

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**Licenciatura en Ciencias Biológicas**

Tesina de Graduación

**COMUNICACIÓN QUÍMICA ASOCIADA AL**  
**COMPORTAMIENTO SEXUAL EN *Austrolebias reicherti***  
**(CYPRINODONTIFORMES, RIVULIDAE)**

Federico Reyes Blengini

Orientadores:

**Dr. Andrés González**

Laboratorio de Ecología Química,  
Facultad de Química

**Mg. Carlos Passos**

Sección Etología, Facultad de Ciencias

*“The notorious odours of male goats in the breeding season, might be as spectacular as a peacock’s tail, if only we had the nose to appreciate them”*

T. D. Wyatt

## AGRADECIMIENTOS

A mis orientadores: al Caco, por estar siempre a la mano, y por transmitir y compartir, en pocas palabras pero certeras, algo de ciencia, biología, evolución, filosofía, literatura, buen cine y boliche, todo mezclado en la misma oración; a Andrés, por aceptar el desafío que implicó dar el salto evolutivo de lepidópteros a vertebrados, y por oficiar de voz de la experiencia.

Agradezco la disposición y buena onda del grupo del Laboratorio de Ecología Química, por hacerme un lugar, asistirme durante el fraccionamiento del agua de macho, prestarme recipientes de vidrio cuyos nombres no recuerdo, y hacer que una extracción en fase sólida fuera algo divertido.

Gracias a Gabriel Francescoli y Gustavo Somoza por la bibliografía alcanzada, y ¡gracias al Seba Serra!, por sus conocimientos sobre '*Austrolebias* y sus mañas de acuario' alcanzados.

Agradezco muy especialmente a Bettina Tassino, por apoyarme desde el arranque, no sólo de esta pasantía, de la cual fue pieza clave para su nacimiento, sino desde la eclosión de mi educación terciaria. Por tirarme siempre para adelante, por prestarme el Wyatt en primer año de facultad, por ser tutora de la vida y gurú "a la luz de la evolución", y por ser gran compañera de trabajo ¡Gracias Betiana!

En otro plano, a La Loba, a Nico Pérez, a Neptunia, a la rana de la cisterna del baño de Neptunia, al Cerro Campanero y a Jurassic Park. A mis profesoras de biología Silvia, Esther y Cristina. A mi vieja, por dejarlo todo en la cancha y transmitirme su pasión por los 'bichos'. A mi hermana Vale, por su capacidad de atraer naturaleza a su plato en la cena. A mi viejo, por su modo particular de estar siempre ahí, y por iniciarme en la buena música que me acompañó día a día durante la elaboración del manuscrito. A mis amigos, a Rodrigo Asuaga, y a La Zafra.

Humildemente, dedico este trabajo a mis amigos del Proyecto Franciscana y Cetáceos Uruguay: María Szephegyi, Cecilia Passadore, Andrés Ligrone, Valentina Franco Treco, Rosina Píriz, Florencia Doño y Rodrigo Forselledo, con quienes me embarqué por vez primera en este viaje que por ahí llaman Ciencia.

## INTRODUCCIÓN

La comunicación química juega un rol relevante en las interacciones inter e intraespecíficas de muchos organismos (revisado en Takken y Dicke, 2006). Las señales químicas intervienen en numerosas actividades biológicas, especialmente en la reproducción (Stacey y Sorensen, 2002), y han sido documentadas para todos los fila de animales (Stoddart, 1990).

Dentro del universo de señales químicas, aquellas que intervienen en la comunicación entre coespecíficos han sido históricamente denominadas como feromonas (del Griego *pherin*, “transferir”, y *hormon* “excitar”). Karlson y Luscher (1959) acuñan el término y definen a las feromonas como “sustancias liberadas al medio por un individuo y recibidas por un segundo de la misma especie, en el que desencadenan una reacción específica, como ser un comportamiento conspicuo o un determinado proceso de desarrollo”. Desde entonces, algunos autores han redefinido el concepto de feromona, de modo de contemplar la gran complejidad química de las señales, el efecto de la experiencia en la modulación de la respuesta, y la posibilidad de que el intercambio de información entre coespecíficos pueda traspasar las barreras especie-específicas estrictas (revisado en Stacey y Sorensen, 2002). Por otra parte, si muchas pistas olfativas que intervienen en el reconocimiento específico o social en diversas especies deben ser consideradas feromonas, ha sido objeto de intenso debate. La controversia se encuentra enteramente ligada a la dificultad de definir ‘comunicación’ en biología. Por un lado, ciertos autores han propuesto distinguir el universo de las señales especializadas y moldeadas por selección natural para transmitir un determinado mensaje, del universo de la información adquirida por los animales de manera incidental, considerando únicamente a las primeras como “verdadera comunicación” (por una revisión de la discusión ver Wyatt, 2003). Como contraparte, Dawkins (1995), por ejemplo, considera que existe comunicación cuando el comportamiento de un animal se ve influenciado por el comportamiento de otro; las señales son los medios por los cuales se logra dicha influencia. En este sentido, desde el momento en

que “las pistas químicas *son* comportamiento” (Hans Hoffmann, *com. pers.*), la información transmitida por ellas, debe ser considerada comunicación.

De acuerdo a nuevas definiciones, una feromona es todo compuesto o mezcla de compuestos olorosos liberados por un individuo (el emisor) los cuales evocan en individuos coespecíficos (los receptores) una respuesta adaptativa, específica y típica de la especie, que no requiere de experiencia previa o aprendizaje para su completa expresión (Sorensen y Stacey, 2004). Si bien se mantiene una gran similitud con la definición de Karlson y Luscher (1959), hoy se contempla la especie-especificidad de manera laxa, y aunque la detección de los olores provenientes de individuos coespecíficos sí requiera de la especialización a nivel del sistema olfatorio de los receptores, no se asume la especialización de los individuos emisores en cuanto a la liberación de los compuestos, como requisito excluyente. Esto es significativo desde el punto de vista evolutivo, ya que la funcionalidad de las pistas químicas como feromonas, sólo se alcanza mediante una especialización en los sistemas olfatorios de los receptores, mientras que sólo en determinadas circunstancias, cuando las fuerzas selectivas pueden actuar sobre la producción de la pista química, es que se alcanza la especialización a nivel de los individuos emisores (ver Sorensen y Stacey, 1999; Stacey y Sorensen, 2002).

En los peces, el grupo de vertebrados más antiguo y diverso, la comunicación a través de olores se ve involucrada en numerosas funciones biológicas, especialmente en la reproducción, donde permite coordinar y sincronizar el comportamiento y fisiología de machos y hembras para el apareamiento (Stacey y Sorensen, 2002), y se ha visto puede intervenir en la selección tanto intersexual (revisado en Johansson y Jones, 2007) como intrasexual (Barata *et al.*, 2008). Asimismo, las señales químicas juegan un rol relevante en la coordinación del comportamiento de cardumen y el reconocimiento de parientes (Mann *et al.*, 2003), durante la migración (Sorensen *et al.*, 2005), y en las respuestas de

alarma y comportamientos anti-predador (Smith, 1992). Sin lugar a duda, vivir en un medio donde la disponibilidad de luz es acotada pero es por definición solvente universal, ha conducido a muchas especies a desarrollar sistemas comunicacionales basados en pistas químicas liberadas pasivamente por coespecíficos, heteroespecíficos, presas y depredadores (Doving, 1976; Sorensen y Stacey, 2004).

Los peces utilizan pistas olfativas para identificar el sexo de los individuos así como para discriminar entre individuos de diferente condición reproductiva. Ciertos trabajos, utilizando agua condicionada como estímulos olfativos –agua donde individuos pertenecientes a determinada categoría fueron alojados por un período de tiempo establecido- han registrado una mayor respuesta de los machos hacia agua condicionada por hembras en ovulación, que hacia agua condicionada por hembras en estado pre-ovulatorio, lo que sugiere que la producción de la feromona coincide con el momento de receptividad de las hembras (Partridge *et al.*, 1976; Honda, 1982). De igual modo, las hembras se ven atraídas hacia la orina de los machos (Colombo *et al.*, 1982), y son capaces de evaluar su estado de madurez sexual basándose exclusivamente en información olfativa proveniente de éstos (Corkum *et al.*, 2006).

Las señales químicas suelen actuar sobre los individuos receptores de dos maneras diferentes: generando cambios comportamentales o provocando efectos fisiológicos (Stacey y Sorensen, 2002). En la primera modalidad de acción, en diversas especies por ejemplo, la sola presencia de señales químicas provenientes de hembras coespecíficas, puede desencadenar la iniciación del comportamiento de cortejo en machos (Tavolga, 1956; Crow y Liley, 1979). En la modalidad de acción fisiológica, trabajos desarrollados principalmente sobre la especie modelo *Carassius auratus* (goldfish), han profundizado sobre el rol de las feromonas en la sincronización y coordinación del apareamiento. Por ejemplo, estas señales químicas son capaces de incrementar la concentración de

hormonas relevantes para la reproducción (Stacey y Sorensen, 1986; Scott *et al.*, 1994), y sincronizar la liberación de gametos (Kobayashi *et al.*, 2002).

Por otra parte, se encuentra ampliamente documentado que las pistas químicas juegan un rol particularmente importante en el reconocimiento de coespecíficos y pueden por tanto, servir de mecanismo de aislamiento reproductivo entre especies cercanamente emparentadas (McLennan y Ryan, 1997, 1999; Rafferty y Boughman, 2006; Wong *et al.*, 2005).

En adición, las pistas químicas han sido recientemente invocadas como un importante *input* de información para la evaluación de parejas. Si bien la importancia de los olores en la selección sexual ya había sido contemplada por Darwin (1874), recién en la última década, estudios que analizan con precisión la cantidad y calidad de los químicos liberados han constatado niveles considerables de variación individual, requisito necesario para que un carácter pueda ser blanco de selección sexual. Un cuerpo creciente de evidencia sugiere que las pistas químicas reflejan la calidad de la pareja, y que el sexo selectivo puede responder ante la variación en la “calidad olfativa” de los pretendientes (revisado en Johansson y Jones, 2007). En peces, estudios recientes muestran que, basándose exclusivamente en pistas olfativas, las hembras de diversas especies presentan la capacidad de evaluar el estatus social (Barata *et al.*, 2008), la condición corporal (Fisher y Rosenthal, 2006), así como también el grado de parentesco y la inmunogenética (Reusch *et al.*, 2001; Milinski *et al.*, 2005) de los candidatos.

Si bien un cuerpo de evidencia en crecimiento sostiene la importancia de la comunicación química en el comportamiento reproductivo de peces, en general, poco se sabe acerca de la naturaleza química de las señales olfativas involucradas. A diferencia de mamíferos e insectos, la gran mayoría de los peces carecen de glándulas especializadas en la liberación de feromonas, y liberan los

químicos directamente al agua o a través de la orina o branquias (Rosenthal y Lobel, 2006), lo que dificulta la toma de muestras para análisis químicos. A pesar de esta dificultad, diferentes aproximaciones metodológicas han aportado al conocimiento de la naturaleza de las pistas químicas de peces. Un abordaje consiste en obtener muestras de orina u agua condicionada y fraccionarlas sucesivamente de acuerdo a su polaridad, para posteriormente evaluar la actividad comportamental u olfatoria de las fracciones obtenidas, y analizar químicamente las fracciones activas (ver Barata *et al.*, 2008 y Levesque *et al.*, 2011). Por otro lado, trabajos con un enfoque neuroendocrinológico han analizado las respuestas biológicas –sensoriales, comportamentales y fisiológicas- evocadas por diversos compuestos hormonales conocidos adicionados al agua. Resultado de ambos conjuntos de estudios es la vasta evidencia que sostiene la importancia de las hormonas y derivados hormonales actuando como feromonas en el grupo (Stacey, 2011). Tanto las hormonas sexuales gonadales - esteroides y prostaglandinas-, componentes clave de la red neuro-endócrina que regula la reproducción en vertebrados, así como sus derivados, se extienden hacia el ambiente, donde actúan como señales olfativas potentes que median las actividades reproductivas entre coespecíficos (Sorensen *et al.*, 1995). De hecho, la gran mayoría de las feromonas sexuales descritas hasta la fecha son derivadas de esteroides y prostaglandinas, siendo las primeras las más distribuidas entre los teleósteos (Stacey, 2011). Otros metabolitos, como los ácidos biliares (Polkinghorne *et al.*, 2001), los aminoácidos (Kawabata, 1993) y las purinas (Pfeiffer *et al.*, 1985) también han sido propuestos como pistas olfativas con acción feromonal. Sin embargo, únicamente para los ácidos biliares y aminoácidos ha sido constatado un rol en la comunicación química asociada a la reproducción (revisado en Sorensen y Stacey, 2004; Stacey, 2011).

La evidencia sostiene que las pistas químicas son una parte esencial del “lenguaje” de los teleósteos en la reproducción y otras actividades. A su vez, la capacidad de los peces de reconocer especie, condición reproductiva, estatus social, parentesco e incluso identidad de los individuos basándose



exclusivamente en pistas químicas, sugiere la complejidad del vocabulario químico de este grupo, e invita a profundizar en el papel que, se ha constatado, juegan durante la evaluación de pareja, el reconocimiento específico y los procesos de especiación. Por otra parte, aunque el rol de los derivados hormonales como importantes mediadores entre la fisiología y el comportamiento reproductivo de machos y hembras es bien reconocido, la química de las pistas olfativas de peces sólo ha sido estudiada en unas pocas especies (Stacey y Sorensen, 2002) y es necesario por tanto, aunar esfuerzos en esta materia.

### **El modelo de estudio: los peces anuales del género *Austrolebias***

Los peces anuales de la familia Rivulidae (Orden Cyprinodontiformes) son peces de agua dulce que poseen un desarrollo embrionario muy particular, el cual consiste en la deposición, por parte de los adultos, de huevos con resistencia a la desecación en el fondo de los charcos temporales que habitan (Simpson, 1979). Estos charcos son cuerpos de agua fragmentados de poca profundidad que se llenan con las lluvias durante el otoño, momento en que eclosionan los huevos (Figura 1). Dentro de este particular grupo de peces, se encuentra el género *Austrolebias*, que incluye 40 especies distribuidas en los ambientes temporales de las cuencas del Río Paraná medio y bajo, el Río Uruguay y el sistema Laguna de Los Patos-Laguna Merín (Costa, 2006; Loureiro *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Charco temporal en el Departamento de Treinta y Tres (Uruguay).

*Austrolebias reicherti* es una especie endémica de los Humedales del Este de Uruguay que se distribuye desde el Río Yaguarón hasta el Río Cebollatí (Loureiro y García, 2004; García *et al.*, 2009). Presenta un marcado dimorfismo sexual en tanto en morfología como comportamiento, un indicador clásico de intensa selección sexual (Andersson, 1994). Los machos poseen las aletas impares intensamente pigmentadas, y presentan un patrón de bandas verticales oscuras sobre un fondo claro en el flanco del cuerpo, mientras que las hembras son de color marrón pardo y presentan las aletas no pigmentadas (Loureiro y García, 2008) (Figura 2). A su vez, las hembras presentan largos períodos de quietud durante el cortejo, asociados a su rol evaluador enmarcado en la selección de pareja. Los machos, realizan despliegues de atracción conspicuos, que involucran la intensificación de su coloración, así como vibraciones del cuerpo y aletas, que culminan con el enterramiento total o parcial de la pareja en el sustrato con el fin de depositar los huevos dentro del mismo (García *et al.*, 2008).



**Figura 2.** Macho (izquierda) y hembra (derecha) adultos de *A. reicherti*.

Estos despliegues de cortejo y coloración de los machos sugieren que las señales visuales juegan un rol importante durante la elección de pareja en esta especie. Sin embargo, el análisis de las preferencias de apareamiento de las hembras no detectó relación alguna con el tamaño corporal o el

número de bandas en el flanco de los machos (Tassino *et al.*, 2008). Por otro lado, el análisis de las interacciones sociales entre machos indica la existencia de un fuerte componente de selección intrasexual, donde el tamaño corporal juega un papel predominante en el establecimiento de la dominancia (Fabra, 2011).

Los peces del género *Austrolebias* habitan cuerpos de agua de poca profundidad, sustrato lodoso, elevada turbidez y alta densidad de vegetación. En este ambiente visualmente empobrecido, señales no visuales podrían jugar un rol de relevancia durante las distintas etapas del comportamiento sexual, como ser en la detección y reconocimiento de parejas potenciales (Doving, 1976; Chapman *et al.*, 2010). Por otra parte, la gran variabilidad en las condiciones físicas de los charcos temporales (Williams, 2006), podría favorecer el uso de modalidades sensoriales múltiples en la reproducción, con el fin de reducir los costos de búsqueda, reconocimiento y elección de pareja (Bushman, 1999). En este sentido, se ha documentado la producción de sonido para dos especies de peces anuales del género *Cynolebias* (Belote y Costa, 2003; Costa *et al.*, 2010), y ha sido sugerido que los despliegues de cortejo de los machos *A. reicherti*, durante los cuales agitan su cuerpo y vibran rápidamente las aletas impares, podrían verse asociados a la generación de señales mecánicas (García *et al.*, 2008) y a la dispersión de pistas químicas. Sin embargo, el rol del canal químico en el comportamiento reproductivo aún no ha sido explorado en el grupo.

Este trabajo de pasantía se encuentra enmarcado en el estudio de los canales comunicativos involucrados en la elección de pareja y el reconocimiento específico en *A. reicherti* y su especie hermana de divergencia reciente, *A. charrua*. Actualmente se lleva a cabo en la Sección Etología de Facultad de Ciencias, un proyecto centrado en determinar la naturaleza del aislamiento reproductivo entre estas especies, determinando asimismo, el grado de incidencia de la selección sexual en su dinámica reproductiva, con el fin de abordar el problema central de la especiación en el grupo.

Ambas especies pertenecen al complejo *A. adloffii*, un grupo monofilético formado por 6 especies (Costa, 2002; García, 2006), que se caracterizan por presentar un marcado dimorfismo sexual y se diferencian exclusivamente por el patrón de coloración de los machos, siendo las hembras similares entre sí y relativamente crípticas (Loureiro, 2004; Costa, 2006). De acuerdo a García (2006), estas especies se habrían diferenciado de manera reciente, posiblemente mediante un proceso de especiación simultánea y múltiple. Este escenario de diferenciación, junto con las diferencias en los patrones de pigmentación de los machos y el marcado dimorfismo sexual en morfología y comportamiento reproductivo, sugiere que la selección sexual pudo estar en la base de la rápida diferenciación fenotípica y especiación. *A. reicherti* y *A. charrua* presentan un área de solapamiento en su distribución (García *et al.*, 2009), donde se ha propuesto la existencia de una zona de hibridación de carácter actual localizada en la parte inferior de la cuenca del Río Cebollatí (Dpto. de Treinta y Tres). Este marco, así como las particularidades del ambiente de los charcos temporales, hacen a *A. reicherti* un modelo interesante y novedoso para explorar el rol del canal químico en el comportamiento sexual.

## **Hipótesis de trabajo**

H1: Los machos de *A. reicherti* liberan pistas olfativas que los identifican como tales y atraen a las hembras hacia éstos.

*Predicción 1a)* Las hembras de *A. reicherti* permanecerán más tiempo en cercanía de una fuente de estímulo olfativo de machos (agua condicionada) que de una fuente de agua control (sin condicionar).

*Predicción 1b)* Las hembras de *A. reicherti* permanecerán más tiempo en cercanía de una fuente de estímulo olfativo de machos que de una fuente de estímulo olfativo de hembras.

H2: Las pistas olfativas liberadas por los machos de *A. reicherti* son de naturaleza esteroidea.

*Predicción 2)* Luego de someter el estímulo olfativo de machos a un fraccionamiento químico de acuerdo a su polaridad química, las hembras de *A. reicherti* permanecerán más tiempo en cercanía de una fuente de la fracción del estímulo olfativo de machos que contenga los elementos menos polares.

## **Objetivo General I**

Evaluar la existencia de comunicación química asociada al comportamiento reproductivo en *Austrolebias reicherti*.

### ***Objetivos específicos***

- 1) Evaluar la respuesta comportamental de hembras de *A. reicherti* ante agua condicionada por machos y hembras y agua sin condicionar.
- 2) Evaluar la respuesta comportamental de hembras de *A. reicherti* ante dos fracciones del agua condicionada por machos de distinta polaridad química.

## METODOLOGÍA

### **Animales de experimentación**

Se utilizaron ejemplares adultos de *Austrolebias reicherti* de ambos sexos provenientes de experiencias de cría en cautividad con individuos colectados durante la temporada 2009 en la localidad de Vergara, Dpto. Treinta y Tres, Uruguay. En total se utilizó un stock de 28 machos y 28 hembras de *A. reicherti*. Las etapas de cría y mantenimiento se realizaron a temperatura constante (19°C) y fotoperiodo natural en el acuario de la Facultad de Ciencias, entre los meses de Mayo y Setiembre de 2010. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con *Artemia salina* y *Tubifex tubifex*. Una vez alcanzada la diferenciación sexual, y con el fin de reducir el estrés por interacciones agonísticas (Fabra, 2011), los machos fueron alojados en acuarios individuales (largo × ancho × altura = 20 × 8 × 16 cm). Las hembras fueron mantenidas en grupos de 5 individuos en acuarios de dimensiones 25 × 11 × 16 cm.

### **Preparación de los estímulos olfativos**

Para condicionar el agua y generar los estímulos olfativos, machos (n = 28, largo estándar = 30.5 ± 3.2 mm, media ± DS) y hembras (n = 28, largo estándar = 25.4 ± 2.4 mm) fueron alojados individualmente por 24 hs, en acuarios (20 × 8 × 16 cm) previamente lavados con detergente y alcohol (95%), conteniendo 1 L de agua dechlorada. Durante este tiempo y las 24 hs previas, todos los animales fueron privados de alimento con el fin de reducir la incidencia de pistas olfativas vinculadas a la fisiología alimenticia (Sorensen *et al.*, 1991). De modo de proveerles de un contexto reproductivo, los acuarios conteniendo machos fueron alojados adyacentes a acuarios conteniendo hembras, ya que machos y hembras interactúan a través del vidrio de sus peceras, y realizan despliegues de cortejo (Bettina Tassinio *com. pers.* y observaciones personales). Para evitar interacciones entre machos, el contacto visual entre éstos fue impedido colocando un plástico opaco entre sus acuarios.

Para promediar el efecto de la variación individual en la calidad de las pistas olfativas, y obtener un estímulo homogéneo, el agua condicionada por 14 individuos del mismo sexo fue mezclada y unificada, generándose en total dos réplicas de estímulos de macho y dos de hembras. Debido a que no hubo diferencias significativas en la respuesta de las hembras a ambas réplicas de estímulos, los datos fueron analizados de manera conjunta (no se muestran los datos). El mismo protocolo, pero sin peces, fue utilizado para generar el agua control (agua sin condicionar). Agua condicionada y control fueron almacenadas a -20 °C en recipientes plásticos de 2 L de agua mineral embotellada previamente lavados con agua y detergente. Aproximadamente 18 hs antes de su utilización, los estímulos fueron descongelados y mantenidos a 19 °C. Cada recipiente fue utilizado una única vez y luego descartado. Al finalizar el procedimiento todos los individuos fueron fotografiados y devueltos a sus peceras de mantenimiento.

### **Fraccionamiento químico del agua condicionada de machos**

Siete litros de una mezcla homogénea de ambas réplicas del estímulo de macho fueron sometidos a fraccionamiento químico mediante extracción en fase sólida (SPE, *por sus siglas en inglés*) (ver ANEXO). Luego de filtrar la muestra para remover sólidos (papel Whatman n°4) y registrar el pH, alícuotas de 1 L de la muestra adicionadas con 20 mL de metanol -para preservar las características del cartucho según especificaciones del fabricante- fueron pasadas a un flujo máximo de 5 mL/min a través de cartuchos de SPE C18 de fase reversa (1000 mg, Alltech Assoc. Inc., USA). Los cartuchos fueron previamente lavados y condicionados con agua y metanol. Los solutos retenidos en el cartucho fueron eluidos con 20 mL de metanol, y diluidos en agua destilada hasta un volumen de 1 L, conformando la *fracción apolar*. El filtrado, constituido por el agua condicionada de macho (adicionada con 20 mL de metanol), sin los solutos retenidos en el cartucho, conformó la *fracción polar*. Para controlar el efecto del metanol, el agua control utilizada para evaluar ambas fracciones fue adicionada con metanol en idéntica concentración. Fracciones y agua control fueron almacenadas

a -20 °C en recipientes plásticos de 2 L de agua mineral embotellada previamente lavados con agua y detergente. Aproximadamente 18 hs antes a su utilización, los estímulos fueron descongelados y mantenidos a 19 °C. Cada recipiente fue utilizado una única vez y luego descartado.

El fraccionamiento químico por SPE fue llevado a cabo en el Laboratorio de Ecología Química de la Facultad de Química (Universidad de la República).

## **Ensayos comportamentales**

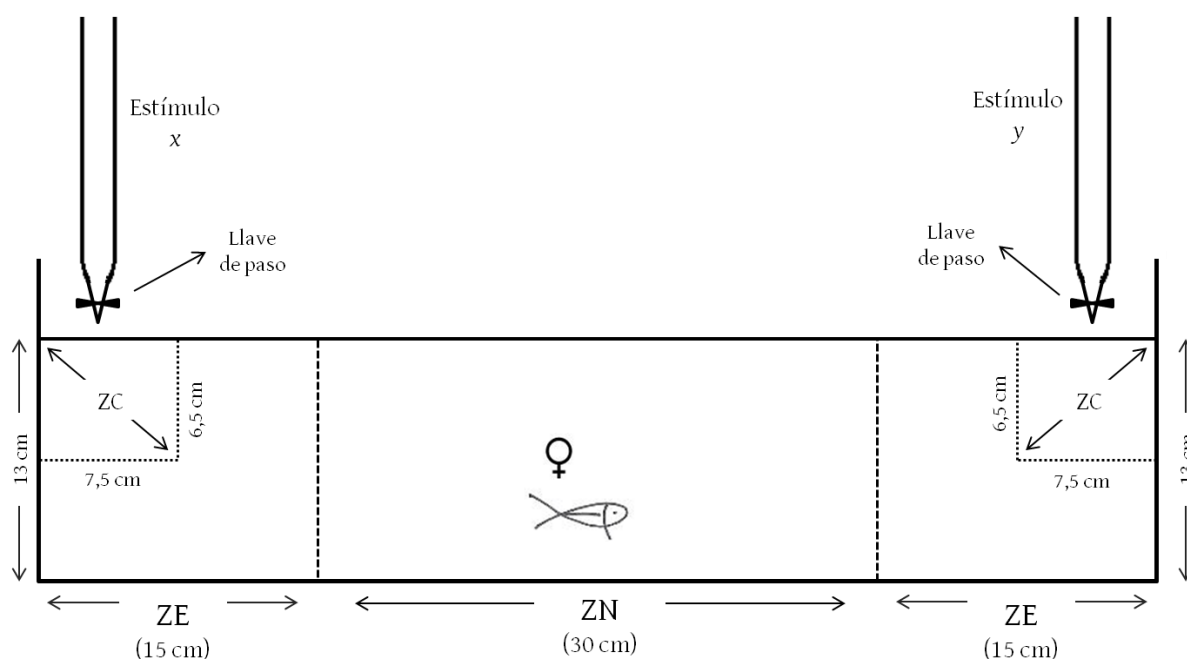
### *Sistema experimental*

Para evaluar la existencia de pistas químicas asociadas al sexo, 20 hembras fueron individual y secuencialmente evaluadas en dos pruebas de elección dual: *a)* agua condicionada por machos *vs.* agua control, y *b)* agua condicionada por machos *vs.* agua condicionada por hembras. Por otro lado, para evaluar el carácter químico de las pistas olfativas liberadas por los machos, 20 nuevas hembras fueron individual y secuencialmente evaluadas en otras dos pruebas de elección: *c)* fracción polar del agua condicionada por machos *vs.* agua control, y *d)* fracción apolar del agua condicionada de machos *vs.* agua control. Los experimentos secuenciales fueron realizados día por medio, y para controlar el efecto de la experiencia previa en el sistema, el orden de presentación de los experimentos fue alternado.

Se utilizaron acuarios experimentales (largo × ancho × altura = 60 × 20 × 18 cm) llenos con agua declorada y oxigenada hasta una altura de 13 cm. Los acuarios fueron divididos a lo largo por marcas dibujadas en su exterior en tres sectores: un sector central (zona neutra, largo = 30 cm), y dos sectores laterales (zonas de elección, largo = 15 cm). El cuadrante superior externo de cada zona de elección fue considerado como zona de cercanía al estímulo. Los estímulos fueron adicionados al acuario desde columnas de vidrio de 1 L de capacidad, equipadas con llaves de paso regulables, y



colocadas una en cada extremo del acuario, 2 cm sobre la línea de agua (Figura 3). Para controlar por sesgos de lateralidad de las hembras, el lado asignado a cada estímulo fue determinado aleatoriamente para cada experimento.



**Figura 3.** Sistema experimental para pruebas de elección entre dos estímulos olfativos. El sistema fue conformado por un acuario conteniendo 16 L de agua y dos recipientes proveedores de estímulos ubicados 2 cm por encima de la línea de agua (13 cm), equipados con llaves de paso regulables. Zona neutra (ZN), zonas de elección (ZE) y zonas de cercanía (ZC) fueron definidas por marcas externas (líneas punteadas).

Treinta minutos antes de la presentación de los estímulos, las hembras fueron individualmente alojadas en el acuario experimental, donde se les permitió moverse libremente. Luego de este tiempo, las hembras fueron recluidas en el centro de la pecera en un prisma de acrílico opaco (largo  $\times$  ancho  $\times$  altura = 10  $\times$  10  $\times$  18 cm) y una vez que la liberación de los estímulos fue simultáneamente iniciada a un flujo de 10 mL/min, éstas fueron liberadas. Con el fin de asegurarse que las hembras evaluaran ambos estímulos, el videoregistro del comportamiento fue iniciado una vez las hembras visitaron ambas zonas de elección, y continuó por 20 minutos. Pruebas preliminares en este sistema experimental bajo idénticas condiciones y utilizando agua con colorante de

repostería, permitieron observar que las plumas de tinta entraban en contacto en el centro del acuario a los 30 min de iniciado el flujo. Por este motivo, las hembras que tardaron más de 10 min en visitar ambos compartimientos fueron excluidas del análisis de datos (13 de 80 ensayos previstos fueron descartados bajo este criterio).

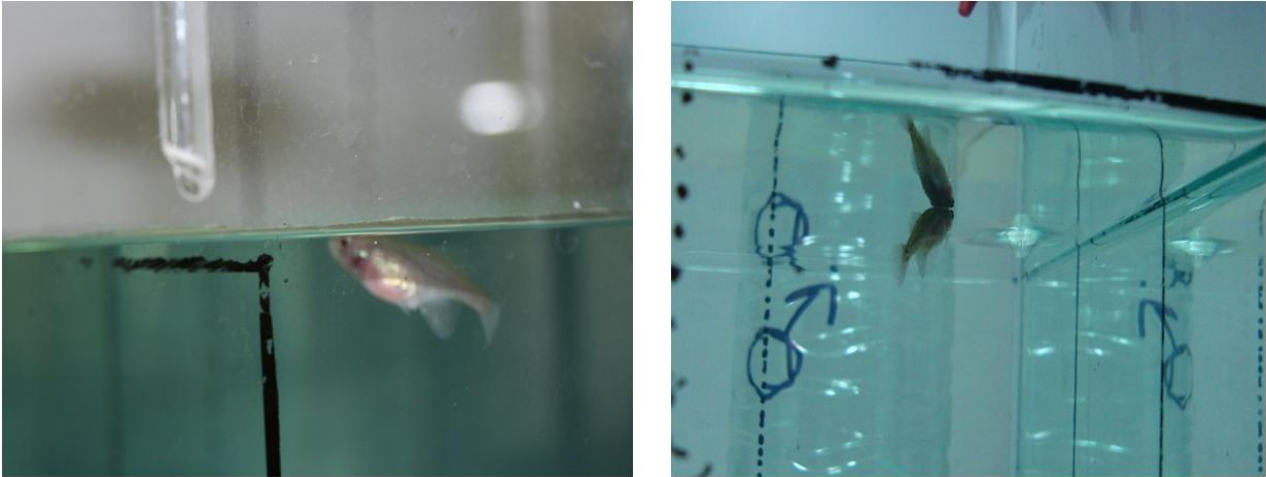
Al finalizar cada prueba, las peceras experimentales y los recipientes proveedores de estímulos fueron lavados con agua, jabón y alcohol, y secados al aire. Al culminar la totalidad de las experiencias, las hembras fueron fotografiadas y reincorporadas al bioterio como stock reproductivo.

Todos los ensayos fueron conducidos entre las 11:00 y las 17:00 hs, durante los primeros 15 días desde la preparación de estímulos (experimentos a y b), o durante los primeros 7 días luego del fraccionamiento químico (experimentos c y d). Tanto la preparación de estímulos como los ensayos comportamentales fueron llevados a cabo en el laboratorio de la Sección Etología de la Facultad de Ciencias (Universidad de la República), bajo condiciones de temperatura constante (19 °C) y fotoperiodo regulado (12:12)

#### *Variables y análisis de datos*

Las variables consideradas fueron: *a)* el tiempo de asociación al estímulo definido como el tiempo permanecido en la zona de elección (ZE) correspondiente. El tiempo de asociación es la medida estándar de preferencia en estudios de comunicación química en peces poecílidos (Crapon de Caprona y Ryan, 1990; Guevara-Fiore *et al.*, 2010; Rosenthal *et al.*, 2011). *b)* Proporción de tiempo en zona de cercanía (ZC) definido como el tiempo en ZC / tiempo en ZE correspondiente  $\times 100$ ; *c)* el número de visitas a cada ZE; y *d)* el número de acercamientos a la fuente de estímulo, posicionándose inmediatamente por debajo de ésta (en adelante, número de *contactos*, Figura 4). Este comportamiento fue observado en pruebas preliminares. A su vez, se calculó la fuerza de

preferencia definida como:  $(\text{tiempo en ZE}_x - \text{tiempo en ZE}_y) / (\text{tiempo en ZE}_x + \text{tiempo en ZE}_y)$ ; y la movilidad (número total de visitas a ambas ZE) de las hembras.



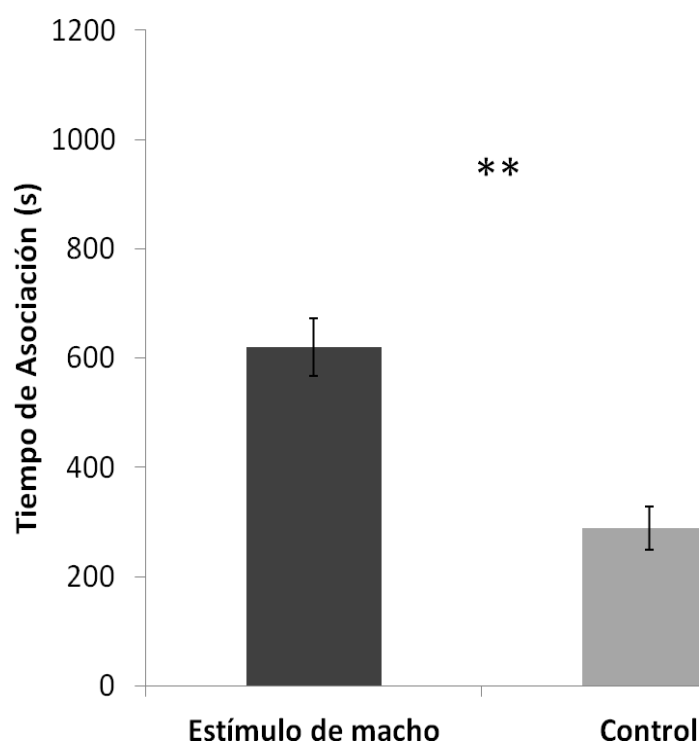
**Figura 4.** Hembras de *A. reicherti* realizando *contacto* con la fuente de estímulo.

Los videoregistros fueron analizados mediante el software J-Watcher. Para evaluar la hipótesis nula de que no existe diferencia en el tiempo de asociación a los estímulos, la proporción de tiempo en cercanía, el número de visitas a las zonas de elección o el número de contactos en cada prueba de elección, se utilizó la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas. Para evaluar el efecto de la experiencia previa en el sistema, se evaluaron diferencias en la fuerza de preferencia y la movilidad de las hembras entre hembras con y sin experiencia, utilizando la prueba de Mann-Whitney para muestras independientes. No se constataron diferencias significativas entre hembras con y sin experiencia en los ensayos con el agua condicionada, así como para los ensayos con las fracciones del agua condicionada por los que los datos fueron analizados de manera conjunta. Se consideró un valor de  $p$  de 0.05 como umbral de significancia estadística. Todos los datos fueron analizados con Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., 2007) y se expresan en términos de media  $\pm$  error estándar. El largo estándar de todos los individuos fue obtenido a partir de las fotografías utilizando el software *Analyzing Digital Images 2008*.

## RESULTADOS

### 1) Agua condicionada de macho vs. agua control

Las hembras pasaron significativamente más tiempo asociadas al estímulo olfativo de macho que al agua control (prueba de Wilcoxon para muestras pareadas:  $N = 18$ ,  $z = 2.9$ ,  $p < 0.01$ , Figura 5). A su vez, las hembras visitaron más veces la zona de elección correspondiente al estímulo olfativo de macho y realizaron más contactos sobre dicha fuente de estímulo (Tabla 1). No hubo diferencias significativas en cuanto a la proporción de tiempo en cercanía (macho =  $31.6 \pm 4.8$ ; control =  $24.8 \pm 5.0$ ; prueba de Wilcoxon para muestras pareadas:  $N = 18$ ,  $z = 1.65$ ,  $p = 0.10$ ).



**Figura 5.** Tiempo de asociación de las hembras a cada estímulo en el ensayo agua condicionada de macho vs. agua control. \*\* =  $p < 0.01$ . Se presenta la media y error estándar de los datos.

**Tabla 1.** Número de ingresos a la zona de elección (ZE) y número de contactos con la fuente de estímulo para los ensayos con agua condicionada (1 y 2) y con las fracciones del agua condicionada de macho (3 y 4).

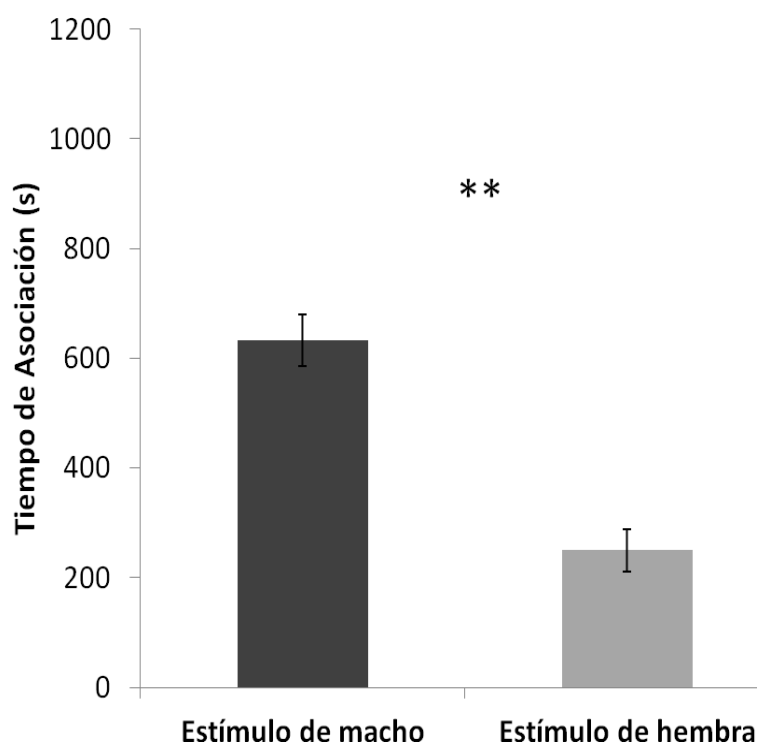
Ensayos	Estímulos	N	n° de ingresos a ZE <sup>a</sup>	<i>p</i> *	n° de contactos <sup>a</sup>	<i>p</i> *
1	Estímulo de macho vs. Control	18	14.6 ± 1.8 11.7 ± 1.9	<b>0.01</b>	4.1 ± 1.0 1.2 ± 0.4	<b>0.01</b>
2	Estímulo de macho vs. estímulo de hembra	19	13.8 ± 2.3 11.1 ± 2.6	0.08	3.2 ± 1.2 0.9 ± 0.5	<b>0.03</b>
3	Fracción apolar vs. Control	15	17.9 ± 3.9 16.1 ± 4.2	0.25	3.9 ± 1.3 1.1 ± 0.6	0.08
4	Fracción polar vs. Control	15	14.5 ± 2.5 15.1 ± 3.7	0.65	3.7 ± 1.2 2.0 ± 1.3	0.10

<sup>a</sup> Media ± error estándar

\* Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas

## 2) Agua condicionada de macho vs. agua condicionada de hembra

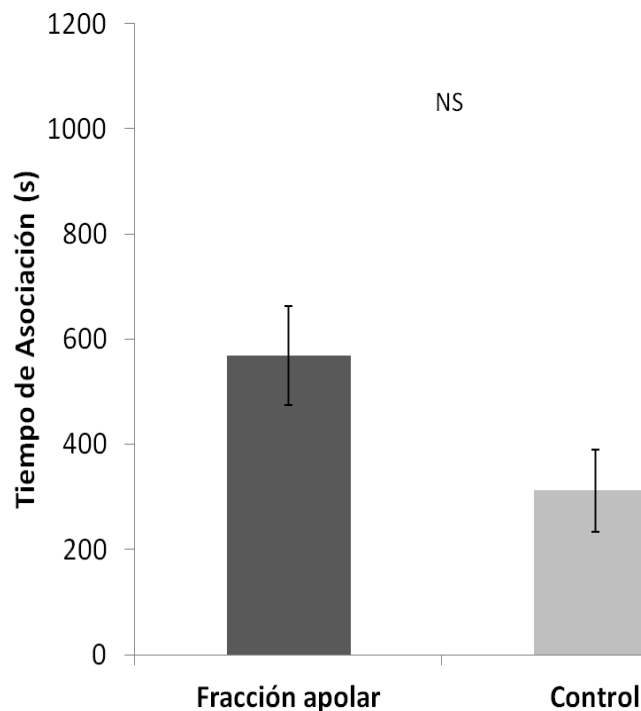
Las hembras pasaron significativamente más tiempo asociadas al estímulo olfativo de macho que al estímulo olfativo de hembra (prueba de Wilcoxon para muestras pareadas:  $N = 19$ ,  $z = 3.22$ ,  $p < 0.01$ , Figura 6). Tanto el número de eventos de contacto como el número de vistas a las zonas de elección fueron mayores para el estímulo olfativo de macho, si bien en el último caso la tendencia no es estadísticamente significativa (Tabla 1). De igual modo, las hembras permanecieron una mayor proporción de tiempo en cercanía en la zona de elección correspondiente al estímulo olfativo de macho si bien dicha tendencia presentó valores marginales a la significancia estadística (macho =  $26.6 \pm 5.1$ ; hembra =  $19.4 \pm 4.3$ , prueba de Wilcoxon para muestras pareadas:  $N = 19$ ,  $z = 1.87$ ,  $p = 0.06$ ).



**Figura 6.** Tiempo de asociación de las hembras a cada estímulo en el ensayo agua condicionada de macho vs. agua condicionada de hembra. \*\* =  $p < 0.01$ . Se presenta la media y error estándar de los datos.

1) *Fracción apolar del agua condicionada de macho vs. agua control*

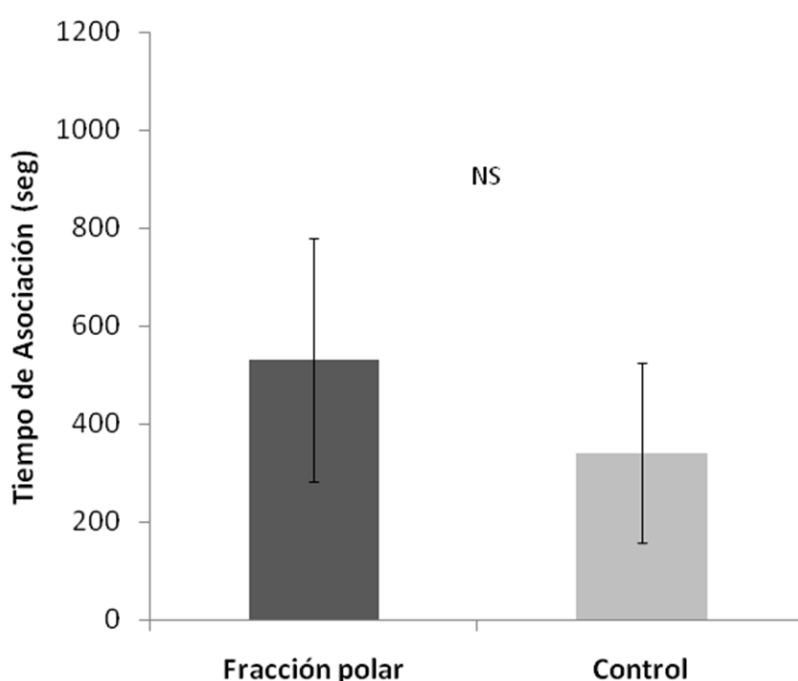
No hubo diferencia significativa en el tiempo de asociación a los estímulos (prueba de Wilcoxon para muestras pareadas:  $N = 15$ ,  $z = 1.42$ ,  $p = 0.16$ , Figura 7), así como en el número de ingresos a las zonas de elección o el número de eventos de contactos (Tabla 1). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los estímulos en cuanto a la proporción de tiempo en cercanía (fracción apolar:  $26.9 \pm 6.3$ ; control:  $18.7 \pm 5.4$ ; Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas:  $N = 15$ ,  $z = 1.02$ ,  $p = 0.31$ ).



**Figura 7.** Tiempo de asociación de las hembras a cada estímulo en el ensayo fracción apolar del agua condicionada de macho vs. agua control. NS =  $p > 0.05$ . Se presenta la media y error estándar de los datos.

2) *Fracción polar del agua condicionada de macho vs. agua control*

No hubo diferencia en el tiempo de asociación a los estímulos (prueba de Wilcoxon para muestras pareadas:  $N = 15$ ,  $z = 1.64$ ,  $p = 0.10$ , Figura 8), así como en el número de ingresos a las zonas de elección o el número de eventos de contacto (Tabla 1). Sin embargo, la proporción de tiempo en cercanía fue significativamente mayor para la fracción polar (fracción polar =  $30.3 \pm 5.4$ ; control =  $17.1 \pm 4.8$ ; prueba de Wilcoxon para muestras pareadas:  $N = 15$ ,  $z = 2.22$ ,  $p < 0.05$ ).



**Figura 8.** Tiempo de asociación de las hembras a cada estímulo en el ensayo fracción polar del agua condicionada de macho vs. agua control. NS =  $p > 0.05$ . Se presenta la media y error estándar de los datos.



## DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo indican que las hembras de *Austrolebias reicherti* son atraídas hacia pistas olfativas liberadas por machos coespecíficos en un contexto reproductivo. El análisis del carácter químico podría indicar la presencia de compuestos activos de diversa polaridad.

### **Pistas químicas en el comportamiento sexual de *A. reicherti***

El tiempo en proximidad de una fuente de estímulo es comúnmente considerado como medida de la preferencia en pruebas de elección de pareja en peces (Crapon de Caprona y Ryan, 1990; Fisher *et al.*, 2006; Guevara-Fiore *et al.*, 2010 ; MacLaren *et al.*, 2011; Rosenthal *et al.*, 2011). En un primer experimento de elección, enfrentando agua condicionada de machos vs. agua control, el tiempo de asociación, así como el número de eventos de contacto con la fuente de olor y el número de vistas a la zona de elección, fueron significativamente mayores para el agua condicionada. Estos resultados sugieren que las hembras de *A. reicherti* utilizan pistas químicas para detectar machos coespecíficos. La importancia de la información olfativa en las interacciones entre coespecíficos se encuentra largamente documentada para los teleósteos. Los peces utilizan pistas químicas como señales de agregación (Mann *et al.*, 2003), de alarma (Smith, 1992), o como pistas para el encuentro y reconocimiento de parejas potenciales (Guevara-Fiore *et al.*, 2010).

En el medio acuático, la comunicación basada en pistas químicas presenta condiciones propicias para su desarrollo. Los sistemas olfatorios de los peces se encuentran en contacto directo con odorantes liberados pasivamente por coespecíficos, presas y depredadores (Doving, 1976). Además, los cuerpos de agua suelen ser ambientes visualmente restrictivos, donde la atenuación de la luz por la columna de agua, la turbidez y densidad de vegetación, son factores determinantes de la pérdida de visibilidad (Dusenbery, 1992). En este sentido, los peces anuales del género *Austrolebias* habitan cuerpos de agua someros, de sustrato lodoso, elevada turbidez y gran densidad de vegetación. En

especies que habitan aguas turbias, se ha documentado un papel importante de las señales químicas en la comunicación intraespecífica (Poling *et al.*, 2001; Corkum *et al.*, 2006; Johannesen *et al.*, 2012). En el goby *Neogobius melanostomus*, los machos construyen sus nidos en aguas profundas de baja visibilidad y las hembras ingresan a estos para oviponer. Corkum y cols. (2006) sugieren que los machos señalarían la localización de sus nidos mediante la liberación de feromonas. En un par de subespecies simpátricas de *G. aculeatus*, los individuos pertenecientes a la subespecie de hábitos bentónicos son capaces de discriminar coespecíficos mediante olores, mientras que individuos de la subespecie límnic no presentan dicha capacidad (Rafferty y Boughman, 2006). Además, un estudio reciente en esta especie, ha mostrado que la habilidad para detectar presas en aguas altamente turbias se ve incrementada cuando tanto información visual como química proveniente de éstas se encuentra disponible (Johannesen *et al.*, 2012).

En el segundo experimento de elección de este trabajo, enfrentando agua condicionada por machos a agua condicionada por hembras, las hembras focales permanecieron más tiempo asociadas al agua condicionada de macho, a la vez que realizaron un mayor número de contactos sobre esta fuente de olor. Estos resultados sugieren que las pistas químicas liberadas por los machos *A. reicherti* son pistas sexuales que permiten a las hembras discriminar entre machos y hembras, y podrían jugar un rol central en la reproducción. La discriminación sexual de las hembras basada en olores ha sido bien documentada en peces (Bloom y Perlmutter, 1977; Cole y Smith, 1992; Gammon *et al.*, 2005), y en especial, las interacciones comportamentales y fisiológicas mediadas por feromonas sexuales entre individuos reproductivos han sido largamente estudiadas en goldfish (*Carassius auratus*, Cyprinidae). En esta especie, las hembras liberan al agua distintos subproductos hormonales que reflejan su estado fisiológico a lo largo del ciclo de ovulación. Estas feromonas generan repuestas tanto comportamentales como fisiológicas en los machos y permiten sincronizar la liberación de esperma y la oviposición (Sorensen y Stacey, 2004). El hecho de que esta especie se reproduzca de

manera esporádica e impredecible, y pueda mantener huevos fértiles tan sólo por unas pocas horas, habría conducido al desarrollo de un sistema de feromonas que permitiese coordinar el comportamiento y fisiología de machos y hembras de manera precisa (Sorensen *et al.*, 1998). Goldfish, sin embargo, presenta diferencias sustanciales con los peces anuales en cuanto a su ciclo reproductivo y sistema de apareamiento. Los peces anuales se caracterizan por ser semélparos, es decir, se reproducen continuamente una vez que alcanzan la madurez sexual. Dado que en este caso, la fisiología de machos y hembras se encuentra sincronizada *a priori*, no sería necesaria la mediación de feromonas a estos efectos.

Sin embargo, en el ambiente visualmente empobrecido de los charcos temporales, las señales químicas liberadas por los machos *A. reicherti* podrían jugar un rol relevante en la detección y localización de parejas potenciales. La presencia de pistas químicas provenientes de un individuo, pueden alertar de la cercanía de éste a quienes las perciben, facilitando su detección y reconocimiento una vez en presencia del mismo, reduciéndose así los costos de búsqueda (Wiley, 1994). A su vez, el olor de los coespecíficos podría aportar pistas útiles en la evaluación y elección de parejas potenciales. El rol de la comunicación química en la elección de pareja ha cobrado especial interés en las últimas décadas. Un cuerpo creciente de evidencia sugiere que las hembras poseen la capacidad de evaluar la “calidad olfatoria” de los pretendientes (revisado en Johansson y Jones, 2007). Fisher y Rosenthal (2006) observaron que las hembras de *Xiphophorus birchmanni* (Poeciliidae) discriminan machos bien alimentados de machos que tuvieron un acceso limitado al alimento basándose únicamente en pistas químicas. En adición, las hembras son capaces de seleccionar, vía olfato, machos con una carga alélica compatible del Complejo de Histocompatibilidad Mayor, un conjunto de genes que refleja las capacidades de resistencia a diversos patógenos (Reusch *et al.*, 2001; Milinski *et al.*, 2005).

Por otra parte, las hembras de diversas especies de peces presentan la capacidad de evaluar el estatus social de los machos a través de olores. En la Tilapia de Mozambique (*Oreochromis mossambicus*) los machos dominantes orinan con mayor frecuencia que los subordinados, a la vez que presentan una orina con mayor concentración de un odorante detectado con altísima sensibilidad por las hembras (Barata *et al.*, 2008). *A. reicherti* presenta un fuerte componente de selección intrasexual, donde los machos establecen relaciones de dominancia y subordinación: los machos dominantes intensifican su coloración y cortejan hembras con mayor frecuencia, mientras que los subordinados “apagan” su pigmentación, a la vez que repliegan sus aletas (Fabra, 2011). La calidad de dominante y subordinado podría ser señalizada, a su vez, mediante pistas olfativas y las hembras podrían evaluar dicha condición utilizando este canal comunicativo.

García y cols. (2008) han sugerido que las señales mecánicas provocadas por los despliegues sigmoides y laterales que realizan los machos durante el cortejo, podrían ser importantes rasgos evaluados durante el cortejo. Más aún, dichos despliegues podrían asociarse a la dispersión de pistas químicas en el agua. Debido a que los compuestos difunden cuatro órdenes de magnitud más lento en el agua que en el aire (Dusenbery, 1992), los peces deben recurrir, o bien a las corrientes naturales presentes en el ambiente (Rosenthal *et al.*, 2011), o a la autogeneración de corrientes para difundir pistas químicas en el ambiente. Los peces pueden producir corrientes mediante la ventilación de sus branquias, movimientos del cuerpo y aletas, o la liberación de pulsos de orina, generando “turbulencias olorosas” que transportan tanto información mecano-sensorial como química (Atema, 1996). Dado que los charcos temporales que las *Austrolebias* habitan se caracterizan por ser cuerpos de agua no circulante, sería esperable encontrar mecanismos de autogeneración de corrientes asociados a la liberación de pistas químicas en este grupo.

Se encuentra bien documentado que el uso de múltiples pistas y canales sensoriales durante el reconocimiento y elección de pareja, permite realizar una mejor evaluación por parte de las hembras (Candolin, 2003). Dado que los ambientes temporales se caracterizan por presentar grandes fluctuaciones en sus parámetros ecológicos (Williams, 2006), las *Austrolebias* podrían valerse de una gama de señales de diversas modalidades sensoriales que les permitiesen contrarrestar las limitantes en ciertos canales comunicativos provocadas por dichos cambios (Bushman, 1999). La importancia relativa de ciertas modalidades sensoriales podría variar a lo largo de la temporada reproductiva (Chapman *et al.*, 2010). Recientemente, Fernández y cols. (2011) constataron diferencias en los patrones de proliferación neuronal de áreas cerebrales involucradas en el procesamiento sensorial entre dos especies del género *Austrolebias*. *A. reicherti* mostró los niveles más altos de proliferación en el bulbo olfatorio, mientras que *A. affinis* lo hizo en áreas vinculadas con el procesamiento visual. Estos resultados sugieren diferencias en la jerarquía de las distintas modalidades sensoriales entre las especies, que podrían deberse a diferencias en el hábitat o a la divergencia genética, y sugieren en especial, la importancia de la información olfativa en *A. reicherti*. Por tanto, si bien los despliegues motores y de coloración de los machos indican que la información visual juega un rol importante en la evaluación y selección de pareja en *A. reicherti*, el papel del canal químico en esta instancia, deberá ser considerado en futuras investigaciones.

En adición, en muchos peces el reconocimiento de especie suele basarse fundamentalmente en la información química. En particular, el rol de las pistas químicas en el reconocimiento específico ha sido ampliamente documentado para los peces del género *Xiphophorus*, donde en ciertas especies las hembras son capaces de discriminar hacia machos coespecíficos basándose únicamente en pistas olfativas (Crapon de Caprona y Ryan, 1990; McLennan y Ryan, 1997; Hankison y Morris, 2003). Por este motivo, las pistas químicas suelen ser importantes en el mantenimiento del aislamiento reproductivo, como sucede en ciertas especies de cíclidos africanos de divergencia reciente y

distribución simpátrica (Plenderleith *et al.*, 2005). Las pistas químicas podrían jugar un papel relevante en el mantenimiento del aislamiento reproductivo entre *A. reicherti* y su especie hermana, *A. charrua*, cuya distribución presenta un área de solapamiento. Exploraciones recientes de esta zona de contacto, han constatado la presencia de individuos morfológicamente intermedios, a la vez que se obtenido la progenie híbrida en el laboratorio (Passos *et al.*, 2012). Sin embargo, resultados preliminares sugieren que las hembras son capaces de discriminar hacia machos coespecíficos, y que dicha discriminación, requeriría tanto de pistas visuales como químicas (Passos *et al.* datos no publicados). Al igual que para el resto de las especies del complejo *A. adloffii*, el comportamiento reproductivo en *A. reicherti* y *A. charrua* es cualitativamente similar (García *et al.*, 2008). Esta gran conservación de los despliegues de cortejo, indicaría que el reconocimiento específico, y por tanto la barrera a la hibridación, no ocurrirían en esta etapa a menos que existieran diferencias cuantitativas en los despliegues de cortejo o señales especie-específicas no visuales en juego.

#### **Naturaleza química de las pistas olfativas de machos de *A. reicherti***

En cuanto a la naturaleza química de las pistas olfativas liberadas por los machos, si bien las hembras permanecieron más tiempo asociadas a las fracciones, no mostraron una preferencia significativa por ninguna de estas. No obstante, las hembras permanecieron una mayor proporción de tiempo en cercanía de la fuente de la fracción polar respecto al control, sugiriendo la presencia de componentes polares activos en el agua condicionada de machos. Dicha actividad podría deberse a la acción de mezclas particulares de aminoácidos como ha sido previamente documentado para otros peces (Kawabata, 1993).

La pérdida de actividad comportamental de las fracciones respecto a la respuesta evocada por el agua condicionada sin fraccionar, podría ser el resultado de cambios en la concentración efectiva o estructura de los compuestos activos durante el proceso de fraccionamiento, o de la separación de compuestos de distinta polaridad actuando en forma aditiva o sinérgica. La evidencia de que los

peces utilizan mezclas complejas de derivados hormonales como señales químicas es importante (Sorensen y Stacey, 1999). Los odorantes particulares presentes en dichas mezclas feromonales pueden generar efectos independientes, sumados, o adicionales (Stacey y Sorensen, 2002). En goldfish, se han identificado tres componentes principales de la feromona post-ovulatoria de las hembras. Presentados por separado, cada uno de estos compuestos provoca efectos similares sobre el comportamiento de los machos, pero únicamente la presencia de los tres en simultáneo desencadena una respuesta fisiológica particular en los machos (Sorensen y Stacey 1999). A su vez, el análisis del carácter químico de las sustancias presentes en agua condicionada de ejemplares juveniles de goldfish, sugiere que la feromona identificatoria de la especie, estaría conformada por elementos de distinta polaridad cuya acción combinada sería necesaria para la completa actividad biológica (Levesque *et al.*, 2011). Futuros análisis de la identidad química de las pistas olfativas liberadas por los machos de *A. reicherti* deberían evaluar la actividad comportamental de una mezcla homogénea de fracciones polares y apolares del agua condicionada.

## CONCLUSIÓN

Los resultados del presente trabajo de pasantía indican la presencia de comunicación química asociada al comportamiento sexual en *Austrolebias reicherti*. Las pistas olfativas liberadas al agua por los machos y detectadas por las hembras, podrían jugar un rol relevante en las etapas iniciales de detección y localización de parejas, y eventualmente intervenir en su evaluación y selección durante el cortejo.

Nuestros resultados abren la posibilidad de adoptar a *A. reicherti* como modelo interesante para explorar el uso de pistas químicas en el comportamiento reproductivo de peces, y su rol potencial en el reconocimiento específico y elección de pareja. El ambiente visualmente empobrecido, fácilmente perturbable y altamente variable de los charcos temporales, así como las diferencias interespecíficas encontradas en los patrones de proliferación neuronal en el género *Austrolebias*, sugieren que la señalización química es una modalidad comunicativa importante en *A. reicherti*. Esto se hace especialmente interesante en el contexto de diferenciación y especiación posiblemente mediada por selección sexual. De acuerdo a nuestro conocimiento, este estudio representa la primera aproximación al estudio de la comunicación química en los peces anuales.



## ANEXO: Protocolo de Extracción en Fase Sólida

Una muestra de estímulos olfativos de macho *A. reicherti* fue sometida a fraccionamiento químico mediante Extracción en Fase Sólida (SPE) de fase reversa. El fraccionamiento por SPE es una técnica ampliamente utilizada en comunicación química de peces, ya que permite fraccionar muestras de orina u agua condicionada de acuerdo a su polaridad (Barata *et al.*, 2008; Levesque *et al.*, 2011). La técnica consiste en pasar alícuotas de una muestra a través de columnas adsorbentes, generalmente sílicas hidroxiladas, que en el caso de una SPE de fase reversa, estas se encuentran químicamente modificadas con grupos funcionales hidrofóbicos. Una SPE de fase reversa consta de una fase móvil polar o relativamente polar (la solución acuosa de la muestra) y una fase estacionaria apolar (los compuestos que se pretende retener). El adsorbente hidrofóbico retendrá aquellos compuestos de polaridad media a nula presentes en la muestra a través de uniones no covalentes (Fuerzas de van der Waals o dispersión), mientras que los compuestos más polares atravesarán la columna. Los compuestos retenidos deben ser posteriormente eluidos utilizando un solvente no polar que debilite las fuerzas hidrofóbicas que los retienen en el adsorbente. Previo a la etapa de elución, la columna debe ser lavada. El lavado permite eliminar cualquier material que haya permanecido unido al adsorbente por motivos ajenos a sus propiedades químicas (tomado de SUPELCO, Sigma-Aldrich Co., 1998).

### Datos de la muestra

- Mezcla homogénea filtrada de estímulos olfativos de macho réplica 1 y 2
- Origen: agua condicionada por machos *A. reicherti* en contexto reproductivo
- Fecha de preparación de estímulo réplica 1: 26/09/10
- Fecha de preparación de estímulo réplica 2: 09/10/10
- Almacenadas a -20°C
- Volumen: 7 l
- Filtrado: papel Whatman nº 4
- $5 < \text{pH} < 6$

### Especificaciones del Cartucho de Fase Reversa

-Marca: Alltech® Extract-Clean™, Grace Davison, Deerfield, Illinois, USA

-Tipo: Standard C 18: Sílica con 6% Carbón

-Peso del Adsorbente: 1000 mg

-Capacidad de la Columna: 8 ml

### Procedimiento

Fecha de realización: entre el 07/12/10 y el 17/12/10

#### 1- Condicionado

- a) Pasar 10 ml de MeOH
- b) Pasar 10 ml de Agua dest. 2% MeOH.

#### 2- Pasaje

- Pasar alícuotas de 1 l de Agua de Macho 2% MeOH
- Flujo < 5 ml/min

#### 3- Lavado

- Agregar 10 ml Agua dest. 2% MeOH.

#### 4- Eluido

- a) Pasar 20 ml MeOH: pasar 10 ml, dejar secar y pasar los otros 10 ml.
- b) Retomar en Agua dest. Hasta 1 l (concentración original)

#### 5- Limpieza de materiales

- Enjuagar Quitasato con Agua dest. 2% MeOH
- Dejar secar

### Constitución de fracciones y controles

- Eluido (fracción apolar): Agua destilada 2% MeOH + solutos retenidos en el cartucho
- Control del eluido: Agua destilada 2% MeOH
- Filtrado (fracción polar): Agua condicionada por machos 2% MeOH sin solutos retenidos
- Control del filtrado: Agua 2% MeOH

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andersson, M. (1994). *Sexual Selection*. Princeton: Princeton University Press.
- Atema, J. (1996). Eddy chemotaxis and odor landscapes: exploration of nature with animal sensors. *Biology Bulletin*, 191, 129–138.
- Barata, E. N., Fine, J. M., Hubbard, P. C., Almeida, O. G., Frade, P., Sorensen, P. W., & Canário, A. V. M. (2008). A Sterol-Like Odorant in the Urine of Mozambique Tilapia Males Likely Signals Social Dominance to Females. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 438–449.
- Belote, D. F., & Costa, W. J. E. M. (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*, 61(4), 241–244.
- Bloom, H. D., & Perlmuter, A. (1977). A sexual aggregating pheromone system in the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *Journal of Experimental Zoology*, 199, 215–226.
- Bushmann, P. J. (1999). Concurrent Signals and Behavioral Plasticity in Blue Crab (*Callinectes sapidus* Rathbun) Courtship. *Biology Bulletin*, 197, 63–71.
- Candolin, U. (2003). The use of multiple cues in mate choice. *Biological Reviews*, 78, 575–595.
- Chapman, B., Morrell, L., Tosh, C. R., & Krause, J. (2010). Behavioural consequences of sensory plasticity in guppies. *Proceedings of the Royal Society B*, 277, 1395–1401.
- Cole, K. S., & Smith, R. J. F. (1992). Attraction of female fathead minnows, *Pimephales promelas*, to chemical stimuli from breeding males. *Journal of Chemical Ecology*, 18, 1269–1284.
- Colombo, L., Belvedere, P. C., Marconato, A., & Bentivegna, F. (1982). Endocrinology of teleost reproduction. En C. J. J. Richter & H. J. T. Goos (Eds.) Proceedings of the Second International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish (pp. 84–94). Pudoc, The Netherlands.
- Corkum, L. D., Arbuckle, W. J., Belanger, A. J., Gammon, D. B., Li, W., Scott, A. P., & Zielinski, B. (2006). Evidence of a male sex pheromone in the round goby (*Neogobius melanostomus*). *Biological Invasions*, 8, 105–112.
- Costa, W. E. J. M. (2002). Monophyly and phylogenetic relationships of the Neotropical annual fish genera *Austrolebias* and *Megalebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Copeia*, 2002, 916–927.
- Costa, W. (2006). American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, descriptive morphology and taxonomic. *Zootaxa*, 1213, 1–162.

- Costa, W. J. E. M., Ramos, T. P. A, Alexandre, L. C., & Ramos, R. T. C. (2010). *Cynolebias parnaibensis*, a new seasonal killifish from the Caatinga, Parnaíba River basin, northeastern Brazil, with notes on sound producing courtship behavior (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Neotropical Ichthyology*, 8(2), 283–288.
- Crapon de Caprona, M.-D., & Ryan, M. J. (1990). Conspecific mate recognition in swordtails, *Xiphophorus nigrensis* and *X. pygmaeus* (Poeciliidae): olfactory and visual cues. *Animal Behaviour*, 39, 290–296.
- Crow, R. T., & Liley, N. R. (1979). A sexual pheromone in the guppy, *Poecilia reticulata* (Peters). *Canadian Journal of Zoology*, 57, 184–188.
- Darwin, C. (1874). *The descent of man and selection in relation to sex*, 2nd edn. (p. 436). London: John Murray.
- Dawkins, M. S. (1995). *Unravelling animal behaviour*. (p. 159). Harlow: Longman Scientific & Technical.
- Dusenbery, D. B. (1992). *Sensory Ecology: How Organisms Acquire and Respond to Information*. New York: W. H. Freeman.
- Doving, K. (1976). Evolutionary trends in olfaction. En G. Benz (Eds.) *The Structure-Activity Relationships in Olfaction* (pp. 149–159). IRL Press, London.
- Fabra, A. (2011). *Comportamiento agonístico en machos de Austrolebias reicherti*. Tesina de grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.
- Fernández, A. S., Rosillo, J. C., Casanova, G., & Olivera-Bravo, S. (2011). Proliferation zones in the brain of adult fish *Austrolebias* (Cyprinodontiform: Rivulidae): a comparative study. *Neuroscience*, 189, 12–24.
- Fisher, H. S., & Rosenthal, G. G. (2006). Female swordtail fish use chemical cues to select well-fed mates. *Animal Behaviour*, 72(3), 721–725.
- Fisher, H. S., Wong, B. B. M., & Rosenthal, G. G. (2006). Alteration of the chemical environment disrupts communication in a freshwater fish. *Proceedings of the Royal Society B*, 273, 1187–1193.
- Gammon, D. B., Li, W., Scott, A. P., Zielinski, B. S., & Corkum, L. D. (2005). Behavioural responses of female *Neogobius melanostomus* to odours of conspecifics. *Journal of Fish Biology*, 67, 615–626.

- García, D., Loureiro, M., & Tassino, B. (2008). Reproductive behavior in the annual fish *Austrolebias reicherti* Loureiro & García 2004 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Neotropical Ichthyology*, 6(2), 243–248.
- García, G. (2006). Multiple simultaneous speciation in killifishes of the *Cynolebias adloffii* species complex (Cyprinodontiformes, Rivulidae) from phylogeography and chromosome data. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 44(1), 75–87.
- García, G., Loureiro, M., Berois, N., Arezo, M. J., Casanova, G., Clivio, G., & Olivera, A. (2009). Pattern of differentiation in the annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from a biosphere reserve site in South America: a multidisciplinary approach. *Biological Journal of the Linnean Society*, 98, 620–635.
- Guevara-Fiore, P., Stapley, J., Krause, J., Ramnarine, I. W., & Watt, P. J. (2010). Male mate-searching strategies and female cues: how do male guppies find receptive females? *Animal Behaviour*, 79(6), 1191–1197.
- Hankison, S., & Morris, M. R. (2003). Avoiding a compromise between sexual selection and species recognition: female swordtail fish assess multiple species-specific cues. *Behavioral Ecology*, 14(2), 282–287.
- Honda, H. (1982). On the female sex pheromones and courtship behavior in the salmonids, *Oncorhynchus masou* and *O. rhodurus*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 48, 47–49.
- Johannesen, A., Dunn, A. M., & Morrell, L. J. (2012). Olfactory cue use by three-spined sticklebacks foraging in turbid water: prey detection or prey location? *Animal Behaviour*, 84(1), 151–158.
- Johansson, B. G., & Jones, T. M. (2007). The role of chemical communication in mate choice. *Biological Reviews*, 82(2), 265–289.
- Karlson, P., & Luscher, M. (1959). "Pheromones": a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, 183, 55–56.
- Kawabata, K. (1993). Induction of sexual behaviour in male fish (*Rhodeus ocellatus ocellatus*) by aminoacids. *Amino Acids*, 5, 323–327.
- Kobayashi, M., Sorensen, P. W., & Stacey, N. E. (2002). Hormonal and pheromonal control of spawning behaviour in the goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26, 71–84.
- Levesque, H. M., Scaffidi, D., Polkinghorne, C. N., & Sorensen, P. W. (2011). A Multi-Component Species Identifying Pheromone in the Goldfish. *Journal of Chemical Ecology*, 37, 219–227.
- Loureiro, M., & García, G. (2004). *Cynolebias reicherti*, a new annual fish species (Rivulidae: Cynolebiatinae) from southern Laguna Merín basin. *Acta Zoológica Lilloana*, 42(1-2), 11–23.

- Loureiro, Marcelo. (2004). Sistemática y Biogeografía de los peces anuales de la subtribu Cynolebiatina (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Disertación de Tesis de doctorado, PEDECIBA, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.
- Loureiro, Marcelo, Duarte, A., & Zarucki, M. (2011). A new species of *Austrolebias* Costa (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from northeastern Uruguay, with comments on distribution patterns. *Sociedade Brasileira de Ictiologia*, 9(2), 335–342.
- Loureiro, Marcelo, & García, G. (2008). *Austrolebias reicherti* Loureiro & Garcia, a valid species of annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from Uruguay. *Zootaxa*, 1940, 1–15.
- MacLaren, R. D., Gagnon, J., & He, R. (2011). Female bias for enlarged male body and dorsal fins in *Xiphophorus variatus*. *Behavioural processes*, 87(2), 197–202.
- Mann, K. D., Turnell, E. R., Atema, J., & Gerlach, G. (2003). Kin recognition in juvenile zebrafish (*Danio rerio*) based on olfactory cues. *Biological Bulletin*, 205, 224–225.
- McLennan, D. A., & Ryan, M. J. (1997). Responses to conspecific and heterospecific olfactory cues in the swordtail *Xiphophorus cortezi*. *Animal Behaviour*, 54, 1077–1088.
- McLennan, D. A., & Ryan, M. J. (1999). Interspecific recognition and discrimination based upon olfactory cues in northern Swordtails. *Evolution*, 53(3), 880–888.
- Milinski, M., Griffiths, S., Wegner, K. M., Reusch, T. B. H., Haas-assenbaum, A., & Boehm, T. (2005). Mate choice decisions of stickleback females predictably modified by MHC peptide ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(12), 4414–4418.
- Partridge, B. L., Liley, N. R., & Stacey, N. E. (1976). The role of pheromones in the sexual behavior of the goldfish. *Animal Behaviour*, 24, 291–299.
- Passos, C., D'Anatro, A., Tassinio, B., & Loureiro, M. (2012). Hibridación entre dos especies hermanas de peces anuales del género *Austrolebias* (Rivulidae, Cyprinodontiformes). II Congreso Uruguayo de Zoología.
- Pfeiffer, W., Riegelbauer, G., Meier, G., Scheibler, B. (1985). Effect of hypoxanthine–3(N)-oxide and hypoxanthine–1(N)-oxide on central nervous excitation of the black tetra *Gymnocorymbus ternetzi* (Characidae, Ostariophysi, Pisces) indicated by dorsal light response. *Journal of Chemical Ecology*, 11, 507–523.
- Plenderleith, M., Oosterhout, C. Van, Robinson, R. L., & Turner, G. F. (2005). Female preference for conspecific males based on olfactory cues in a Lake Malawi cichlid fish. *Biology Letters*, 1, 411–414.

- Poling, K. R., Fraser, E. J., & Sorensen, P. W. (2001). The three steroidal components of the goldfish preovulatory pheromone signal evoke different behaviors in males. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, *129*, 645–651.
- Polkinghorne, C. A., Olson, J. M., Gallaher, D. G., Sorensen, P. W. (2001). Larval sea lamprey release two unique bile acids to the water at a rate sufficient to produce detectable riverine pheromonal plumes. *Fish Physiology and Biochemistry*, *24*, 15–30.
- Rafferty, N. E., & Boughman, J. W. (2006). Olfactory mate recognition in a sympatric species pair of three-spined sticklebacks. *Behavioral Ecology*, *17*(6), 965–970.
- Reusch, T., Häberli, M., Aeschlimann, P., & Milinski, M. (2001). Female sticklebacks count alleles in a strategy of sexual selection explaining MHC polymorphism. *Nature*, *414*, 300–302.
- Rosenthal, G., Fitzsimmons, J., & Woods, K. (2011). Tactical release of a sexually-selected pheromone in a swordtail fish. *PloS one*, *6*(2), 3–7.
- Rosenthal, G. G., & Lobel, P. S. (2006). Communication. En K. Sloman, S. Balshine, & R. Wilson (Eds.), *Behaviour and Physiology of Fish (vol. 24)* (pp. 39–78). Academic Press.
- Scott, A. P., Liley, N. R., & Vermeirssen, E. L. M. (1994). Urine of reproductively female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), contains a priming pheromone which enhances plasma levels of sex steroids and gonadotropin II in malts. *Journal of Fish Biology*, *44*, 131–148.
- Simpson, B.R.C. 1979. The phenology of annual killifishes. En P. J. Miller (Ed.), *Fish Phenology: Anabolic Adaptiveness in Teleosts, Symposium of the Zoological Society of London 44* (pp. 243–261). Academic Press, London.
- Smith, J. F. (1992). Alarm signals in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, *2*, 33–63.
- Sorensen, P. W., & Stacey, N. E. (1999). Evolution and specialization of fish hormonal pheromones. En R. E. Johnston, D. Müller-Schwarze, & P. W. Sorensen (Eds.), *Advances in Chemical Signals in Vertebrates* (pp. 15–47). Kluwer Academic/Plenum Press, New York.
- Sorensen, P. W., & Stacey, N. E. (2004). Brief review of fish pheromones and discussion of their possible uses in the control of non-indigenous teleost fishes. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, *38*, 399–417.
- Sorensen, P. W., Hara, T. J., & Stacey, N. E. (1991). Sex pheromones selectively stimulate the medial olfactory tracts of male goldfish. *Brain research*, *558*(2), 343–347.
- Sorensen, P. W., Christensen, T. A., & Stacey, N. E. (1998). Discrimination with insects of pheromonal cues in fish: emerging parallels with insects. *Current Opinion in Neurobiology*, *8*, 458–467.

- Sorensen, P. W., Scott, A. P., Stacey, N. E., & Bowdin, L. (1995). Sulfated 17,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one functions as a potent and specific olfactory stimulant with pheromonal actions in the goldfish. *General & Comparative Endocrinology*, *100*(1), 128–142.
- Sorensen, P. W., Fine, J. M., Dvornikovs, V., Jeffrey, C. S., Shao, F., Wang, J., Vrieze, L. A., Anderson, K. R., & Hoye, T. R. (2005). Mixture of new sulphated steroids functions as a migratory pheromone in the sea lamprey. *Nature Chemical Biology*, *1*, 324–328.
- Stacey, N. (2011). Hormonally Derived Sex Pheromones in Fishes. En D. O. Norris & K. H. Lopez (Eds.), *Hormones and Reproduction of Vertebrates. Vol. 1: Fishes* (p. 297). London: Academic Press.
- Stacey, N. E., Sorensen, P. W. (1986). 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one: a steroidal primer pheromone which increases milt volume in the goldfish. *Canadian Journal of Zoology*, *64*, 2412-2417.
- Stacey, N., & Sorensen, P. (2002). Hormonal Pheromones in Fish. In D. Pfaff, A. Arnold, A. Etgen, S. Fahrbach, & R. Rubin (Eds.), *Hormones, Brain and Behavior Vol. 2* (pp. 375–434). San Diego: Academic Press.
- StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- Stoddart, D.M. (1990). The scented ape: the biology and culture of human odour (p. 291). Cambridge: Cambridge University Press.
- SUPELCO. (1998). Guide to Solid Phase Extraction. Sigma-Aldrich Co.
- Takken, W., & Dicke, M. (2006). Chemical ecology: a multidisciplinary approach. In M. Dicke & W. Takken (Eds.), *Chemical Ecology: from gene to ecosystem* (p. 193). Dordrecht: Springer.
- Tassino, B., Loureiro, M., & García, D. (2008). Selección sexual y preferencias de apareamiento en el pez anual *Austrolebias reicherti* (RIVULIDAE, CYPRINODONTIFORMES). *XII Congreso Nacional y IX Iberoamericano de Etología* (p. 36). Valencia: Universidad de Valencia.
- Tavolga, W. N. (1956). Visual, chemical and sound stimuli as cues in the sex discriminatory behavior of the gobiid fish, *Bathygobius soporator*. *Zoologica*, *41*, 49–64.
- Wiley, R. H. (1994). Errors, exaggeration, and deception in animal communication. En L. A. Real (Ed.) *Behavioral Mechanisms in Evolutionary Ecology* (pp. 157–189). Chicago: The University of Chicago Press.
- Williams, D. (2006). *The biology of temporary waters* (p. 337). Oxford: Oxford University Press.
- Wong, B. B. M., Fisher, H. S., & Rosenthal, G. G. (2005). Species recognition by male swordtails via chemical cues. *Behavioral Ecology*, *16*(4), 818–822.



Wyatt, T. D. (2003). *Pheromones and Animal Behaviour* (p. 391). Cambridge: Cambridge University Press.

## CONTRIBUCIONES

Este trabajo fue presentado en modalidad póster en tres eventos académicos:

- Simposio Biología de Peces Anuales, realizado en Facultad de Ciencias en Agosto de 2010.
- III Jornadas Uruguayas de Comportamiento Animal, realizadas en Facultad de Ciencias en Agosto de 2011. El trabajo presentado bajo el título SEÑALIZACIÓN QUÍMICA ASOCIADA AL COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO EN *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) recibió el premio a mejor presentación en modalidad póster.
- XIV Jornadas de la SUB, realizadas en el Argentino Hotel de Piriápolis, en Agosto y Setiembre de 2012.

A su vez, este manuscrito se encuentra en vías de ser publicado. Al momento, se encuentra bajo revisión en la revista arbitrada *Ethology*, bajo el título "Female annual killifish *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) attend to male chemical cues". Autores: Passos, Carlos; Reyes, Federico; Tassino, Bettina; Rosenthal, Gil; González, Andrés. Número de solicitud: ETH-13-0028.