apariciones de todas las unidades del enfrentamiento. El tiempo mínimo que se pudo registrar de una unidad fue 1 segundo, ya que esa es la precisión del software utilizado, por lo que las unidades con duración menor a 1s, fueron registradas con duración 0s. Dado que durante los 30 minutos de filmación, además de las unidades componentes del cortejo, los individuos realizan otros comportamientos, se decidió considerar para los análisis únicamente las unidades que forman parte del cortejo. Unidades como la quietud, nado errático o movimientos indeterminados, como cuando el individuo nada enfrentando a su reflejo en el vidrio del acuario, fueron descartadas de los análisis. De todas formas estos datos fueron registrados, influenciando sobre los datos de proporciones de tiempo y frecuencias relativas.

## *Análisis de los Datos*

Se describió cualitativamente el cortejo de las distintas especies, remarcando las similitudes y las diferencias entre las mismas. Con fines exploratorios, se realizó un Análisis de Componentes Principales, buscando agrupamientos entre los clados analizados. Para este análisis se utilizaron la totalidad de las unidades componentes del cortejo de todas las especies, las cuales fueron agrupadas por clado o grupo de especies. En este caso, los datos fueron transformados utilizando el método de transformación Z, ya que estaban medidos en diferentes escalas. Esta estandarización convierte una distribución con media y desviación dada en una distribución estandarizada con media 0 y desviación 1. Para convertir valores normales  $X$  en estándar  $Z$ , se calcula:

$$Z = \frac{X - \text{media}}{\text{desvío}}$$

## *Buscando señales filogenéticas*

Para poner a prueba la primer hipótesis, se buscaron señales filogenéticas en los diferentes caracteres según lo propuesto por Blomberg *et al.* (2003). Para esto se utiliza una prueba de aleatorización para señales filogenéticas. La idea básica es poner a prueba si un árbol dado se ajusta mejor a un set de datos, cuando se compara con el ajuste obtenido cuando los datos se permutaron aleatoriamente entre los extremos del árbol; es decir, quitando cualquier señal filogenética existente.

La prueba se puede implementar vía PGLS (por la sigla en inglés de Mínimos Cuadrados Generalizados Filogenéticos; Grafen, 1989; Martins & Hansen, 1997), para lo que se utilizó el programa PHYSIG.M (conseguido bajo pedido a Ted Garland Jr.). Este programa utiliza el Error Cuadrado Medio (MSE) como estadístico. Es un test de aleatorización que provee de un método donde el grado de semejanza entre taxa muy emparentados puede ser distinguido de lo aleatorio. También posee un estadístico que indica la fuerza de la señal filogenética comparada con una expectativa analítica basada sólo en la estructura del árbol y asumiendo evolución del carácter por Movimiento Browniano. Este estadístico surge de la relación entre el MSE de los datos medidos a partir de la media filogenéticamente correcta ( $MSE_0$ ) y el MSE de los datos calculados usando la matriz de varianza covarianza derivada del árbol de referencia. Las

ecuaciones para calcular el MSE y el  $MSE_0$  se detallan en el apéndice 2. Si el árbol de referencia describe en forma precisa los patrones de varianza-covarianza observados en los datos, entonces el valor de MSE será relativamente pequeño, llevando a un valor alto de  $MSE_0/MSE$ . Por el contrario, si hay poca covarianza dentro de los datos terminales que es explicada por el árbol candidato, entonces el  $MSE_0$  será relativamente pequeño, llevando a valores más pequeños de  $MSE_0/MSE$ . De este modo, altos valores de  $MSE_0/MSE$  implican más señal filogenética.

El valor esperado de  $MSE_0/MSE$  depende del tamaño y forma del árbol, por lo que es natural escalar los valores de  $MSE_0/MSE$  observados, divididos por esperados bajo evolución por Movimiento Browniano (apéndice 2). Esto determina el estadístico:

$$K = \frac{MSE_0}{MSE} \text{obs} / \frac{MSE_0}{MSE} \text{esp}$$

Un  $K < 1$  implica que los taxa emparentados se asemejan entre sí menos que lo esperado bajo evolución por movimiento Browniano a lo largo del árbol de referencia. Esto puede deberse, tanto a un alejamiento de la evolución por movimiento Browniano, como puede ser por evolución adaptativa que no está correlacionada con la filogenia, o a errores de medición en sentido amplio (Blomberg *et al.*, 2003). Un  $K > 1$  indica que taxa más cercanos se parecen más entre sí que lo esperado bajo evolución por movimiento Browniano. Para poder comparar árboles diferentes, se debe comparar el  $MSE_0/MSE$  *esperado*. Un valor más alto de este parámetro indica un árbol más jerárquico que otro con valor más bajo (Blomberg *et al.*, 2003).

Dado que para realizar este análisis se necesita tener un valor único por especie, se decidió utilizar la mediana como medida de centralidad, debido al bajo número de réplicas por especie. La mediana es una medida de centralidad que se ve menos afectada por valores extremos. Si las muestras son pequeñas ( $n=6$ ), no hay otra alternativa que usar pruebas no paramétricas, salvo que se conozca exactamente la distribución de los datos (Siegel, 1959). Los resultados obtenidos en este análisis dependen del largo de las ramas de los árboles de referencia y de la cantidad de especies que se analizan. Como los árboles utilizados no presentan largos de ramas, se resolvió otorgar un valor de 1 a cada rama. Además consideramos que el número de especies analizado es bajo ( $<20$ ), por lo tanto, decidimos tomar en cuenta como “posibles señales” a los caracteres que tenían un nivel de significancia entre  $0,05 < \alpha < 0,06$ . Los caracteres que presentaron señal filogenética, y los que presentaron “posibles señales” con un  $K > 1$  en los tres árboles

filogenéticos de referencia, fueron mapeados para observar la posible evolución de los mismos.

Para mapear los caracteres continuos, se discretizaron según el método de Thiele (1993). Este método, que requiere también un valor único de cada carácter para cada especie, es llamado “*gap weighting*” en inglés, ya que se basa en el pesado diferencial de los espacios entre los estados codificados de un carácter. En principio sugiere que los datos deben ser transformados si las varianzas son diferentes y se sugiere la transformación  $y = \log(x+1)$ . Luego se expresan los datos crudos como un set de estados ordenados de acuerdo al valor de su medida de centralidad, en este caso, la mediana. Los datos crudos fueron transformados de la forma sugerida y luego se realizó una matriz conteniendo los valores de la mediana de los datos transformados para cada especie. Para discretizar los datos se realiza una estandarización por rangos, según:

$$x_s = \frac{x - \min}{\max - \min} n,$$

donde  $n$  es el número de estados ordenados. En este caso se escalan los estados de los caracteres entre 0 y 9, por lo que el  $n$  utilizado fue 9. Los valores estandarizados se redondearon y se trataron los caracteres como multiestados ordenados. La reconstrucción de los caracteres ancestrales se realizó mediante Máxima Parsimonia utilizando el programa Mesquite v2.75 (Maddison & Maddison, 2011).

Tanto para la detección de señales filogenéticas como para realizar mapeo de caracteres, las filogenias morfológicas que se utilizaron como referencia fueron las propuestas por Loureiro (2004) y Costa (2010) (fig. 2). La filogenia molecular fue la propuesta por García *et al.* (2002) (fig. 3). Éstas fueron resumidas para ajustarlas a la cantidad de especies utilizadas en los análisis. Las especies analizadas ausentes en el árbol de García *et al.* (2002) fueron ubicadas en el mismo según sugerencia de la autora del trabajo (García, *com. pers.*). La especie *A. quirogai* Loureiro, Duarte & Zarucki, 2011, no está incluida en ninguna de las filogenias utilizadas, ya que su descripción es más reciente (Loureiro *et al.*, 2011). Dado que en su descripción se propone como cercana a *A. luteoflamulatus* (Vaz-Ferreira, Sierra de Soriano & Scaglia de Paulete, 1965), se decidió incluirla como especie hermana de ésta en todos los árboles.

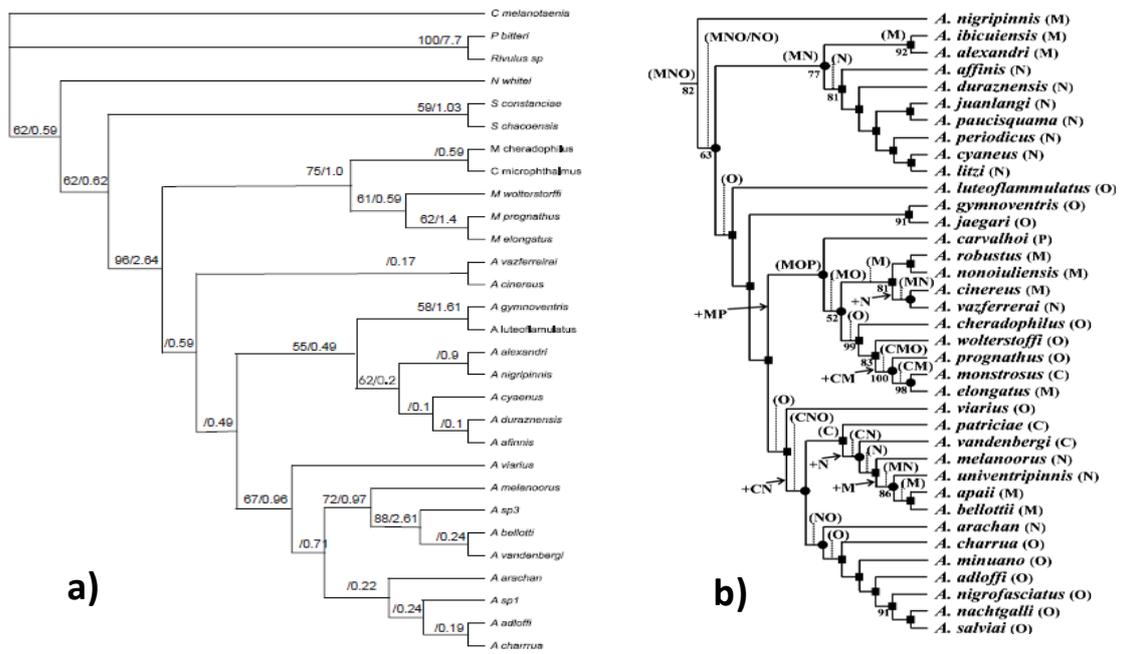


Figura 2. Árboles filogenéticos de referencia basados en caracteres morfológicos que se utilizaron como comparación para detectar señales filogenéticas. a) Loureiro, 2004; b) Costa, 2010.

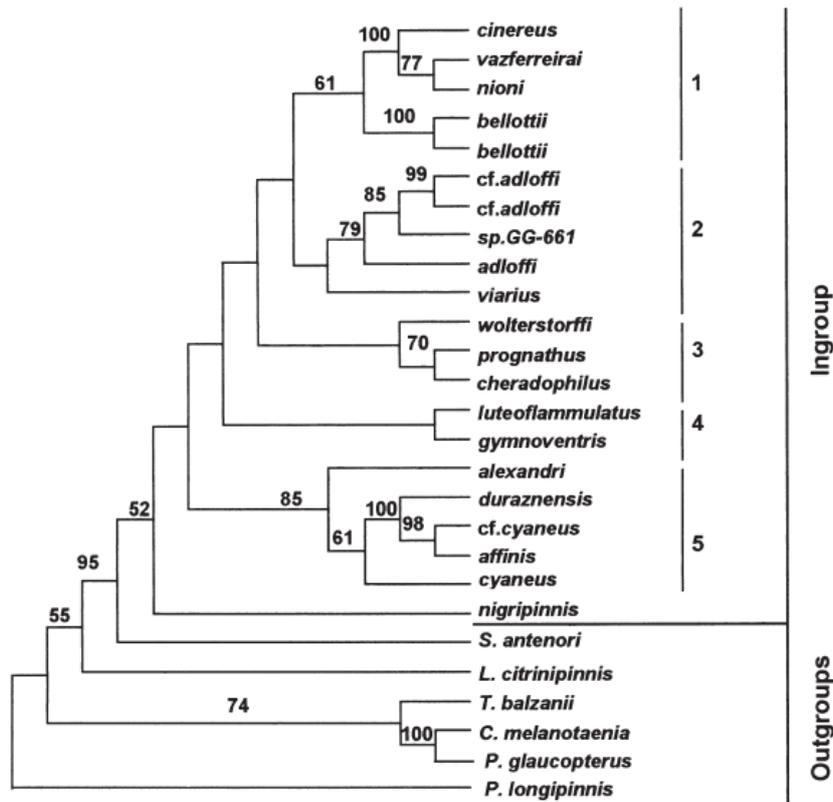


Figura 3. Árbol filogenético de referencia basado en caracteres moleculares que se utilizó como comparación para detectar señales filogenéticas (García *et al.*, 2002).

### *Buscando divergencias en simpatría*

Para poner a prueba la segunda hipótesis se utilizaron el clado “Megalebias” y el grupo *A. affinis* ya que presentan especies simpátridas dentro del mismo clado. Tres de las especies del clado “Megalebias”, *A. prognathus* (Amato, 1986), *A. cheradophilus* (Vaz-Ferreira, Sierra de Soriano & Scaglia de Paulete, 1965) y *A. wolterstorffi* (Ahl, 1924), se distribuyen en los humedales del Este de Uruguay (cuenca Laguna Merín), con un área de simpatría en los humedales del Río Cebollatí y cuenca de la Laguna Negra (fig. 1). Por otra parte, el grupo *A. affinis* tiene una amplia distribución en las cuencas del Río Uruguay y Patos-Merín, encontrándose *A. nigripinnis* (Regan, 1912) y *A. alexandri* (Castello & López, 1974) en simpatría en los humedales del Río Uruguay (fig. 1).

Con fines exploratorios, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP). Para este análisis se utilizaron la totalidad de las unidades componentes del cortejo y se realizó para cada clado por separado. Los datos fueron transformados utilizando el método de transformación Z, ya que estaban medidos en diferentes escalas. Utilizando las variables que contribuyeron con mayor intensidad sobre los Componentes Principales (CP) 1 y 2 ( $-0,5 < x < 0,5$ ) se realizaron pruebas no paramétricas (Mann Whithney-U) para evidenciar diferencias significativas entre las especies simpátridas en alguna característica de las distintas unidades cuantificadas, en forma separada para cada clado. Para realizar estos análisis se utilizaron los datos crudos, con un valor único para cada individuo de cada especie. Todos los análisis exploratorios y los test de significancia fueron realizados con el paquete estadístico Statistica V10.

## **Resultados**

Se obtuvo un etograma detallado y completo para todas las especies del género analizadas (tabla 2). Las unidades descritas para *A. reicherti* por García *et al.* (2008) fueron subdivididas de la siguiente forma: el Despliegue Lateral (DL) se subdividió en DL, Despliegue Lateral Vibrado (DLV) y Despliegue Lateral Abrazador (DLA). El Despliegue Sigmoide (DS) se subdividió en DS, Despliegue Sigmoide Abrazador (DSA) y Despliegue Sigmoide Circular (DSC); esta última unidad fue definida por Librán (2011) para *A. affinis* (Amato, 1986). La quietud de la hembra, definida por García *et al.* (2008), se dividió en quietud propiamente dicha (Q) y Quietud Expectante (QE), siendo Q una quietud en la que la hembra no presenta ningún interés por el macho

y QE cuando ésta acompaña los despliegues de su pareja (tabla 2). También se definieron unidades que no habían sido descritas previamente. Éstas son la Pasadita (P) y Palpación Genital (PG). Estas unidades son realizadas por las hembras, principalmente del clado “Megalebias”.

Tabla 2. Etograma de las unidades y tipos de datos utilizados para los análisis. -t: mediana de la duración de la unidad; -f: frecuencia absoluta de la unidad; -p: proporción de tiempo que ocupa la unidad en el total del experimento; -fr: frecuencia relativa que presentó la unidad. M-H indica si la unidad la realizan machos, hembras o ambos.

Unidad	Código	Descripción	Datos utilizados	M-H
Despliegue Lateral	<b>DL</b>	Extiende sus aletas impares y tensa su cuerpo.	-t; -f; -p; -fr	M
Despliegue Lateral Vibrado	<b>DLV</b>	Extiende sus aletas impares, tensa su cuerpo y hace vibrar las aletas extendidas.	-t; -f; -p; -fr	M
Despliegue Lateral Abrazador	<b>DLA</b>	Extiende sus aletas impares y describe un arco, curvando el cuerpo y las aletas.	-t; -f; -p; -fr	M
Despliegue Sigmoide	<b>DS</b>	Realiza ondulaciones del cuerpo con las aletas extendidas.	-t; -f; -p; -fr	M
Despliegue Sigmoide Abrazador	<b>DSA</b>	Realiza ondulaciones del cuerpo y arquea las aletas impares y curva su cuerpo.	-t; -f; -p; -fr	M
Despliegue Sigmoide Circular	<b>DSC</b>	Ondula su cuerpo a la vez que se desplaza describiendo un círculo alrededor del otro, quedando siempre perpendicular a éste, y frente a sus ojos.	-t; -f; -p; -fr	M
Invitación al Enterramiento	<b>IE</b>	Se posiciona con la cabeza apuntando hacia el sustrato, extiende las aletas y las hace vibrar.	-t; -f; -p; -fr	M
Aceptación del Enterramiento	<b>AE</b>	Se ubica al costado de otro que esté haciendo IE, en posición vertical y lo toca con su cabeza	-t; -f; -p; -fr	H
Apareamiento	<b>A</b>	Se entierra o se acuesta sobre el sustrato y libera sus gametos.	-t; -f; -p; -fr	M, H
Espera	<b>E</b>	Período refractario entre un apareamiento y otra unidad. El individuo está un momento quieto luego de emerger del sustrato.	-t; -p	M, H
Quietud Expectante	<b>QE</b>	El individuo acompaña de cerca los despliegues del otro. No realiza despliegues pero puede desplazarse.	-p	H
Palpación Genital	<b>PG</b>	Un animal toca la papila genital del otro con su boca.	-t; -f; -p; -fr	H
Pasadita	<b>P</b>	Un individuo pasa debajo del otro.	-t; -f; -p; -fr	H
Invitación al Seguimiento	<b>IS</b>	El animal avanza, alejándose del otro, y espera a que éste lo siga. Si lo hace, avanza un poco más.	-fr	M
Despliegues Laterales	<b>DLS</b>	Es la suma de todos los despliegues laterales	-p; -fr	M
Despliegues Sigmoides	<b>DSs</b>	Es la suma de todos los despliegues sigmoides	-p; -fr	M
Diferencia de Apareamiento	<b>difA</b>	Es el valor absoluto de la resta del valor de apareamiento del macho menos el de la hembra	-t; -p	[M-H]

El cortejo en el género se caracteriza despliegues (DL y DS o alguna de sus variantes) realizados por el macho. Cuando éste capta la atención de la hembra, realiza Invitación al Enterramiento (IE), motivando a la hembra a Aceptar el Enterramiento (AE). Cuando la hembra acepta, la pareja se sumerge dentro del sustrato donde se da el Apareamiento (A). Luego que emergen del sustrato, permanecen cierto tiempo inmóviles sobre el sitio de enterramiento en Espera (E), hasta que retoman otro ciclo de

cortejo (García *et al.*, 2008; fig. 4). Sin embargo, se observaron ciertas variantes que caracterizan a los subgrupos, y también algunas particularidades dentro de cada uno.

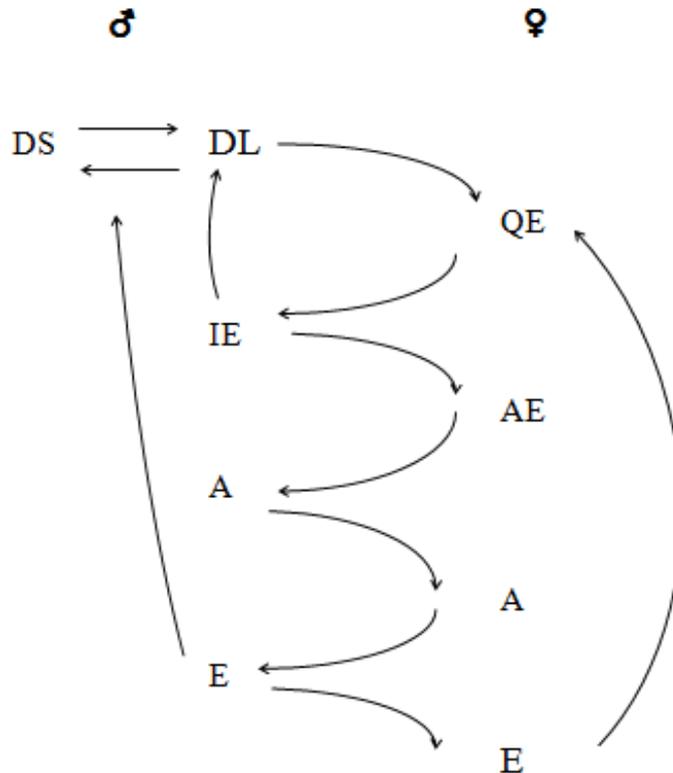


Figura 4. Representación generalizada del cortejo del género *Austrolebias*. Modificado de García *et al.* 2008.

El grupo “Megalebias” se caracteriza por tener alta duración del Despliegue Lateral (DL) y del Despliegue Sigmoide (DS) (fig. 5, tabla 3). Además presenta en forma frecuente el Despliegue Lateral Abrazador (DLA) y el Despliegue Sigmoide Abrazador (DSA). Si bien estas unidades se han observado en otros grupos, nunca con tanta frecuencia (fig. 6, tabla 3). Por su parte, las hembras presentan dos unidades sinapomórficas del grupo: Pasadita (P) y Palpación Genital (PG). Estas unidades no fueron observadas en otras especies, excepto en *A. quirogai* que presentó la unidad PG, aunque con la diferencia que únicamente la realiza cuando el macho está en IE. *Austrolebias prognathus* presenta en su cortejo una particularidad que lo distingue del resto de las “Megalebias”: el Despliegue Lateral Vibrado es la unidad que lo caracteriza, en lugar del DL o DLA. Presenta gran intensidad de la vibración de las aletas impares, hasta el punto de alcanzar un temblor del cuerpo.

Tabla 3. Caracteres que presentaron diferencias significativas entre los distintos subgrupos respecto al subgrupo Megalebias. Prueba de Mann Whithney-U. Ver códigos de las unidades en la tabla 2

Unidad\Subgrupo		<i>A. affinis</i>	<i>A. bellottii</i>	<i>A. luteoflammulatus</i>	<i>A. charrua</i>
DL-t	z	5,43	3,61	3,26	2,82
	p	0,000	0,003	0,011	0,048
DS-t	z	3,56	3,39	3,40	4,48
	p	0,004	0,007	0,007	0,000
DLA-fr	z	5,45	6,73	5,58	5,49
	p	0,000	0,000	0,000	0,000
DSA-fr	z	4,17	3,83	3,45	3,61
	p	0,000	0,001	0,006	0,003
PG-fr	z	5,91	5,11	3,36	3,95
	p	0,000	0,000	0,008	0,001
P-fr	z	4,93	4,51	4,77	3,48
	p	0,000	0,000	0,000	0,005

En el grupo *A. affinis* se destaca el DL como principal despliegue del cortejo. Si bien es una unidad muy frecuente, no presenta gran duración. A esta unidad se le agrega el DS, en general de corta duración y con alta frecuencia. También aparece el Despliegue Sigmoide Circular como parte recurrente del cortejo en el grupo. Estas especies tienen la capacidad de realizar DLV aunque en baja frecuencia. Las hembras no presentan ninguna unidad característica distintiva. *Austrolebias nigripinnis* y *A. affinis* presentan ocasionalmente DLA y DSA. Por su parte *A. alexandri*, en ocasiones puede presentar DLA con baja frecuencia como parte de las señales utilizadas.

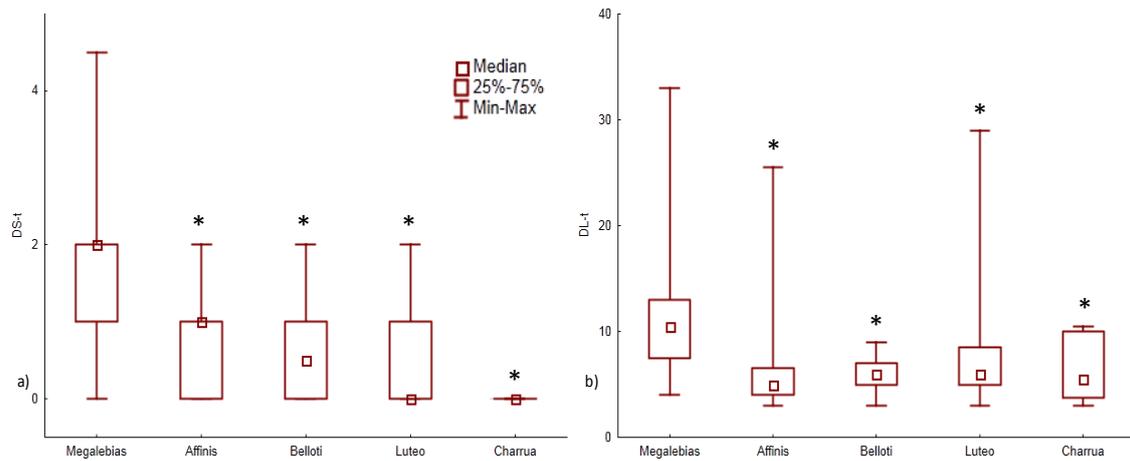


Figura 5. Boxplot de la duración del Despliegue Sigmoide y de la del Despliegue Lateral de los distintos subgrupos de *Austrolebias* analizados. a) DS-t, b) DL-t. \* indica diferencias significativas con el grupo “Megalebias” (Mann-Whitney-U,  $p < 0,05$ , tabla 3).

El grupo *A. bellottii* presenta el Despliegue Lateral muy conspicuo, aunque de corta duración. También aparece el DLV como parte del cortejo. El DS bastante frecuente en el grupo y de corta duración. En *A. bellottii* (Steindachner, 1881) el apareamiento se produce con el macho sobre la hembra; no se entierran totalmente ni le destinan demasiado tiempo a la Espera. Por su parte, *A. melanoorus* (Amato, 1986) presenta los IE del macho diferentes al resto de las especies del género. En particular, presenta movimientos ondulatorios del cuerpo como realizando un pozo en el sustrato, en lugar de realizar vibraciones de las aletas impares. El apareamiento se realiza fuera del sustrato, generalmente en posición de nado con contracciones espasmódicas del cuerpo, sincronizadas entre macho y hembra, indicando una posible puesta de gametos. Tampoco se observa la unidad Espera (E). Debido a que se observó únicamente una especie perteneciente al grupo *A. charrua*, se desconocen las generalidades del grupo. Sin embargo en todas las filogenias utilizadas como referencia (Loureiro, 2004; Costa, 2010; García *et al.*, 2002) este grupo aparece como hermano del grupo *A. bellottii*, por lo que se resolvió tratar esta especie (*A. reicherti*) como parte de un gran grupo monofilético que abarca las tres especies analizadas (*A. bellottii*, *A. melanoorus* y *A. reicherti*). *Austrolebias reicherti* presenta el DL como unidad predominante. En ocasiones presenta DLV. Se observa el DS en forma muy frecuente pero de muy corta duración (<1s). El apareamiento es, en general sobre el sustrato, sin enterramiento.

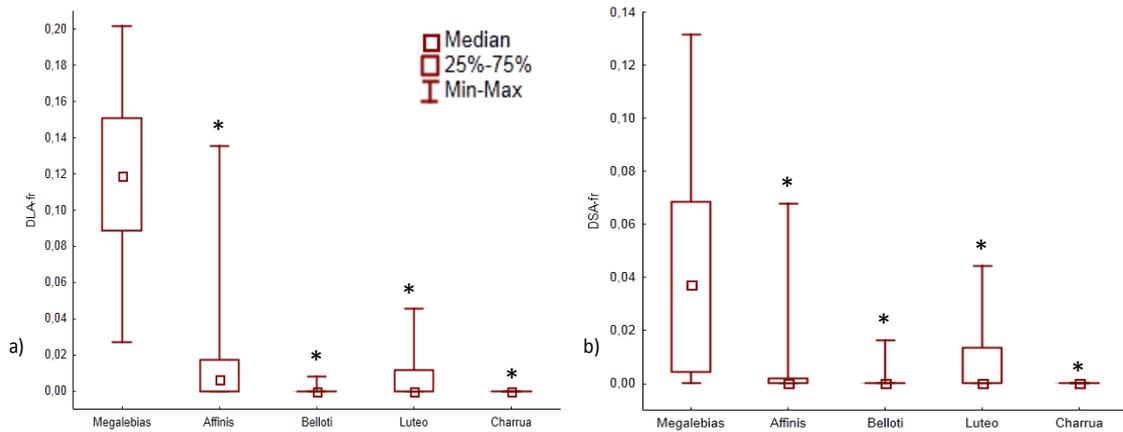


Figura 6. Boxplot de la frecuencia relativa del Despliegue Lateral Abrazador (a) y del Despliegue Sigmoide Abrazador (b) de los distintos subgrupos del género *Austrolebias*. \* indica diferencias significativas con el grupo “Megalebias” (Mann Withney-U,  $p < 0,05$ , tabla 3).

El grupo *A. luteoflammulatus* se caracteriza por realizar como unidad básica del cortejo al Despliegue Lateral, al que le intercala distintos comportamientos, dependiendo de la especie. En todas las especies del grupo el enterramiento es total. *Austrolebias luteoflammulatus*, en ocasiones, cuando realiza DL puede adoptar una posición en la que el cuerpo forma un ángulo de  $45^\circ$  con la vertical, y con la cabeza hacia arriba. En esa posición puede realizar ciertos desplazamientos hacia adelante o atrás. Se observa el DS en forma muy frecuente y con duración mayor a 1s. Por su parte, *A. quirogai* puede presentar DLV aunque con poca frecuencia. Se observa el DS en forma muy frecuente y de corta duración. Algo característico de esta especie es que cuando el macho hace IE, la hembra hace unos movimientos como de golpeteo o mordisqueo al poro genital del macho (PG). Por su parte, el macho de *A. gymnoventris* (Amato, 1986) se distingue de los otros en que la unidad predominante es el Despliegue Lateral entre la cual intercala vibraciones (DLV) de muy corta duración ( $< 1s$ ). El Despliegue Sigmoide no es una unidad central en el cortejo, aunque puede realizarla en forma esporádica.

Al realizar el ACP incluyendo todas las especies agrupadas por clado, y todos los caracteres considerados, se observa una tendencia del grupo “Megalebias” a separarse del resto de las *Austrolebias* en forma clara. Entre los otros subgrupos se observa un mayor solapamiento (fig. 7), aunque el grupo *A. luteoflammulatus* es el que más se acerca a “Megalebias”. El grupo *A. bellottii* forma dos grupos separados, y en una posición entre medio de ambos se encuentra *A. reicherti*. Los CP 1 y 2 explican el 33,79% de la varianza de los datos.

Las variables que tienden a separar a las “Megalebias” del resto, hacia valores positivos del CP 1 y CP 2 son, en mayor medida, el Despliegue Lateral Abrazador, Despliegue Sigmoide Abrazador, la Palpación Genital, la Pasadita, la duración del Despliegue Sigmoide y del Despliegue Lateral (fig. 8).

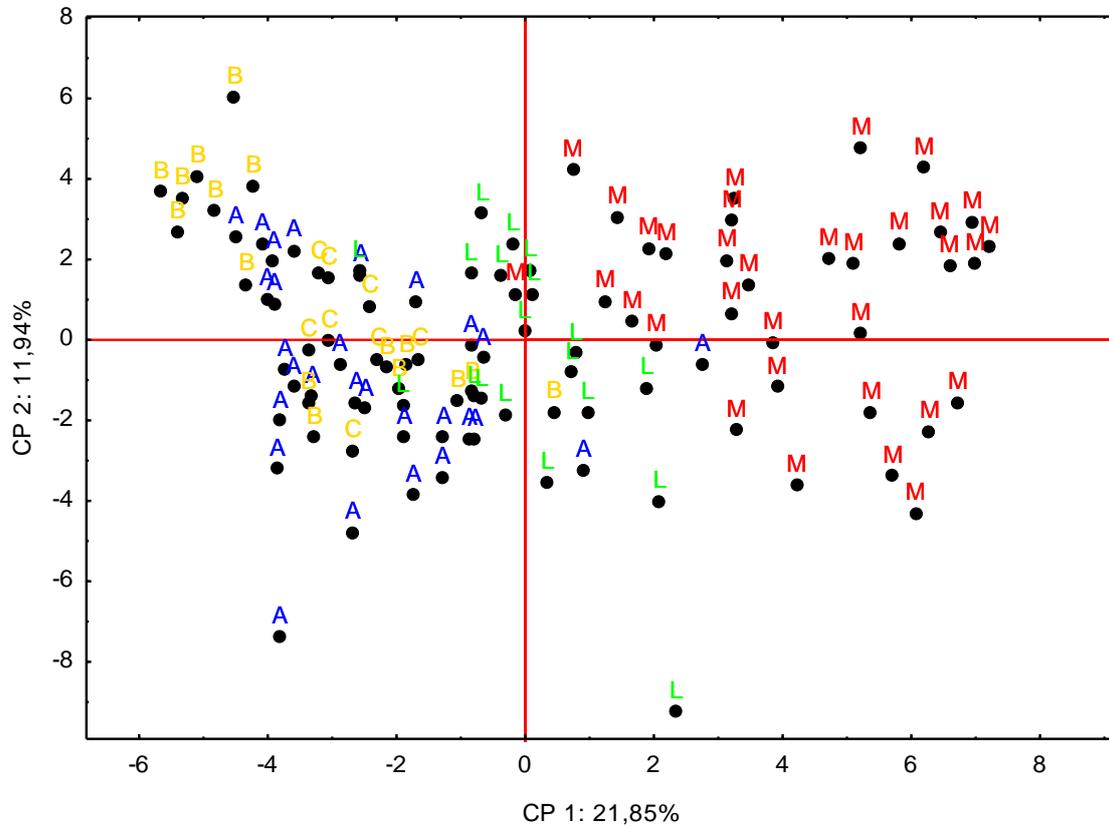


Figura 7. ACP del género utilizando la totalidad de los caracteres transformados mediante transformación Z y agrupados por clados. M: subgrupo Megalebias; A: subgrupo *A. affinis*; B: subgrupo *A. bellottii*; L: subgrupo *A. luteoflammulatus*; C: subgrupo *A. charrua*.



Tabla 4. Caracteres que presentaron señales filogenéticas significativas y “posibles señales” (señaladas con \*). a) Loureiro, 2004; b) Costa, 2010; c) García *et al.*, 2002. Se indica con rojo las señales filogenéticas comunes a los tres árboles y con amarillo las señales con K>1. Ver códigos de caracteres en tabla 2.

a)	DL-t	DLA-t	DLA-f	DLA-p	DLA-fr	P-t	P-f	P-p	P-fr	IS-fr	AE-t	A-t	Eh-t	DS-f	PG-fr	PG-f
MSE árbol	3,15	4,52	24,22	0	0	0,18	0,9	0	0	0	10,66	240,02	365,15	162,06	0	15,93
MSE <sub>0</sub> /MSE obs	1,95	2,19	2,51	2,75	3,82	4,5	2,43	2,83	2,74	1,32	1,49	1,13	1,84	1,1	1,97	2,05
MSE <sub>0</sub> /MSE esp	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47
K	1,32	1,49	1,7	1,86	2,59	3,06	1,65	1,92	1,86	0,89	1,01	0,77	1,25	0,75	1,34	1,39
Nº MSEs ≤ al original	0	1	5	0	1	0	2	0	0	37	23	44	2	48	28	40
P valor (señal filogenética)	0	0,001	0,005	0	0,001	0	0,002	0	0	0,037	0,023	0,044	0,002	0,048	0,028	0,04

b)	DL-t	DLA-t	DLA-f	DLA-p	DLA-fr	P-t	P-f	P-p	P-fr	IS-fr	AE-t	A-t	Eh-t	DS-f	PG-fr	Ah-t	DS-fr
MSE árbol	3,3	4,4	28,3	0	0	0,22	1,06	0	0	0	10,94	200,55	394,94	131,47	0,01	3611,89	0
MSE <sub>0</sub> /MSE obs	2,7	2,17	1,75	2,75	3,06	4,77	2,05	2,8	2,8	1,87	1,67	1,97	2,26	2,43	1,46	1,92	2,97
MSE <sub>0</sub> /MSE esp	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18
K	1,24	0,99	0,8	1,26	1,4	2,18	0,94	1,28	1,28	0,85	0,77	0,9	1,03	1,11	0,67	0,88	1,36
Nº MSEs ≤ al original	4	0	11	1	1	0	7	0	2	29	14	14	6	18	58	44	54
P valor (señal filogenética)	0,004	0	0,011	0,001	0,001	0	0,007	0	0,002	0,029	0,014	0,014	0,006	0,018	0,058*	0,044	0,054*

c)	DL-t	DLA-t	DLA-f	DLA-p	DLA-fr	P-t	P-f	P-p	P-fr	IS-fr	AE-t	A-t	Eh-t	Eh-p	DSA-t	Ah-t
MSE árbol	4,06	5,99	14,35	0	0	0,4	1,24	0	0	0	13,24	222,12	305,25	0	1,38	3793,82
MSE <sub>0</sub> /MSE obs	2,13	1,58	3,4	1,79	2,36	2,52	1,66	2,05	2,27	2,21	1,53	1,6	3	2,04	1,38	1,71
MSE <sub>0</sub> /MSE esp	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
K	1,06	0,79	1,7	0,89	1,18	1,26	0,83	1,03	1,14	1,11	0,76	0,8	1,5	1,02	0,69	0,86
Nº MSEs ≤ al original	8	13	0	8	3	9	20	0	7	12	47	38	0	10	33	55
P valor (señal filogenética)	0,008	0,013	0	0,008	0,003	0,009	0,02	0	0,007	0,012	0,047	0,038	0	0,01	0,033	0,055*

Se observaron 13 caracteres en los que se encontraron señales filogenéticas significativas comunes a los tres árboles de referencia. Éstos son: la duración del Despliegue Lateral (DL-t), el Despliegue Lateral Abrazador en todos sus parámetros (DLA-t, -f, -p, -fr), la Pasadita en todos sus parámetros (P-t, -f, -p, -fr), la frecuencia relativa de la Invitación al Seguimiento (IS-fr), la duración de la Aceptación al Enterramiento (AE-t), la duración del Apareamiento de machos (A-t) y la duración de la Espera de las hembras (Eh-t). Se encontraron 6 caracteres que presentaron señal filogenética significativa y con un K>1 en los tres árboles de referencia. Estos son: la duración del Despliegue Lateral (DL-t), la frecuencia relativa del Despliegue Lateral Abrazador (DLA-fr), la duración, proporción de tiempo y frecuencia relativa de la Pasadita (P-t, -p, -fr) y la duración de la Espera de las hembras (Eh-t). El resto de los caracteres presentaron baja señal filogenética y un K<1. El carácter que presentó mayor señal filogenética fue la duración de la Pasadita (P-t), que en el árbol de Loureiro (2004) tuvo un K=3,06 y en el de Costa (2010) un K=2,18. Sin embargo, para el árbol de García *et al.* 2002 el carácter que presentó el mayor K fue la frecuencia absoluta del Despliegue Lateral Abrazador (DLA-f; K=1,7). Los mapeos de los caracteres que presentaron señal filogenética significativa y K>1 (excepto la unidad P, ver discusión) en los tres árboles de referencia se muestran en las figuras 9 a 11. Los valores reales de estos caracteres para cada especie se detallan en el apéndice 3.

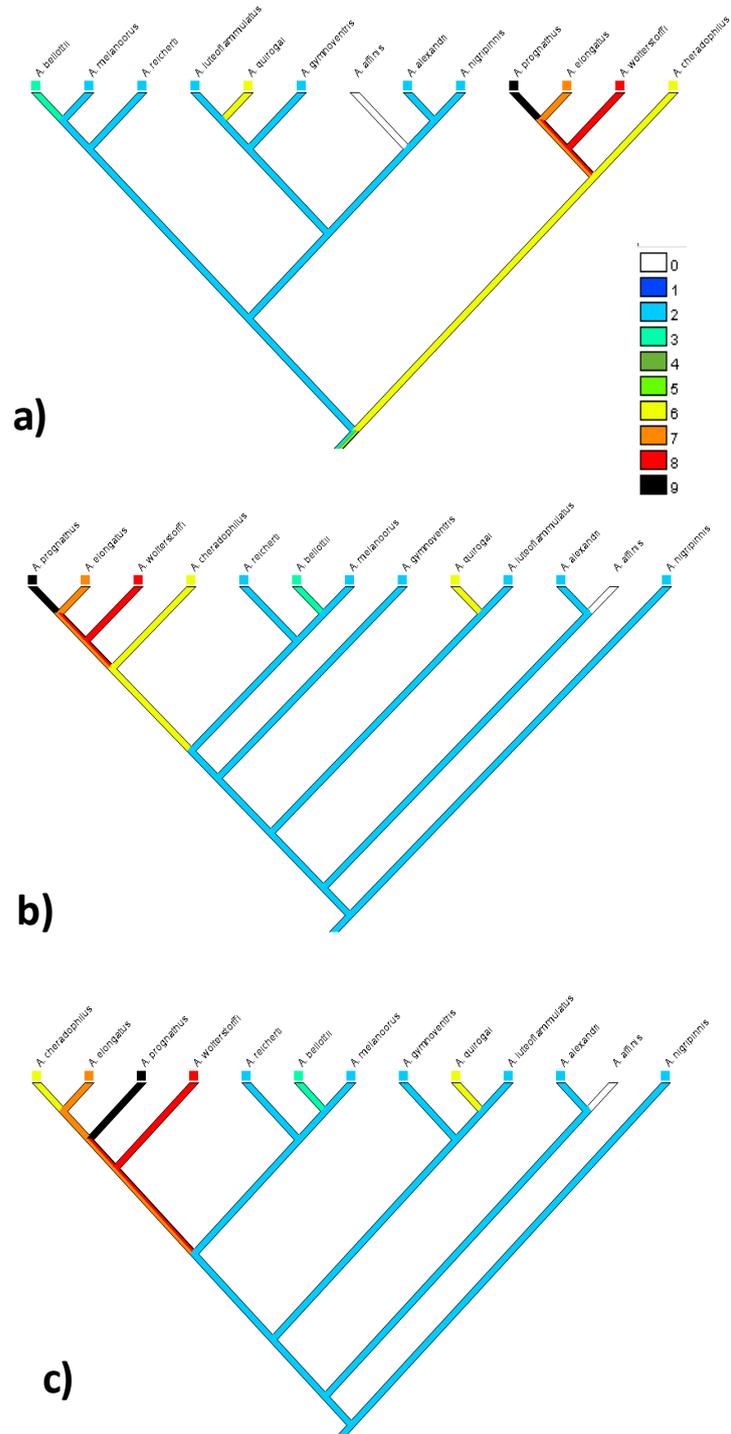


Figura 9. Mapeo de la duración del Despliegue Lateral (DL-t) mediante el método *gap weighting*. Los colores indican el estado del carácter, 0-menor duración, 9-mayor duración. a) Loureiro, 2004; b) Costa, 2010; c) García *et al.*, 2002. Los valores de duración de cada especie se detallan en el apéndice 3.

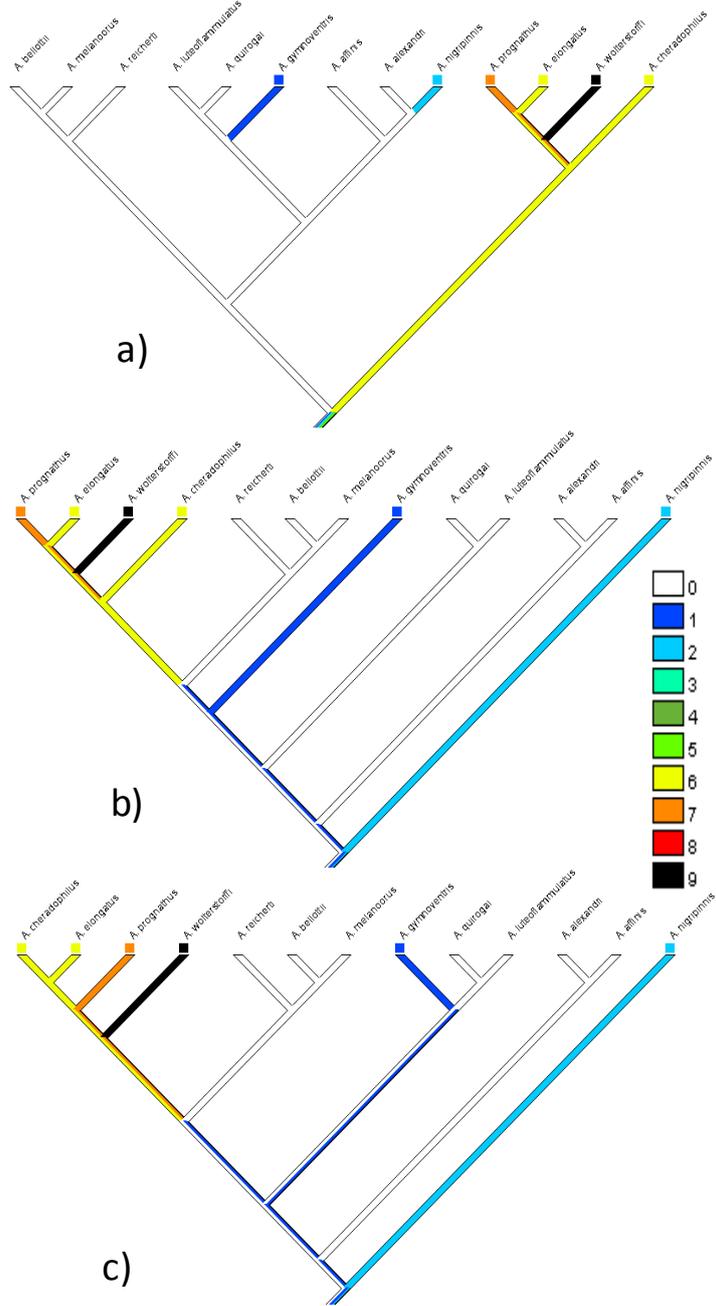


Figura 10. Mapeo de la frecuencia relativa del Despliegue Lateral Abrazador (DLA-fr) mediante el método *gap weighting*. Los colores indican el estado del caracter, 0-menor frecuencia relativa, 9-mayor frecuencia relativa. a) Loureiro, 2004; b) Costa, 2010; c) García *et al.*, 2002. Los valores de frecuencia relativa de cada especie se detallan en el apéndice 3.

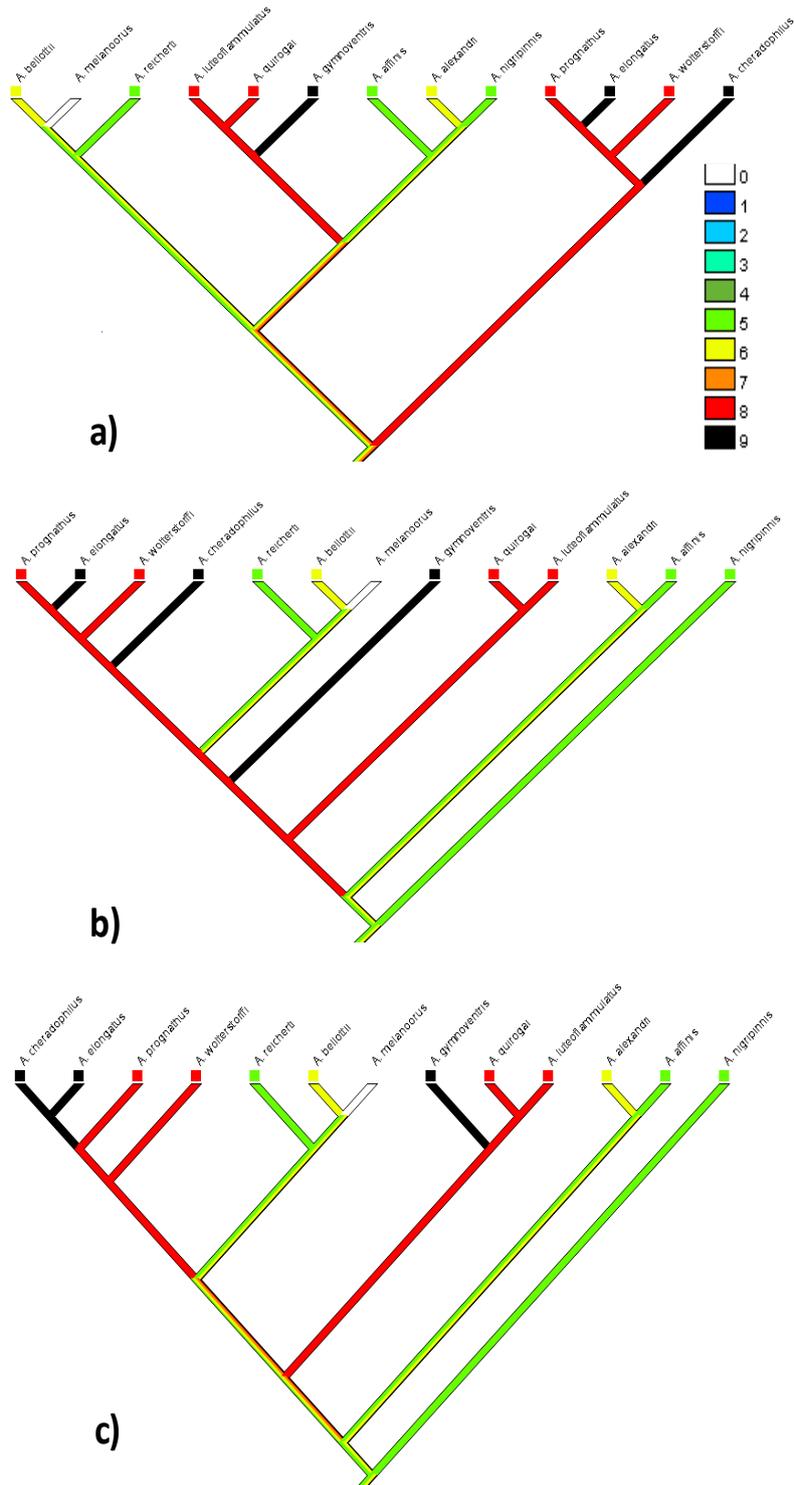


Figura 11. Mapeo de la duración de Espera de las hembras (Eh-t) mediante el método *gap weighting*. Los colores indican el estado del carácter, 0-menor duración, 9-mayor duración. a) Loureiro, 2003; b) Costa 2010; c) García *et al.*, 2002. Los valores de duración de cada especie se detallan en el apéndice 3.

Comparando los árboles entre sí, el árbol de Costa (2010) resultó ser el más jerárquico de los tres, luego el de García *et al.* (2002), y el menos jerárquico fue el de Loureiro (2004) ( $\frac{MSE0}{MSE}$  *esperado* : 2,18; 2; 1,47 respectivamente).

### *Divergencias en simpatría*

Cuando se realiza el ACP para el grupo “Megalebias” y se proyectan los casos en los ejes 1 y 2, la tendencia de los agrupamientos es que la mayoría de los individuos de *A. prognathus* se separen del grupo que contiene a las otras tres especies del clado. Esta especie tiende a agruparse en los valores positivos del CP1, y negativos del CP2, mientras que la mayoría de los individuos de *A. cheradophilus* y *A. wolterstorffi* se agrupan en los valores negativos del CP1 y positivos del CP2 (fig. 12). Los componentes 1 y 2 explican el 33,89% de la varianza. Cuando se proyecta la contribución de las variables en el análisis, se puede observar qué caracteres son los que tienden a diferenciar el grupo (fig. 13). La principal separación de *A. prognathus* con el resto de las especies se observa en el CP1. Las variables que contribuyen en mayor medida a esta separación son la frecuencia relativa del Apareamiento, tanto de machos como de hembras (A-fr; Ah-fr), el Despliegue Lateral Vibrado en todos sus parámetros (DLV-t, -f, -p, -fr), la frecuencia absoluta del Apareamiento en machos (A-f) y la frecuencia relativa del Despliegue Sigmoide Circular (DSC-fr). las variables que contribuyen en mayor medida para la separación hacia valores negativos son la frecuencia absoluta y relativa y la proporción de tiempo ocupada por el Despliegue Lateral (DL-f, -fr, -p), la frecuencia absoluta y relativa y la proporción de tiempo ocupado por el Despliegue Sigmoide (DS-f, -fr, -p), la frecuencia relativa y la proporción de tiempo ocupado por todos los Despliegues Sigmoides (DSs-fr, -p), la frecuencia absoluta del Despliegue Lateral Abrazador (DLA-f) y la frecuencia relativa y absoluta de la Palpación Genital (PG-fr, -f) (apéndice 4).

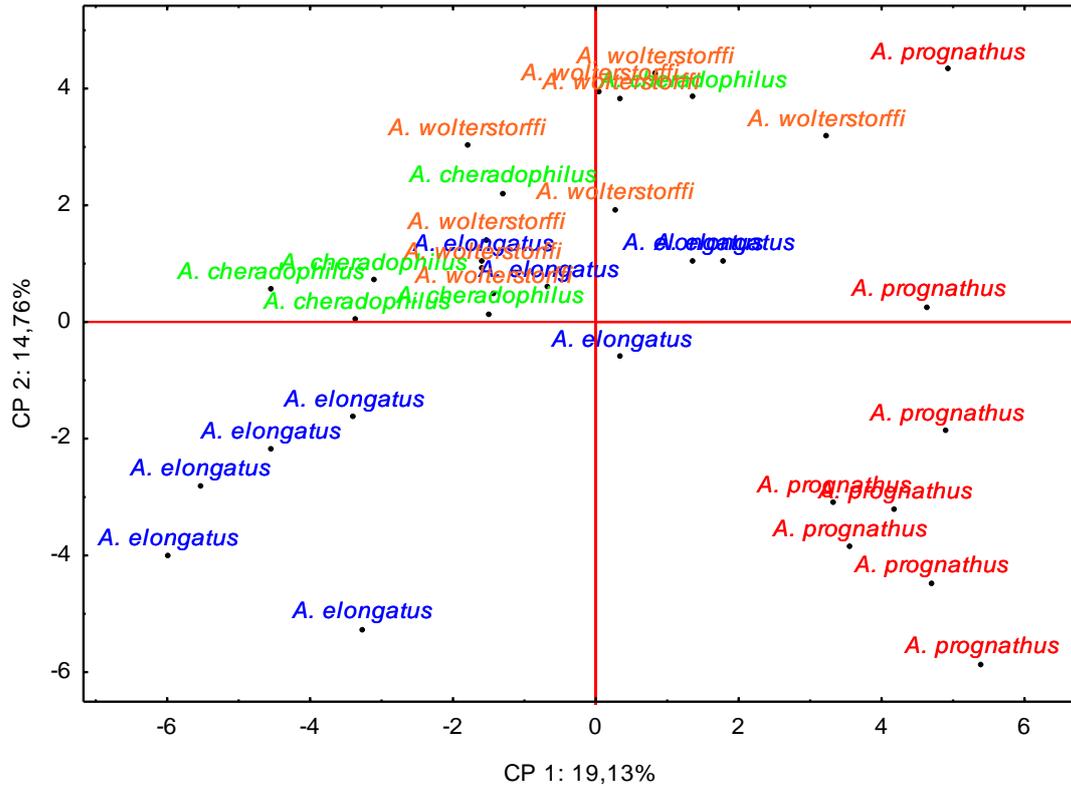


Figura 12. Análisis de Componentes Principales del grupo “Megalebias” en el que se incluyó la totalidad de los caracteres analizados, transformados mediante transformación Z.

Las variables que contribuyen en mayor medida al CP2 fueron, hacia valores positivos son la proporción de tiempo ocupada por el Apareamiento de las hembras (Ah-p), la duración de la Aceptación al Enterramiento (AE-t) y la duración del Apareamiento de hembras (Ah-t). Las variables que contribuyen más hacia valores negativos del CP2 son el Despliegue Lateral Vibrado en todos sus parámetros (DLV-t, -f, -p, -fr), la frecuencia absoluta y la proporción de tiempo ocupados por la Invitación al Enterramiento (IE-f, -p), la frecuencia relativa de los Despliegues Laterales (DLs-fr), la proporción de tiempo ocupada por la Quietud Expectante (QE-p) y la proporción de tiempo ocupada por los Despliegues Sigmoides (DSs-p) (apéndice 4).

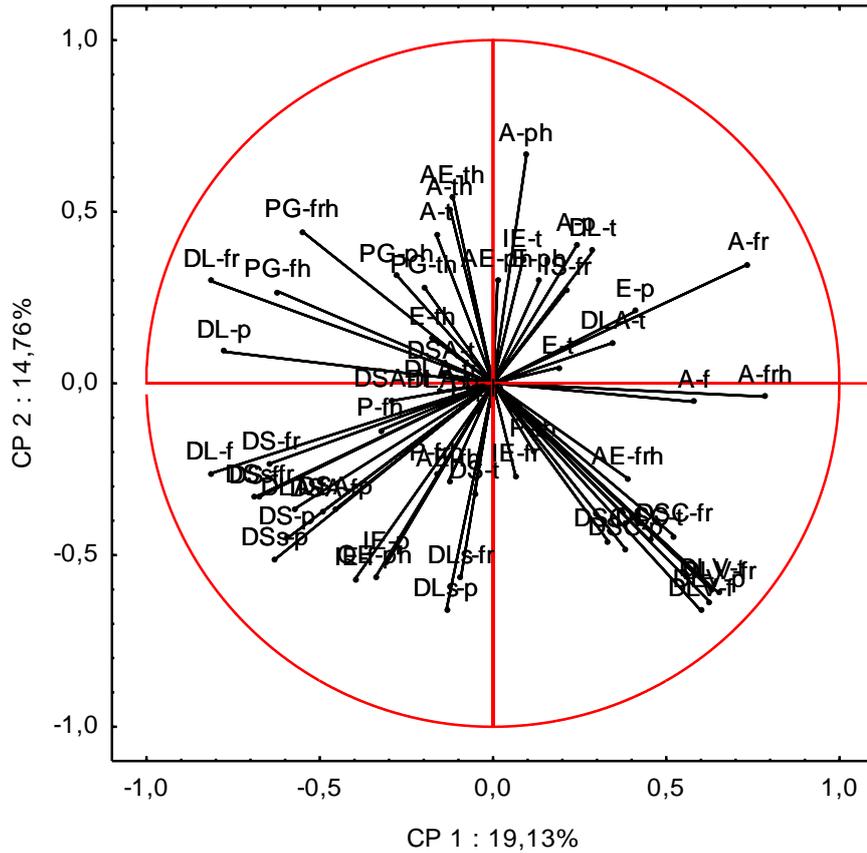


Figura 13. Proyección de los caracteres en el plano de los componentes 1 y 2 del grupo “Megalebias”. Ver códigos de caracteres en tabla 2.

Se encontraron 12 caracteres que evidencian diferencias significativas entre *A. prognathus* y *A. cheradophilus*, en 12 entre *A. prognathus* y *A. wolterstorffi*, pero sólo en uno entre *A. cheradophilus* y *A. wolterstorffi* (tabla 5). Diez de los caracteres que presentaron diferencias entre *A. prognathus* y *A. cheradophilus*, también aparecen entre los que aportan en mayor medida a los componentes principales del ACP. Cuando se comparan *A. prognathus* y *A. wolterstorffi*, son 8 los caracteres con diferencias que aportan en mayor medida a los componentes principales del ACP. El único carácter que presentó diferencias entre *A. cheradophilus* y *A. wolterstorffi*, no se encontró entre los que aportaron en mayor medida a los componentes del ACP. Los box-plot ilustran las diferencias entre las especies en los caracteres con diferencias (figs 14 a 18).

Tabla 5. Caracteres que presentaron diferencias significativas entre las especies simpátricas. a) diferencias entre *A. prognathus* y *A. cheradophilus*; b) entre *A. prognathus* y *A. wolterstorffi* y c) *A. cheradophilus* y *A. wolterstorffi*. Test Mann Whithney-U. Ver códigos de caracteres en tabla 2. Se indica con rojo los caracteres que aportaron en mayor medida al ACP.

a)	DL-f	DL-fr	DLV-t	DLV-f	DLV-p	DLV-fr	A-t	Ah-fr	AE-t	AE-fr	PG-f	PG-fr
z	3,41	3,73	3,33	3,25	3,31	3,38	3,16	2,75	2,69	2,82	3,79	3,81
p	0,004	0,001	0,005	0,007	0,006	0,004	0,009	0,036	0,043	0,028	0,001	0,001
b)	DLV-t	DLV-f	DLV-p	DLV-fr	A-t	Ah-fr	E-t	E-p	PG-t	PG-f	PG-p	PG-fr
z	3,26	3,08	3,22	3,22	3,04	2,95	3,43	3,28	2,87	3,12	3,76	2,90
p	0,007	0,012	0,008	0,008	0,014	0,019	0,004	0,006	0,024	0,011	0,001	0,022
c)	DLA-t											
z	2,65											
p	0,048											

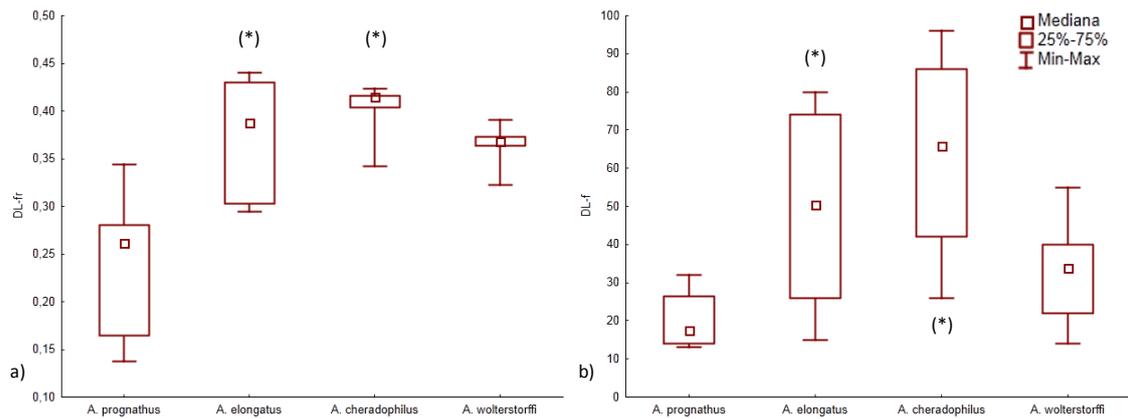


Figura 14. Box-plot de caracteres que presentaron diferencias significativas entre *A. prognathus* y *A. cheradophilus*. a) DL-fr; b) DL-f. (\*) indica diferencias significativas con *A. prognathus*.

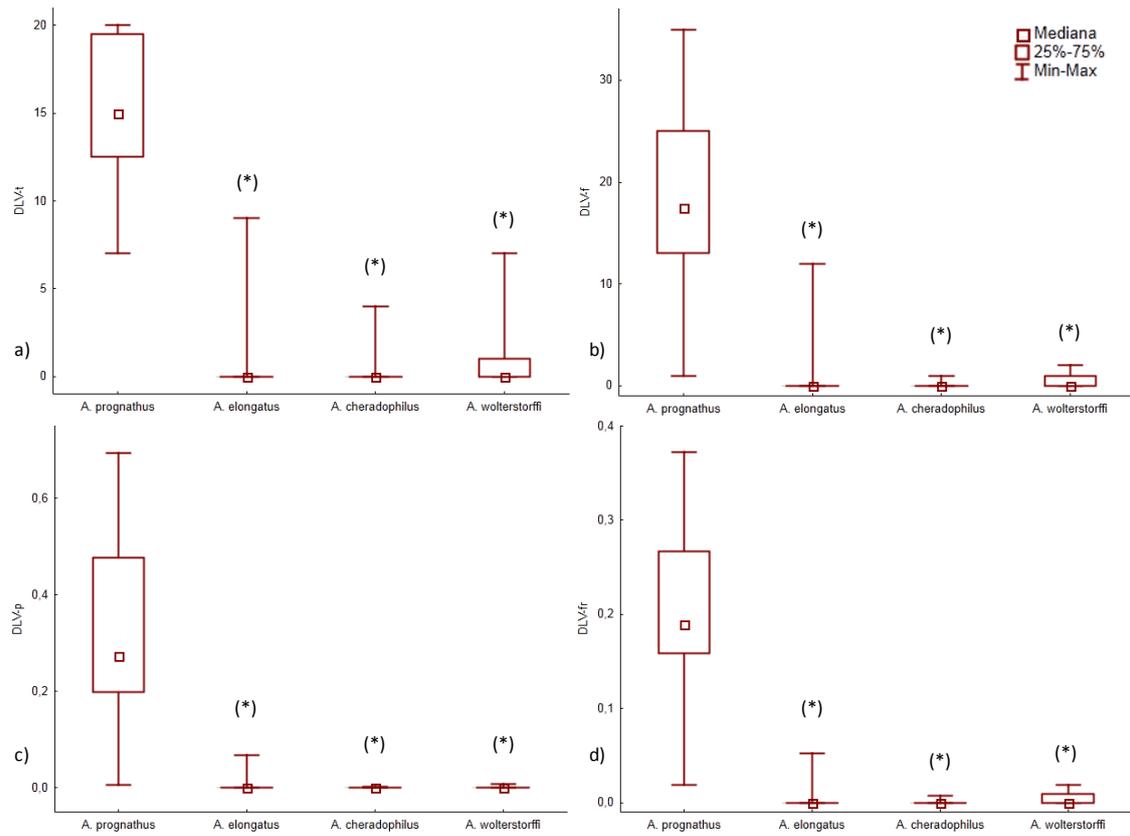


Figura 15. Box-plot de caracteres que presentaron diferencias significativas entre las “Megalebias”. a) DLV-t; b) DLV-f; c) DLV-p; d) DLV-fr. (\*) indica diferencias significativas con *A. prognathus*.

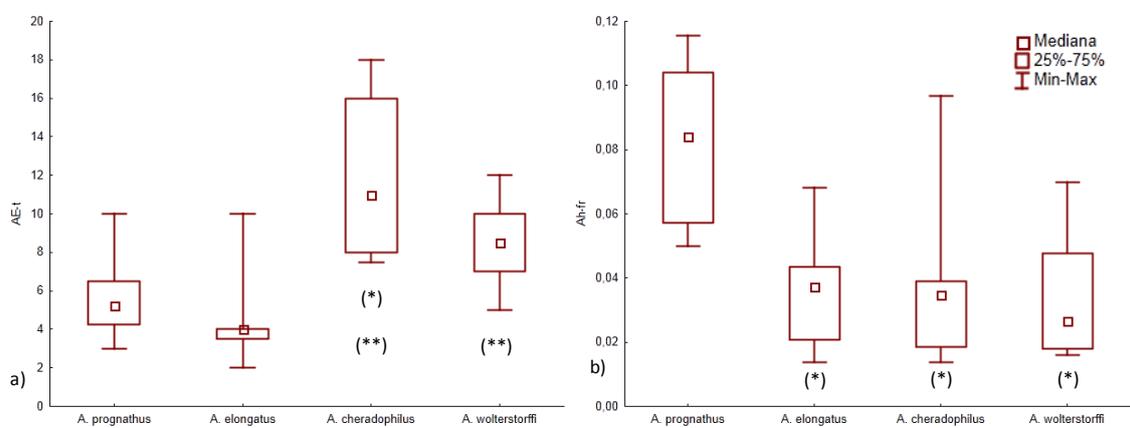


Figura. 16. Box-plot de caracteres que presentaron diferencias significativas en el grupo “Megalebias”. a) AE-t; b) Ah-fr. (\*) indica diferencias significativas con *A. prognathus*. (\*\*) indica diferencias significativas con *A. elongatus*.

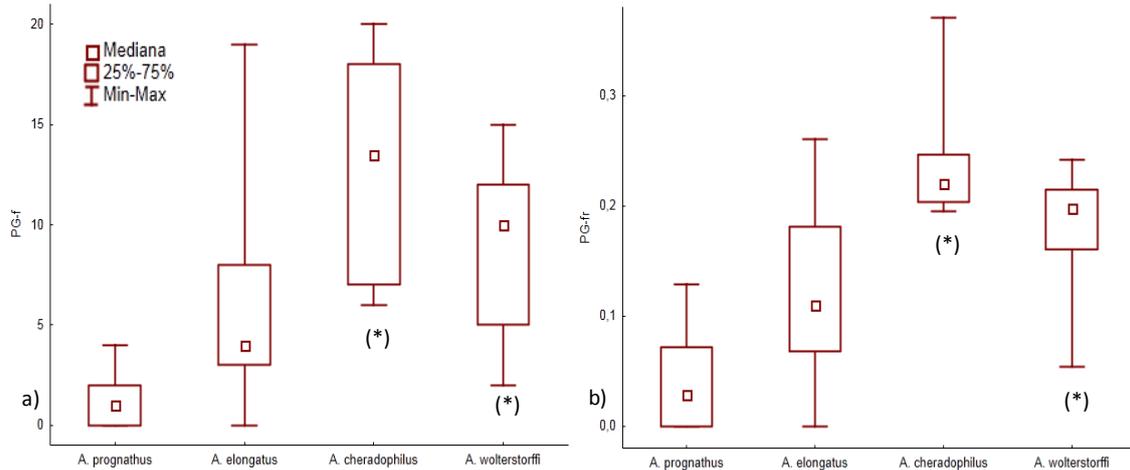


Figura. 17: Box-plot de caracteres que presentaron diferencias significativas en el grupo “Megalebias”. a) PG-f; b) PG-fr. (\*) indica diferencias significativas con *A. prognathus*.

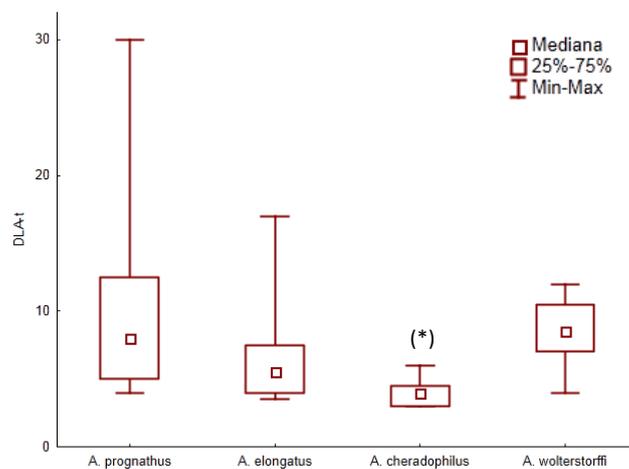


Figura. 18: Box-plot de caracteres que presentaron diferencias significativas en el grupo “Megalebias”. (\*) indica diferencias significativas con *A. wolterstorffi*.

Al analizar los datos del grupo *A. affinis*, se observa que los agrupamientos que muestra la proyección de los casos del ACP tienen cierta tendencia a que los individuos de *A. nigripinnis* se separen del grupo que forman *A. alexandri* y *A. affinis* a lo largo del CP1 y *A. alexandri* se separa de *A. nigripinnis* y *A. affinis* a lo largo del CP2 (fig. 19). Los ejes explicaron el 38,28% de la varianza.

Al observar la proyección de las variables en el plano de los componentes 1 y 2 (fig. 20), pueden apreciarse las unidades que tienden a separar a *A. nigripinnis* y a *A.*

*alexandri*. De éstas, las que contribuyen en mayor medida hacia valores positivos del CP1 son la Aceptación al Enterramiento en todos sus parámetros (AE-t, -f, -p, -fr) la frecuencia relativa y la proporción de tiempo ocupada por la Invitación al Enterramiento (IE-fr, -p), la frecuencia absoluta de los Apareamientos de machos (A-f), y la proporción de tiempo ocupado por la Espera de las hembras (Eh-p). De éstas, las que presentaron diferencias significativas entre *A. nigripinnis* y *A. alexandri* fueron la frecuencia relativa de la Invitación al Enterramiento (IE-fr) y la duración de la Aceptación al Enterramiento (AE-t) (apéndice 4).

Hacia valores negativos, las variables que contribuyen en mayor medida son el Despliegue Sigmoide Abrazador en todos sus parámetros (DSA-t, -f, -p, -fr), la duración y la proporción de tiempo ocupada por el Despliegue Sigmoide (DS-t, -p), la frecuencia absoluta y relativa y la proporción de tiempo ocupado por el Despliegue Lateral Abrazador (DLA- f, -fr, -p), la duración del Apareamiento de machos y de hembras (A-t, Ah-t), la frecuencia relativa de los Despliegues Laterales (DLs) y la Palpación Genital en todos sus parámetros (PG-t, -f, -p, -fr). De éstas, las que presentan diferencias significativas entre las especies a considerar son el Despliegue Sigmoide Abrazador en todos sus parámetros, la duración y la proporción de tiempo ocupado por el Despliegue Sigmoide (DS-t, -p) y la duración del Apareamiento de las hembras (Ah-t) (apéndice 4).

Al Componente Principal 2 contribuyeron en mayor medida, hacia valores positivos, la proporción de tiempo y la frecuencia relativa del Apareamiento de machos y de hembras (A-p, -fr; Ah-p, -fr) y la duración de la Invitación al Enterramiento (IE-t). Hacia valores negativos contribuyen en mayor medida la proporción de tiempo ocupado por los Despliegues Laterales (DLs-p, -fr), la proporción de tiempo y las frecuencias, relativa y absoluta del Despliegue Lateral (DL-p, -fr, -f) y del Despliegue Sigmoide Circular (DSC-p, -fr, -f), la proporción de tiempo ocupado por la Quietud Expectante (QE-p) y la frecuencia absoluta de la Invitación al Enterramiento. De estos caracteres, presentaron diferencias significativas entre *A. nigripinnis* y *A. alexandri* la duración de la Invitación al Enterramiento (IE-t), la frecuencia absoluta de la Invitación al Enterramiento (IE-f) y la frecuencia relativa del Despliegue Lateral (DL-fr) (apéndice 4).

Se encontraron 15 caracteres que presentaron diferencias significativas entre *A. nigripinnis* y *A. alexandri* (tabla 6). De éstos, 13 variables están entre las que más contribuyen a los componentes principales (tabla 6). En las figuras 21 a 24 se observa cómo se diferencian estos caracteres entre las especies.

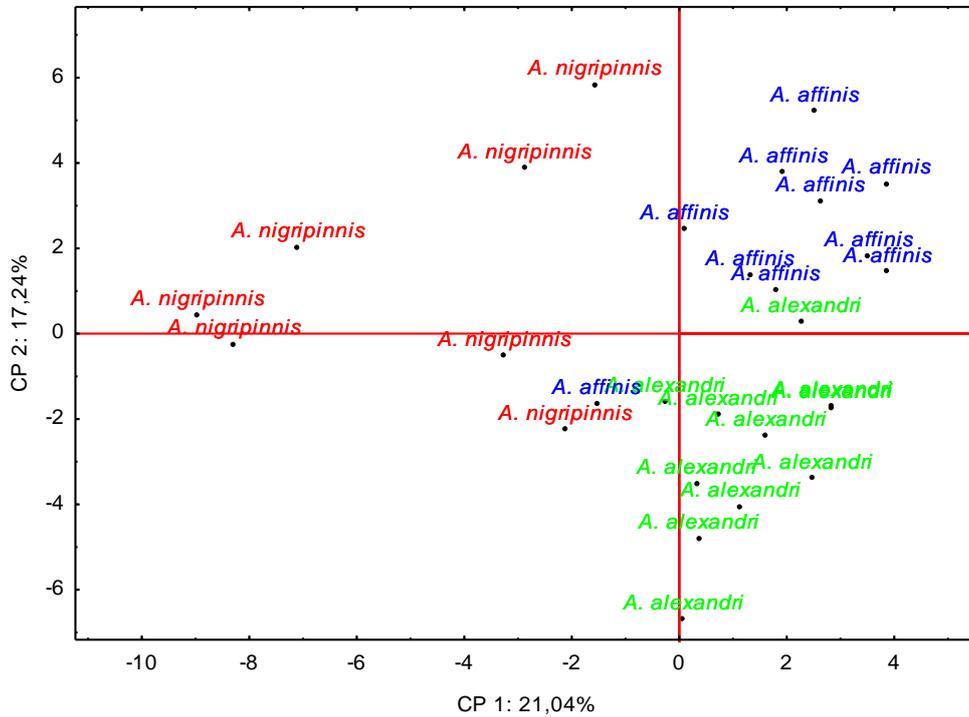


Figura 19. Análisis de Componentes Principales del grupo *A. affinis* en el que se incluyó la totalidad de los caracteres analizados, transformados mediante transformación Z.

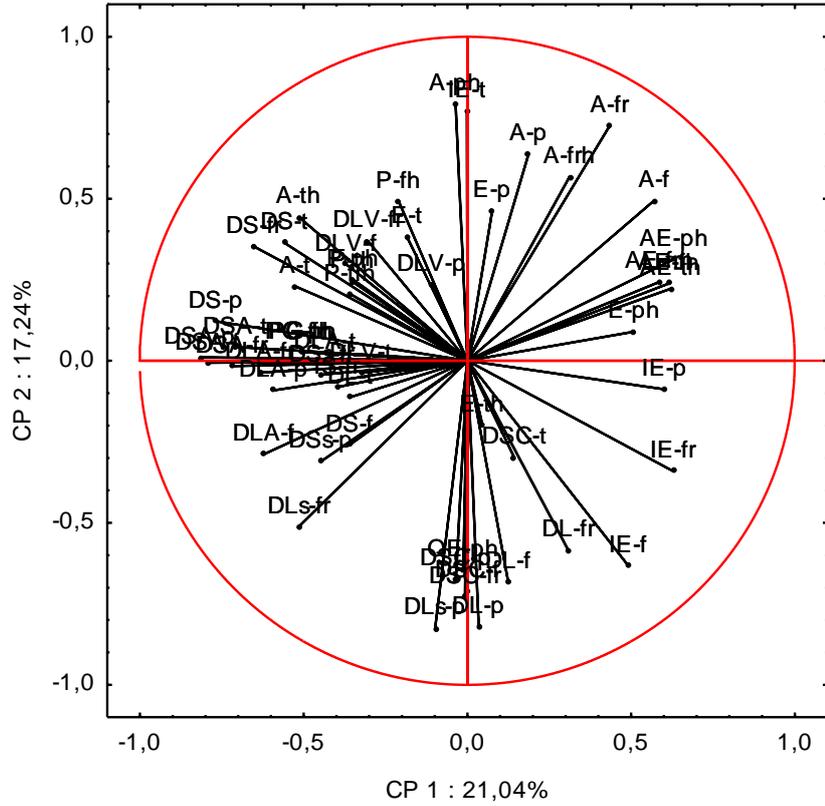


Figura 20. Proyección de los caracteres en el plano de los ejes 1 y 2 para el grupo *A. affinis*. Ver códigos de caracteres en tabla 2.

Tabla 6. Caracteres que presentaron diferencias significativas entre *A. alexandri* y *A. nigripinnis* (test Mann Whitney-U). Ver códigos de caracteres en tabla 2. Se indica con rojo los caracteres que aportaron en mayor medida al ACP.

	DL-fr	DS-t	DS-p	DS-fr	DSA-t	DSA-f	DSA-p	DSA-fr	IE-t	IE-f	IE-fr	AE-t	Ah-t	difA-t	IS-fr
z	3,09	3,08	3,49	3,49	2,55	2,66	2,62	2,66	3,07	3,40	3,21	2,43	2,66	2,57	2,40
p	0,006	0,006	0,001	0,001	0,032	0,024	0,026	0,024	0,006	0,002	0,004	0,045	0,023	0,031	0,049

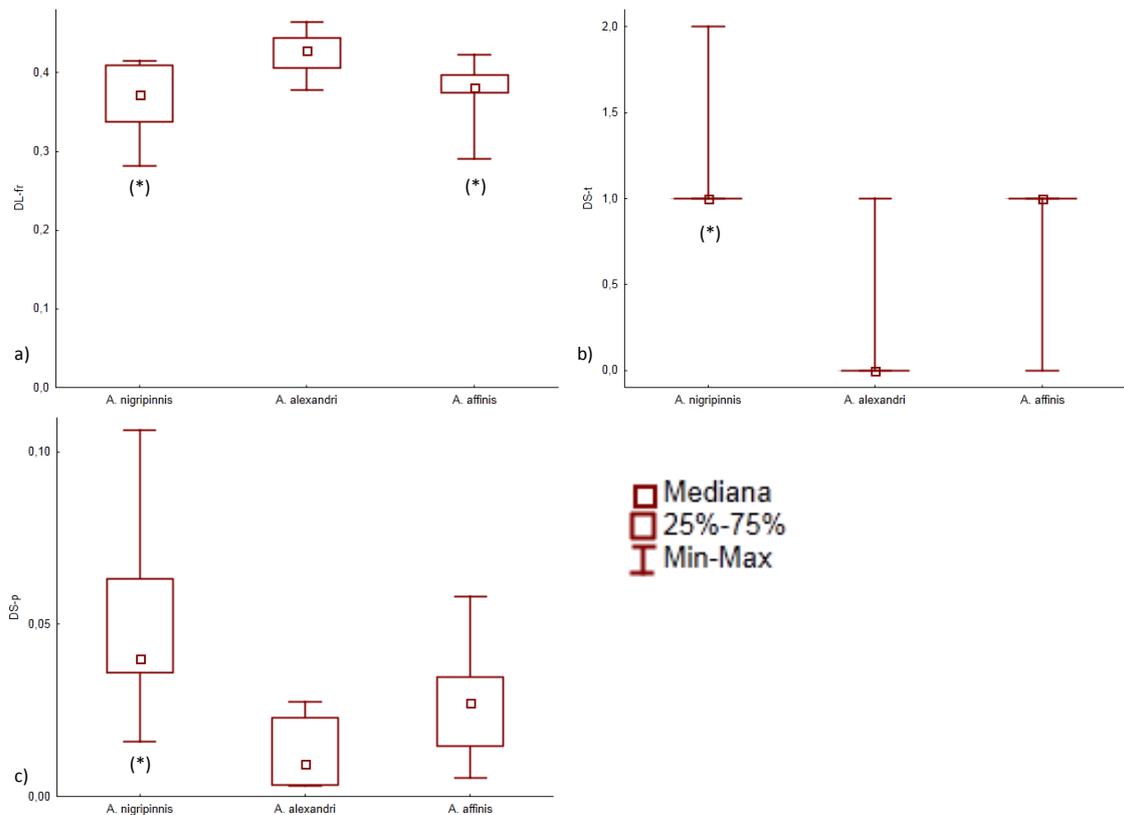


Figura 21. Box-plot de caracteres que presentaron diferencias significativas en el grupo *A. affinis*. a) DL-fr; b) DS-t; c) DS-p. (\*) indica diferencias significativas con *A. alexandri*.

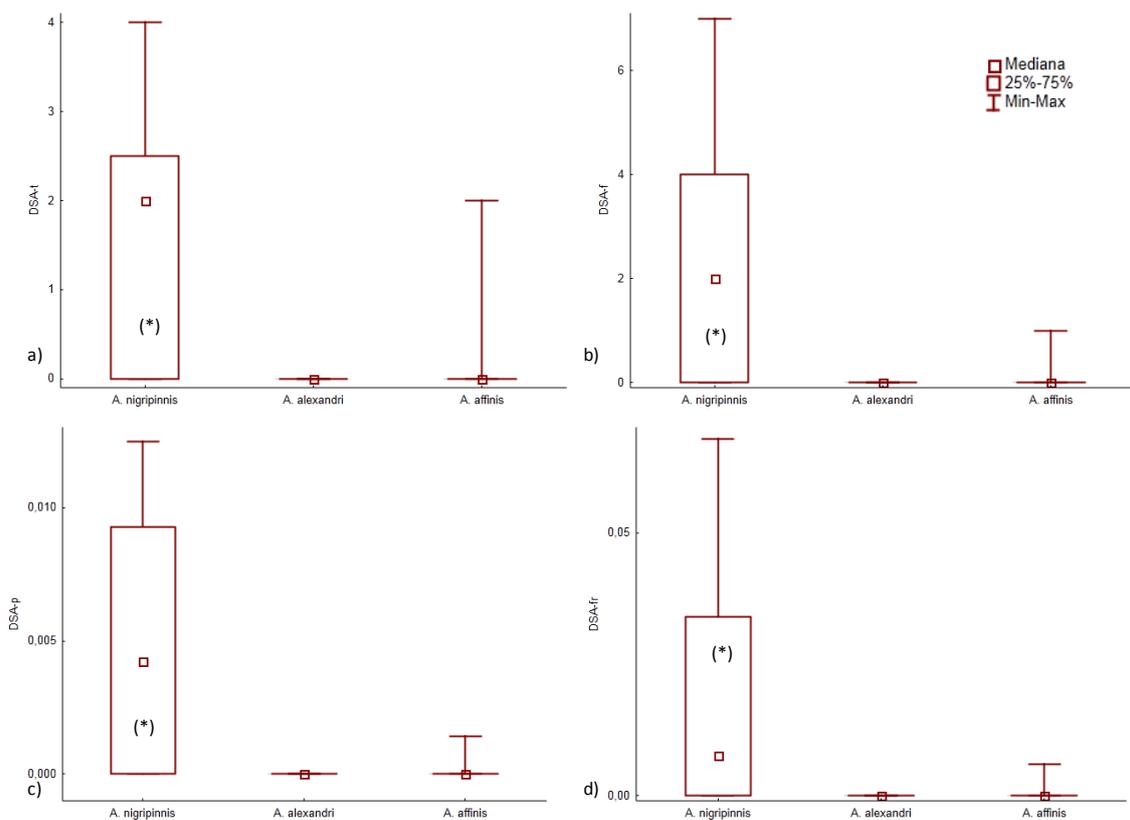


Figura 22. Box-plot de caracteres que presentaron diferencias significativas entre *A. nigripinnis* y *A. alexandri*. a) DSA-t; b) DSA-f; c) DSA-p; d) DSA-fr. (\*) indica diferencias significativas con *A. alexandri*.

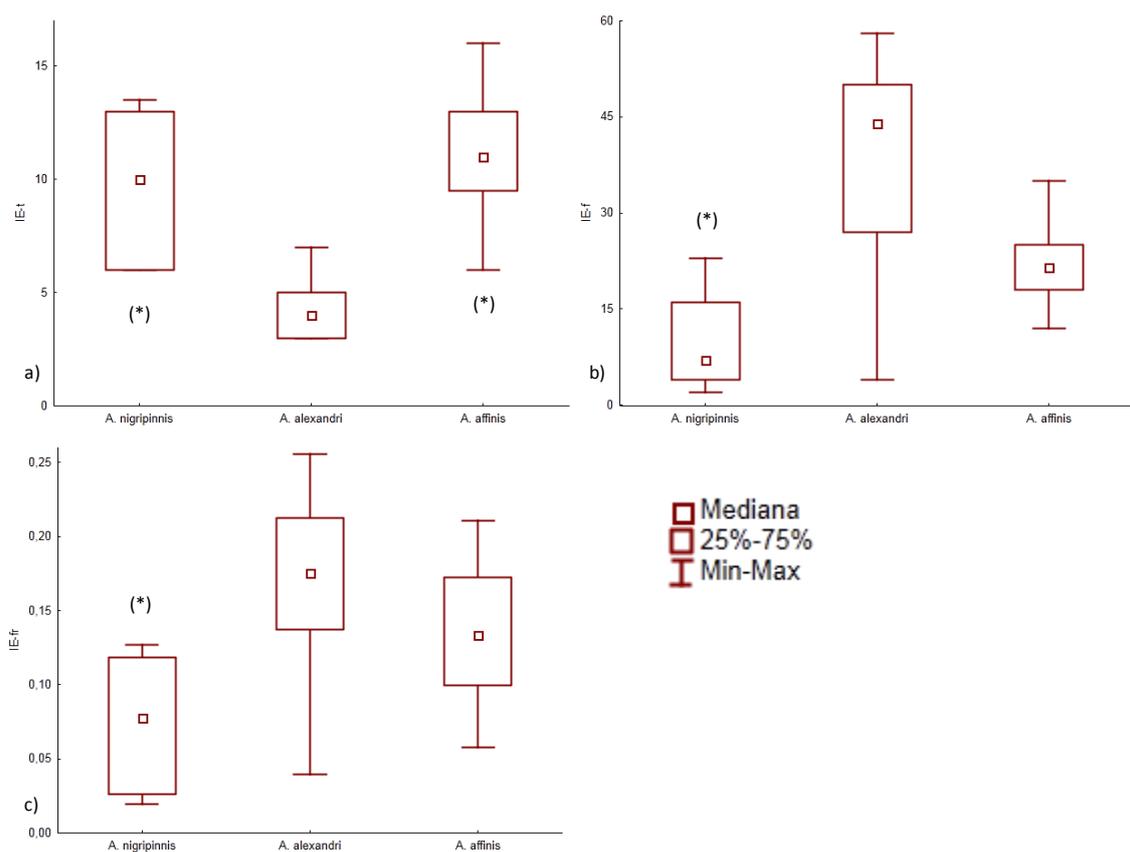


Figura 23. Box-plot de caracteres que presentaron diferencias significativas en el grupo *A. affinis*. a) IE-t; b) IE-f; c) IE-fr. (\*) indica diferencias significativas con *A. alexandri*.

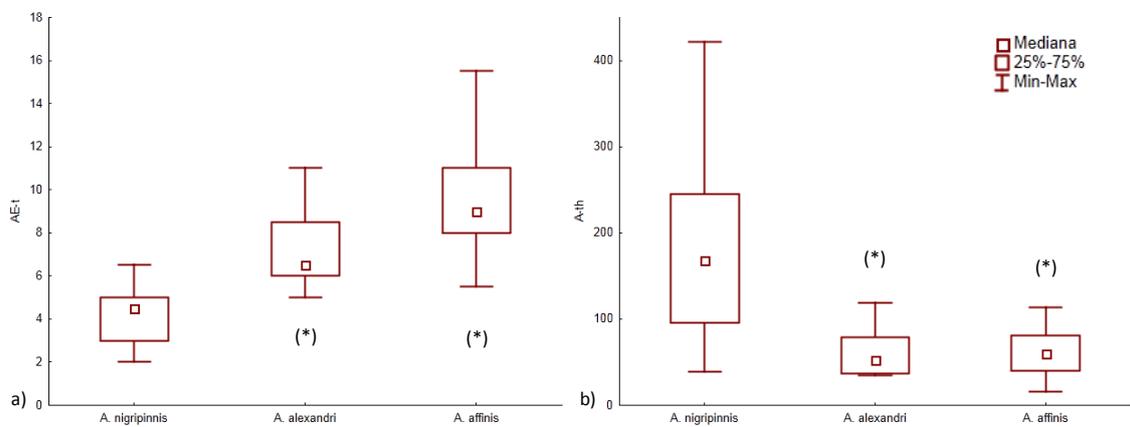


Figura 24. Box-plot de caracteres que presentaron diferencias significativas entre *A. nigripinnis* y *A. alexandri*. a) AE-t; b) Ah-t. (\*) indica diferencias significativas con *A. nigripinnis*.

## Discusión

Los resultados cualitativos de este trabajo indican que el cortejo del género *Austrolebias* es muy conservado en el sentido de que las especies realizan las mismas unidades comportamentales básicas. Sin embargo hay ciertos indicadores, principalmente diferencias cuantitativas, como ser frecuencias y duraciones de algunas unidades, que tienden a agrupar las especies más emparentadas. La historia evolutiva del género no está del todo clara, ya que distintos abordajes han arrojado distintas topologías de árboles filogenéticos (Loureiro, 2004; Costa, 2002, 2006, 2010; García *et al.*, 2002). El grupo “Megalebias” es un grupo conflictivo en cuanto a su ubicación en el árbol, que sirve como claro ejemplo. En 2002 Costa separó el género *Cynolebias* Steindachner 1876 en tres géneros: *Cynolebias sensu stricto*, *Austrolebias* y *Megalebias* (Costa, 2002). Luego el mismo autor sinonimizó *Megalebias* a *Austrolebias* (Costa, 2006), quedando el grupo “Megalebias” anidado dentro de *Austrolebias*. Este género quedó restringido geográficamente a la cuenca del Plata y Patos-Merín. Más adelante el mismo autor lo ubica en otra posición en el árbol, distinta de la anterior (Costa, 2010; fig. 2b). Por su parte Loureiro (2004) lo ubica como grupo hermano del resto de las *Austrolebias* (fig. 2a). El árbol filogenético basado en datos moleculares (García *et al.*, 2002) ubica este subgrupo anidado dentro de las *Austrolebias*, pero las relaciones dentro del mismo son diferentes que las obtenidas con datos morfológicos (fig. 3).

El cortejo de las especies del grupo “Megalebias” presenta características que lo hacen diferente del resto de las *Austrolebias* como la mayor frecuencia y duración de DLA y DSA; también las hembras son más activas que las otras *Austrolebias*, presentando dos unidades características Pasadita y Palpación Genital. La primera sólo se observó en este grupo y la segunda únicamente se observó fuera del grupo en *A. quirogai*, pero con la diferencia de que en esta especie la realizan sólo cuando el macho está en Invitación al Enterramiento. La unidad PG, o algo muy similar, fue mencionada por Belote & Costa (2003) para el género *Cynolebias*. Según Costa (2010), el grupo *Cynolebias* es hermano de *Austrolebias*, pero esta unidad comportamental fue descrita como exclusiva de las *Cynolebias* (Belote & Costa, 2003). El análisis filogenético realizado por Loureiro (2004) incluye una especie de *Cynolebias* (*C. microptalmus*), la cual se ubica como hermana de *A. cheradophilus*, y anidada dentro del grupo “Megalebias” (fig. 2a). En este estudio se observa que este carácter es compartido entre ambas especies. Además de estas similitudes, “Megalebias” y *Cynolebias* comparten

características morfológicas (como ser tamaño corporal grande) que pueden deberse a la filogenia o a convergencias evolutivas. Se ha observado en otros grupos de peces que similitudes ecológicas pueden llevar a similitudes de forma y tamaño, aunque las especies no estén directamente relacionados en la filogenia (Rüber & Adams, 2001). En la filogenia realizada por Costa (2010) el género *Cynolebias* se ubica como grupo hermano del género *Austrolebias*, y el grupo Megalebias se encuentra anidado dentro de las *Austrolebias*. En ese trabajo se hipotetiza que el tamaño corporal similar entre estos grupos es debido a convergencias evolutivas (Costa, 2010). Lamentablemente en este estudio se careció de ejemplares de *Cynolebias* para poder realizar una comparación detallada del cortejo. Una vez más queda de manifiesto la necesidad de tener una filogenia robusta del grupo. Cuando se realizó el ACP de todos los grupos, se observó una tendencia de las “Megalebias” a agruparse aparte del resto de las *Austrolebias*, lo que indica que hay caracteres, tanto frecuencia como duraciones, que tienden a separar a este grupo del resto de las especies del género.

El grupo *A. luteoflammulatus* presenta particularidades que revelan diferencias cualitativas en el cortejo entre las especies integrantes del mismo. *Austrolebias luteoflammulatus* presenta un cortejo con mayor cantidad de Despliegues Sigmoide y de mayor duración; *A. quirogai* presenta Despliegues Sigmoides de menor duración, pero además tiene la particularidad de presentar la Palpación Genital, lo cual lo estaría relacionando con las Megalebias. Por otra parte *A. gymnoventris* no presenta al Despliegue Sigmoide como un componente determinante en su cortejo. En lugar de realizar esta unidad, realiza un Despliegue Lateral que intercala con vibraciones (DLV) de muy corta duración (<1s). En la filogenia de Loureiro (2004) se incluyen para el grupo las especies *A. luteoflamulatus* y *A. gymnoventris*. Estas especies se ubican como hermanas y el grupo se ubica como hermana del grupo *A. affinis* (fig. 2a). La filogenia de García *et al.* (2002) también lo muestra como un grupo monofilético, pero hermano de un grupo que incluye los subgrupos *A. bellottii*, *A. charrua* y “Megalebias”. (fig. 3). Sin embargo, en la filogenia de Costa (2010) este grupo no es monofilético, sino que *A. luteoflamulatus* es una especie basal, hermana de un gran grupo que incluye el grupo *A. gymnoventris* y *A. jaegari*, el grupo *A. bellottii*, el grupo “Megalebias” y el grupo *A. charrua* (fig. 2b). Tal vez una revisión mayor del cortejo de este clado controversial, incluyendo mayor cantidad de especies, arrojaría más luz sobre la evolución de este subgrupo.

También las especies del subgrupo *A. bellottii* se comportaron en forma bastante disímil entre ellas. El grupo comparte la característica de que las especies no se entierran totalmente, al menos para las especies analizadas. Esta tendencia, que incluye a *A. reicherti*, puede interpretarse como propia de este subgrupo, llegando a el extremo en *A. melanoorus*. Principalmente *A. melanoorus* presenta tres particularidades que la hacen diferente del resto de todas las *Austrolebias* analizadas. Su Invitación al Enterramiento es realizando ondulaciones del cuerpo, como realizando un hoyo con la cabeza. El Apareamiento se realiza fuera del sustrato, en posición de nado, el macho al lado de la hembra y no presenta la unidad Espera. El aparearse dentro del sustrato es una característica de las *Austrolebias* que es compartida con los géneros *Cynolebias* (Belote & Costa, 2003) y *Simpsonichthys* Carvalho, 1959 (Belote & Costa, 2002). Sin embargo no está presente en *Plesiolebias glaucopterus* (Costa & Lacerda, 1988) (Belote & Costa, 2004b) ni en el pez anual africano *Nothobranchius guentheri* (Pfeffer, 1893) (Haas, 1976). En todas las filogenias analizadas en esta tesis (García *et al.*, 2002; Loureiro, 2004; Costa, 2010), *A. melanoorus* aparece como especie basal del grupo “Bellottii”. Además existe gran aislamiento geográfico entre ambas especies, lo que seguramente haya significado mayor tiempo de divergencia entre ambas y esto a mayor divergencia del cortejo. Un escenario tentativo es que enterrarse totalmente, característica ancestral de las *Austrolebias*, se haya revertido en el grupo *A. bellottii*, y *A. melanoorus* haya evolucionado hacia un estado del carácter en que simplemente escarbe un hoyo y deposite sus gametos en él. Esta estrategia reduce los costos energéticos del enterramiento, por lo que la especie no se vería forzada a utilizar un tiempo refractario entre un apareamiento y el comienzo de un nuevo cortejo (E).

#### *Sobre las señales filogenéticas*

Los datos obtenidos con el método que se utilizó (Blomberg *et al.*, 2003), apoyan nuestra primer hipótesis planteada y cumplen con la predicción realizada en tal sentido. Si bien los árboles de Loureiro (2004), Costa (2010) y García *et al.* (2002) encontraron aproximadamente la misma cantidad de señales y “posibles señales” en conjunto (16, 17 y 16 respectivamente), las señales que tuvieron un  $K > 1$  fueron más cuando se toma como referencia el árbol de Loureiro, 2004 (13, 9 y 9). El estadístico  $K > 1$  indica que taxa muy relacionados se parecen más entre sí que lo esperado bajo evolución por Movimiento Browniano. En estos casos el estadístico  $\frac{MSE0}{MSE}$  observado para el árbol de

referencia fue relativamente alto, lo que indica una fuerza de la señal filogenética alta (Blomberg *et al.*, 2003).

Una característica que relaciona a todas las variables que presentaron  $K > 1$  en los tres árboles de referencia, es que el mapeo de los caracteres en todos los casos separa claramente a las “Megalebias” del resto de las *Austrolebias*, siempre teniendo las primeras estados del carácter que indican valores más altos. La unidad P (Pasadita) es un carácter sinapomórfico de las “Megalebias”, por lo que en el resto de las *Austrolebias* el estado del carácter es cero. Así, esta unidad presentó señal filogenética con los valores de K más altos. Llamativamente, la unidad PG (Palpación Genital) no presentó señal filogenética significativa en todos los árboles. El hecho de que también apareciera en *A. quirogai*, además de aparecer en las “Megalebias” agregó un factor adicional que le quita significancia estadística a este carácter. Sin embargo, cualitativamente, la unidad desplegada por *A. quirogai* es muy diferente a la desplegada por las “Megalebias”. Esto puede indicar tanto una homología del carácter, el cual se perdió en las *Austrolebias* menores y se revirtió en *A. quirogai*, aunque con modificaciones, o una convergencia del carácter (homoplasia), con dos apariciones independientes con ciertas similitudes. De todos modos, debido a que la filogenia de las *Austrolebias* aún no está totalmente resuelta, existe la posibilidad de que esta especie esté más directamente relacionada con las “Megalebias” que lo propuesto en las filogenias existentes.

La duración del despliegue lateral (DL-t) resultó ser una señal filogenética con  $K > 1$  en los tres árboles de referencia. Según estos datos, las tendencias del grupo son a, por un lado hacia un Despliegue Lateral más largo en la rama de las “Megalebias”, y por otro lado, en el resto de las *Austrolebias* hacia un DL de corta duración (fig. 9). Interpretando esta tendencia en el árbol de Loureiro (2004), el clado “Megalebias” se separa del resto de las *Austrolebias* en forma basal; por lo que este carácter podría haber tenido valores altos en especies basales, o también podría ser que el clado “Megalebias” haya divergido independientemente a valores altos del carácter, siendo la tendencia del subgrupo a aumentarlos en taxa más derivados. Lamentablemente se careció de grupos externos para poder realizar este tipo de comparaciones. Si se interpreta en el árbol de Costa (2010), la duración de esta unidad sería corta en las *Austrolebias* más basales y la duración alta se daría en un grupo derivado (“Megalebias”). La misma interpretación se hace al observar el árbol de García *et al.* (2002). Llamativamente, la duración del

Despliegue Lateral de *A. quirogai* es similar a la de las Megalebias. Este dato estaría apoyando la hipótesis de un parentesco más cercano entre esta especie y el grupo Megalebias. Posiblemente, para el reconocimiento intraespecífico la señal clave no sea la duración del Despliegue Lateral, sino la frecuencia con que aparece, las unidades que se intercalen entre medio de éste y la duración de las unidades intercaladas. Así, la duración del Despliegue Lateral pudo divergir entre los subgrupos, adquiriendo características que hacen que las especies más emparentadas se parezcan más entre sí que con especies menos relacionadas.

La frecuencia relativa del Despliegue Lateral Abrazador (DLA-fr) también presentó el  $K > 1$  en todos los árboles de referencia. Esta unidad es característica de las “Megalebias”, aunque también aparece en otras especies con duraciones y frecuencias más bajas (fig. 10). Cuando se toma como referencia el árbol de Loureiro (2004), se observa esta unidad como un carácter ancestral, que tiende a disminuir en las *Austrolebias*, y a aumentar en “Megalebias”. En cambio en los árboles de Costa (2010) y García *et al.* (2002), este carácter aparece con estados del carácter bajos en taxa basales y aumenta en el clado “Megalebias”.

El tiempo de espera de las hembras (Eh-t), otra señal con  $K > 1$  en todos los árboles, tiende a ser muy alto en el grupo “Megalebias” y en el grupo *A. luteoflammulatus* y tiende a valores intermedios en los grupos *A. affinis* y *A. bellottii*, no existiendo en *A. melanoorus* (fig. 11). La duración de esta unidad sugiere nuevamente una relación de parentesco cercano entre el clado “Megalebias” y el grupo *A. luteoflammulatus* y este dato es apoyado por el ACP de los subgrupos del género (fig. 7). Esta unidad se considera relevante, ya que indica la duración del período refractario entre un apareamiento y el comienzo de un nuevo cortejo. Podemos considerar que las especies que tienen un menor gasto energético durante el cortejo y el apareamiento, tienden a tener una duración menor de esta unidad. Estos gastos pueden deberse tanto a los despliegues utilizados como al tamaño corporal de las especies.

Haber encontrado tantas señales filogenéticas con un  $K > 1$  es un resultado significativo, ya que cuando se realizaron estudios empíricos para comparar la fuerza de la señal filogenética (mediante el estadístico K), se observó que los datos comportamentales presentaban mayormente un  $K < 1$ , sin importar el tamaño de los árboles utilizados (número de especies). Sin embargo, estos estudios comportamentales se basan en distintos tipos de comportamiento (Blomberg *et al.* 2003). En la presente

tesis se hallaron 20 señales filogenéticas significativas, de las cuales 13 tuvieron un  $K > 1$  para el árbol de Loureiro (2004), 9 para el de Costa (2010) y también 9 para el de García *et al.* (2002). Estos datos sugieren el comportamiento de cortejo podría no presentar tanta labilidad como otros comportamientos, ya que éste debe mantener ciertos patrones que permitan el reconocimiento entre especies. Es por esto que ciertos caracteres del cortejo mantienen semejanzas con taxa cercanamente relacionados. Además este grupo de peces presenta un ciclo de vida muy particular, que implica rápida madurez sexual y una temporada reproductiva que abarca toda la vida adulta de los individuos (Berois *et al.*, 2012). Al no presentar superposición de generaciones, no presentan aprendizaje a partir de generaciones anteriores, lo que implica que el reconocimiento intraespecífico debe ser innato. Generalmente el comportamiento está asociado a varios genes. Estudios en *Drosophila melanogaster* han identificado genes que afectan el comportamiento, incluso algunos que afectan el cortejo (revisado en Sokolowski, 2001). Alguna mutación en estos genes puede llevar a modificaciones de los comportamientos asociados. Posiblemente a lo largo de la historia evolutiva del grupo se hayan ido acumulando mutaciones que llevaron a que las especies cercanamente emparentadas se diferencien mucho de las especies lejanas y adquiriendo características propias de cada grupo. El presentar señales conservadas dentro de los grupos, lleva a que haya una mayor fidelidad en la transmisión de la señal, permitiendo mayor exactitud para el reconocimiento de individuos coespecíficos (Barlow, 2002; Barnard, 2004).

El método de *gap weighting* (Thiele 1993), resultó ser un buen método para discretizar caracteres continuos, que al ser mapeados indican la evolución de los mismos a lo largo del árbol utilizado. Sin embargo este método requiere que los caracteres sean caracterizados como ordenados. Este requerimiento parece bastante lógico cuando se trata de discretizar caracteres morfológicos, ya que es más difícil pasar de un estado, por ejemplo, 3 a uno 9, el cual implica una gran diferencia morfológica. Los caracteres que se discretizaron en este trabajo son, sin embargo, caracteres comportamentales, los cuales son fácilmente modificables. Por otra parte, lo cuantificado son frecuencias y duraciones. Fácilmente una especie puede modificar la frecuencia de un carácter de 3 a 9, ya que no implica un gran costo energético; más aún si este carácter reemplaza a otro. Por lo tanto, se debe tener cuidado al elegir los

métodos de discretización. De todas formas este método resultó ser muy adecuado para el tipo de datos que se tienen.

### *Jerarquía de Árboles*

Uno debería esperar que la evolución de un carácter a través de un árbol más jerárquico conduzca a un mayor grado de señal filogenética que si el árbol representara más una radiación adaptativa con múltiples eventos de especiación simultánea, seguida de un período de evolución independiente que lleve a las especies actuales (Blomberg *et al.* 2003). Sin embargo, los  $MSE_0/MSE$  esperados, que indican cuán jerárquicos son los árboles, muestra una mayor jerarquía del árbol de Costa (2010) (2,18) frente al de García *et al.* (2002) y el de Loureiro (2004) (2 y 1,47 respectivamente), aunque se encontraron mayor cantidad de señales con  $K > 1$  en el árbol de Loureiro (2004). Se ha sugerido que la historia evolutiva de este grupo de peces, puede haber tenido dos pulsos de cladogénesis (uno a finales del Mioceno y otro en el Plioceno-Pleistoceno) (García *et al.*, 2002). Por otra parte, usando aproximaciones filogeográficas, se sugiere un proceso de especiación múltiple asociada a las transgresiones marinas del Cuaternario (García, 2006). Por lo tanto es razonable suponer que el árbol más real posible sea más parecido a uno más cercano a una posible radiación adaptativa con evoluciones por separado de los distintos subgrupos. Por lo tanto, un árbol más jerárquico no siempre indica la realidad de la evolución del grupo.

### *Diferencias entre especies simpátricas*

Los datos obtenidos en ambos grupos analizados apoyan la segunda hipótesis planteada y cumplen con la predicción que se realizó al respecto.

El grupo “Megalebias” es un sistema de estudio en el cual la especie control es *A. elongatus* (Steindachner, 1881), ya que es la única que se tiene certeza de su evolución independiente del resto y no tiene ninguna clase de contacto en su distribución con las otras. Dependiendo del árbol filogenético que se tome como referencia, ésta se ubica como hermana de *A. prognathus* (Loureiro, 2004; Costa, 2010, fig. 2) o como hermana de *A. cheradophilus* (García *et al.*, 2002; García, *com. pers.*). En este contexto, se esperaría que los caracteres con diferencias entre las especies a evaluar, presentaran alguna similitud en alguna especie con *A. elongatus*.

De los resultados se desprende que *A. prognathus*, especie que habita en simpatría con *A. cheradophilus* y *A. wolterstorffi*, reemplazó el Despliegue Lateral por el Despliegue Lateral Vibrado. Esta puede ser una señal clave para diferenciar esta especie del resto del grupo. Además *A. cheradophilus* y *A. wolterstorffi* realizan la Palpación Genital en forma más frecuente que *A. prognathus*, lo cual puede significar una segunda señal para evitar apareamientos interespecíficos. *Austrolebias wolterstorffi*, que comparte una parte de su distribución con *A. cheradophilus*, tiende a tener Despliegues Lateral Abrazador más largos que *A. cheradophilus*, convirtiéndose ésta en la única característica de las señales visuales que componen el cortejo, que diferencia a estas dos especies. A pesar de que esta unidad no contribuyó en gran medida en el ACP, vale la pena mencionarla, ya que las diferencias en la duración de esta unidad se dan únicamente entre estas dos especies (fig. 21), es probable que la duración del carácter haya tendido a aumentar en *A. wolterstorffi* y a disminuir en *A. cheradophilus*. Esta diferencia no es menor, ya que el DLA es una variante del Despliegue Lateral que hace al macho más conspicuo. Es posible que las hembras de *A. wolterstorffi* tengan un umbral mayor para sentirse atraídas hacia el macho, siendo éste superado con DLAs más largos.

Sería adecuado realizar estudios de distintas poblaciones de *A. cheradophilus*, *A. wolterstorffi* y *A. prognathus* para determinar si las diferencias comportamentales entre las especies se deben efectivamente al un desplazamiento de caracteres dentro del grupo por parte de las especies que habitan en simpatría (Brown & Wilson, 1956), ya que el desplazamiento de caracteres favorece el uso de nuevos recursos reproductivos y lleva a la divergencia entre poblaciones coespecíficas; por lo tanto puede tanto iniciar como terminar procesos de especiación (Pfenning & Pfenning, 2009).

Las diferencias encontradas entre las especies de “Megalebias”, pueden ser causa indirecta de la sustitución por parte de *A. prognathus*, del Despliegue Lateral, por el Despliegue Lateral Vibrado. En el caso de la Palpación Genital, las diferencias son entre *A. prognathus* y *A. cheradophilus*-*A. wolterstorffi*. Esta unidad es realizada en forma menos frecuente por *A. prognathus*, pero sólo se observan diferencias significativas con las especies mencionadas. Nuestra especie control (*A. elongatus*) presenta valores de frecuencia intermedios entre las que presentan diferencias. Posiblemente se haya dado una divergencia en la que *A. prognathus* tendió a disminuir la frecuencia de la unidad y las otras especies (*A. cheradophilus* y *A. wolterstorffi*) tendieron a aumentarla.

Si bien en esta tesis no se tomaron en cuenta datos morfológicos, se debe destacar que existen diferencias en este aspecto bastante marcadas entre las “Megalebias”. Por un lado, *A. wolterstorffi* presenta un dimorfismo sexual más marcado que las otras especies del grupo. El macho de esta especie es muy oscuro con algunos puntos blancos distribuidos por el cuerpo y la hembra es amarronada parecida a las *Austrolebias* pequeñas. Por otra parte, *A. cheradophilus* es la única del grupo que presenta bandas, tanto los machos como las hembras. *Austrolebias prognathus* tiene colores amarronados en ambos sexos con manchas irregulares más oscuras (Costa, 2006). Respecto a la distribución de las especies, si bien las tres ocupan un área de potencial simpatria en tierras bajas de los humedales del este, *A. cheradophilus* y *A. prognathus* comparten otra área de simpatria en una zona de mayor altura, en los humedales del Río Cebollatí (Loureiro, *com. pers.*). Dado que las *Austrolebias* presentan escasa vagilidad y no son propensas a avanzar contra la corriente, este dato permite inferir que estas dos especies habitan un área de simpatria de mayor antigüedad, permitiendo más tiempo para la divergencia de caracteres.

En el caso del grupo *A. affinis* nuestra especie control fue *A. affinis*, porque es la especie del clado que no habita en simpatria con ninguna de las otras dos. En este caso la comparación es más directa, ya que nuestro objetivo es la comparación entre dos especies (*A. nigripinnis* y *A. alexandri*). La filogenia del grupo no es clara, y de las filogenias analizadas, la única que la ubica como grupo monofilético es la de Loureiro (2004; fig. 2a). Las otras dos (Costa, 2010; García *et al.*, 2002) ubican a *A. nigripinnis* como especie basal, y *A. alexandri* y *A. affinis* como especies hermanas, formando un grupo hermano del resto de las *Austrolebias* (quitando a *A. nigripinnis*; figs. 2b, 3). Sin embargo, análisis moleculares de citocromo b más recientes estarían confirmando la monofilia del grupo (García *et al.*, 2012.)

La tendencia del grupo es a que *A. alexandri* diferencie su cortejo de *A. nigripinnis* principalmente por tener mayor frecuencia de Despliegues Lateral y menor frecuencia de Despliegues Sigmoides, los cuales son también más cortos. Por su parte *A. nigripinnis* incorpora el DSA en el cortejo, característica que la diferencia con el resto del grupo, al menos en las especies analizadas, aunque esta incorporación es con poca frecuencia (fig. 22). *Austrolebias alexandri* presenta una mayor frecuencia de IE, de corta duración y *A. nigripinnis* presenta menor frecuencia de esta unidad, pero de mayor duración. Las hembras de *A. nigripinnis* tienen apareamientos de mayor duración

y son significativamente más largos que los de sus machos. Las diferencias encontradas entre estas dos especies hacen pensar que se pueden deber a la coexistencia en simpatria, ya que son caracteres en los que una de las especies se diferencia del resto del grupo y no son caracteres que varíen aleatoriamente.

Este subgrupo también presenta diferencias morfológicas entre las especies. La más evidente es que *A. alexandri* es la única especie de las tres analizadas que presenta un patrón de bandas a los lados del cuerpo, mientras que *A. nigripinnis* y *A. affinis* presentan puntos claros sobre un fondo azul oscuro (Costa, 2006).

En ambos casos analizados una de las especies es la que realiza mayores cambios en el cortejo respecto a la especie control (la especie que habita en alopatria). Estas especies son *A. prognathus* en el grupo Megalebias y *A. alexandri* en el grupo *A. affinis*. Estas especies también son las que se diferencian más morfológicamente, lo que lleva a suponer que podemos estar ante casos de desplazamiento de caracteres asimétrico, en el cual las especies se diferencian en si divergen o no y cuánto lo hacen (Pfenning & Pfenning, 2009).

Otro resultado a destacar es que ninguno de los caracteres que presentó señal filogenética en los tres árboles de referencia, fue de los que diferenciaron en forma significativa a las especies simpátridas. Como ya destacamos, la presencia de la selección natural tiende a oscurecer la señal filogenética (Blomberg & Garland, 2002). Por otra parte, el desplazamiento de caracteres es un proceso que opera bajo regímenes selectivos (Brown & Wilson, 1956; Schluter, 2000). Por lo tanto es posible que sea este proceso selectivo el que lleve al resultado antedicho.

## Conclusiones

En este trabajo se analizó el comportamiento de cortejo del género *Austrolebias* dentro de un marco filogenético. Para poder comprender en forma completa la evolución de un grupo se debe ser capaz de explorar todos los procesos involucrados en el origen de un carácter y separarlos de los involucrados en su mantenimiento. De esta manera se aporta información para estudios de especiación (Brooks *et al.* 1995). Algunos de los caracteres comportamentales cuantitativos en este género tienen la potencialidad de ser explicados por la evolución del grupo. Sin dudas el comportamiento es un carácter filogenético muy lábil y más sencillo de modificar que un carácter morfológico

(Gittleman *et al.*, 1996). Sin embargo, algunos caracteres del género *Austrolebias*, presentan una estabilidad que los convierte en buenos indicadores del subgrupo al que pertenecen y otros caracteres tienden a divergir entre especies cercanamente emparentadas. Esto se debe a que el comportamiento de cortejo es vital para el reconocimiento entre las especies y a menudo conforma la primera barrera contra la hibridación (Barlow, 2002).

Se ha demostrado que diferencias en el comportamiento que evoluciona en forma aislada puede formar barreras poderosas contra la panmixia si las especies alopátricas llegan a desarrollar simpatría secundaria. También diferencias en el comportamiento evolucionando dentro de una población pueden ser un mecanismo para alcanzar la especiación simpátrida. Por otra parte, en especies muy emparentadas que habitan áreas en simpatría, debe haber ciertas señales clave que evitan la hibridación entre las mismas, conservando igualmente ciertas características propias del subgrupo. Basarse únicamente en caracteres como el ADN o la morfología, puede llevarnos a perder detalles de la evolución de la especie, ya que la biología está llena de propiedades emergentes, que lo hacen de una forma no predecible a partir de un montón de unidades menores; propiedades que no tienen que ver con la suma de las partes (Wenzel, 1992).

Respecto a las dos hipótesis en las que nos basamos en un comienzo, ninguna de las dos pudo ser rechazada y se cumplieron las predicciones realizadas para cada una. Por un lado, las especies pertenecientes a un mismo clado dentro del género tienen algunas señales de cortejo significativamente más similares entre sí que con especies de otros clados. Por otro, especies simpátridas de un mismo clado presentan diferencias en el cortejo mayores entre sí que con especies alopátridas del mismo clado.

La necesidad de tener una filogenia robusta del grupo queda en evidencia cuando se comparan los resultados obtenidos tomando dos posibles árboles filogenéticos obtenidos ambos con caracteres morfológicos (Loureiro 2004, Costa 2010) y otro basado en caracteres moleculares (García *et al.*, 2002). Esta comparación se hizo con estos árboles; pero se podría haber hecho con otros (Costa, 2002; 2006) y se habrían obtenido resultados igualmente diferentes.

La conclusión final es que algunos aspectos del cortejo de *Austrolebias* están fuertemente ligados a la filogenia del grupo, y otros aspectos tienen mayor labilidad y están más condicionados por otro tipo de factores como ser la coexistencia en simpatría.

## Perspectivas

Si bien este trabajo aporta al conocimiento de la evolución del cortejo en *Austrolebias*, aún queda mucho por hacer. Por un lado, sería necesario aumentar el número de réplicas de las especies que tuvieron un  $n$  bajo ( $<10$ ), para poder comparar entre especies con mayor precisión. De esta forma se podrían realizar otro tipo de análisis más robustos. También sería importante agregar más especies al análisis, lo cual le daría mayor peso al test de señales filogenéticas, que se apoya mucho, tanto en la topología de los árboles filogenéticos, como en la cantidad de especies incluidas en los análisis (Blomberg *et al.*, 2003).

Se observaron diferencias en el cortejo de las especies simpátridas, pero no fue posible determinar en forma precisa si estas diferencias son causadas por un desplazamiento del carácter en alguna de las especies. Para poder determinar esto, es necesario realizar estudios poblacionales, comparando el cortejo de poblaciones en alopatria con poblaciones en simpatria. De esta forma se podrá determinar si existe efectivamente un desplazamiento de caracteres reproductivos en estas especies. En ambos casos analizados, la especie que tiende a diferenciarse más de la especie control, en cuanto a las señales visuales analizadas, también es la que tiende a diferenciarse más en cuanto a su morfología. Existen dos tipos de desplazamiento de caracteres. El desplazamiento de caracteres sexuales y el desplazamiento de caracteres ecológicos. Sería un gran aporte, determinar si, además del desplazamiento de caracteres sexuales, existe también desplazamiento de caracteres ecológicos, ya que existen muy pocos trabajos que integren ambos tipos de desplazamientos de caracteres (Pfenning & Pfenning, 2009).

Se han observado charcos en los que coexisten peces del grupo “Megalebias” con otros de especies de menor tamaño. De hecho, se hipotetiza que las “Megalebias” podrían ser depredadoras de las especies menores (Loureiro *com. pers.*). Es por esto que resulta igualmente interesante el analizar qué modificaciones pueden ocurrir en el cortejo de las especies menores en presencia de depredadores respecto a su ausencia.

## Referencias bibliográficas

- Abouheif E. 1999. A method for testing the assumption of phylogenetic Independence in comparative data. *Evolutionary Ecology Research*. 1:895-909.
- Arezo MJ, L Pereiro & N Berois. 2005. Early development in the annual fish *Cynolebias viarius*. *Journal of Fish Biology*. 66: 1357-1370.
- Barlow GW. 2002. How behavioral studies contribute to the species problem: a piscine perspective. *Fish and Fisheries*. 3:197-212.
- Barnard C. 2004. Animal Behaviour. Mechanism, Development, Function and Evolution. *Pearson Education Limited*.
- Belote DF & WJEM Costa. 2002. Reproductive behavior patterns in the Neotropical annual fish genus *Simpsonichthys* Carvalho, 1959 (Cyprinodontiformes, Rivulidae): description and phylogenetic implications. *Boletim do Museu Nacional, Nova Série, Rio de Janeiro*. 489:1-10.
- Belote DF & WJEM 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. *Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro*. 61(4):241-244
- Belote DF & WJEM Costa. 2004a. 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.
- Belote DF & WJEM Costa. 2004b. Reproductive behavior patterns in the Brazilian annual fish *Plesiolebias glaucopterus* (Costa & Lacerda, 1988) (CYPRINODONTIFORMES, RIVULIDAE, PLESIOLEBIATINA). *Boletim do Museu Nacional, Nova Série, Rio de Janeiro*. 515: 312-321.
- Berois N, MJ Arezo, NG Papa, GA Clivio. 2012. Annual fish: development adaptations for an extreme environment. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. 1(4): 595–602.
- Blomberg, SP & T Garland Jr. 2002. Tempo and mode in evolution: phylogenetic inertia, adaptation and comparative methods. *Journal of Evolutionary Biology* 15:899-910.

- Blomberg, SP, T Garland Jr & AR Ives. 2003. Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution*. 57(4):717-745.
- Brooks DR & DA McLennan. 1991. Phylogeny, ecology, and behavior: a research program in comparative biology. Chicago: The University of Chicago Press.
- Brooks DR, RL Mayden & DA McLennan. 1992. Phylogeny and biodiversity: conserving our evolutionary legacy. *Trends in Ecology and Evolution*. 7(2):55-59.
- Brooks DR, DA McLennan, JM Carpenter, SG Weller & JA Coddington. 1995. Systematics, Ecology, and Behavior. *BioScience*. 45(10): 687-695.
- Brown WL & EO Wilson. 1956. Character displacement. *Systematic Zoology*. 5:49-64.
- Burt BB. 2001. Evolutionary stasis, constraint and other terminology describing evolutionary patterns. *Biological Journal of the Linnean Society*. 72: 509-517.
- Butlin R & M Ritchie. 1994. Behaviour and speciation. En: *Behaviour and Evolution*. (PJ Slater y TR Halliday eds.) Cambridge University Press, Cambridge.
- Cardozo V. 1999. Tasa Metabólica y excreción del nitrógeno en peces anuales *Cynolebias viarius* (Cyprinodontiformes). Tesis de Maestría. PEDECIBA, Universidad de la República, Montevideo.
- Costa WJEM. 1998. Phylogeny and classification of rivulidae revisited: origin and evolution of annualism and miniaturization in Rivulid fishes Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei). *Journal of Comparative Biology* 3(1): 33-94.
- Costa WJEM. 2002. Monophyly and phylogenetic relationships of the Neotropical annual fish genera *Austrolebias* and *Megalebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Copeia*. 2002(4): 916-927.
- Costa WJEM. 2006. The South American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei; Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, descriptive morphology and taxonomic revision. *Zootaxa*. 1213:1-162.
- Costa WJEM. 2010. Historical biogeography of cynolebiasine annual killifishes inferred from dispersal-vicariance analysis. *Journal of Biogeography*. 37: 1995-2004.
- Darwin C. 1872. The origin of species by means of natural selection. 6th ed. London: John Murray

- de Queiroz A & PH Wimberger. 1993. The usefulness of behavior for phylogeny estimation: levels of homoplasy in behavioral and morphological characters. *Evolution*. 47(1) 46-60
- Edwards SV & S Naeem. 1993. The phylogenetic component of cooperative breeding in perching birds. *American Naturalist*. 148: 943-956.
- Emerson AE. 1938. Termite nests: A study of the phylogeny of behavior. *Ecology Monographies*. 8:247-284.
- Futuyma DJ. 1992. Genetics and the phylogeny of insect-plant interactions. Pp. 191-200. En SBJ Menken, JH Visser & P Harrewijn Eds. Proc 8<sup>th</sup> Inter Symp on Insect-Plant Relationships. Kluwer Academic, Dordrecht.
- 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.
- 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, AI Lalanne, G Aguirre & M Capetta. 2001. Chromosome evolution in the annual killifish genus *Cynolebias* and mitochondrial phylogenetic analysis. *Chromosome Research*. 9:437-448.
- García G, F Alvarez-Valín & N Gómez. 2002. Mitochondrial genes: signals and noise in the phylogenetic reconstruction of the annual killifish genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 76:49-59.
- García G. 2006. Multiple simultaneous speciation in killifishes of the *Cynolebias adloffii* species complex (Cyprinodontiformes, Rivulidae) from phylogeography and chromosome data. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 44:75-87.
- García G, V Gutierrez, N Ríos, P Calviño & M Loureiro. 2012. Filogeografía del complejo de peces anuales *A. alexandri-affinis-nigripinnis* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) endémicas de la cuenca del Río Uruguay. II Congreso Uruguayo de Zoología. Libro de Resúmenes, p 73.

- Garland T Jr, PE Milford & AR Ives. 1999. An introduction to phylogenetically based statistical methods, with a new method for confidence intervals on ancestral values. *Am. Zool.* 39:374-388.
- Gittleman JL & DM Decker. 1994. The Phylogeny of Behaviour. En: *Behaviour and Evolution*. P.J.B. Slater & T.R. Halliday (Eds.) Cambridge University Press. 80-104.
- Gittleman JL, CG Anderson, M Kot & HK Luh. 1996. Phylogenetic Lability and Rates of Evolution: A Comparison of Behavioral, Morphological and Life History Traits. Pp. 166-205. En: *Phylogenies and the comparative method in animal behavior*. EP Martins ed.
- Grafen, A. 1989. The phylogenetic regression. *Proc R Soc. Lond. B.* 326:119-156.
- Gray DA. 2004. Does courtship behavior contribute to species-level reproductive isolation in field crickets? *Behavioral Ecology* 16(1):201-206.
- Haas R. 1976. Behavioral Biology of the Annual Killifish, *Nothobranchius guentheri*. *Copeia*. 1: 80-91.
- Harvey PH & MD Pagel. 1991. The comparative method in evolutionary biology. Oxford University press, Oxford.
- Harrison RG. 1998. Linking evolutionary pattern and process: the relevance of species concepts for the study of speciation. Pp. 19-31. En: *Endless Forms: Species and Speciation*. DJ Howard & SH Berlocher eds. Oxford University Press, New York.
- Heinroth O. 1911. Beiträge zur Biologie, namentlich Ethologie und Psychologie der Anatiden. *Verh. Ver. Int. Ornithol. Kongr. (Berlin)* 1910:589-702.
- Higashi M, Takimoto G & N Yamamura. 1999. Sympatric speciation by sexual selection. *Nature* 402:523-526.
- Howard DJ. 1993. Reinforcement: origin, dynamics, and fate of an evolutionary hypothesis. En: *Hybrid zones and the evolutionary process* (Harrison RG, ed). Oxford: Oxford University Press: 46-69.
- Libran F. 2011. Comportamiento reproductivo en los peces anuales *Austrolebias affinis* Amato 1986. Tesina de grado, Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. U de la R. Montevideo, Uruguay.

- Lorenz K. 1950. The comparative method in studying innate behaviour patterns. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 4:221-268.
- Lorenz K. 1958. The evolution of behavior. *Scientific American.* 199:67-78.
- Lorenz K & Leyhausen P. 1985. Biología del Comportamiento: Raíces Instintivas de la Agresión, el Miedo y la Libertad. *S XXI eds. 10ª edición.*
- Loureiro, M. & R. O. de Sá, 1996. External Morphology of the Chorion of the Annual Fishes *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Copeia*, 1996 (4): 1016-1022.
- Loureiro M. 2004. Sistemática y biogeografía de los peces anuales de la subtribu *Cynolebiatina* (Cyprinodontiformes: Rivulidae, *Cynolebiatinae*). Tesis de Doctorado. PEDECIBA. Universidad de la República. Montevideo.
- Loureiro M & RO de Sá. 2000. Ornamentación del corion en los huevos de especies de *Austrolebias* y *Symptonichthys* (Rivulidae: *Cynolebiatinae*). *FACENA* 16: 85-91.
- Loureiro M, F Teixeira de Mello, A D'Anatro & V Cardozo 2007. *Austrolebias cinereus*, Critically Endangered Species of annual fish from Uruguay. *IUCN Red List*. Verison 2007.1. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>.
- Loureiro M, A Duarte & M Zarucki. 2011. A new species of *Austrolebias* Costa (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from northeastern Uruguay, with comments on distribution patterns. *Neotropical Ichthyology.* 9(2): 335-342.
- Maddison, WP & M Slatkin. 1991. Null models for the number of evolutionary steps in a character on a phylogenetic tree. *Evolution.* 45:1184-1197.
- Maddison, W.P. & D.R. Maddison. 2011. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. <http://mesquiteproject.org>
- Martins EP & TF Hansen. 1997. Phylogenies and the comparative method: a general approach to incorporating phylognetic information into the analysis of interspecific data. *Am Mat.* 149:646-667. Erratum *Am Mat* 153:448.
- Masta SE & WP Maddison. 2002. Sexual selection driving diversification in jumping spiders. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4442-4447.
- Mayr E. 1942. Systematics and the Origin of Species. *Columbia University Press*, New York.
- Mayr E. 1963. Animal Species and Evolution. *Harvard University Press*, Cambridge

- Mayr E. 1982. The growth of biological thought: diversity, evolution and inheritance. Belknap Press, Cambridge, MA.
- McLennan DA & MY Mattern. 2001. The phylogeny of the Gasterosteidae: Combining behavioral and morphological data sets. *Cladistics*. 17:11-27.
- Noor MAF. 1999. Reinforcement and other consequences of sympatry. *Heredity* 83: 503-508.
- Parenti LR. 1981. A phylogenetic and biogeographic analysis of cyprinodontiform fishes (Teleostei: Atherinomorpha). *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.*, 168 (4): 341-557.
- Pfenning KS & DW Pfenning. 2009. Character displacement: ecological and reproductive responses to a common evolutionary problem. *The Quarterly Review of Biology*. 84 (3): 253-276.
- Reis R & Lima F. 2010. *Austrolebias affinis*. In: IUCN 2010. *IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2010.1. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>.
- Ridley M. 1983. The explanation of organic diversity: the comparative method and adaptations for mating. Clarendon, Oxford, UK.
- Ridley M. 2004. Evolution. *Blackwell Publishing*.
- Ritchie MG. 2007. Sexual Selection and Speciation. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 38: 79-102.
- Rüber L & DC Adams. 2001. Evolutionary convergence of body shape and trophic morphology in cichlids from Lake Tanganyika. *Jour. Evol. Biol.* 14:325-332.
- Schluter D. 2000. The Ecology of Adaptive Radiation. *Oxford University Press*.
- Servedio MR & MAF Noor. 2003. The Role of Reinforcement in Speciation: Theory and Data. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 34(2003):339-364.
- Siegel S. 1959. Non-Parametric Statistics. *New York: McGraw-Hill Book Co. Inc.*  
*TEALE FWJ.*
- Simpson GG. 1944. Tempo and Mode in Evolution. *Columbia University Press*.
- Simpson BRC. 1979. The phenology of annual killifishes. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 44:243-261.

- Sokolowski MB. 2001. *Drosophila*: genetics meet behaviour. *Nature reviews*. 2001(2):879-892.
- StatSoft Inc. 2011. STATISTICA (data analysis software system). v10. www.statsoft.com.
- Templeton A. 1989. The meaning of species and speciation: a genetic perspective. En: *Speciation and its consequences* (D. Otte y J. Endler eds.) Sinauer, Sunderland.
- Thiele K. 1993. The holy grail of the perfect character: the cladistic treatment of morphometric data. *Cladistics*. 9:275-304.
- Tinbergen N. 1951. The study of instinct. *London: Oxford University Press*.
- Tinbergen N. 1953. Social behaviour in animals: With special reference to vertebrates. *London: Methuen & Co*.
- Uy JAC & G Borgia, 2000. Sexual selection drives rapid divergence in bowerbird display traits. *Evolution*. 54:273–278.
- Vaz-Ferreira R, B Sierra & S Scaglia, 1964. Ecoetología de la reproducción en los peces del género *Cynolebias* Steindachner 1876. *Arch. Soc. Biol. Montev.* 26: 44-49.
- Vaz-Ferreira R, & B Sierra. 1973. Caracteres etológicos, genéricos y específicos en los peces del género *Cynolebias* Steindachner, 1876. *Bol. Soc. Zool. Uruguay*, 2: 22-35.
- Wenzel JW. 1992. Behavioral Homology and Phylogeny. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 23: 361-381.
- West-Eberhard MJ. 1983. Sexual selection, social competition and speciation. *Quarterly Review of Biology* 58: 155-183.
- Whitman CO. 1899. Animal Behavior. En *Biological lectures*, Woods Hole, ed. C O Whitman, 285-338.
- Wilson EO. 1975. Sociobiology. The New Synthesis. *Harvard University Press*.
- Wourms JP. 1972a. 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* 182:169-200.
- Wourms JP. 1972b. The developmental biology of annual fishes. III pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *Journal of Experimental Zoology* 182:389-414.

## Apéndices

Apéndice 1: Descripción de las unidades del comportamiento reproductor de *Austrolebias reicherti* utilizadas como base para este estudio (modificado de García *et al*, 2008)

Unidades Comportamentales		Descripción
<i>Machos</i>		
Despliegue lateral	DL	Cuerpo quieto. Aletas dorsal y anal extendidas, las cuales pueden o no vibrar.
Despliegue sigmoide	DS	Despliegue lateral con ondulaciones del cuerpo.
Invitación al seguimiento	IS	Nados cortos y detenciones sucesivas.
Invitación al enterramiento	IE	Cuerpo en posición vertical u oblicua con la cabeza sobre el sustrato, y vibración de aletas anal y dorsal extendidas.
Apareamiento	A	Cuerpo ubicado al lado de la hembra, la presiona contra el sustrato. Unidad desplegada desde sobre la superficie hasta totalmente enterrados.
<i>Hembras</i>		
Aceptación del seguimiento	AS	La hembra sigue al macho que despliega IS
Aceptación del enterramiento	AE	La hembra se ubica al costado del macho que despliega IE y toca su cuerpo.
Apareamiento	A	Hembra total o parcialmente enterrada en el sustrato junto al macho.
<i>Unidades compartidas</i>		
Quietud	Q	Cuerpo inmóvil
Espera	E	El individuo se queda quieto sobre el sustrato luego del apareamiento
Escape	Es	El individuo escapa del otro.

Apéndice 2. Ecuaciones para calcular los estadísticos para detectar señales filogenéticas.  $\hat{a}$  es el estimado de la media filogenéticamente correcta (es el valor estimado del carácter en el nodo raíz del árbol, ver Garland *et. al.*, 1999);  $\mathbf{X}$  es el vector de datos que contiene  $n$  valores;  $\mathbf{U} = \mathbf{DX}$ , es el vector  $\mathbf{X}$  transformado mediante GLS;  $tr\mathbf{V}$  es el rastro (suma de los elementos diagonales de  $\mathbf{V}$ );  $\mathbf{V}$  es la matriz varianza-covarianza;  $\sum\sum\mathbf{V}^{-1}$  es la suma de todos los elementos de la matriz inversa de  $\mathbf{V}$ .

$$\text{MSE} = \frac{(\mathbf{U} - \hat{a})'(\mathbf{U} - \hat{a})}{n - 1},$$

$$\text{MSE}_0 = \frac{(\mathbf{X} - \hat{a})'(\mathbf{X} - \hat{a})}{n - 1},$$

$$\frac{\text{MSE}_0}{\text{MSE}} = \left( \frac{1}{n - 1} \right) \left( tr\mathbf{V} - \frac{n}{\sum\sum\mathbf{V}^{-1}} \right)$$

Apéndice 3. Valores reales para cada especie analizada de los caracteres que presentaron señal filogenética significativa y  $K > 1$  en los tres árboles de referencia. DL-t: duración del Despliegue Lateral (en segundos); DLA-fr: frecuencia relativa del Despliegue Lateral Abrazador; Eh-t: duración de la Espera en las hembras (en segundos); P-t: duración de la unidad Pasadita (en segundos); P-p: proporción de tiempo ocupado por la unidad Pasadita; P-fr: frecuencia relativa de la unidad Pasadita.

Especie	DL-t	DLA-fr	Eh-t	P-t	P-p	P-fr
<i>A. prognathus</i>	11,75	0,121	50,00	2	0,003	0,064
<i>A. elongatus</i>	9,00	0,104	71,50	2	0,003	0,034
<i>A. cheradophilus</i>	8,00	0,101	66,50	1	0,002	0,039
<i>A. wolterstorffi</i>	10,50	0,151	50,00	2	0,005	0,071
<i>A. nigripinnis</i>	5,00	0,024	12,00	0	0,000	0,000
<i>A. alexandri</i>	5,00	0,000	20,00	0	0,000	0,000
<i>A. affinis</i>	4,00	0,002	7,50	0	0,000	0,000
<i>A. bellottii</i>	6,00	0,000	15,00	0	0,000	0,000
<i>A. melanoorus</i>	5,00	0,000	0,00	0	0,000	0,000
<i>A. luteoflammulatus</i>	5,00	0,004	47,00	0	0,000	0,000
<i>A. quirogai</i>	8,00	0,000	34,50	0	0,000	0,000
<i>A. gymnoventris</i>	5,50	0,008	59,50	0	0,000	0,000
<i>A. reicherti</i>	5,50	0,000	11,75	0	0,000	0,000

Apéndice 4. Contribución de las variables al Análisis de Componentes Principales. Se indica en amarillo las variables que contribuyeron en mayor medida y en negrita las que además presentaron diferencias significativas entre las especies simpátricas.

A) “Megalebias”; B) grupo *A. affinis*

A) variable	CP1 contribución	A) variable	CP2 contribución	B) variable	CP1 contribución	B) variable	CP2 contribución
<b>A-frh</b>	0,79	A-ph	0,66	<b>AE-ph</b>	0,631871	<b>A-ph</b>	0,792997
A-fr	0,74	<b>AE-th</b>	0,54	<b>IE-fr</b>	0,627908	<b>IE-t</b>	0,772865
<b>DLV-fr</b>	0,65	A-th	0,51	<b>AE-th</b>	0,621930	A-fr	0,724260
<b>DLV-t</b>	0,63	PG-frh	0,44	AE-fh	0,616309	A-p	0,638324
<b>DLV-p</b>	0,63	A-t	0,43	IE-p	0,602752	<b>A-frh</b>	0,568236
<b>DLV-f</b>	0,60	A-p	0,40	<b>AE-frh</b>	0,587557	A-f	0,494548
A-f	0,58	DL-t	0,39	<b>A-f</b>	0,570476	P-fh	0,492000
<b>DSC-fr</b>	0,52	IE-t	0,36	<b>E-ph</b>	0,509897	E-p	0,464781
DSC-t	0,45	A-fr	0,35	IE-f	0,491172	A-th	0,443892
E-p	0,41	PG-ph	0,31	A-fr	0,434125	E-t	0,382499
AE-frh	0,39	E-ph	0,30	A-frh	0,312201	DLV-fr	0,370007
DSC-p	0,38	DL-fr	0,30	DL-fr	0,308104	DS-t	0,363932
DLA-t	0,35	AE-ph	0,30	A-p	0,186743	DS-fr	0,353417
DSC-f	0,33	PG-th	0,28	DSC-t	0,143224	AE-ph	0,314096
DL-t	0,29	IS-fr	0,27	DL-f	0,124408	DLV-f	0,298220
A-p	0,24	PG-fh	0,27	E-p	0,076063	P-ph	0,250068
IS-fr	0,21	E-p	0,21	E-th	0,045915	AE-frh	0,244149
E-t	0,19	E-th	0,13	DL-p	0,034789	P-th	0,244047
E-ph	0,13	DLA-t	0,12	DSC-f	0,000469	AE-fh	0,238759
P-th	0,12	DL-p	0,09	IE-t	-0,001182	DLV-p	0,236528
A-ph	0,10	E-t	0,05	DSC-fr	-0,007017	A-t	0,230084
IE-t	0,09	DSA-t	0,03	QE-ph	-0,012351	AE-th	0,222686
IE-fr	0,06	DLA-fr	-0,02	DSC-p	-0,034924	P-frh	0,206035
AE-ph	0,01	A-frh	-0,04	A-ph	-0,036116	DS-p	0,121867
P-ph	-0,04	DSA-fr	-0,05	DLs-p	-0,098424	E-ph	0,090083
DS-t	-0,05	DLA-p	-0,05	DLV-p	-0,108939	DSA-t	0,042651
DLs-fr	-0,09	A-f	-0,05	E-t	-0,184532	PG-th	0,027622
AE-th	-0,12	P-ph	-0,08	P-fh	-0,209640	PG-fh	0,027622
A-th	-0,12	P-fh	-0,14	DLV-fr	-0,304115	PG-frh	0,027622
AE-fh	-0,13	P-th	-0,20	DLV-t	-0,325620	PG-ph	0,027622
DLs-p	-0,14	DS-fr	-0,23	P-ph	-0,349139	DSA-p	0,010787
DLA-p	-0,14	DL-f	-0,26	P-th	-0,350644	DLA-t	-0,004609
DSA-t	-0,15	P-frh	-0,27	DL-t	-0,356787	DSA-f	-0,005911
DLA-fr	-0,15	IE-fr	-0,27	P-frh	-0,357791	DSA-fr	-0,016496
P-frh	-0,16	AE-frh	-0,28	DS-f	-0,359413	DLA-fr	-0,036267
A-t	-0,16	AE-fh	-0,28	DLV-f	-0,370461	DLV-t	-0,037763
E-th	-0,17	DS-t	-0,32	IS-fr	-0,398679	DSs-fr	-0,042948

Cont.		Cont.		Cont.		Cont.	
A) variable	CP1 contribución	A) variable	CP2 contribución	B) variable	CP1 contribución	B) variable	CP2 contribución
PG-th	-0,20	DSs-fr	-0,33	DLA-t	-0,434803	IS-fr	-0,081431
PG-ph	-0,28	DS-f	-0,33	DSs-fr	-0,445848	IE-p	-0,088201
DSA-fr	-0,29	DSA-p	-0,36	DSs-p	-0,446657	DLA-p	-0,091213
IE-p	-0,31	DLA-f	-0,37	<b>PG-frh</b>	<b>-0,507637</b>	DL-t	-0,112154
P-fh	-0,32	DSA-f	-0,37	<b>PG-th</b>	<b>-0,507637</b>	E-th	-0,198194
QE-ph	-0,34	DSC-fr	-0,44	<b>PG-fh</b>	<b>-0,507637</b>	DS-f	-0,259407
IE-f	-0,40	DS-p	-0,45	<b>PG-ph</b>	<b>-0,507637</b>	DLA-f	-0,288505
DSA-p	-0,45	DSC-t	-0,46	<b>DLs-fr</b>	<b>-0,514777</b>	DSC-t	-0,298083
DSA-f	-0,49	DSC-f	-0,46	<b>A-th</b>	<b>-0,515060</b>	DSs-p	-0,310507
<b>PG-frh</b>	<b>-0,55</b>	DSC-p	-0,48	A-t	-0,526470	IE-fr	-0,340329
DLA-f	-0,57	DSs-p	-0,51	<b>DS-t</b>	<b>-0,558650</b>	<b>DLs-fr</b>	<b>-0,511838</b>
DS-p	-0,59	IE-p	-0,52	DLA-p	-0,591376	<b>DL-fr</b>	<b>-0,584621</b>
<b>PG-fh</b>	<b>-0,62</b>	QE-ph	-0,57	DLA-f	-0,621680	<b>IE-f</b>	<b>-0,631893</b>
DSs-p	-0,63	DLs-fr	-0,57	DLA-fr	-0,633764	QE-ph	-0,644949
DS-fr	-0,64	IE-f	-0,57	DS-fr	-0,652780	DSC-p	-0,671013
DSs-fr	-0,67	<b>DLV-t</b>	-0,60	<b>DSA-t</b>	<b>-0,709053</b>	DL-f	-0,681006
DS-f	-0,69	<b>DLV-fr</b>	-0,61	<b>DSA-fr</b>	<b>-0,720534</b>	DSC-f	-0,708263
DL-p	-0,77	<b>DLV-p</b>	-0,64	<b>DS-p</b>	<b>-0,767585</b>	DSC-fr	-0,728320
<b>DL-fr</b>	<b>-0,81</b>	DLs-p	-0,66	<b>DSA-f</b>	<b>-0,793529</b>	DL-p	-0,821676
<b>DL-f</b>	<b>-0,82</b>	<b>DLV-f</b>	-0,66	<b>DSA-p</b>	<b>-0,816581</b>	DLs-p	-0,824823