



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 0001
Matrícula: 2173801300

Comunicación química durante el comportamiento sexual del pez anual *Hillerichthys robustus* (Miller & Hubbs, 1974)

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 10:00 horas del día 22 del mes de junio del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado

DRA. LAURA VERÓNICA HENAO HOLGUÍN
DRA. MARIA DEL ROSARIO TARRAGO CASTELLANOS
DR. MIGUEL ANGEL LEON GALVAN
DR. JORGE IGNACIO SERVIN MARTINEZ



Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: ANDRES MOCTEZUMA SOTELO VIVEROS

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

ANDRES MOCTEZUMA SOTELO VIVEROS

ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. LARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. LAURA VERÓNICA HENAO HOLGUÍN

VOCAL

DRA. MARIA DEL ROSARIO TARRAGO CASTELLANOS

VOCAL

DR. MIGUEL ANGEL LEON GALVAN

SECRETARIO

DR. JORGE IGNACIO SERVIN MARTINEZ

El presente documento cuenta con la firma -autégrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta - Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



“Comunicación química durante el comportamiento sexual del pez anual *Millerichthys robustus* (Miller & Hubbs, 1974)”

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Biología de la Reproducción Animal

PRESENTA

Biól. Andrés Moctezuma Sotelo Viveros

Comité Tutorial:

M. en C. Miguel Á. Mosqueda Cabrera (Director)
Departamento de El Hombre y su Ambiente, UAM-X
e-mail: zitzitl@correo.xoc.uam.mx

Dra. Ana Laura Esquivel Campos (Asesor)
Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-X
e-mail: aesquivel@correo.xoc.uam.mx

Dr. Gerardo Figueroa Lucero (Asesor)
Departamento de Hidrobiología, UAM-I
e-mail: gfiguer@xanum.uam.mx

junio de 2020

Comité Tutorial:

M. en C. Miguel Á. Mosqueda Cabrera (Director)
Departamento de El Hombre y su Ambiente, UAM-X
e-mail: zitzitl@correo.xoc.uam.mx

Dra. Ana Laura Esquivel Campos (Asesor)
Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-X
e-mail: valuzza@hotmail.com

Dr. Gerardo Figueroa Lucero (Asesor)
Departamento de Hidrobiología, UAM-I
e-mail: gfiguer@xanum.uam.mx

Jurado:

Dra. Laura Verónica Henao Holguín
Investigador Postdoctoral, Facultad de Química, UNAM
e-mail: lvhenaoh@gmail.com

Dra. María del Rosario Tarragó Castellanos
Departamento Biología de la Reproducción, UAM-I
e-mail: mrtc@xanum.uam.mx

Dr. Jorge Ignacio Servín Martínez
Departamento El Hombre y su Ambiente UAM-X
e-mail: jservin@correo.xoc.uam.mx

Dr. Miguel Ángel León Galván
Departamento de Biología, UAM-I
e-mail: leon@xanum.uam.mx

Índice

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Interacciones sociales en animales irracionales	3
2.2. Reconocimiento social.....	5
2.3. Mecanismos de reconocimiento	5
2.3.1. Señales visuales	6
2.3.2. Señales acústicas	6
2.3.3. Señales químicas.....	7
2.4. Peces anuales	9
2.5. Hábitats de peces anuales	11
2.6. Diapausa y tolerancia al estrés ambiental	12
2.6.1. Diapausa I.....	12
2.6.2. Diapausa II.....	12
2.6.3. Diapausa III.....	13
2.7. Conducta reproductora en peces anuales.....	13
2.7.1. Conducta reproductora en <i>Millerichthys robustus</i>	14
2.8. Feromonas en la conducta reproductora de peces	14
2.8.1. Feromonas en la conducta reproductora de peces anuales	15
2.8.2. Detección olfatoria de feromonas en peces.....	15
2.9. Mecanismos endocrinos que regulan el comportamiento sexual en peces.....	17
2.9.1. Esteroides gonadales y la conducta sexual	18
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	21
6. HIPÓTESIS.....	21
7. OBJETIVOS.....	21
7.1. Objetivo general	21
7.2. Objetivos específicos.....	21
8. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
8.1. Identificación del estado gonadal.....	22
8.2. Tiempo de asociación	23
8.2.1. Obtención de los estímulos químicos.....	23
8.2.2. Pruebas de preferencia.....	24
8.2.3. Análisis estadístico.....	25
8.3. Análisis de los estímulos químicos	25
8.3.1. Valoración cuantitativa de las proteínas por el método de Lowry	26
8.3.2. Análisis elemental EDS (Energy-dispersive X-ray spectroscopy)	27
9. RESULTADOS	28
9.1. Obtención de peces reproductores en el laboratorio	28
9.2. Identificación del estado gonadal.....	29
9.3. Tiempo de asociación	29
9.4. Análisis de feromonas	31
9.4.1. Análisis elemental (EDS)	32
10. DISCUSIÓN	35
10.1. Comunicación química vs comunicación visual	35
10.2. Tiempo de asociación	37
10.3. Análisis de feromonas	38
10.3.1. Espectroscopía de infrarrojo.....	38
10.3.2. Análisis elemental (EDS)	38
10.4. Implicaciones ecológicas de la comunicación química en <i>Millerichthys robustus</i>	40

11. CONCLUSIONES	44
12. BIBLIOGRAFÍA	47

Resumen

Los peces anuales sobreviven a la desecación de sus hábitats debido a un complejo desarrollo embrionario mediado por diapausas y un corion engrosado, en Norteamérica la única especie de este grupo es *Millerichthys robustus*. Aunque se ha descrito la conducta reproductora de esta especie, los procesos de comunicación durante el cortejo son desconocidos. Para conocer si la especie produce feromonas sexuales, se realizaron pruebas de preferencia simultánea con organismos en diferentes estadios de madurez sexual. Los resultados permitieron conocer que las hembras no solo se tornan activas durante el cortejo, sino también en la producción de feromonas sexuales. Un análisis elemental del agua en la que los peces fueron estimulados a la reproducción, demostró una cantidad significativa de azufre (S) en el agua de las hembras. La presencia de este elemento está asociado a los procesos de sulfatación, mecanismo para regular la actividad de enzimas y hormonas; lo que sugiere que la feromona con la que se comunica químicamente *M. robustus* podría tratarse de un esteroide sexual femenino. Los resultados sugieren que previo al cortejo, la comunicación química es necesaria para el encuentro de la pareja, por lo tanto, la selección del sitio reproductivo podría no ser un evento azaroso.

Introducción

El desove, la liberación controlada de los gametos, requiere la sincronización del comportamiento sexual con la maduración de células sexuales. El control de este evento es complejo e implica señales hormonales internas y comunicación externa a través de señales químicas, las feromonas (señales externas que se transmiten entre miembros de la misma especie); y señales ambientales tales como fotoperíodo y temperatura. No obstante el considerable interés en la reproducción de peces, el control feromonal del desove se comprende en pocas especies, una situación poco alentadora dada la enorme diversidad de estrategias reproductivas que presentan las aproximadamente 33,000 especies de peces descritas (Kobayashi et al., 2002; Sánchez-Hernández, 2019).

Los peces anuales habitan cuerpos de agua temporales, son organismos ovíparos con fertilización externa que entierran sus huevos en el sustrato para protegerlos durante la etapa “seca” del año. Considerando que todos los peces adultos mueren cuando el cuerpo de agua se seca, sólo los huevos sobreviven y eclosionan en el inicio de la siguiente temporada de lluvias cuando el cuerpo de agua temporal se llena (Berois et al., 2016; Podrabsky et al., 2010). Las poblaciones de peces anuales sobreviven a la sequía debido al engrosamiento del corion de sus huevos que permanecen ocultos en el fango hasta la siguiente estación de lluvias cuando eclosionan y comienzan un nuevo ciclo de vida y un complejo desarrollo embrionario en el que ocurren diapausas (Podrabsky et al., 2010; Wourms, 1972a).

El hábitat de los peces anuales está representado por cuerpos de agua temporal relativamente pequeños (con un área menor a 20 m²) y poco profundos (hasta 1.5 m), soportan comunidades únicas de organismos acuáticos y presentan una fase seca anual de duración variable. (Collinson et al., 1995; Lanés, Keppeler, et al., 2014; Maltchik, 2003; Williams, 2006). El ambiente extremadamente variable proporcionado por estos ambientes expone a los organismos a cambios drásticos en las características del agua (particularmente turbidez), para ello, las especies de peces anuales elaboran una compleja conducta reproductora y utilizan diferentes

modalidades sensoriales durante este proceso, incluyendo señales acústicas (Belote & Costa, 2002, 2003, 2004; Berois et al., 2016; Costa, Ramos, Alexandre & Ramos, 2010). Es por lo expuesto anteriormente que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el control que las feromonas ejercen sobre la conducta reproductora en hembras y machos de *M. robustus*.

1. Antecedentes

2.1. Interacciones sociales en animales irracionales

La formación de grupos sociales es uno de los aspectos más prominentes y generalizados del comportamiento animal (Krause & Ruxton, 2002). Existe un espectro social en términos de la frecuencia con la que tienen lugar estas interacciones y cuán complejas son. En un extremo, vemos un comportamiento relativamente simplista entre uno o más individuos que interactúan temporalmente para acceder a ciertos recursos. Ejemplos de esto incluyen grupos de ñúes (*Connochaetes taurinus*), cebras (*Equus quagga*), elefantes (familia: Elephantidae) y búfalos (*Syncerus caffer*) que forman agregaciones temporales de alimentación en los pozos de agua (Gereta et al., 2004). En el extremo opuesto del espectro se encuentran complejas y dinámicas formas de vida grupal, en la que sociedades comparten recursos, cooperan y dividen el trabajo. La forma más extrema de esto está representada por la eusocialidad en una gran cantidad de especies de insectos y ratas topo desnudas, *Heterocephalus glaber* (Jarvis, 1981; Wilson & Holldobler, 2005). Además, en este extremo del espectro, vemos individuos que son capaces de cuidar altruistamente a los juveniles y formar jerarquías de dominio (Bernstein, 1976; König, 1997).

Los patrones de comportamiento social expresados por una población son consecuencia de los estímulos sociales y físicos encontrados por un individuo y su agrupación (Mills & Marchant-Forde, 2010). Se sabe que muchas especies de peces pasan una cantidad importante de tiempo en grupos sociales (Pitcher, 1993). Estos son muy dinámicos, con individuos que se unen y abandonan grupos que varían en

tamaño y composición en respuesta tanto al medio ambiente como a su propio estado interno (Hoare et al., 2000).

Agruparse es común entre las especies de peces, pero sus costos y beneficios son variables. Algunos individuos se agrupan únicamente como alevines o juveniles (Guttridge et al., 2009; Hoare et al., 2000), mientras que otros se agrupan únicamente como adultos (Radford et al., 2010, 2011; Searcy & Sponaugle, 2001).

Desde la perspectiva de la depredación, pertenecer a un grupo proporciona una multitud de beneficios a través de diferentes defensas. A pesar de que un grupo más grande tiene una mayor probabilidad de ser detectado, si un depredador solo puede consumir una cierta cantidad de presas en un solo ataque, la vida en grupo disminuye la posibilidad de que un individuo sea depredado y da lugar al efecto de dilución (Foster & Treherne, 1981). Un ejemplo en peces es el del killi anillado (*Fundulus diaphanous*), que elige asociarse con peces en un grupo más grande cuando se les presenta la opción de elegir entre dos tamaños de grupo diferentes después de un evento de depredación (Krause & Godin, 1996).

La probabilidad de supervivencia aumenta si un individuo es capaz de detectar y evitar al depredador. Cuando se vive en un grupo, hay más organismos buscados por algunos depredadores. Esto no solo aumenta las posibilidades de que se detecte al depredador, sino que también permite que un individuo dedique más tiempo a buscar alimento sin aumentar su riesgo de depredación (Pulliam, 1973).

La vida en grupo también puede influir en el éxito reproductivo, ya que es más probable que un individuo encuentre una pareja en un entorno grupal debido a la alta densidad de individuos en un área. El carricero de Seychelles (*Acrocephalus sechellensis*), entre otras aves, crían y cuidan cooperativamente a las crías, lo que no solo aumenta sus propias posibilidades de reproducción, sino que aumenta la posibilidad de supervivencia tanto de sus crías como de las crías de otros miembros del grupo (Komdeur, 1992).

A medida que aumenta el tamaño del grupo los costos asociados con la vida en conjunto también aumentan; por ejemplo, la competencia por alimento. Estos costos pueden no ser iguales para todos los individuos, particularmente si la población adopta una estructura jerárquica (Pitcher, 1993). Por lo tanto, la vida solitaria y la vida grupal representan diferentes soluciones para la supervivencia y reproducción.

Aunque la vida en grupo puede aumentar las posibilidades de encontrar pareja y mejorar la supervivencia de la descendencia, también puede tener efectos negativos en la reproducción. Los grupos que están aislados de otros corren el riesgo de reducir el flujo de genes y la variación genética, lo que puede provocar endogamia (Madsen et al., 1996). Por otra parte, es posible que la transmisión de algún patógeno aumente en una situación grupal (Krause & Godin, 1996). En este sentido, la transmisión de enfermedades en grupos no debe exacerbarse cuando la competencia por alimentos y recursos es evidente (Cote & Poulinb, 1995).

2.2. *Reconocimiento social*

La variación en los mecanismos de reconocimiento se explica por los costos y beneficios asociados con la necesidad de reconocimiento específico (Tibbetts & Dale, 2007). En grupos sociales estables donde los individuos interactúan repetidamente, puede ser posible que un animal reconozca a ciertos individuos y asociarse preferencialmente con ellos. Muchas especies de peces son capaces de un nivel de reconocimiento más sofisticado y pueden distinguir entre familiares y conespecíficos en consecuencia. Por ejemplo, los alevines de *Gasterosteus aculeatus* pasan más tiempo asociados con parientes cuando los depredadores están presentes (FitzGerald & Morrissette, 1992).

2.3. *Mecanismos de reconocimiento*

Tres componentes principales son importantes al reconocer a otros individuos: producción de una señal, percepción de la misma y acción específica (Sherman et al., 1997). Estos componentes se refieren a una interacción entre dos o más organismos. Por ejemplo, un animal (remitente) produce una señal que es recibida

por otro animal (receptor), el receptor luego analiza esta señal para producir una respuesta conductual específica (Mateo, 2004). Dependiendo del tipo de señal, su calidad y la sofisticación de la plantilla de reconocimiento del receptor, el animal que recibe la señal puede deducir la identidad del remitente como mínimo, a un nivel específico o heteroespecífico (Sherman et al., 1997). Una vez que el receptor ha identificado al remitente, puede ajustar sus acciones y comportarse en consecuencia. Las señales sensoriales utilizadas para comunicarse varían y pueden ser de forma acústica, visual o química. El uso de señales depende de las preferencias de hábitat y organización social y los individuos no están limitados a usar un método; una combinación proporciona a los receptores una multitud de señales a las que pueden hacer referencia, lo que aumenta la probabilidad de reconocimiento (Rybak et al., 2002).

2.3.1. Señales visuales

Las señales visuales, como la variación en el tamaño, la coloración y otros caracteres sexuales secundarios, son utilizadas por los organismos para unirse a un grupo en el que los miembros son fenotípicamente similares (Ward & Hart, 2003). A pesar de la calidad generalmente pobre de las imágenes subacuáticas, los peces dependen en gran medida de la visión como fuente de información sensorial. Todos menos algunos (principalmente especies que habitan en cuevas) tienen ojos bien desarrollados. En cuanto a ornamentos visuales, los organismos que habitan en ambientes de aguas claras exhiben una gran variedad de patrones de color y movimientos específicos que podrían compararse con las especies de aves y mamíferos mayor ataviadas (Pitcher, 1993).

2.3.2. Señales acústicas

El uso del sonido para comunicarse es muy común en el reino animal y las vocalizaciones de animales son utilizadas por una gran variedad de taxones (Cheng et al., 2010). Se pueden obtener altos niveles de especificidad a través de este tipo de uso de señal.

Investigaciones recientes han demostrado que diferentes hábitats en ambientes costeros poco profundos pueden caracterizarse en cuanto a la diversidad de especies, por las señales acústicas que específicamente son producidas por cada una de ellas (Radford et al., 2010). La contribución del camarón, los erizos, los peces y otros organismos productores de señales varía en diferentes hábitats, y estas diferencias acústicas entre los hábitats, proporcionan el potencial para que el sonido subacuático del hábitat sea una señal de orientación para los organismos. Aunque se ha encontrado que las señales acústicas son importantes para los peces en diferentes etapas de su ciclo de vida, solo un pequeño número de estudios respalda la importancia de estas señales en organismos acuáticos (Radford et al., 2011).

2.3.3. Señales químicas

Los estímulos químicos incluyen productos bioquímicos liberados por conoespecíficos y otros organismos, algunos de los cuales pueden revelar la presencia y ubicación de alimentos, pareja, depredadores o sitios de desove. Los sentidos químicos de los teleósteos desempeñan un papel importante en la mediación de respuestas fisiológicas; la información disponible indica que estas señales químicas, incluidas las feromonas, están más extendidas en las interacciones sociales de lo que podría sospecharse. La mayoría de las investigaciones en este tema aún se encuentran en etapas descriptivas (Sorensen & Wisenden, 2015).

Las feromonas fueron definidas originalmente como moléculas que sirven de señalización química para provocar una reacción específica en un organismo, por ejemplo, un comportamiento estereotipado o un proceso de desarrollo (Karlson & Lüscher, 1959). Definiciones recientes refieren a una feromona como un compuesto o mezcla de compuestos químicos liberados por un individuo (el emisor), que inducen importantes efectos conductuales y fisiológicos en organismos de la misma especie (los receptores) (Sorensen & Stacey, 2004; Stacey, 2011). La comunicación química en las interacciones sociales de los peces ha sido ampliamente reconocida.

Por ejemplo, en especies de peces no anuales de la familia Gasterosteidae, las feromonas se usan en el reconocimiento de la pareja (McLennan, 2003; McLennan, 2004; Ostlund, 1995; Rafferty & Boughman, 2006), reconocimiento de parentesco (Mehlis et al., 2008), evaluación de la compatibilidad de la pareja (Aeschlimann et al., 2003; Milinski et al., 2005; Reusch et al., 2001) y la condición reproductiva (Häberli & Aeschlimann, 2004; Waas & Colgan, 1992).

Los sistemas de comunicación por feromonas son extremadamente variables, los cambios en un número relativamente pequeño de genes pueden llevar a una diversificación específica bajo selección sexual o contra la hibridación (Smadja & Butlin, 2009). En este sentido, se han descrito los efectos feromonales del glucurónido de etiocolanolona, hormona sexual masculina, que atrae a las hembras de *Gobius niger* y *Danio rerio* a su nido para el desove (Colombo et al., 1980; Van Den Hurk & Resink, 1992). Desde entonces, se han identificado a los esteroides y las prostaglandinas como las feromonas predominantemente utilizadas en una variedad de especies de peces (Sorensen & Stacey, 1999; Sorensen & Wisenden, 2015).

Los esteroides derivados del tejido ovárico han sido utilizados como feromonas hormonales en algunas especies de peces, aunque la información específica sobre la identidad y producción ha sido descrita en pocas especies (Stacey, 2015; Stewart & Sorensen, 2015), por ejemplo, en las lampreas de mar *Petromyzon marinus* (Figura 1).

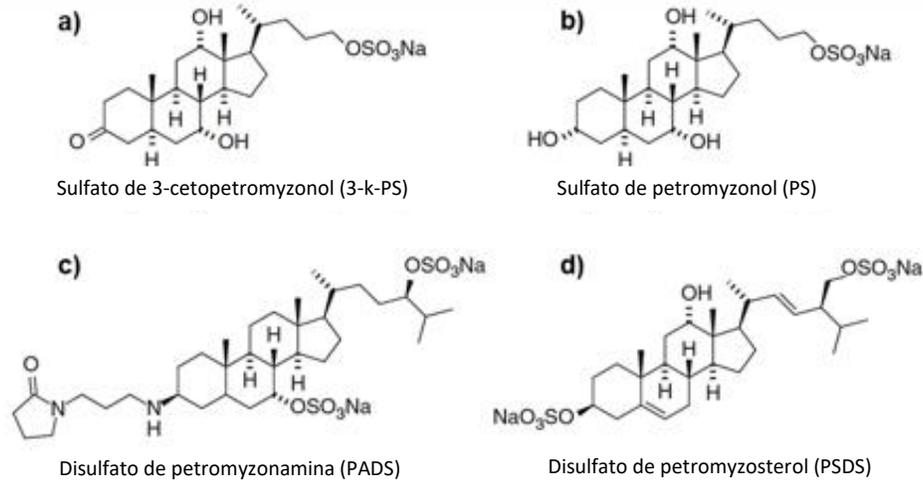


Figura 1. **a)** Sulfato de 3-cetopetromyzonol (3-k-PS), feromona sexual masculina de *Petromyzon marinus*. Feromonas utilizadas para la migración en larvas de *Petromyzon marinus*: **b)** Sulfato de petromyzonol (PS), **c)** Disulfato de petromyzonamina (PADS), y **d)** Disulfato de petromyzosterol (PSDS) (Stewart & Sorensen, 2015).

2.4. Peces anuales

El orden de los Cyprinodontiformes, es un grupo de peces pequeños (≈ 6 cm) con dimorfismo sexual marcado que habitualmente viven en hábitats marginales, siendo estos inhóspitos para otras especies de peces (Karsten et al., 2008).

Este grupo numeroso de peces conformado por 1264 especies reconocidas, se acompaña de una sorprendente diversidad en la morfología y hábitos tróficos. Exhiben una variedad de modos reproductivos, incluidas especies vivíparas (familias Poeciliidae, Goodeidae y Anablepidae) y una especie partenogenética, *Poecilia formosa*. Dentro de este orden, se encuentra el suborden Aplocheiloidei con distribución Neotropical y africana que exhibe características reproductivas únicas. Los ejemplos más conocidos son el auto-apareamiento en dos especies del género *Kryptolebias* (Tatarenkov et al., 2009) y los sorprendentes ciclos de vida anuales de las familias Notobranchiidae y Rivulidae (algunas especies). Además, algunas especies que presentan inseminación interna, por ejemplo los géneros, *Campelollebias* y *Cynopoecilus* (Costa, 1998; Ferrer et al., 2014; Furness, 2015).

Los peces anuales habitan cuerpos de agua que se inundan semanas o meses durante la estación de lluvias, siguiendo los ciclos estacionales y transitando obligadamente por una fase seca (Myers, 1952; Wourms, 1972a, 1972b). Durante el hidroperíodo (tiempo en que el hábitat presenta agua) los peces tienen un acelerado crecimiento y reproducción, y toda la población muere al secarse el estanque. En la siguiente estación de lluvias una nueva población tiene lugar a partir de los huevos que resisten la sequía mediante depresiones metabólicas conocidas como diapausas embrionarias (Mosqueda-Cabrera et al., 2019). Debido a su ciclo de vida excepcionalmente corto, los peces anuales están emergiendo como organismos modelo en la investigación etológica y fisiológica (Cellerino et al., 2016; Harel et al., 2016).

La depresión metabólica durante el desarrollo embrionario es relativamente poco común en peces, aunque ha sido documentada en diferentes etapas de su ciclo de vida; esta condición es inducida en respuesta a condiciones ambientales desfavorables, especialmente cambios en la disponibilidad de agua, alimento y cambios en la temperatura. El letargo es probablemente la forma más común de latencia en peces adultos y ha sido reportada en una gran cantidad de especies (Hansen & Sidell, 1983; Lesser, Martini, & Heiser, 1997; Podrabsky et al., 2010). Sin embargo, la detención del desarrollo embrionario es más efectiva desde una perspectiva geográfica, ecológica y evolutiva. Esta capacidad es probablemente impulsada por la variedad de ambientes en los que habitan las especies de peces y es muy probable que la evolución de este proceso esté ligada a la tolerancia a la desecación del hábitat. Así, los embriones de los peces anuales están altamente adaptados para la vida en la interfaz entre la tierra y el agua (Podrabsky et al., 2010).

La mayoría de las especies de peces anuales se encuentran geográficamente en regiones tropicales y subtropicales, además han sido ubicadas sistemáticamente en dos familias, la familia Rivulidae (aproximadamente 160 especies) de América y la familia Aplocheilidae (aproximadamente 189 especies) de África (Murphy & Collier, 1997).

2.5. *Hábitats de peces anuales*

Los hábitats acuáticos temporales o marginales donde habitan los peces anuales, están sujetos a un alto grado de variación ambiental. Además, muchos de estos hábitats alcanzan extremos en los parámetros ambientales que se acercan a los límites de la supervivencia de los vertebrados (Podrabsky et al., 2015).

Los cuerpos de agua temporal varían en sus condiciones dependiendo principalmente de su posición geográfica principalmente. Por ejemplo, los peces que los habitan pueden estar expuestos a temperaturas cercanas al punto de congelación, cuando sus hábitats son ubicados en las zonas subtropicales y templadas de Argentina, Uruguay y el sur de Brasil (Errea & Danulat, 2001; Volcan et al., 2011), mientras que en los desiertos costeros de Venezuela y las sabanas de Mozambique pueden estar expuestos a temperaturas cercanas a su límite letal superior (40 °C) (Podrabsky et al., 1997; Reichard, 2010). En ambos casos, los cuerpos de agua temporal son relativamente pequeños y poco profundos y, por lo tanto, tienen una capacidad limitada para amortiguar los cambios ambientales que ocurren a diario o estacionalmente. El agua puede ser muy turbia o transparente y de color verdosa en los casos en que hay una cantidad significativa de vegetación degradante. Por lo tanto, los peces anuales deben soportar un alto grado de variación diaria y estacional en parámetros ambientales importantes como la temperatura, la concentración de oxígeno, el pH, la salinidad y, por supuesto, la disponibilidad de agua (Lanés, et al., 2014; Podrabsky et al., 1997; Volcan et al., 2011, 2014). Los sustratos fangosos que casi siempre están asociados con los hábitats de peces anuales son ricos en minerales arcillosos y están sujetos a hincharse cuando están húmedos y a contraerse significativamente cuando están secos. Estos tipos de suelos generalmente se clasifican como vertisoles y también tienen una capacidad significativa de intercambio catiónico y amortiguación (especialmente calcio y magnesio) cuando están hidratados (Podrabsky et al., 2015).

2.6. *Diapausa y tolerancia al estrés ambiental*

El hábitat de los peces anuales es altamente variable, los eventos de lluvia que los inundan pueden ocurrir con impredecibilidad, esto los vuelve efímeros con una exposición temporal a la sequía; el pH puede oscilar entre 3-4 unidades entre hábitats de la misma localidad y varias unidades en un solo hábitat durante el transcurso del día. La temperatura oscila entre los 20°C y los 40°C y sus sedimentos son extremadamente hipóxicos o anóxicos durante los períodos de inundación (Podrabsky et al., 1997). Para sobrevivir a estos ambientes extremos los peces anuales expresan diferentes adaptaciones que incluyen la detención del desarrollo embrionario en tres etapas separadas llamadas: diapausa I, II, y III. Estas etapas extienden el tiempo total de desarrollo embrionario durante la estación seca para que los embriones nazcan cuando el hábitat esté disponible (Murphy & Collier, 1997; Wourms, 1972c).

2.6.1. *Diapausa I*

Ocurre en el desarrollo temprano antes de la formación del eje embrionario, se asocia con una etapa de desarrollo única de los peces anuales llamada la fase de dispersión celular y es inducida por bajas temperaturas e hipoxia (Inglima et al., 1981).

2.6.2. *Diapausa II*

En esta detención del desarrollo embrionario el metabolismo es deprimido en más del 90% y ocurre después de la formación del eje embrionario, las bases del sistema nervioso central, las placodas olfatorias y ópticas, las vesículas óticas y un corazón tubular funcional. (Levels et al., 1986; Podrabsky & Hand, 1999; Wourms, 1972b). La mayoría de los datos fisiológicos sobre la diapausa en embriones de peces se han centrado en esta etapa por su increíble robustez para hacer frente a la estación del hidroperíodo seca, por medio de la excreción de alguna sustancia hidrofóbica en el fluido perivitellino o la vitrificación del mismo que evita la desecación del compartimiento embrionario (Podrabsky et al., 2010).

2.6.3. *Diapausa III*

Ocurre antes de la eclosión, cuando comienza la temporada de lluvias. El desarrollo embrionario es esencialmente completado y se ha consumido una parte significativa de la masa vitelina del huevo, el embrión está listo para eclosionar y solamente espera condiciones hídricas favorables como el llenado del hábitat para su nacimiento. También se conoce que durante la diapausa III en algunas especies de peces anuales la eclosión no ocurre si están presentes otras especies de peces no anuales, esto ha sido interpretado como una medida para evitar la depredación (Podrabsky et al., 2010; Wourms, 1972c).

2.7. *Conducta reproductora en peces anuales*

El comportamiento sexual generalmente se define como el conjunto de conductas que tienen como objetivo producir descendencia (Munakata & Kobayashi, 2010). Para los peces anuales se ha documentado tres sitios de desove, a saber: en la columna de agua, sobre las raíces de plantas y en el sustrato (Costa, 1998); mientras que la conducta reproductora ha sido descrita en 5 estadios diferentes:

- A. *Cortejo*. El macho comienza a exhibir intensos movimientos corporales en forma de “S” alrededor y delante de la hembra, exhibiendo las aletas de manera expandida, mientras que la hembra solamente observa. Si la respuesta de la hembra es receptiva, se acerca y sigue al macho, que se mueve cerca del fondo buscando un lugar para sumergirse.
- B. *Invitación a sumergirse*. El macho nada cerca del sustrato poniendo su boca inclinada hacia abajo haciendo un ángulo de entre 30 y 90°, sacudiendo el cuerpo y las aletas, moviendo ligeramente el sustrato para llamar a la hembra a sumergirse.
- C. *Sumersión*. La hembra se empareja al macho y ambos cavan en el sustrato haciendo vibrar el cuerpo y aletas.

- D. *Desove y fertilización*. Sumergida la pareja en el substrato, el desove y la fertilización de los ovocitos ocurre mientras el macho presiona a la hembra contra el fondo con su cuerpo para estimular al desove.
- E. *Emerger*. Después del desove, la pareja permanece sumergida durante unos segundos o pocos minutos y luego emergen juntos, o en diferentes momentos y lugares, así, comienza un nuevo ciclo de cortejo (Belote & Costa, 2002, 2003, 2004; García et al., 2008; Valdesalici et al., 2016).

Además, en un contexto evolutivo, el alto grado de preservación del proceso de cortejo que presentan las especies de peces anuales; es decir, un carácter taxonómico bien conservado, indica que la conducta reproductora *per se* no representa una barrera suficiente para evitar la hibridación en especies simpátricas, para que eso suceda deben ocurrir procesos fisiológicos tales como la producción de señales no visuales o químicas de manera paralela (Valdesalici et al., 2016).

2.7.1. *Conducta reproductora en Millerichthys robustus*

Recientemente ha sido documentada la conducta reproductora de *M. robustus*, el comportamiento observado es similar al descrito para las especies anuales sudamericanas; Es decir, las parejas de *M. robustus* también despliegan los estadios conductuales indicados en los incisos A-E descritos en el párrafo anterior (Belote & Costa, 2002, 2003, 2004; García et al., 2008; Volcan, Fonseca & Robaldo, 2011). Sin embargo, la especie exhibe diferencias que pueden ser interpretadas como condiciones apomórficas, es decir, características evolutivamente recientes dentro de un grupo taxonómico de especies, por ejemplo, la fase de invitación a sumergirse no es iniciada por el macho, sino por la hembra, a diferencia de todas las especies de peces anuales en las que ha sido documentada la conducta reproductora (Valdesalici et al., 2016).

2.8. *Feromonas en la conducta reproductora de peces*

Podría mencionarse que el evento más importante en la vida de un organismo es encontrar una pareja adecuada y reproducirse. Los peces no son la excepción y los

desafíos de la vida bajo el agua parecen haber favorecido el uso de señales sexuales, incluidas las feromonas. Se han identificado algunas de estas como productos hormonales y sus derivados ("feromonas hormonales") cuya producción presumiblemente refleja el estado y la actividad reproductiva inherentes. La producción, liberación y respuesta de productos hormonales seleccionados ahora se ha demostrado en algunas especies de peces, por ejemplo: el pez dorado (*Carassius auratus*), la carpa común (*Cyprinus carpio*), el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y el bagre africano (*Clarias gariepinus*) (Sorensen & Hoye, 2010).

Se ha demostrado que cientos de especies de peces de una amplia variedad de grupos detectan al menos algunos productos hormonales con alta sensibilidad y especificidad; por lo tanto, el uso de feromonas hormonales probablemente está muy extendido entre los peces. Excepciones notables son un ácido ceto biliar utilizado por la lamprea marina masculina (*P. marinus*) (Li, 2002) y un aminoácido inusual utilizado en el ovulado del salmón masu (*Oncorhynchus masou*) (Yambe et al., 2006). Las feromonas hormonales se han descrito bien entre los peces pequeños y las carpas donde funcionan como mezclas cambiantes en el contexto de otras señales (Sorensen, 2014).

2.8.1. Feromonas en la conducta reproductora de peces anuales

Dentro de la poca evidencia documentada de que los rivulidos utilizan señales químicas durante la elección de la pareja, se encuentran un par de especies del género *Austrolebias*; en estas se reporta la respuesta de las hembras de *A. reicherti* a las señales químicas emitidas por machos conespecíficos (Passos et al., 2013) y su capacidad para discriminar entre machos heteroespecíficos (*A. charrua*) y conespecíficos (Passos et al., 2016; Reyes et al., 2017).

2.8.2. Detección olfatoria de feromonas en peces

El olfato en peces está mediado por el primer nervio craneal, que está formado por axones muy delgados de neuronas sensoriales olfativas (NSO) y que terminan en el cerebro anterior del sistema nervioso central. El sentido del olfato media una serie

de diferentes patrones de comportamiento evocados por los olores que están relacionados con señales propias de cada hábitat, indicación de alarma y reproducción, entre otras. En todas las especies de peces se encuentran elementos compartidos por la mayoría de ellos. Todas las NSO tienen un axón que termina en el bulbo olfatorio. Las neuronas secundarias median información al telencéfalo a través de sus axones que forman los tractos olfatorios. Todas estas estructuras se encuentran en la parte anterior del cerebro, con neuronas sensoriales frecuentemente reunidas en una roseta que se localiza frente a los ojos y cerca de la punta de la nariz (Figura 2) (Lastein et al., 2014).

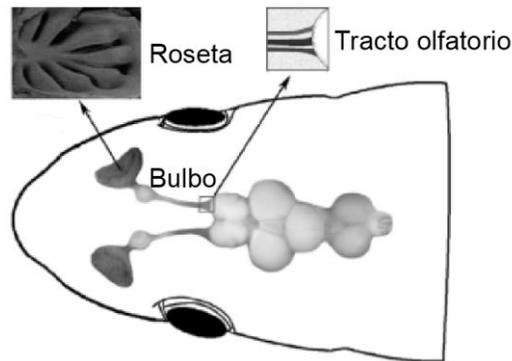


Figura 2 Morfología general del sistema olfatorio en peces.

En resumen, la señal se recibe en la roseta olfativa, se transmite al bulbo olfatorio donde es discriminada (señal sexual, parental, de alerta, etc.) y es enviada por el tracto olfatorio hacia el telencéfalo.

Se han descrito tres tipos diferentes de neuronas sensoriales en teleósteos: neuronas sensoriales ciliadas (NSC), neuronas sensoriales microvellosas (NSM) y células crípticas. Las señales de hábitat y las sustancias de alarma activan las NSC que se proyectan hacia el tracto olfatorio medial (TOM). Las células crípticas están implicadas en el comportamiento reproductivo, ya que se conectan al haz del tracto olfatorio que media el comportamiento reproductivo, la parte lateral del TOM. Las NSM median las respuestas a los olores de los alimentos (Hansen & Finger, 2000).

2.9. *Mecanismos endocrinos que regulan el comportamiento sexual en peces*

El término "hormona" se aplicó inicialmente a las moléculas que se sintetizan en las glándulas endocrinas, se secretan en el torrente sanguíneo y luego se transportan a sitios distantes. Originalmente, solo se reconocían tres clases de hormonas: proteínas y péptidos (por ejemplo, hormona liberadora de gonadotropinas, hormona luteinizante), esteroides (por ejemplo, testosterona, estradiol) y hormonas relacionadas con los aminoácidos (por ejemplo, noradrenalina (norepinefrina), adrenalina (epinefrina)). La definición actual considera que una hormona es una sustancia química que actúa a nivel celular para iniciar, detener o modular un proceso celular. El sitio de acción puede estar cerca al lugar de síntesis o en un objetivo distante dentro del mismo individuo. Las hormonas pueden actuar a través de mecanismos paracrinos, autocrinos o endocrinos (Silver & Kriegsfeld, 2001).

Las hormonas se consideraron clásicamente como agentes causales de comportamiento donde la presencia de una hormona particular era necesaria para la expresión de un comportamiento dado. Sin embargo, una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares, a través de los cuales las hormonas influyen en el comportamiento, ha cambiado esta visión al considerar a las hormonas como moduladores en lugar de agentes causales del comportamiento (Oliveira, 2004). Los andrógenos, además de desempeñar un papel en la regulación de la espermatogénesis (Miura et al., 1991), la diferenciación gonadal (Strüssmann & Nakamura, 2002) y el desarrollo de las características sexuales secundarias masculinas (Mayer et al., 1994); los andrógenos gonadales también se han implicado en la activación del comportamiento sexual masculino en peces (Borg, 1994; Gonçalves & Oliveira, 2011; Stacey, 2015).

Los componentes endocrinos generales y las vías que regulan la reproducción de los peces están altamente conservados y, como en otros vertebrados, son generados por el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HPG) (Zohar et al., 2010).

El hipotálamo responde a las condiciones ambientales y fisiológicas, sintetizando y liberando neuropéptidos (principalmente hormona liberadora de gonadotropina;

GnRH) y monoaminas (principalmente dopamina) que regulan la actividad de las células endocrinas en la hipófisis anterior. Esa región de la hipófisis produce la hormona foliculoestimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH); tras la estimulación, las células gonadótropas ubicadas en la hipófisis anterior producen y liberan estas hormonas a la sangre (Levavi-Sivan et al., 2010).

Ambas gonadotropinas estimulan en las gónadas la síntesis de hormonas esteroides que, a su vez, regulan la maduración de los gametos y ejercen un mecanismo de retroalimentación al hipotálamo y la hipófisis (Biran & Levavi-Sivan, 2018).

2.9.1. Esteroides gonadales y la conducta sexual

Los esteroides sexuales gonadales han sido reconocidos como hormonas clave que regulan: la diferenciación sexual, algunos aspectos fisiológicos de la reproducción y el desarrollo de características sexuales primarias y secundarias (Chaves-Pozo et al., 2018). Los principales esteroides sexuales detectados en el plasma de machos teleósteos son testosterona (T), 11 β -hidroxitestosterona (OHT) y la 11-cetotestosterona no aromatizable (11-KT) (Borg, 1994). La 11-KT es generalmente el esteroide sexual más abundante en el plasma de los machos y se cree que es el andrógeno más relevante en este sexo, mientras que la "T" es el andrógeno circulante más importante en las hembras (Borg, 1994; Lokman et al., 2002). El efecto de estos andrógenos es mediado por receptores de andrógenos (Ars) (Laudet & Gronemeyer, 2002). Los andrógenos se pueden convertir en estrógenos, que desempeñan un papel clave en la reproducción al unirse con los receptores de estrógeno (Ers). Esta conversión está catalizada por la citocromo p450 aromatasa, familia 19, subfamilia A (Cyp19a) (Diotel et al., 2010). En este sentido, se ha documentado que el comportamiento sexual masculino en guppies (*P. reticulata*), se reduce por inhibición de P450 (Hallgren et al., 2006), lo que sugiere que, al igual que con otros vertebrados, la aromatización de "T" a "E₂" facilita algunos aspectos del comportamiento sexual masculino.

En algunas especies de peces se ha documentado que la sincronización sexual entre machos y hembras de la misma especie, se logra mediante la liberación de feromonas al ambiente y que funciona a través de una compleja interacción hormona-comportamiento que da lugar al cortejo (Kobayashi et al., 2002; Stacey & Sorensen, 2002). Las hormonas que regulan etapas específicas del desarrollo folicular en las hembras de algunas especies, se liberan al ambiente externo a través de las branquias u orina, actuando como feromonas en los machos (Munakata & Kobayashi, 2010).

3. Justificación

Los peces son un excelente grupo taxonómico para estudiar los mecanismos a través de los cuales las hormonas modulan la expresión de los comportamientos sexuales en los vertebrados.

En primer lugar, el sistema neuroendocrino de los peces está bien conservado entre los vertebrados y es probable que los mecanismos de acción hormonal en el comportamiento compartan similitudes con los de otros vertebrados. En segundo lugar, los peces se han adaptado virtualmente a todos los ambientes acuáticos, reflejado en una extraordinaria diversidad de comportamientos reproductivos. En tercer lugar, muchas especies presentan plasticidad en sus conductas sexuales, por ejemplo, los peces que cambian de sexo o que adoptan más de una táctica reproductiva durante su vida, esta plasticidad parece estar mediada por hormonas.

Por otra parte, el conocimiento sobre la reproducción de peces anuales ha aumentado en los últimos años, aunque el cortejo y los comportamientos de apareamiento han sido descritos detalladamente en algunas especies; los estudios sobre la comunicación química durante este evento son escasos. Aunque la mayor parte de la investigación sobre el papel del olfato en los sistemas de apareamiento en peces se ha centrado en la respuesta del macho a las señales químicas de las hembras, el único estudio realizado en peces anuales (*Austrolebias reicherti*) es

representado por la respuesta de las hembras a estas señales; es importante recalcar que de todas las especies de peces anuales, *M. robustus* es la única especie de pez anual donde las hembras se tornan activas conductualmente durante el cortejo.

En este sentido, el primer acercamiento a la comunicación que interviene en el apareamiento selectivo de *M. robustus* permitirá comprender cómo emergió el aislamiento reproductivo durante la especiación y cómo se ha mantenido en esta la única especie anual de Norteamérica. Además, para evaluar la vulnerabilidad de esta especie a las perturbaciones ambientales, es crucial comprender las capacidades perceptivas, cognitivas y conductuales desde un contexto reproductivo.

El conocimiento sobre las sustancias que participan en el reconocimiento específico durante la reproducción y los mecanismos involucrados en la determinación y madurez sexual en peces anuales es completamente desconocido e indispensable para comprender aspectos básicos de la biología reproductiva, ecología, fisiología y ecología del comportamiento de un grupo zoológico tan diverso y con presiones ambientales que ponen en riesgo su permanencia en hábitats naturales. Por lo tanto, generar el conocimiento básico antes mencionado es relevante en la propuesta de estudio y conservación de las poblaciones de *M. robustus* y sus hábitats.

4. Planteamiento del problema

Las fases de la conducta reproductora que presentan las especies de peces anuales pertenecientes a la familia Rivulidae han sido preservadas a lo largo de la evolución de cada especie, todas las especies de la familia en las que ha sido descrita la conducta reproductora presentan 5 estadios bien definidos: 1) cortejo, 2) invitación a sumergirse, 3) sumergirse, 4) desove y fertilización, y 5) emerger. Por lo anterior, dentro de esta familia, la conducta reproductora puede ser considerada como una condición conservada evolutivamente; es decir, plesiomórfica. Por otra parte, una

serie de conductas únicas en algunas especies de peces anuales son interpretadas como autapomorfias; vale la pena recalcar que estas conductas son presentadas únicamente por los machos; sin embargo, entre todas las especies de este grupo de peces, *M. robustus* es la única que presenta una conducta autapomórfica por parte de las hembras, durante la invitación a sumergirse. Además, los caracteres sexuales secundarios en *M. robustus* como la coloración no son brillantes o muy coloridos, carácter típico de los machos de peces anuales, ello permite suponer que la comunicación feromonal durante el comportamiento reproductivo es conducida por las hembras de esta especie.

5. Pregunta de investigación

¿Existe alguna diferencia en la expresión de feromonas sexuales entre machos y hembras de *M. robustus*?

6. Hipótesis

Si durante el cortejo, las hembras de *M. robustus* se muestran participes conductualmente; entonces, también se tornarán activas en el control feromonal de este evento.

7. Objetivos

7.1. Objetivo general

Evaluar el control que las feromonas ejercen sobre la conducta reproductora en hembras y machos de *M. robustus*.

7.2. Objetivos específicos

- Detectar la producción de feromonas involucradas en la conducta reproductora de *M. robustus*.
- Evaluar la respuesta de machos y hembras de *M. robustus* al agua acondicionada durante la reproducción.

- Identificar la naturaleza elemental de las feromonas sexuales en *M. robustus*.

8. Material y métodos

Para la realización del presente estudio, únicamente se extrajeron huevos de *M. robustus* del medio natural en una ocasión, bajo el permiso de colecta científica SGPA/DGVS/04147/17, otorgado por la Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental, Dirección General de Vida Silvestre de la SEMARNAT. La búsqueda de huevos se realizó en el sustrato del hábitat con la ayuda de agujas de disección. Se colectaron huevos del 24 al 26 de octubre de 2017 en la localidad de Tlacotalpan, Veracruz (TL-1) (Domínguez-Castanedo et al., 2013), cuando el hábitat se encontró completamente inundado. Después de 20 días de colectados, los huevos fueron inducidos a la eclosión. Los alevines fueron alimentados con *Artemia Salina* y contenidos en peceras de 3 l hasta alcanzar una talla de 2 cm; posteriormente, se alimentaron *ad libitum* con *Tubifex* sp en peceras de 40 l a una temperatura constante de 26°C con un fotoperiodo de 14 horas luz y 10 horas oscuridad en el laboratorio de Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM-X).

A los 90 días después de la eclosión, los machos de *M. robustus* fueron reconocidos de acuerdo con el color rojo o amarillo de la banda transversal submarginal de la aleta anal y las hembras por presentar puntos negros en la base de la aleta caudal. Los organismos fueron sexados en 9 machos y 10 hembras, los cuales fueron inducidos a la reproducción mediante la simulación de las condiciones de desove; se colocaron envases transparentes de un litro con sustrato de musgo (*Sphagnum* sp.).

8.1. Identificación del estado gonadal

El conocimiento sobre la curva de madurez es importante especialmente para determinar si los organismos que fueron evaluados en las pruebas de preferencia eran maduros sexualmente y pudieran ser incluidos dentro de las diferentes

cohortes. El índice gonadosomático (IGS) o coeficiente de madurez es una métrica que representa el peso relativo de la gónada respecto al peso del pez. El IGS ha sido ampliamente utilizado porque representa una técnica económica y fácil de calcular. Los cambios en el IGS están determinados principalmente por variaciones en el número de óvulos y la concentración de la yema durante las diferentes etapas de los ovocitos y, por lo tanto, proporciona información sobre la maduración y los patrones estacionales en el desarrollo de las gónadas.

Para conocer el estado de madurez sexual de los organismos, dos individuos de cada generación fueron sacrificados por hipotermia para extraer las gónadas. El IGS se valoró calculando el peso de la gónada / peso corporal x 100.

8.2. *Tiempo de asociación*

8.2.1. *Obtención de los estímulos químicos*

Para obtener los estímulos químicos de cada sexo, un organismo fue mantenido en un contenedor de vidrio (10 X 10 X 20 cm, previamente lavado con detergente y etanol al 95%) con un litro de agua de garrafón, colocado adyacentemente a otro contenedor con las mismas características, pero con un organismo del sexo contrario. Se permitió la comunicación visual entre los organismos durante 24 horas, además, se evitó el contacto visual con el resto de los organismos del laboratorio cubriendo las dos peceras con papel albanene. Los organismos se privaron de alimento 24 horas antes y durante la comunicación visual para minimizar la presencia de compuestos químicos fecales, el líquido con las señales obtenidas en este proceso se denomina "agua acondicionada". Una muestra blanco fue generada usando el protocolo antes mencionado sin introducir peces en los contenedores. Para el análisis químico de los estímulos, 400 ml del agua acondicionada de cada sexo se almacenó a -70°C durante dos días para ser liofilizada y analizada posteriormente, los 600 ml de agua restante se utilizaron en las pruebas de preferencia simultánea.

8.2.2. Pruebas de preferencia

Se realizaron pruebas de preferencia simultánea para conocer la respuesta de machos y hembras a: (1) agua acondicionada de hembras vs agua acondicionada de macho y (2) agua acondicionada del sexo opuesto vs blanco; para validar que la respuesta hacía el agua acondicionada estuviera relacionada con la madurez de los organismos, se realizaron pruebas de preferencia con organismos inmaduros. Cada tratamiento fue realizado por sextuplicado considerando este número como las repeticiones necesarias para que el tratamiento estadístico fuera validado.

Para las pruebas de preferencia simultánea se utilizaron peceras de 60 X 20 X 20 cm con 18 L de agua aireada y desclorada, en estas, tres sectores fueron definidos por marcas externas en el vidrio, a saber: un área central de 30 cm (zona neutral) y dos zonas a los lados de 15 cm (zonas de preferencia) (Figura 3). Para conocer la respuesta a los estímulos químicos, un macho o una hembra de *M. robustus* fue introducida en la pecera y se le permitió nadar libremente para aclimatarse durante 30 min, posteriormente fue contenido en una cámara opaca en el centro de la zona neutral por 5 min; después de este tiempo se liberó agua acondicionada (desde los contenedores superiores) en la zona de preferencia del sexo correspondiente con un flujo de 10 ml/min a 1 cm de la superficie del agua de tal manera que provocaran perturbación superficial (McLennan & Ryan, 1997). Para determinar la efectividad temporal del experimento, se realizó un estudio preliminar utilizando una disolución acuosa con colorante, mostrando que el agregado tarda 30min en difundirse desde las zonas de preferencia a la zona neutral. Una vez iniciada la liberación de agua acondicionada, la cámara opaca fue retirada. Se realizaron grabaciones con una cámara de video (Sony HDR-CX405/BCE23) para cuantificar la actividad de los peces durante 20 min.

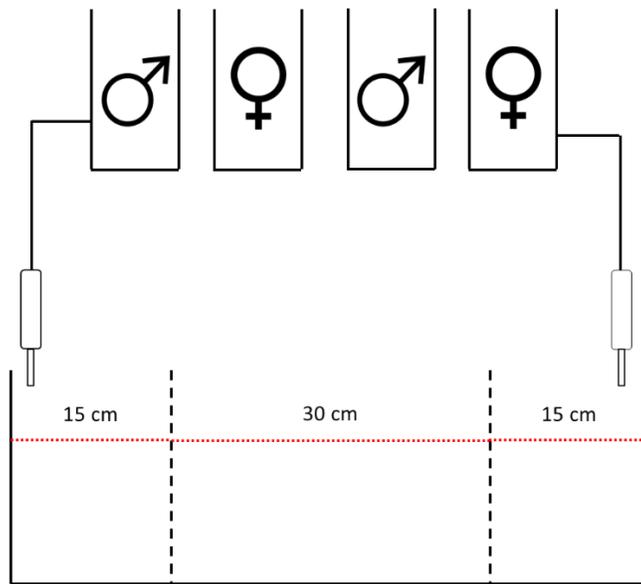


Figura 3. Modelo de pecera experimental durante las pruebas de preferencia. La parte superior refiere al origen (macho/hembra) del agua acondicionada y la inferior a la pecera de evaluación, la línea punteada de color rojo representa el nivel de agua.

Después de cada tratamiento los peces fueron devueltos a sus peceras de mantenimiento. Los videos fueron analizados para cuantificar el tiempo que los organismos permanecieron en alguna de las zonas de preferencia, es decir, el “tiempo de asociación”.

8.2.3. Análisis estadístico

Para conocer si los organismos fueron atraídos significativamente por uno de los dos estímulos (agua acondicionada de macho o de hembra), se comparó el tiempo de asociación en segundos con una prueba “t” para medias de dos muestras emparejadas usando el programa SYSTAT® 12.0.

8.3. Análisis de los estímulos químicos

Para el análisis de los estímulos químicos, únicamente se utilizó el liofilizado de agua acondicionada del sexo que estimuló una respuesta conductual significativa en las pruebas de preferencia; también se utilizó el blanco para poder hacer una

comparación entre los compuestos del agua y las feromonas. Debido al escaso conocimiento sobre la naturaleza y caracterización de las feromonas en los peces anuales, se utilizaron las siguientes técnicas que permitieran un primer acercamiento a la naturaleza de las mismas.

8.3.1. Valoración cuantitativa de las proteínas por el método de Lowry

Para conocer si el agua acondicionada de cada sexo contenía proteínas o péptidos que pudieran participar como feromonas durante la conducta reproductora de *M. robustus* se realizó una valoración cuantitativa de proteínas por el método de Lowry; este es un método colorimétrico donde la intensidad de color es proporcional a la concentración de la proteína.

El método se basa en dos reacciones diferentes. La primera es la formación de un complejo de iones de cobre con enlaces amida, formando cobre reducido en soluciones alcalinas. Esto se llama un cromóforo de Biuret y se estabiliza comúnmente mediante la adición de tartrato.

La segunda reacción es la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (fosfomolibdato y fosfotungstato), principalmente por la reducción del complejo de enlace cobre-amida, así como por la tirosina, triptófano, histidina, cistina y residuos de cisteína en la proteína. reacción. El reactivo de Folin-Ciocalteu reducido es azul y, por lo tanto, detectable con un espectrofotómetro en el rango de 500 a 750 nm. El uso del reactivo de Folin-Ciocalteu para detectar el cobre reducido hace que el ensayo de Lowry sea casi 100 veces más sensible que la reacción de Biuret sola.

Para identificar la presencia y concentración de proteínas totales del agua acondicionada se construyó una curva de calibración a partir de una solución patrón de albúmina sérica bovina (BSA) (1 mg/mL) (Lowry et al., 1951).

Para la curva estándar se utilizó una solución patrón de BSA (1000 µg/mL) con las concentraciones: 20, 40, 60, 80 y 100 µg/ mL. Las muestras se determinaron haciendo la dilución apropiada de cada una de ellas. La absorbancia se determinó en un espectrofotómetro modelo DU650 fabricado por la empresa Beckman Coulter

a una longitud de onda de 500, 600, 700 y 750 nm. La concentración de proteína se determinó por interpolación de la curva de calibración de albúmina.

8.3.2. Espectroscopia de infrarrojo

La espectroscopia infrarroja se basa en el hecho de que los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas, que corresponden a los niveles de energía de la molécula. Estas frecuencias dependen de la forma de la superficie de energía potencial de la molécula, la geometría molecular, las masas atómicas y posiblemente, el acoplamiento vibracional.

Con el fin de hacer medidas en una muestra, se transmite un rayo monocromo de luz infrarroja a través de la muestra y se registra la cantidad de energía absorbida. Repitiendo esta operación en un rango de longitudes de onda de interés ($4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$) se puede construir un gráfico. Al examinar el gráfico de una sustancia, es posible obtener información sobre los grupos funcionales que se encuentran en una muestra.

Para cada lectura se utilizaron $\sim 3\text{ }\mu\text{g}$ del liofilizado obtenido a partir del agua acondicionada, sobre una placa de diamante, los espectros fueron obtenidos a través de un espectrofotómetro Perkin Elmer Spectrum Two FTIR. Para cada espectro se realizaron 64 exploraciones realizadas en modo ATR (*Attenuated Total Reflection* por sus siglas en inglés) de haz único con una resolución de 4 cm^{-1} . Se registró un espectro de referencia con el liofilizado del blanco.

8.3.3. Análisis elemental EDS (*Energy-dispersive X-ray spectroscopy*)

El análisis micro elemental SEM-EDS utiliza espectroscopia de rayos X de energía dispersa (EDS por sus siglas en inglés) que analiza los rayos X generados como producto de la interacción del haz de electrones de un microscopio electrónico de barrido con el material sometido a análisis para la identificación y cuantificación de rayos x (Figura 4). Se realizaron evaluaciones elementales generales, seccionales y puntuales de los liofilizados para identificar y cuantificar la composición química de las muestras. Se valoró la presencia de los elementos relacionados con

feromonas descritas en otras especies de peces: N, Na, P, S, Cl, K y Ca los valores se obtuvieron a través de un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo - FE-SEM - modelo: JSM-7600F marca: JEOL. Para saber sí la cantidad relativa de los elementos químicos es significativamente diferente entre los liofilizados, se comparó con una prueba "t" para medias de dos muestras emparejadas usando el programa SYSTAT® 12.0.

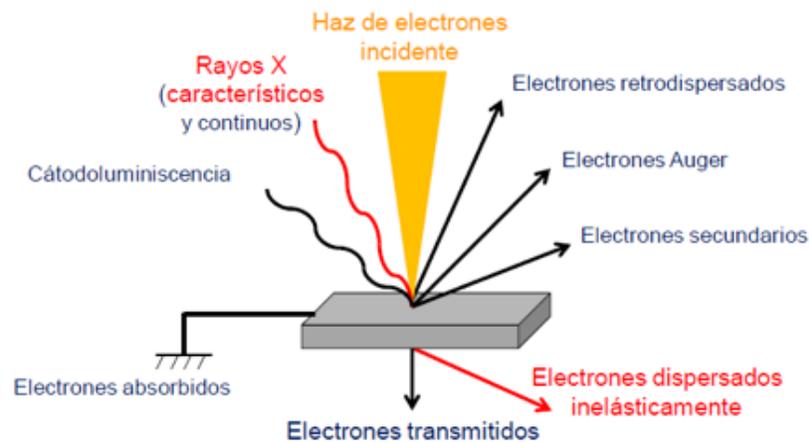


Figura 4. Interacciones resultantes entre un haz de electrones incidentes y una muestra estudiada.

9. Resultados

9.1. Obtención de peces reproductores en el laboratorio

Se obtuvieron de campo un total de 19 huevos en diapausa I. Los huevos se incubaron bajo condiciones que no detuvieran el desarrollo embrionario en diapausa II. Una vez que se completó el desarrollo se colocaron en turba bajo oscuridad por una semana, después de este tiempo se estimularon a la eclosión. Esta primera cohorte fue alimentada con *Aremia salina* durante el primer mes de nacimiento, posteriormente se realizó con *Tubifex* sp. y se estimularon a la reproducción mediante la colocación de nidos dentro de las peceras de mantenimiento. A partir de estos reproductores se mantuvo una cantidad suficiente de huevos en el laboratorio que se utilizaron a lo largo de los experimentos.

9.2. Identificación del estado gonadal

El índice gonadosomático calculado para cinco hembras de *M. robustus* demostró que estas alcanzan la madurez sexual alrededor de los 35 días de edad (Figura 5), cuando presentaron una talla superior a los 29 mm y el índice gonadosomático está cercano a 5 % (Tabla 4).

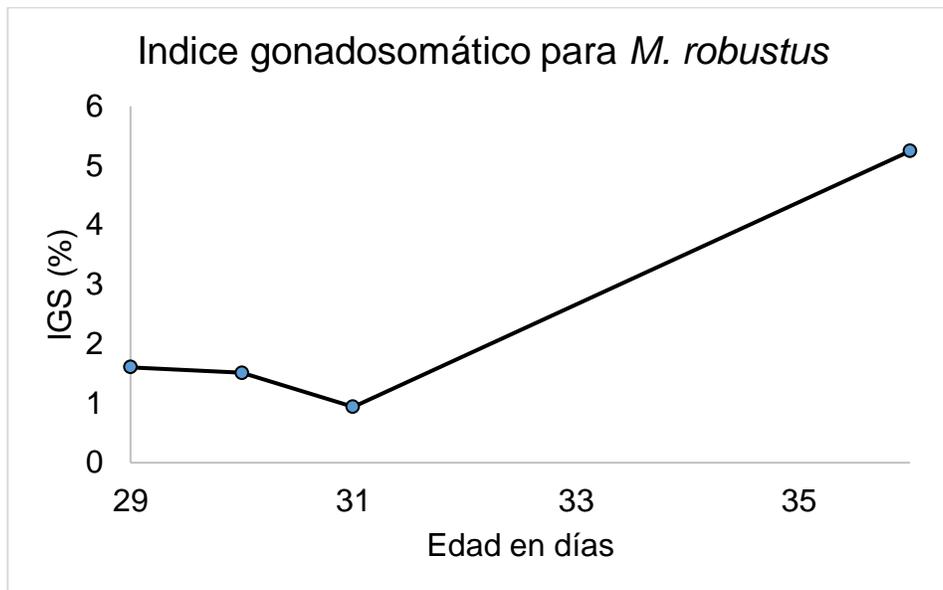


Figura 5 Variación del índice gonadosomático en hembras de *M. robustus*.

9.3. Tiempo de asociación

Se utilizaron tres cohortes de machos ($n = 20$, longitud estándar = 40.3 ± 3.7 mm) y hembras ($n = 20$, longitud estándar = 37.3 ± 2.9 mm) de *M. robustus* maduros sexualmente (>35 días de edad), obtenidos en el laboratorio. Condición que fue confirmada por la presencia de ovocitos en el fondo de los contenedores, producto del cortejo visual.

Para asegurar que el organismo en evaluación recibiera señales químicas en ambas zonas de preferencia y elegir entre las dos opciones, solo los datos de aquellos que visitaron ambos lados de la pecera durante los primeros 10 minutos fueron utilizados para el análisis estadístico (18 de 26 pruebas).

Los machos de *M. robustus* presentaron tiempo de asociación significativa al agua acondicionada de hembra cuando se comparó con el agua acondicionada de macho ($t = 3.084$, $p = 0.013$, Figura 6a); y de la misma manera cuando se comparó con el blanco, la preferencia fue por la hembra ($t = 5.121$, $p = 0.018$, Figura 6b).

Por otra parte, las hembras no presentaron tiempo de asociación preferentes significativamente al agua acondicionada de macho o hembra ($t = -0.231$, $p = 0.413$, Figura 6c). Estos resultados sugieren que, no obstante las hembras visitaron ambos sitios de preferencia, las señales que pudieran producir los machos no les son atractivas; sin embargo, los machos fueron atraídos a las señales emitidas por las hembras durante el cortejo.

Para validar que las señales químicas que estimularon a los machos estuvieran relacionadas con la madurez sexual, se obtuvo agua acondicionada de organismos inmaduros sexualmente y fue utilizada para realizar pruebas de preferencia con machos maduros (organismos en prueba) debido a que fueron los únicos en mostrar atracción por el agua acondicionada del sexo contrario. Como resultado se obtuvo que los machos maduros no mostraron preferencia por ningún sexo ($t = -0.479$, $p = 0.256$, Figura 6d).

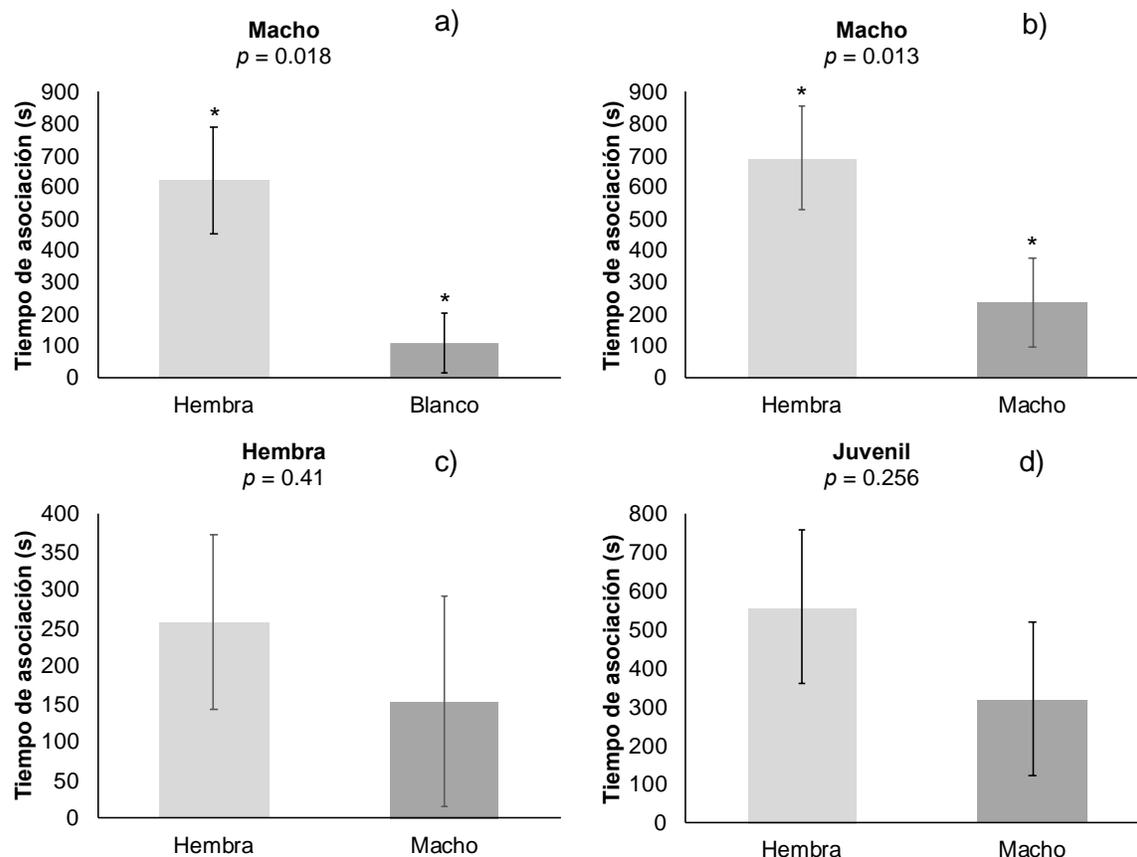


Figura 6. Tiempo de asociación de *M. robustus* (promedio [$n = 6$] \pm desviación estándar). Condición de macho; **a)** hembra vs blanco, **b)** hembra vs macho. Condición de hembra; **c)** hembra vs macho. Condición de juvenil; **d)** hembra vs macho.

9.4. Análisis de feromonas

Debido a que no se observó ninguna absorbancia en el método de Lowry, se validó que el agua acondicionada de cada organismo no contiene proteínas, lo cual es un primer referente para descartar que las feromonas, presentes durante la conducta reproductora, son de esta naturaleza.

El resultado anterior dio lugar a un análisis de espectroscopia de infrarrojo en el que no se observaron diferencias significativas entre los espectros del agua acondicionada de las hembras y el blanco. La banda ancha que se observa a 3500 cm^{-1} corresponde a una banda típica de muestras con humedad o grupos hidroxilo, las bandas alrededor de 1900 cm^{-1} , corresponden a los carotenoides, fosfatos y

metilenos (1500 y 1600 cm^{-1} respectivamente) se encuentran regularmente en el agua no potabilizada (Figura 7).

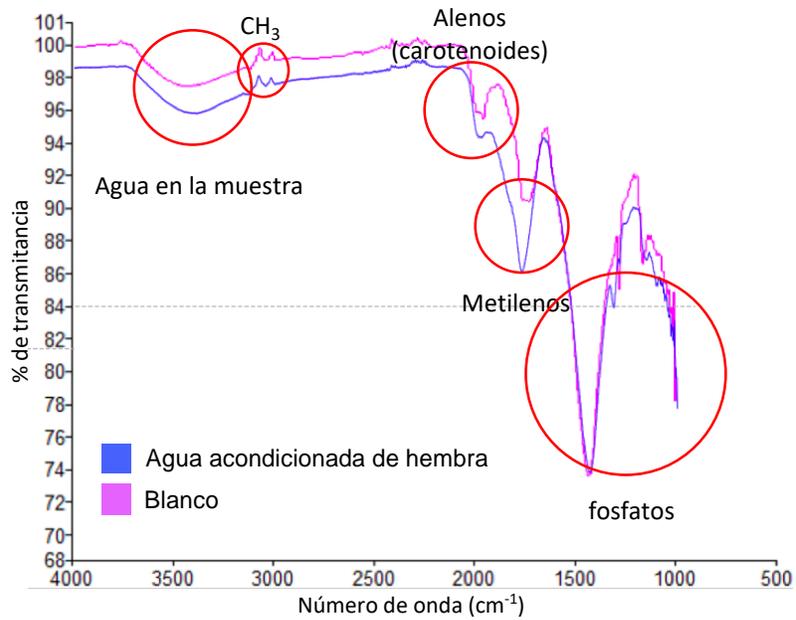


Figura 7. Espectro infrarrojo del agua acondicionada de hembra y blanco.

9.4.1. Análisis elemental (EDS)

Se realizaron un total de 28 observaciones elementales en dos zonas de la muestra de agua acondicionada de hembra, macho y blanco. Debido a la gran cantidad de micrografías (168), en la Figura 8 solo se muestran ejemplos de estas (izq.) y sus espectros (der.).

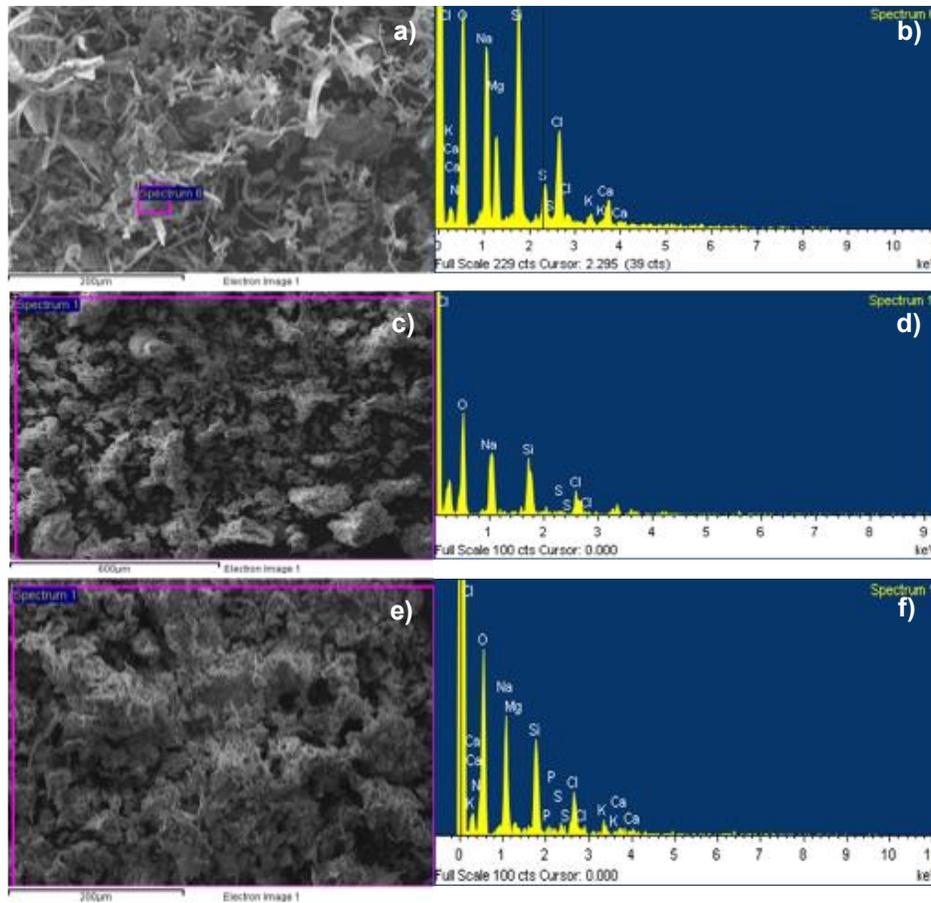


Figura 8. Micrografías al microscopio electrónico de barrido y análisis elemental EDS. Agua acondicionada de hembra (a - b), de macho (c - d) y del blanco (e - f).

De los ocho elementos evaluados, el azufre ($t = 5.121$ $p = 0.010$) fue el único con valores significativamente diferentes. Se encontró una mayor proporción de azufre en el agua acondicionada de hembra (Tabla 1), mientras que el agua acondicionada de macho y el blanco, no mostraron diferencias significativas cuando fueron comparadas entre sí (Tabla 2); además, el azufre se identificó en tres observaciones puntuales de la muestra del blanco mientras que la del agua acondicionada de hembra se identificó en doce. Lo anterior demuestra una mayor distribución de este elemento en las muestras.

Tabla 1. Análisis elemental del agua liofilizada del blanco y del agua acondicionada de hembra.

Elemento	Blanco (% de peso)	Agua acondicionada de hembra (% de peso)	<i>P</i>
N	0.000	0.622	0.188
O	57.424	55.295	0.071
Na	19.516	19.045	0.337
P	0.000	0.168	0.081
S	0.213	0.926	0.010
Cl	16.796	17.303	0.108
K	3.780	2.871	0.087
Ca	2.271	3.770	0.073
Total	100	100	

Tabla 2. Análisis elemental del agua liofilizada del blanco y del agua acondicionada de macho.

Elemento	Blanco (% de peso)	Agua acondicionada de macho (% de peso)	<i>P</i>
N	0.000	0.422	0.198
O	51.802	52.567	0.592
Na	23.516	22.446	0.426
P	0.000	0.062	0.188
S	0.213	0	0.128
Cl	16.796	16.577	0.762
K	3.780	4.031	0.387
Ca	3.893	3.895	0.173
Total	100	100	

10. Discusión

Los resultados obtenidos en los experimentos conductuales demuestran que existe una comunicación química durante el cortejo de *M. robustus*, las hembras se tornan activas no solo conductualmente como ha sido descrito (Valdesalici et al., 2016), sino también en la producción de señales químicas sexuales que estimulan una respuesta conductual en los machos.

Durante el desarrollo ontogénico de los peces anuales han sido identificadas diferentes señales de comunicación que permiten la sobrevivencia de sus poblaciones. En las especies del género *Nothobranchius* después de la fertilización, durante la dispersión de los blastómeros, el huevo recibe señales químicas de los padres para postergar su reagregación, es decir, se presenta la diapausa I. En este sentido, se ha observado que cuando los embriones de *N. guentheri*, son incubados en presencia de peces adultos sin aireación, casi el 100% de los embriones detienen el desarrollo en la diapausa I a pesar de las condiciones propicias para continuar con el desarrollo embrionario (Inglima et al., 1981; Podrabsky & Hand, 1999). Resultados similares han sido documentados para embriones de *N. korthausae*, donde se determinó que la sustancia responsable de la detención del desarrollo embrionario es una sustancia hidrófila aún no caracterizada (Podrabsky et al., 2010).

Por otra parte, se ha relacionado la edad de las madres de *Austrofundulus limnaeus* con la decisión de que sus embriones entren o escapen de la diapausa II, esto se debe a las disminuciones en los niveles maternos de estradiol asociados con la edad que a su vez provocan la disminución en la producción de embriones que no detienen su desarrollo en la diapausa II, es decir, embriones de escape (Pri-Tal et al., 2011).

10.1. Comunicación química vs comunicación visual

Aunque los organismos de *M. robustus* mostraron cortejo cuando solamente se les permitió comunicación visual (durante la obtención de los estímulos químicos para

las pruebas de preferencia) la importancia de las señales químicas durante la conducta reproductora fue validada a través de los tiempos de asociación; es decir, no obstante, la importancia de la comunicación visual durante el cortejo, existen otras alternativas de percepción, en especial por comunicación química en esta especie. En este contexto, se han reportado diferencias sustanciales en el índice de proliferación celular en el cerebro de los organismos pertenecientes a las especies del género *Austrolebias*. Mientras que *A. affinis* mostró niveles más altos de proliferación en áreas asociadas con la visión, *A. reicherti* y *A. charrua* lo hizo en el bulbo olfativo, lo que sugiere que el olfato es un canal sensorial importante para estas dos especies (Fernández et al., 2011). Estas diferencias intragenéricas podrían demostrar, que no todos los peces anuales se comunican principalmente por feromonas y que la selección natural también favorece las modalidades sensoriales que se adaptan mejor a las condiciones ambientales, que enfrenta cada una de estas especies.

Entre otras características relevantes, los hábitats típicos de *M. robustus* presentan, vegetación emergente abundante y una alta turbidez, ambas características permiten inferir que la comunicación visual resulte poco exitosa durante la conducta reproductora; una especialización en la comunicación ha sido documentada en algunas especies del género *Cynolebias*, que utilizan señales acústicas durante la conducta reproductora (Belote & Costa, 2003; Costa et al., 2010). Los argumentos descritos y la poca expresión de caracteres sexuales secundarios atípicamente de los demás peces anuales, hace evidente que la evolución ha conducido a *M. robustus* a invertir más energía en la comunicación química que en ornamentaciones morfológicas ostentosas incluyendo la producción y el mantenimiento de colores llamativos.

Una característica bien conocida de los peces anuales es el sorprendente dimorfismo sexual, en el que los machos exhiben patrones de coloración más brillantes. De acuerdo con Passos et al. (2016), el contraste intensificado de las marcas corporales (forma y color) durante el cortejo, sugiere que las señales

visuales juegan un papel importante durante las interacciones reproductivas en los peces anuales.

10.2. Tiempo de asociación

Las pruebas de preferencia representan experimentos donde, el tiempo que los peces permanecen próximos a una fuente de feromonas, es comúnmente usado como una medida para evaluar la respuesta a estas (Fisher et al., 2006; McLennan & Ryan, 1997, 1999; Rafferty & Boughman, 2006; Wong et al., 2005).

Los resultados de esta investigación demostraron que los machos de *M. robustus* exhiben una respuesta específica a las señales químicas producidas por las hembras conespecíficas. Resultados semejantes han sido documentados para *Austrolebioas reicherti*, pero a diferencia, en esta especie la hembra reconoce la producción de señales químicas por parte de los machos (Passos et al., 2013). Las diferencias en los resultados de esta investigación, indican que *M. robustus* actualmente es la única especie anual donde las hembras se tornan activas durante el cortejo, no solamente conductualmente (Valdesalici et al., 2016), sino también en la producción de señales químicas. Es probable que la producción de señales químicas por parte de las hembras de *M. robustus* también sea una característica apomórfica dentro de los peces anuales. La producción de señales químicas por parte de las hembras ha sido ampliamente reconocida en especies de peces no anuales. Por ejemplo, el macho del espinoso (*Culaea inconstans*) es capaz de reconocer y discriminar entre machos y hembras conespecíficas en ovulación, así como entre el olor de los ovulados de hembras conespecíficas y hembras heteroespecíficas (*Gasterosteus aculeatus*) (McLennan, 2004); los machos de *Pimephales promelas* (Cole & Smith, 1987) y *Puntius gonionotus* (Liley & Tan, 1985) comienzan el cortejo en el sitio de liberación de olores a pesar de la ausencia de señales visuales. Otros ejemplos pueden ser observados en la acerina, *Gymnocephalus cernuus* (Sorensen et al., 2004); el carpín, *C. carassius* (Olsén et al., 2006); los guppys, *P. reticulata* (Crow & Liley, 1979); entre otras especies.

10.3. *Análisis de feromonas*

Los eventos reproductivos clave en la vida de los peces (maduración de los gametos, ovulación, espermiación y desove) están correlacionados con los cambios en los niveles sanguíneos de dos clases de hormonas reproductivas que son detectadas por los sistemas olfativos de muchos peces: las prostaglandinas de la serie F (PGF) y esteroides gonadales (sexuales) (Stacey, 2015). Los cambios en las concentraciones plasmáticas de esteroides están estrechamente relacionados con los cambios en la liberación de esteroides al agua; de hecho, la medición de esteroides en el agua de mantenimiento se ha utilizado como una técnica no invasiva para monitorear los procesos fisiológicos en los peces (Scott & Ellis, 2007).

10.3.1. *Espectroscopía de infrarrojo*

Se han propuesto diferentes estructuras químicas para las feromonas sexuales en peces, en especial para las hormonales. Por ejemplo, los peces dorados (*C. auratus*) machos liberan el andrógeno androstenediona y varios otros esteroides C19 por los cuales las hembras reconocen a los machos. En este sentido, también se sabe que el sistema olfativo masculino es extremadamente sensible a la androstendiona y lo detecta a concentraciones muy bajas, cercanas a picomolares. (Sorensen et al., 2005). El más conocido de estos es el $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona ($17,20\beta$ P) que se libera junto con otros conjugados por carpas ovulantes en concentraciones picomolares (Dulka et al., 1987).

Debido a las bajas concentraciones de feromonas con las que los peces son capaces de comunicarse y al traslape de las bandas más intensas de los compuestos químicos típicos del agua potable, es probable que las muestras de agua acondicionada de *M. robustus* a través de los espectros obtenidos con esta técnica no hayan mostrado diferencias significativas.

10.3.2. *Análisis elemental (EDS)*

Aunque no fue la finalidad de esta investigación, el realizar un análisis morfológico de las micrografías obtenidas a través de la microscopía electrónica de barrido, es

posible diferenciar dos texturas entre los liofilizados del agua acondicionada de hembra, de macho y el blanco. El liofilizado del agua de las hembras presenta estructuras con lados bien definidos (similares a una fibra), diferentes a las del agua acondicionada de macho y el blanco; en las que únicamente se aprecian estructuras amorfas con caras redondeadas. Resalta que las texturas del agua acondicionada de macho y el blanco, son similares y que no es fácil encontrar diferencias entre ellas. Esta diferencia en la morfología de las muestras podría ser consecuencia de la cantidad diferencial de azufre, único elemento con concentraciones diferentes en el análisis EDS.

Es importante mencionar que algunas feromonas descritas para otras especies de peces tienen en común la presencia de azufre en sus estructuras. Muchos de estos compuestos están conjugadas con azúcares o sulfatos, que aumentan su solubilidad (Sorensen, 2014). Aunque en los peces anuales se ha demostrado que existe una comunicación visual, acústica y química (incluso no se puede descartar la comunicación por contacto) durante el apareamiento (Belote & Costa, 2002, 2003; Passos et al., 2013; Reyes et al., 2017; Valdesalici et al., 2016), a la fecha no se conoce algún compuesto químico que conduzca hacia un exitoso reconocimiento de la pareja; sin embargo, las formas libres sulfatadas de $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona, el sulfato de $17,20\beta$ P ($17,20\beta$ P-S) y androstenediona fueron los esteroides feromonales más importantes liberados por la hembra del pez no anual *C. auratus* (Scott & Sorensen, 1994). En este sentido, las vías de sulfatación (adición de grupos sulfato) y desulfuración de esteroides representan rutas fundamentales que regulan el transporte y la acción circulatoria de esteroides. La sulfatación es uno de los mecanismos que regulan la actividad de enzimas y hormonas relacionadas a la conducta sexual (Foster & Mueller, 2018; Hirai & Saito, 2008). De acuerdo a lo anterior es posible inferir que la cantidad diferencial de azufre a favor del agua acondicionada de hembras se deba a que la feromona utilizada por *M. robustus* para la comunicación durante el cortejo, sea un esteroide sexual femenino similar a la $17,20\beta$ P o su metabolito $17,20\beta,21$ -P.

10.4. Implicaciones ecológicas de la comunicación química en *Millerichthys robustus*

Dentro de las principales actividades de las feromonas no sexuales se encuentran aquellas encargadas de facilitar la orientación migratoria y son usadas por adultos o juveniles que buscan hábitats poblados por conoespecíficos; por ejemplo, las anguilas de agua dulce (*Anguilla anguilla*), los salmones (*Salvelinus alpinus*), los puyes (*Galaxias maculatus*) y las lampreas (*Petromyzontidae* marinus), se guían por olores corporales específicos entre otros mecanismos (Baker & Montgomery, 2001). Los complejos sistemas sociales utilizados por algunos peces han favorecido la evolución de los mecanismos quimiosensoriales para determinar la relación de los conoespecíficos (Olsén et al., 1998). Las funciones de estos olores "familiares" incluyen el reconocimiento de la edad en los otros organismos (Ward & Hart, 2003). Los estudios en salmónidos sugieren que se liberan olores de parentesco en la orina (Olsén et al., 2002).

La mayoría de investigaciones sobre feromonas en la búsqueda y migración han sido realizadas en salmónidos anádromos, peces que desovan en agua dulce, migran al mar y regresan a su corriente natal para desovar cuando son adultos. Se han propuesto dos hipótesis para explicar la selección del hábitat por olores en salmónidos. La primera postuló que los salmónidos jóvenes se acondicionan al conjunto de olores orgánicos característicos de su corriente nativa, que reconocen y orientan durante el reingreso al agua dulce y la migración aguas arriba (Hasler & Wisby, 1951). La segunda hipótesis propuso que los peces migrantes regresan al sitio de su nacimiento al detectar feromonas específicas secretadas por los parientes más jóvenes que residen en el río (Nordeng, 1971, 1977),

A diferencia de las señales visuales y acústicas, las señales químicas pueden persistir por un tiempo y pueden ser identificadas por otros organismos incluso si el emisor de la señal ya no está en el área (Ward & Webster, 2016).

Otra evidencia que apoya esta hipótesis se refiere al hábitat único de los peces anuales (es decir, fragmentado, discreto y estacional) que tiene una fuerte influencia

en cómo se generan los patrones de distribución y diversidad (Kiflawi et al., 2003). De esta manera, las especies de peces sudamericanas han estado involucradas en procesos acelerados de especiación, dadas las barreras geográficas que hacen menos probable el flujo génico. Por ejemplo, en el género *Austrolebias* relativamente rico en especies, de la familia Rivulidae, con ca. 42 especies actualmente reconocidas, y distribuidas en las cuencas La Plata-Paraná y Patos-Merín (Calviño, 2005; García et al., 2008); se ha documentado que hasta siete especies del género cohabitan en la misma área en el centro de Uruguay (Costa, 1998). Diferente a lo que sucede en Norteamérica, donde la única especie anual reconocida es *M. robustus*. Es probable que las barreras físicas no sean suficientemente robustas para conducir a la especiación de este género y que los procesos de selección de un hábitat son recurrentes.

En sentido de lo anterior, en colectas previas a esta investigación, se han reconocido una serie de fenómenos interesantes; durante el período de inundación, los diferentes hábitats quedan unidos por una gran masa de agua pluvial, cuando las lluvias cesan, los diferentes cuerpos de agua quedan aislados entre sí. A pesar de los esfuerzos de muestreo en los cuerpos de agua inmediatos a sus hábitats, hasta el momento, no ha sido posible encontrar ejemplares de *M. robustus*. Expresado de otra manera, la colonización de los hábitats posterior al período de inundación pareciera estar orientada por feromonas de organismos conespecíficos de hidroperíodos anteriores. Por ejemplo, los hábitats 4, 5 y 9 de Playa Salinas (Figura 9) transitaron por extinciones locales representadas en los años 2015 y 2016; para el 2017, la población retornó con una cantidad considerable de organismos, lo que fortalece la idea de la actividad feromonal durante la selección del hábitat cuando la región inundada comienza a fragmentarse (Tabla 3).

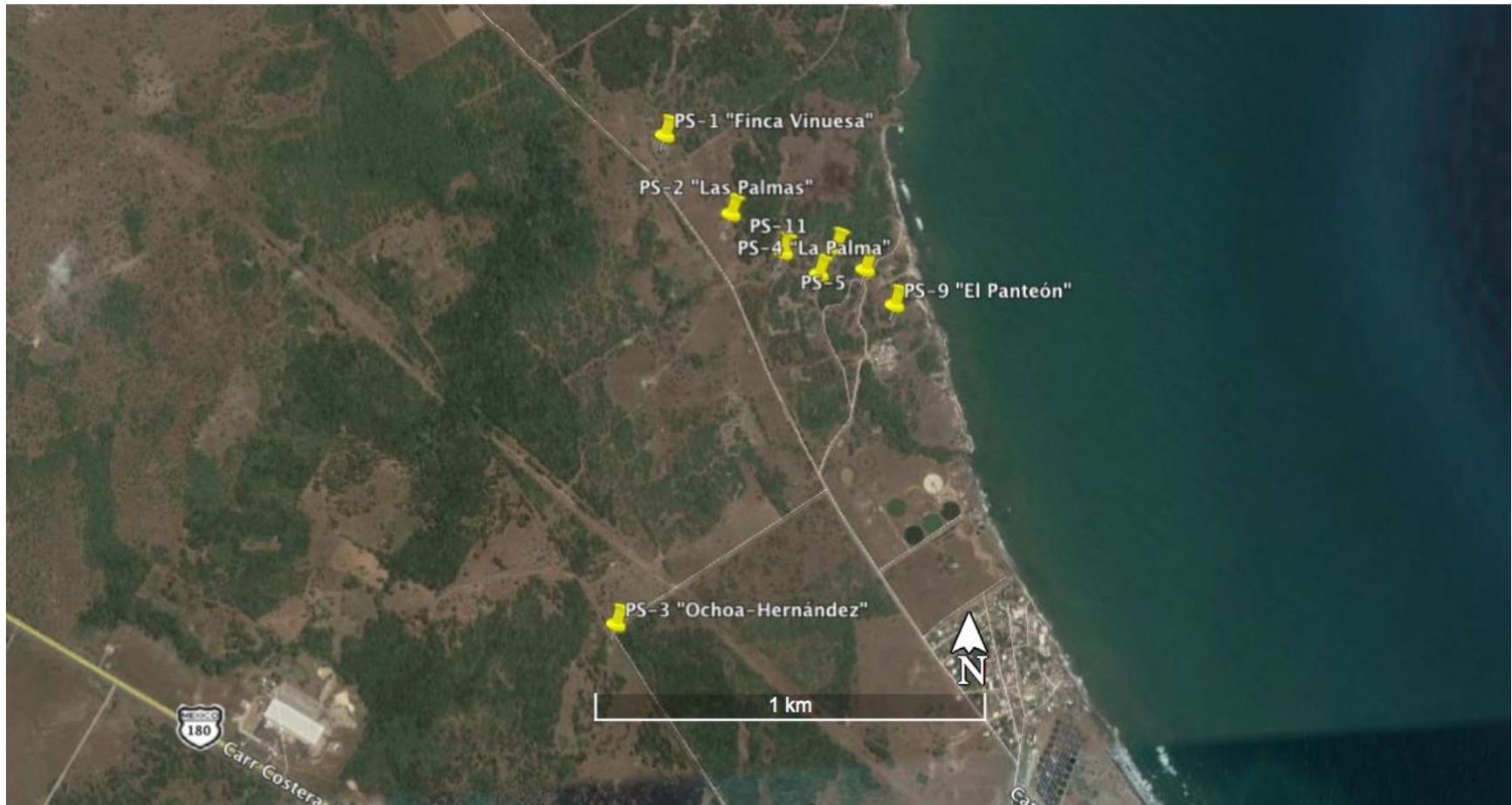


Figura 9 Ubicación de hábitats en Playa Salinas, Veracruz.

Tabla 3 Poblaciones de *Millerichthys robustus* en Playa Salinas, Veracruz. N = abundancia, M = macho, H = hembra.

Hábitat	Área m ²	Profundidad m	Datos de la población N (M:H)					
			Octubre 2014	Octubre 2015	Octubre 2016	Octubre 2017	Octubre 2018	Octubre 2019
1	2,500	0.36	73 (6:67)	22 (11:11)	73 (26:47)	56 (25:31)	18 (12:6)	0
2	180	0.85	5 (1:4)	0	0	4 (1:3)	8 (5:3)	0
3	650	0.20	59 (23:36)	25 (6:19)	17 (6:11)	16 (1:15)	7 (0:7)	0
4	400	0.29	10 (7:3)	0	0	41 (15:26)	31 (12:19)	0
5	160	0.20	56 (25:31)	1 (0:1)	0	36 (22:14)	46 (5:41)	0
6	60	0.10	9 (3:6)	0	0	12 (4:8)	10 (2:8)	0
7	10	0.10	2 (0:2)	0	0	14 (1:13)	16 (2:14)	0
8	50	0.35	3 (3:0)	0	0	15 (3:12)	6 (6:0)	0
9	169	0.30	79 (23:56)	0	0	56 (19:37)	21 (5:16)	0
10	148	0.10	10 (5:5)	0	0	11 (5:6)	5 (2:3)	0
11	270	0.27	12 (7:5)	0	0	10 (6:4)	15 (5:10)	0

11. Conclusiones

Los hallazgos presentados en este documento son los primeros en proporcionar información básica sobre la comunicación química durante el cortejo de *M. robustus*, asimismo, se relacionaron diferentes metodologías de química analítica, etológicas, de microscopía, entre otras, para conocer la participación de la comunicación química en el apareo de *M. robustus*. En este sentido, se reconoció que existe una participación importante de feromonas sexuales durante el cortejo y que es mediada por las hembras de esta especie, que potencialmente podría convertirse en un organismo modelo en investigación científica.

Por la cantidad diferencial de azufre contenida en el agua acondicionada de las hembras de *M. robustus*, probablemente la molécula encargada de esta comunicación sea un esteroide sexual como el 3-ceto-petromyzonol sulfato (3-k-PS), feromona sexual en lampreas de mar (*Petromyzon marinus*).

Aunque la producción de feromonas sexuales por parte de las hembras ha sido documentada en especies de peces, dentro del grupo de los anuales, este trabajo representa el primer reporte.

Por otra parte, a lo largo del ciclo de vida de los peces anuales, han sido documentadas distintas rutas de comunicación química, incluidos los cuidados parentales, selección de pareja en presencia de otras especies, entre otras. El presente trabajo, ayuda a comprender el alto grado de especificidad en las señales químicas para producir conductas estereotipadas, en etapas de la vida específicas.

Además, la comunicación por feromonas podría representar una estrategia de sobrevivencia para las poblaciones de *M. robustus*, permitiendo que la colonización de sus hábitats (después de eventos de extinción debido a la variabilidad del ambiente) sea exitosa.

Se identificó que la comunicación visual *per se* es capaz de estimular una respuesta en la conducta sexual de *M. robustus*; sin embargo, la preferencia de los machos hacia el agua acondicionada de las hembras durante las pruebas de predefrencia y la alta turbidez que regularmente presentan sus hábitats, permiten inferir que, de manera natural, las parejas de *M. robustus* se comunican principalmente por señales químicas durante el cortejo. Una forma de confirmar lo anterior, podría ser comparando el índice de proliferación celular en áreas del cerebro asociadas con la visión y el olfato, como ha sido documentado para otras especies de peces anuales.

Para reconocer a los esteroides sexuales femeninos como feromonas durante el cortejo de *M. robustus*, se podrán utilizar técnicas de biología molecular para evaluar la expresión de genes relacionados a la producción de esteroides sexuales y posteriormente medir la cantidad de estos esteroides en el agua de mantenimiento como se ha realizado en otras especies de peces no anuales.

En este sentido, se conservaron las gónadas y los cerebros de algunos peces que fueron utilizados en las pruebas de preferencia en etanol 96%. Para asegurarse de que la cantidad de tejido fuera suficiente para la obtención de *cDNA*; se realizó la extracción de *RNA* y la síntesis de *cDNA* de las gónadas y cerebro de peces juveniles y maduros (n = 8) del sexo que estimuló una respuesta conductual significativa en las pruebas de preferencia.

El ácido ribonucleico (*RNA*) total fue aislado de tejido cerebral y gonadal utilizando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El *RNA* total (1 µg) se transcribió de forma inversa a ácido desoxirribonucleico complementario (*cDNA*) y se amplificó por PCR utilizando oligo (dT) 20 (Invitrogen) con el kit de Sistema de Transcripción Inversa de Promega. El ARN y *cDNA* fueron cuantificados mediante espectrofotometría de luz ultravioleta y se conservó a -80°C (Tabla 4).

Tabla 4. Cuantificación de material genético *RNA* y *cDNA* de gónadas y cerebro de *M. robustus*.

Sexo	Estado de desarrollo	Edad en días	Peso (g)	Longitud estándar (mm)	Peso de las gónadas (g)	Índice gonadosomático	ARN cerebro (ng/μL)	ARN gónadas (ng/μL)	ADNc cerebro (ng/μL)	ADNc gónadas (ng/μL)
		29	0.485	28	0.0078	1.61	221.0	665.7	1163.3	1127.0
Macho		30	0.463	27.5	0.0072	1.56	470.2	406.8	1129.4	1143.3
	Juvenil	31	0.442	28	0.0017	0.38	132.3	168.3	1164.1	238.7
		30	0.37	24	0.0054	1.46	255.2	256.7	1181.2	1176.1
		31	0.314	25	0.0047	1.50	88.3	220.5	*	418.2
Hembra		36	0.296	25	0.003	1.15	80.9	377.6	*	919.9
	Maduro	36	0.459	29	0.021	4.58	188.3	983.0	1092.8	1120.4
		36	0.626	33	0.037	5.91	407.5	1011.0	1047.3	1148.1

*La ausencia en los valores se debe a la baja concentración ARN para su síntesis.

Finalmente, se sugiere realizar un análisis de PCR para evaluar la expresión de algunos genes que han sido relacionados con la conducta sexual en otras especies de peces (Tabla 5) a partir del cDNA.

Tabla 5 . Genes propuestos para su evaluación.

Gen	Secuencia del cebador (5'-3')	Tamaño (pares de bases)	R ²	Función
<i>dax1</i>	F:CCCTGATCATCCAGGCATAG	175	0.998	Factor regulatorio
	R: TTCTTCTGTGATGGCTGCAC			
<i>ar</i>	F: AAGCCAATCCTGTTTCACAA	121	0.999	Receptor de andrógeno
	R: CACTGCCTGTTGACTAAATG			
<i>cyp19a1</i>	F: GATAGCAGCACCTGACACCA	95	0.999	E2 sintetasa
	R: TTTCTCCAGCAGTTTCCTC			

El gen *dax1* se evaluará debido a que codifica una proteína que actúa en la transcripción de receptores nucleares, incluido el factor esteroideogénico. Esta proteína también funciona como un gen anti-testículo al actuar de forma antagónica al SRY (McCabe, 2007).

En este sentido, el receptor de andrógenos (*ar*) funciona como un factor de transcripción de unión al ADN que regula la expresión génica. Los genes regulados por andrógenos son críticos para el desarrollo y mantenimiento del fenotipo sexual masculino (Heinlein & Chang, 2002).

Por último, el gen CYP19A1 proporciona instrucciones para hacer una enzima llamada aromatasa. Esta enzima convierte una clase de hormonas llamadas andrógenos, que están involucradas en el desarrollo sexual masculino, en diferentes formas de estrógeno, la hormona sexual femenina.

12. Bibliografía

Aeschlimann, P. B., Häberli, M. A., Reusch, T. B. H., Boehm, T., & Milinski, M. (2003). Female sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* use self-reference to

- optimize MHC allele number during mate selection. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 54(2), 119-126. <https://doi.org/10.1007/s00265-003-0611-6>
- Baker, C. F., & Montgomery, J. C. (2001). Species-specific attraction of migratory banded kokopu juveniles to adult pheromones. *Journal of Fish Biology*, 58(5), 1221-1229. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb02281.x>
- Belote, D. F., & Costa, W. J. E. M. (2002). Reproductive behavior patterns in the Neotropical annual fish genus *Simpsonichthys* Carvalho, 1959 (Cyprinodontiformes, Rivulidae): Description and phylogenetic implications. *Boletim do Museu Nacional. Nova serie zoologia*, 489, 1-10.
- Belote, D. F., & Costa, W. J. E. M. (2003). Reproductive behavior of the brazilian annual fish *Cynolebias albipunctatus* Costa & Brash, 1991 (Teleostei, Cyprinodontiformes, Rivulidae): A new report of sound production in fishes. *Arquivos Do Museu Nacional*, 61(4), 241-244. <https://biblat.unam.mx/fr/revista/arquivos-do-museu-nacional-rio-de-janeiro/articulo/reproductive-behavior-of-the-brazilian-annual-fish-cynolebias-albipunctatus-costa-brash-1991-teleostei-cyprinodontiformes-rivulidae-a-new-report-of-sound-production-in-fishes>
- Belote, D. F., & Costa, W. J. E. M. (2004). Reproductive behavior patterns in three species of the South American annual fish genus *Austrolebias* Costa, 1998 (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Boletim do Museu Nacional, Nova Série*, 514, 1-7.
- Bernstein, I. S. (1976). Dominance, aggression and reproduction in primate societies. *Journal of Theoretical Biology*, 60(2), 459-472. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(76\)90072-2](https://doi.org/10.1016/0022-5193(76)90072-2)
- Berois, N., García, G., & Sá, R. O. de. (2016). *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution*. CRC Press.
- Biran, J., & Levavi-Sivan, B. (2018). Endocrine Control of Reproduction, Fish. En *Encyclopedia of Reproduction* (pp. 362-368). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20579-7>
- Borg, B. (1994). Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 109(3), 219-245. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(94\)00063-G](https://doi.org/10.1016/0742-8413(94)00063-G)
- Calviño, P. A. (2005). *Austrolebias toba* (Cyprinodontiformes: Rivulidae), una especie nueva de pez anual de la Argentina. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 9.
- Cellerino, A., Valenzano, D. R., & Reichard, M. (2016). From the bush to the bench: The annual *Nothobranchius* fishes as a new model system in biology: Biology of *Nothobranchius*. *Biological Reviews*, 91(2), 511-533.

<https://doi.org/10.1111/brv.12183>

- Chaves-Pozo, E., García-Ayala, A., & Cabas, I. (2018). Effects of Sex Steroids on Fish Leukocytes. *Biology*, 7(1), 1-21. <https://doi.org/10.3390/biology7010009>
- Cheng, J., Sun, Y., & Ji, L. (2010). A call-independent and automatic acoustic system for the individual recognition of animals: A novel model using four passerines. *Pattern Recognition*, 43(11), 3846-3852. <https://doi.org/10.1016/j.patcog.2010.04.026>
- Cole, K. S., & Smith, R. J. (1987). Release of chemicals by prostaglandin-treated female fathead minnows, *Pimephales promelas*, that stimulate male courtship. *Hormones and Behavior*, 21(4), 440-456.
- Collinson, N. H., Biggs, J., Corfield, A., Hodson, M. J., Walker, D., Whitfield, M., & Williams, P. J. (1995). Temporary and permanent ponds: An assessment of the effects of drying out on the conservation value of aquatic macroinvertebrate communities. *Biological Conservation*, 74(2), 125-133. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(95\)00021-U](https://doi.org/10.1016/0006-3207(95)00021-U)
- Colombo, L., Marconato, A., Belvedere, P. C., & Friso, C. (1980). Endocrinology of teleost reproduction: A testicular steroid pheromone in the black goby, *Gobius joso* L. *Bolletino Di Zoologia*, 47(3-4), 355-364. <https://doi.org/10.1080/11250008009438692>
- Costa, W. J. E. M. (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), 33-92.
- 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. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252010000200006>
- Cote, I. M., & Poulin, R. (1995). Parasitism and group size in social animals: A meta-analysis. *Behavioral Ecology*, 6(2), 159-165. <https://doi.org/10.1093/beheco/6.2.159>
- Crow, R. T., & Liley, N. R. (1979). A sexual pheromone in the guppy, *Poecilia reticulata* (Peters). *Canadian Journal of Zoology*, 57(1), 184-188. <https://doi.org/10.1139/z79-016>
- Diotel, N., Page, Y. L., Mouriec, K., Tong, S.-K., Pellegrini, E., Vaillant, C., Anglade, I., Brion, F., Pakdel, F., Chung, B., & Kah, O. (2010). Aromatase in the brain of teleost fish: Expression, regulation and putative functions. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31(2), 172-192.

<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.01.003>

- Domínguez-Castanedo, O., Mosqueda-Cabrera, M. Á., & Valdesalici, S. (2013). First observations of annualism in *Millerichthys robustus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 24(1), 15-20.
- Dulka, J. G., Stacey, N. E., Sorensen, P. W., & Kraak, G. J. V. D. (1987). A steroid sex pheromone synchronizes male–female spawning readiness in goldfish. *Nature*, 325(6101), 251-253. <https://doi.org/10.1038/325251a0>
- Errea, A., & Danulat, E. (2001). Growth of the Annual Fish, *Cynolebias Viarius* (Cyprinodontiformes), in the Natural Habitat Compared to Laboratory Conditions. *Environmental Biology of Fishes*, 61(3), 261-268. <https://doi.org/10.1023/A:1011047611009>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.05.063>
- Ferrer, J., Wingert, J. M., & Malabarba, L. R. (2014). Description of a new species and phylogenetic analysis of the subtribe Cynopoecilina, including continuous characters without discretization (Cyprinodontiformes: Rivulidae): Phylogenetic Analysis of Cynopoecilina. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 172(4), 846-866. <https://doi.org/10.1111/zoj.12190>
- 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 of London B: Biological Sciences*, 273(1591), 1187-1193. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3406>
- FitzGerald, G. J., & Morrissette, J. (1992). Kin recognition and choice of shoal mates by threespine sticklebacks. *Ethology Ecology & Evolution*, 4(3), 273-283. <https://doi.org/10.1080/08927014.1992.9523138>
- Foster, P. A., & Mueller, J. W. (2018). Insights into steroid sulfation and desulfation pathways. *Journal of Molecular Endocrinology*, 61(2), T271-T283. <https://doi.org/10.1530/JME-18-0086>
- Foster, W. A., & Treherne, J. E. (1981). Evidence for the dilution effect in the selfish herd from fish predation on a marine insect. *Nature*, 293(5832), 466-467. <https://doi.org/10.1038/293466a0>
- Furness, A. I. (2015). The evolution of an annual life cycle in killifish: Adaptation to ephemeral aquatic environments through embryonic diapause: The evolution of an annual life cycle in killifish. *Biological Reviews*, 91(3), 796-812. <https://doi.org/10.1111/brv.12194>
- García, D., Loureiro, M., & Tassino, B. (2008). Reproductive behavior in the annual

- fish *Austrolebias reicherti* Loureiro & Garcia 2004 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Neotropical Ichthyology*, 6(2), 243-248. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252008000200012>
- Gereta, E., Ole Meing'ataki, G. E., Mduma, S., & Wolanski, E. (2004). The role of wetlands in wildlife migration in the Tarangire ecosystem, Tanzania. *Wetlands Ecology and Management*, 12(4), 285-299. <https://doi.org/10.1007/s11273-005-3499-2>
- Gonçalves, D. M., & Oliveira, R. F. (2011). Hormones and Sexual Behavior of Teleost Fishes. En *Hormones and Reproduction of Vertebrates* (pp. 119-147). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375009-9.10007-4>
- Guttridge, T. L., Gruber, S. H., Gledhill, K. S., Croft, D. P., Sims, D. W., & Krause, J. (2009). Social preferences of juvenile lemon sharks, *Negaprion brevirostris*. *Animal Behaviour*, 78(2), 543-548. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2009.06.009>
- Häberli, M. A., & Aeschlimann, P. B. (2004). Male traits influence odour-based mate choice in the three-spined stickleback. *Journal of Fish Biology*, 64(3), 702-710. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2004.00338.x>
- Hallgren, S. L. E., Linderöth, M., & Olsén, K. H. (2006). Inhibition of cytochrome p450 brain aromatase reduces two male specific sexual behaviours in the male Endler guppy (*Poecilia reticulata*). *General and Comparative Endocrinology*, 147(3), 323-328. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.02.005>
- Hansen, A., & Finger, T. E. (2000). Phyletic Distribution of Crypt-Type Olfactory Receptor Neurons in Fishes. *Brain, Behavior and Evolution*, 55(2), 100-110. <https://doi.org/10.1159/000006645>
- Hansen, C. A., & Sidell, B. D. (1983). Atlantic hagfish cardiac muscle: Metabolic basis of tolerance to anoxia. *The American Journal of Physiology*, 244(3), 356-362. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1983.244.3.R356>
- Harel, I., Valenzano, D. R., & Brunet, A. (2016). Efficient genome engineering approaches for the short-lived African turquoise killifish. *Nature Protocols*, 11(10), 2010-2028. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.103>
- Hasler, A. D., & Wisby, W. J. (1951). Discrimination of Stream Odors by Fishes and Its Relation to Parent Stream Behavior. *The American Naturalist*, 85(823), 223-238. JSTOR. <https://www.jstor.org/stable/2457678>
- Heinlein, C. A., & Chang, C. (2002). The Roles of Androgen Receptors and Androgen-Binding Proteins in Nongenomic Androgen Actions. *Molecular Endocrinology*, 16(10), 2181-2187. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0070>
- Hirai, M. Y., & Saito, K. (2008). Analysis of systemic sulfur metabolism in plants using integrated '-omics' strategies. *Molecular BioSystems*, 4(10), 967.

<https://doi.org/10.1039/b802911n>

Hoare, D. J., Krause, J., Peuhkuri, N., & Godin, J.-G. J. (2000). Body size and shoaling in fish. *Journal of Fish Biology*, 57(6), 1351-1366. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2000.tb02217.x>

Inglima, K., Perlmutter, A., & Markofsky, J. (1981). Reversible stage-specific embryonic inhibition mediated by the presence of adults in the annual fish *Nothobranchius guentheri*. *The Journal of Experimental Zoology*, 215(1), 23-33. <https://doi.org/10.1002/jez.1402150104>

Jarvis, J. (1981). Eusociality in a mammal: Cooperative breeding in naked mole-rat colonies. *Science*, 212(4494), 571-573. <https://doi.org/10.1126/science.7209555>

Karlson, P., & Lüscher, M. (1959). 'Pheromones': A New Term for a Class of Biologically Active Substances. *Nature*, 183(4653), 55-56. <https://doi.org/10.1038/183055a0>

Karsten, K. B., Andriamandimbarisoa, L. N., Fox, S. F., & Raxworthy, C. J. (2008). A unique life history among tetrapods: An annual chameleon living mostly as an egg. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(26), 8980-8984. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802468105>

Kiflawi, M., Eitam, A., & Blaustein, L. (2003). The relative impact of local and regional processes on macro-invertebrate species richness in temporary pools. *Journal of Animal Ecology*, 72(3), 447-452. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.2003.00712.x>

Kobayashi, M., Sorensen, P. W., & Stacey, N. E. (2002). Hormonal and pheromonal control of spawning behavior in the goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26, 71-84. <https://doi.org/10.1023/a:1023375931734>

Komdeur, J. (1992). Importance of habitat saturation and territory quality for evolution of cooperative breeding in the Seychelles warbler. *Nature*, 358(6386), 493-495. <https://doi.org/10.1038/358493a0>

König, B. (1997). Cooperative Care of Young in Mammals. *Naturwissenschaften*, 84(3), 95-104. <https://doi.org/10.1007/s001140050356>

Krause, J., & Godin, J.-G. J. (1996). Influence of Parasitism on Shoal Choice in the Banded Killifish (*Fundulus diaphanus*, Teleostei, Cyprinodontidae). *Ethology*, 102(1), 40-49. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1996.tb01102.x>

Krause, J., & Ruxton, G. D. (2002). *Living in groups*. Oxford University Press.

Lanés, L. E. K., Gonçalves, Â. C., & Volcan, M. V. (2014). Discovery of endangered annual killifish *Austrolebias cheradophilus* (Aplocheiloidei: Rivulidae) in Brazil, with comments on habitat, population structure and conservation

- status. *Neotropical Ichthyology*, 12(1), 117-124.
<https://doi.org/10.1590/S1679-62252014000100012>
- Lanés, L. E. K., Keppeler, F. W., & Maltchik, L. (2014). Abundance variations and life history traits of two sympatric species of Neotropical annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae) in temporary ponds of southern Brazil. *Journal of Natural History*, 48, 1971-1988.
<https://doi.org/10.1080/00222933.2013.862577>
- Lastein, S., Hamdani, E. H., & Døving, K. B. (2014). Olfactory Discrimination of Pheromones. En P. W. Sorensen & B. D. Wisenden (Eds.), *Fish Pheromones and Related Cues* (pp. 159-195). John Wiley & Sons, Inc.
<https://doi.org/10.1002/9781118794739.ch8>
- Laudet, V., & Gronemeyer, H. (2002). *The nuclear receptor: Factsbook*. Academic Press.
- Lesser, M. P., Martini, F. H., & Heiser, J. B. (1997). Ecology of the hagfish, *Myxine glutinosa* L. in the Gulf of Maine I. Metabolic rates and energetics. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 208(1-2), 215-225.
[https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(96\)02665-2](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(96)02665-2)
- Levavi-Sivan, B., Bogerd, J., Mañanós, E. L., Gómez, A., & Lareyre, J. J. (2010). Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 412-437.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.07.019>
- Levels, P. J., Gubbels, R. E. M. B., & Denucé, J. M. (1986). Oxygen consumption during embryonic development of the annual fish *Nothobranchius korthausae* with special reference to diapause. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 84(4), 767-770. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(86\)90403-2](https://doi.org/10.1016/0300-9629(86)90403-2)
- Li, W. (2002). Bile Acid Secreted by Male Sea Lamprey That Acts as a Sex Pheromone. *Science*, 296(5565), 138-141.
<https://doi.org/10.1126/science.1067797>
- Liley, N. R., & Tan, E. S. P. (1985). The induction of spawning behaviour in *Puntius gonionotus* (Bleeker) by treatment with prostaglandin PGF₂α. *Journal of Fish Biology*, 26(5), 491-502. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1985.tb04289.x>
- Lokman, P. M., Harris, B., Kusakabe, M., Kime, D. E., Schulz, R. W., Adachi, S., & Young, G. (2002). 11-Oxygenated androgens in female teleosts: Prevalence, abundance, and life history implications. *General and Comparative Endocrinology*, 129(1), 1-12. [https://doi.org/10.1016/s0016-6480\(02\)00562-2](https://doi.org/10.1016/s0016-6480(02)00562-2)
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological*

Chemistry, 193(1), 265-275.

- Madsen, T., Stille, B., & Shine, R. (1996). Inbreeding depression in an isolated population of adders *Vipera berus*. *Biological Conservation*, 75(2), 113-118. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(95\)00067-4](https://doi.org/10.1016/0006-3207(95)00067-4)
- Maltchik, L. (2003). Three new wetlands inventories in Brazil. *Interciencia*, 28(7). <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=33908209>
- Mateo, J. M. (2004). Recognition systems and biological organization: The perception component of social recognition. *Ann. Zool. Fennici.*, 41, 17.
- Mayer, I., Liley, N. R., & Borg, B. (1994). Stimulation of Spawning Behavior in Castrated Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) by 17 α , 20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one, but Not by 11-Ketoandrostenedione. *Hormones and Behavior*, 28(2), 181-190. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1994.1015>
- McCabe, E. R. B. (2007). DAX1: Increasing complexity in the roles of this novel nuclear receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 265-266, 179-182. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.12.017>
- McLennan, D. A. (2003). The importance of olfactory signals in the gasterosteid mating system: Sticklebacks go multimodal. *Biological Journal of the Linnean Society*, 80(4), 555-572. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2003.00254.x>
- McLennan, D. A. (2004). Male Brook Sticklebacks' (*Culaea Inconstans*) Response to Olfactory Cues. *Behaviour*, 141(11-12), 1411-1424. <https://doi.org/10.1163/1568539042948132>
- McLennan, D. A., & Ryan, M. J. (1997). Responses to conspecific and heterospecific olfactory cues in the swordtail *Xiphophorus cortezi*. *Animal Behaviour*, 54(5), 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. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1999.tb05382.x>
- Mehlis, M., Bakker, T. C. M., & Frommen, J. G. (2008). Smells like sib spirit: Kin recognition in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) is mediated by olfactory cues. *Animal Cognition*, 11(4), 643-650. <https://doi.org/10.1007/s10071-008-0154-3>
- 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*, 102(12), 4414-4418. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408264102>
- Mills, D. S., & Marchant-Forde, J. N. (Eds.). (2010). *The encyclopedia of applied animal behaviour and welfare*. CABI.

- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., & Nagahama, Y. (1991). Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(13), 5774-5778.
- Mosqueda-Cabrera, M. Á., Labastida-Valerio, J. Á., Sotelo-Viveros, A. M., Becerra-García, R. E., & Jiménez-García, M. I. (2019). Helminths of the annual *Millerichthys robustus* (Teleostei: Rivulidae), an endemic species of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *90*(0), 1-9. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2019.90.2652>
- Munakata, A., & Kobayashi, M. (2010). Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, *165*(3), 456-468. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.04.011>
- Murphy, W. J., & Collier, G. E. (1997). A molecular phylogeny for aplocheiloid fishes (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): The role of vicariance and the origins of annualism. *Molecular Biology and Evolution*, *14*(8), 790-799. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025819>
- Myers, G. S. (1952). Annual fishes. *Aquarium Journal*, *23*, 125-141.
- Nordeng, H. (1971). Is the local orientation of anadromous fishes determined by pheromones? *Nature*, *233*(5319), 411-413. <https://doi.org/10.1038/233411a0>
- Nordeng, H. (1977). A Pheromone Hypothesis for Homeward Migration in Anadromous Salmonids. *Oikos*, *28*(2/3), 155. <https://doi.org/10.2307/3543965>
- Oliveira, R. F. (2004). Social Modulation of Androgens in Vertebrates: Mechanisms and Function. En *Advances in the Study of Behavior* (Vol. 34, pp. 165-239). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-3454\(04\)34005-2](https://doi.org/10.1016/S0065-3454(04)34005-2)
- Olsén, K. H., Grahn, M., & Lohm, J. (2002). Influence of MHC on sibling discrimination in Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.). *Journal of Chemical Ecology*, *28*(4), 783-795. <https://doi.org/10.1023/A:1015240810676>
- Olsén, K. Håkan, Grahn, M., Lohm, J., & Langefors, Å. (1998). MHC and kin discrimination in juvenile Arctic charr, (*Salvelinus alpinus* L.). *Animal Behaviour*, *56*(2), 319-327. <https://doi.org/10.1006/anbe.1998.0837>
- Olsén, K.H., Sawisky, G. R., & Stacey, N. E. (2006). Endocrine and milt responses of male crucian carp (*Carassius carassius* L.) to periovulatory females under field conditions. *General and Comparative Endocrinology*, *149*(3), 294-302. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.06.011>
- Ostlund, S. (1995). Female 15-spined sticklebacks detect males with empty nests by non-visual cues. *Journal of Fish Biology*, *47*(6), 1106-1109.

<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1995.tb06035.x>

- Passos, C., Reyes, F., Tassinio, B., Rosenthal, G. G., & González, A. (2013). Female Annual Killifish *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) Attend to Male Chemical Cues. *Ethology*, *119*(10), 891-897. <https://doi.org/10.1111/eth.12129>
- Passos, C., Tassinio, B., Rosenthal, G. G., & Reichard, M. (2016). Reproductive behavior and sexual selection in annual fishes. En N. Berois, G. García, & R. De Sá (Eds.), *Annual fishes: Life history strategy, diversity and evolution* (pp. 207-229). CRC Press.
- Pitcher, T. J. (Ed.). (1993). *Behaviour of teleost fishes* (2nd ed). Chapman & Hall.
- Podrabsky, J. E., & Hand, S. C. (1999). The bioenergetics of embryonic diapause in an annual killifish, *Austrofundulus limnaeus*. *The Journal of Experimental Biology*, *202* (Pt 19), 2567-2580.
- Podrabsky, J. E., Hrbek, T., & Hand, S. C. (1997). Physical and chemical characteristics of ephemeral pond habitats in the Maracaibo basin and Llanos region of Venezuela. *Hydrobiologia*, *362*(1-3), 67-77. <https://doi.org/10.1023/A:1003168704178>
- Podrabsky, J. E., Riggs, C. L., & Wagner, J. T. (2015). Tolerance of environmental stress. En N. Berois, G. García, & R. De Sá (Eds.), *Annual Fishes: Life strategy, diversity and evolution* (pp. 159-184). CRC Press.
- Podrabsky, J. E., Tingaud-Sequeira, A., & Cerdà, J. (2010). Metabolic Dormancy and Responses to Environmental Desiccation in Fish Embryos. En E. Lubzens, J. Cerda, & M. Clark (Eds.), *Dormancy and Resistance in Harsh Environments* (Vol. 21). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-12422-8_12
- Pri-Tal, B. M., Blue, S., Pau, F. K.-Y., & Podrabsky, J. E. (2011). Hormonal components of altered developmental pathways in the annual killifish, *Austrofundulus limnaeus*. *General and Comparative Endocrinology*, *174*(2), 166-174. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.08.016>
- Pulliam, H. R. (1973). On the advantages of flocking. *Journal of Theoretical Biology*, *38*(2), 419-422. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(73\)90184-7](https://doi.org/10.1016/0022-5193(73)90184-7)
- Radford, C. A., Stanley, J. A., Simpson, S. D., & Jeffs, A. G. (2011). Juvenile coral reef fish use sound to locate habitats. *Coral Reefs*, *30*(2), 295-305. <https://doi.org/10.1007/s00338-010-0710-6>
- Radford, C. A., Stanley, J., Tindle, C., Montgomery, J., & Jeffs, A. (2010). Localised coastal habitats have distinct underwater sound signatures. *Marine Ecology Progress Series*, *401*, 21-29. <https://doi.org/10.3354/meps08451>

- 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. <https://doi.org/10.1093/beheco/arl030>
- Reichard, M. (2010). *Nothobranchius kadleci* (Cyprinodontiformes: Nothobranchiidae), a new species of annual killifish from central Mozambique. *Zootaxa*, 2332(1), 49. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2332.1.4>
- Reusch, T. B. H., Häberli, M. A., Aeschlimann, P. B., & Milinski, M. (2001). Female sticklebacks count alleles in a strategy of sexual selection explaining MHC polymorphism. *Nature*, 414(6861), 300-302. <https://doi.org/10.1038/35104547>
- Reyes, F., Tassino, B., & Passos, C. (2017). Females of the annual killifish *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) recognize conspecific mates based upon chemical cues. *Behavioural Processes*. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2017.08.007>
- Rybak, F., Sureau, G., & Aubin, T. (2002). Functional coupling of acoustic and chemical signals in the courtship behaviour of the male *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1492), 695-701. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1919>
- Sánchez-Hernández, J. (2019). Taxonomy-based differences in feeding guilds of fish. *Current Zoology*, 66(1), 51-56. <https://doi.org/10.1093/cz/zoz015>
- Scott, A. P., & Ellis, T. (2007). Measurement of fish steroids in water—A review. *General and Comparative Endocrinology*, 153(1-3), 392-400. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.11.006>
- Scott, A. P., & Sorensen, P. W. (1994). Time Course of Release of Pheromonally Active Gonadal Steroids and Their Conjugates by Ovulatory Goldfish. *General and Comparative Endocrinology*, 96(2), 309-323. <https://doi.org/10.1006/gcen.1994.1186>
- Searcy, S. P., & Sponaugle, S. (2001). Selective Mortality during the Larval-Juvenile Transition in Two Coral Reef Fishes. *Ecology*, 82(9), 2452. <https://doi.org/10.2307/2679928>
- Sherman, P., Reeve, H., & Pfennig, D. (1997). Recognition Systems. En J. Krebs & N. Davies (Eds.), *Behavioural Ecology, 4th Edition* (pp. 69–96). Oxford: Blackwell Science.
- Silver, R., & Kriegsfeld, L. J. (2001). Hormones and Behaviour. En John Wiley & Sons, Ltd (Ed.), *ELS*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0000146>

- Smadja, C., & Butlin, R. K. (2009). On the scent of speciation: The chemosensory system and its role in premating isolation. *Heredity*, 102(1), 77-97. <https://doi.org/10.1038/hdy.2008.55>
- Sorensen, P. W. (2014). Introduction to Pheromones and Related Chemical Cues in Fishes. En P. W. Sorensen & B. D. Wisenden (Eds.), *Fish Pheromones and Related Cues* (pp. 1-9). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118794739.ch1>
- Sorensen, P. W., & Hoye, T. R. (2010). Pheromones in Vertebrates. En *Chemical Ecology, Comprehensive Natural Products II* (pp. 225-262). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00096-4>
- Sorensen, P. W., Murphy, C. A., Loomis, K., Maniak, P., & Thomas, P. (2004). Evidence that 4-pregnen-17,20 β ,21-triol-3-one functions as a maturation-inducing hormone and pheromonal precursor in the percid fish, *Gymnocephalus cernuus*. *General and Comparative Endocrinology*, 139(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.05.014>
- Sorensen, P. W., Pinillos, M., & Scott, A. P. (2005). Sexually mature male goldfish release large quantities of androstenedione into the water where it functions as a pheromone. *General and Comparative Endocrinology*, 140(3), 164-175. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.11.006>
- 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). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4733-4_2
- 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(3), 399-417. <https://doi.org/10.1080/00288330.2004.9517248>
- Sorensen, P. W., & Wisenden, B. D. (Eds.). (2015). *Fish pheromones and related cues*. John Wiley & Sons, Inc.
- Stacey, N. (2011). Hormonally Derived Sex Pheromones in Fishes. En *Hormones and Reproduction of Vertebrates* (pp. 169-192). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375009-9.10009-8>
- Stacey, N. (2015). Hormonally Derived Pheromones in Teleost Fishes. En P. W. Sorensen & B. D. Wisenden (Eds.), *Fish Pheromones and Related Cues* (pp. 33-88). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118794739.ch3>
- Stacey, & Sorensen, P. W. (2002). Fish hormonal pheromones. *Hormones*. <https://experts.umn.edu/en/publications/fish-hormonal-pheromones>
- Stewart, M., & Sorensen, P. W. (2015). Measuring and identifying fish pheromones.

Fish Pheromones and Related Cues, 197–216.

- Strüssmann, C. A., & Nakamura, M. (2002). Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26, 13-29.
- Tatarenkov, A., Lima, S. M. Q., Taylor, D. S., & Avise, J. C. (2009). Long-term retention of self-fertilization in a fish clade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(34), 14456-14459. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907852106>
- Tibbetts, E. A., & Dale, J. (2007). Individual recognition: It is good to be different. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(10), 529-537. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.09.001>
- Valdesalici, S., Domínguez-Castanedo, O., & Mosqueda-Cabrera, M. Á. (2016). Patterns of reproductive behaviour in *Millerichthys robustus* (Cyprinodontiformes: Cynolebiidae). *Aqua*, 22(4), 177-180.
- Van Den Hurk, R., & Resink, J. W. (1992). Male reproductive system as sex pheromone producer in teleost fish. *Journal of Experimental Zoology*, 261(2), 204-213. <https://doi.org/10.1002/jez.1402610211>
- Volcan, M. V., Fonseca, A. P., & Robaldo, R. B. (2011). Reproduction of the threatened Annual Killifish *Austrolebias nigrofasciatus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae), confined in a natural environment. *Journal of Threatened Taxa*, 3(6), 1864-1867. <http://threatenedtaxa.org/index.php/JoTT/article/view/662>
- Volcan, M. V., Gonçalves, Â., & Lanés, L. (2014). *Austrolebias quirogai* (Actinopterygii: Cyprinodontiformes: Rivulidae) in Brazil: Occurrence, population parameters, habitat characteristics, and conservation status. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 44(1), 37-44. <https://doi.org/10.3750/AIP2014.44.1.05>
- Waas, J. R., & Colgan, P. W. (1992). Chemical cues associated with visually elaborate aggressive displays of three-spine sticklebacks. *Journal of Chemical Ecology*, 18(12), 2277-2284. <https://doi.org/10.1007/BF00984950>
- Ward, A. J. W., & Hart, P. J. B. (2003). The effects of kin and familiarity on interactions between fish. *Fish and Fisheries*, 4(4), 348-358. <https://doi.org/10.1046/j.1467-2979.2003.00135.x>
- Ward, A., & Webster, M. (2016). *Sociality: The Behaviour of Group-Living Animals*. Springer.
- Williams, D. D. (2006). *The biology of temporary waters*. Oxford University Press.
- Wilson, E. O., & Holldobler, B. (2005). Eusociality: Origin and consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(38), 13367-13371.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0505858102>

- 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. <https://doi.org/10.1093/beheco/ari058>
- Wourms. (1972a). Developmental biology of annual fishes. I. Stages in the normal development of *Austrofundulus myersi* Dahl. *The Journal of Experimental Zoology*, *182*(2), 143-167. <https://doi.org/10.1002/jez.1401820202>
- Wourms. (1972b). The developmental biology of annual fishes. II. Naturally occurring dispersion and reaggregation of blastomeres during the development of annual fish eggs. *Journal of Experimental Zoology*, *182*(2), 169-200. <https://doi.org/10.1002/jez.1401820203>
- Wourms, J. P. (1972c). 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 Part A: Ecological Genetics and Physiology*, *182*(3), 389-414. <https://doi.org/10.1002/jez.1401820310>
- Yambe, H., Kitamura, S., Kamio, M., Yamada, M., Matsunaga, S., Fusetani, N., & Yamazaki, F. (2006). L-Kynurenine, an amino acid identified as a sex pheromone in the urine of ovulated female masu salmon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(42), 15370-15374. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604340103>
- Zohar, Y., Muñoz-Cueto, J. A., Elizur, A., & Kah, O. (2010). Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, *165*(3), 438-455. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.04.017>