

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

INSTITUTO DE FISIOLOGÍA

EL EFECTO DE LA PROPORCIÓN DE SEXOS EN EL
RESGUARDO DE PAREJA DE APAREAMIENTO EN EL
ANFÍPODO *Hyaella azteca*

*Tesis presentada para obtener el grado de:
maestría en ciencias fisiológicas*

Presenta:

Lic. en biomedicina Remilia Aurora Mondragón Chávez

Director de tesis:

Dr. Alejandro C. Moyaho Martínez

Co-director de tesis:

Dra. Evelyn Beristain Castillo

11 de octubre de 2024

Resumen

En el anfípodo *Hyalella azteca* las hembras son receptivas durante un periodo de tiempo corto, después de la muda de su exoesqueleto. Así que el macho busca aprovechar esta ventana de tiempo y resguarda a la hembra esperando la muda durante horas o días. El inicio y duración del resguardo (también llamado amplexo) deriva en un conflicto de interés intersexual porque sus tiempos óptimos difieren entre ambos sexos. El establecimiento y la duración del amplexo pueden ser afectados por diversos factores, siendo la proporción de sexos uno de los más importantes. Un estudio previo en este anfípodo mostró que cuando la proporción de sexos está sesgada en favor de las hembras, y en menor medida, de los machos, la probabilidad de éxito del amplexo aumenta para el sexo más raro. En cambio, cuando la proporción es equilibrada la probabilidad de éxito del amplexo disminuye.

Como el apareamiento depende de una homogamia de tamaño corporal, es posible que la disminución en la probabilidad del amplexo sea porque la disponibilidad de los individuos del sexo opuesto es baja. En este estudio, desarrollé un modelo de simulación que evalué midiendo el efecto de la proporción de sexos en la probabilidad de amplexo en una población de *H.azteca*. El modelo de simulación se ajusta con precisión a los datos experimentales, confirmando que el sistema de apareamiento concordante por tamaño corporal determina la disminución de la probabilidad del amplexo en el anfípodo *H. azteca*. Por otra parte, la duración estimada del

amplexo es mayor cuando la proporción de sexos está sesgada ligeramente hacia las hembras. Estos hallazgos pueden explicar en parte las proporciones de sexos sesgadas observadas en varias poblaciones de anfípodos acuáticos en la naturaleza.

Índice

1. Introducción	5
2. Sustento teórico	6
2.1. Ciclo de vida de <i>H. azteca</i>	8
2.2. Comportamiento de resguardo de pareja en <i>H. azteca</i>	11
3. Pregunta de investigación	15
4. Hipótesis y predicciones	15
5. Objetivos	16
5.1. Objetivo general	16
5.2. Objetivos particulares	17
6. Material y métodos	17
6.1. Modelo de simulación	18
6.2. Parte experimental	21
6.2.1. Animales de estudio	21
6.2.2. Selección de los anfípodos	22
6.2.3. Sexo de los anfípodos	23
6.2.4. Medición de los anfípodos	23
6.2.5. Diseño experimental	24
6.2.6. Recolección de los datos	25
6.3. Análisis de los datos	27

7. Resultados	29
7.1. Resultados del modelo de simulación	29
7.2. Resultados experimentales	31
7.2.1. Descripciones de los anfípodos utilizados	31
7.2.2. Análisis de las covariables	33
7.2.3. Éxito y duración del amplexo	35
8. Discusión	41
9. Conclusión	46
Referencias	47

1. Introducción

Los rasgos característicos de las especies han evolucionado y mantenido por selección natural, posiblemente porque confieren a los organismos que los poseen una mayor capacidad de supervivencia, lo que los vuelve predominantes en la población (Darwin 1859). En general se asume que los rasgos morfológicos y de comportamiento son adaptaciones de las especies (Fox y Wesneat 2010). Algunos rasgos están relacionados exclusivamente con la capacidad de conseguir parejas de apareamiento y son por lo tanto favorecidos por la selección sexual, aunque pueden ser perjudiciales para la supervivencia del individuo (Darwin 1859). Como decía, los rasgos pueden ser características anatómicas, fisiológicas y de comportamiento; esto es, lo que constituye el las características generales de una especie (Krebs y Davies 1993).

El conocimiento del comportamiento reproductivo en *Hyalella azteca* aún presenta aspectos por explicar. Un hallazgo reciente en este anfípodo sugiere que el inicio del resguardo de pareja de apareamiento o amplexo no es aleatorio (Beristain-Castillo y Cols. 2023). El mismo estudio indica que cuando la proporción sexual es pareja, la probabilidad de encontrar a los individuos en amplexo disminuye. Una explicación posible tiene relación con el apareamiento concordante (los machos grandes se aparean con hembras grandes y los machos chicos con hembras chicas) que ocurre comúnmente entre crustáceos. Esta condición puede restringir las

posibilidades de apareamiento.

A continuación, describo el ciclo de vida de *H. azteca*, lo que se sabe sobre su comportamiento de resguardo de pareja, y presento una explicación de la disminución de la probabilidad de encontrar anfípodos en amplexo.

También describo el método que usé para poner a prueba la veracidad de la explicación.

2. Sustento teórico

Hyalella azteca (Saussure 1858; [Figura 1](#) y [Figura 3a](#)) es un crustáceo dulceacuícola pequeño (de 4 a 10mm de longitud en los individuos adultos) del orden amphipoda (Hickman y Larson 2021; Lange y Schram 1999) que habita en el fondo de aguas quietas o estancadas, tales como los lagos, lagunas, estanques y pantanos de Norteamérica y Centroamérica (Väinölä y Cols. 2008). Estudios genéticos han demostrado que existe divergencia genética entre poblaciones de *H. azteca*, por lo que este anfípodo es considerado como un complejo de especies con al menos 30 de ellas con fenotipos similares, pero con genotipos diferentes (Duan y Cols. 2000; Witt y Cols. 2006).



Figura 1. Ejemplares de *H. azteca* del laboratorio de Ecología de la conducta, BUAP.

Las hembras de los anfípodos en general son receptivas sólo durante un periodo corto de tiempo. El periodo receptivo de las hembras ocurre entre la muda del exoesqueleto y la ovulación (periodo que varía de unos minutos hasta algunas horas, dependiendo de la especie (Borowsky 1986; Sheader 1983)) por lo que los machos, quienes generalmente son sexualmente activos en todo momento, han adoptado una variedad amplia de estrategias de resguardo de pareja para asegurar la paternidad de las crías (Conlan 1991).

Una estrategia de resguardo de pareja en los anfípodos es el **amplexo**, el cual consiste en la sujeción de la hembra por parte del macho. Puede prolongarse por horas o incluso días, hasta la muda del exoesqueleto de la hembra cuando ambos individuos pueden copular. Los anfípodos que

presentan este comportamiento están clasificados como crustáceos acarreadores acuáticos (Conlan 1991). *H. azteca* presenta este rasgo y diversas aproximaciones, tanto teóricas como experimentales, han sido utilizadas para estimar la duración del amplexo. Los factores desencadenantes del amplexo, están relacionados con el ciclo reproductivo femenino y la capacidad de elección de pareja reproductiva de ambos sexos (Jormalainen 1998).

2.1. Ciclo de vida de *H. azteca*

La reproducción de *H. azteca* es obligatoriamente sexual. Las crías de *H. azteca* pasan por 7 fases intermuda o instar con una duración total de 25-40 días, donde crecen antes de alcanzar la etapa adulta (Othman y Pascoe 2001). Una vez alcanzada la madurez sexual, la duración del ciclo intermuda es diferente para machos y hembras (entre 8-40 días para los machos y entre 9 a 16 días para las hembras) y depende de factores ambientales del agua que habitan tales como la temperatura, el pH, nivel de oxígeno y la disponibilidad de alimento (Cooper 1965; Strong 1972). Además, la duración del periodo intermuda, el periodo de incubación y la duración del amplexo pueden todos diferir entre poblaciones (Strong 1972) (Figura 2).

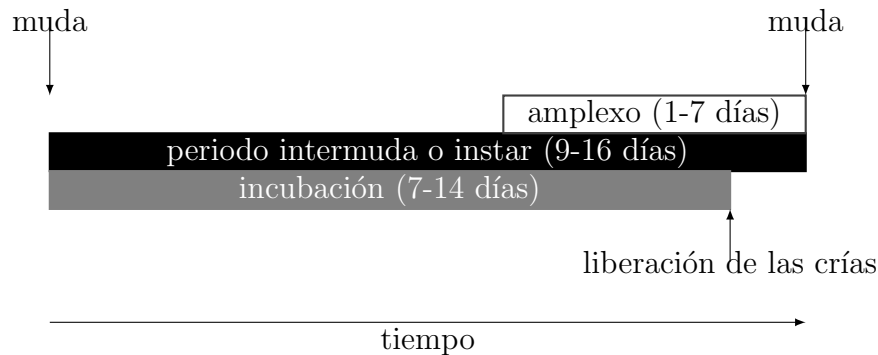
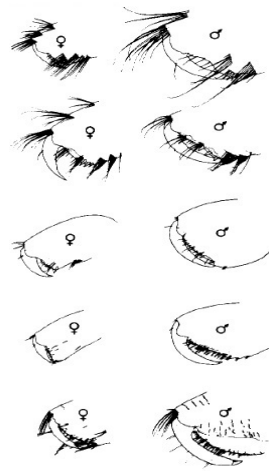
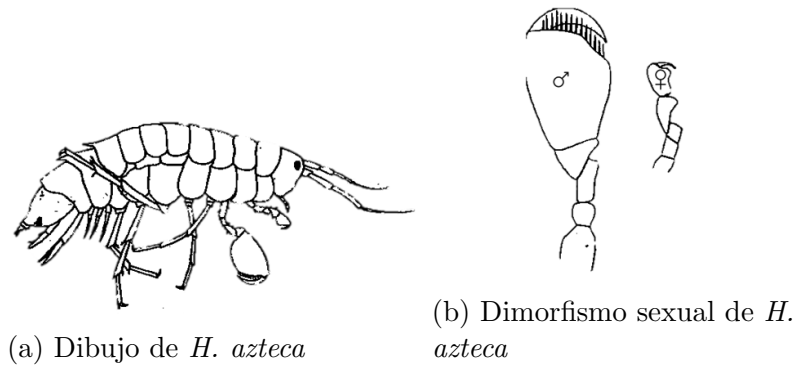


Figura 2. Esquema del ciclo reproductivo típico de las hembras de *H. azteca*. las duraciones observadas de los distintos componentes del ciclo están indicadas entre paréntesis. Tomado y modificado de Strong 1973.

Los anfípodos acarreadores acuáticos presentan dimorfismos sexuales. Por ejemplo, la longitud corporal y el segmento distal del segundo par de gnatópodos son mayores en los machos que en las hembras (Conlan 1991). En *H. azteca* estos dimorfismos aparecen en la etapa adulta. En la [Figura 3](#) muestro un dibujo de la diferencia morfológica entre los gnatópodos de machos y hembras de *H. azteca*, y algunos ejemplos de esta diferencia en otros crustáceos acarreadores acuáticos.

H. azteca puede ser cultivada en condiciones seminaturales de laboratorio como se ha conseguido hacer en el laboratorio de Ecología de la Conducta del Instituto de Fisiología de la BUAP, donde actualmente hay una población estable. En estudios anteriores con esta población se estimó una proporción de sexos ligeramente sesgada hacia los machos ($machos/(machos + hembras) = 0.537$), una longitud corporal de $5.63 \pm$



(c) Dimorfismo sexual de otros crustáceos acarreadores acuáticos

Figura 3. Comparación de la forma del gnatópodo entre machos y hembras de crustáceos acarreadores acuáticos. En los paneles 3a y 3b muestro un dibujo de *H. azteca* y la diferencia del segundo par de gnatópodos, respectivamente. El gnatópodo del macho juvenil se parece al de la hembra hasta la etapa adulta cuando se diferencian uno del otro. En el panel 3c muestro de arriba abajo la comparación de los gnatópodos en: *Eulimnogammarus obtusatus*, *Echinogammarus marinus*, *Hyale nilssoni*, *Allorchestes angusta* y *Melita nitida*. Tomado y modificado de Conlan 1991 y Saussure 1858.

0.08 mm (promedio \pm desviación estándar del promedio) para los machos adultos y una longitud corporal de 4.91 ± 0.08 mm para las hembras adultas (Beristain-Castillo y Cols. 2023).

2.2. Comportamiento de resguardo de pareja en *H. azteca*

Conflictos de interés intrasexual e intersexual se generan en torno al comportamiento de amplexo. El conflicto de interés intrasexual surge porque las hembras son un recurso reproductivo escaso y valioso; las hembras solo tienen una oportunidad para ser fertilizadas a lo largo de un ciclo reproductivo, además de que invierten recursos incubando los huevos fertilizados, a diferencia de los machos que pueden reproducirse casi permanentemente sin invertir recursos en la progenie (Trivers 1972). Las hembras, al ser un recurso reproductivo escaso, provocan que los machos compitan entre sí resguardándolas o incluso, desplazando a otros machos en amplexo (Jormalainen 1998). El conflicto de interés intersexual ocurre porque la restricción mecánica ocasionada por el amplexo podría impedir realizar actividades diversas (e.g. forrajear, evadir depredadores, buscar más parejas, etc.) de manera diferencial entre ambos sexos, por lo que el momento óptimo de iniciación del amplexo difiere entre ellos (Jormalainen 1998). Esto explica el hecho de que las hembras de varias especies de crustáceos acarreadores acuáticos (incluida *H. azteca*) muchas veces

rechazan los intentos de amplexo de los machos (Jormalainen 1998; Strong 1973).

Existen numerosos modelos teóricos que intentan predecir el momento óptimo del inicio del amplexo. Sin embargo, la mayoría de ellos asumen un papel pasivo para las hembras o condiciones que no ocurren en la naturaleza (Jormalainen 1998). En 1996 fue propuesto un modelo en términos de un compromiso intermedio entre machos y hembras para resolver el conflicto respecto del inicio y duración del amplexo (Yamamura y Jormalainen 1996). Tal modelo asume la capacidad de los machos para determinar el estado reproductivo de las hembras, cuando el ciclo de muda en la población es asincrónico. La predicción principal del modelo fue que existen dos factores predominantes en la determinación del inicio del amplexo: la fuerza física relativa de cada individuo en la pareja, y la proporción de sexos.

La proporción de sexos parece ser un factor crítico en el establecimiento del amplexo. En un trabajo previo (Beristain-Castillo y Cols. 2023) se halló que cuando la proporción de sexos se acercaba a 0.5 (mismo número de machos que de hembras) la probabilidad de observar amplexos disminuía. En cambio, cuando la proporción estaba sesgada hacia las hembras, y en menor medida hacia los machos, la probabilidad de hallar amplexos aumentaba para el sexo más raro. Una explicación posible tiene relación con el

apareamiento concordante por tamaño corporal (i.e. machos grandes se aparean con hembras grandes y machos chicos con hembras chicas); si hay un sesgo en la proporción de sexos, es más probable que los crustáceos del sexo más raro encuentren una pareja del tamaño adecuado con la cual formar amplexo. Los autores encontraron que las hembras de *H. azteca* siempre aceptaban a machos con una longitud corporal de 0.72mm mayor que la longitud corporal de ellas, y muy rara vez aceptaban a machos más pequeños que ellas. Los autores no manipularon la proporción de sexos, por lo que aún se desconoce si este factor es un elemento crítico en la probabilidad de hallar amplexos. La [Figura 4](#) y la [Figura 5](#) ilustran la hipótesis de la proporción de sexos como un factor determinante en la probabilidad de encontrar amplexos.

La formación del amplexo sigue un patrón de apareamiento concordante respecto del tamaño corporal. Es una tendencia en los crustáceos acarreadores acuáticos, aunque no se sabe con certeza su causa (Conlan 1991). Una explicación posible podría ser la de una restricción mecánica para conseguir el amplexo como se ha demostrado que sucede en el anfípodo *Gammarus pulex* (Adams y Greenwood 1983). Además, es importante tomar en cuenta que el aumento en el tamaño corporal de las hembras está asociado con su madurez sexual y con el número de huevos

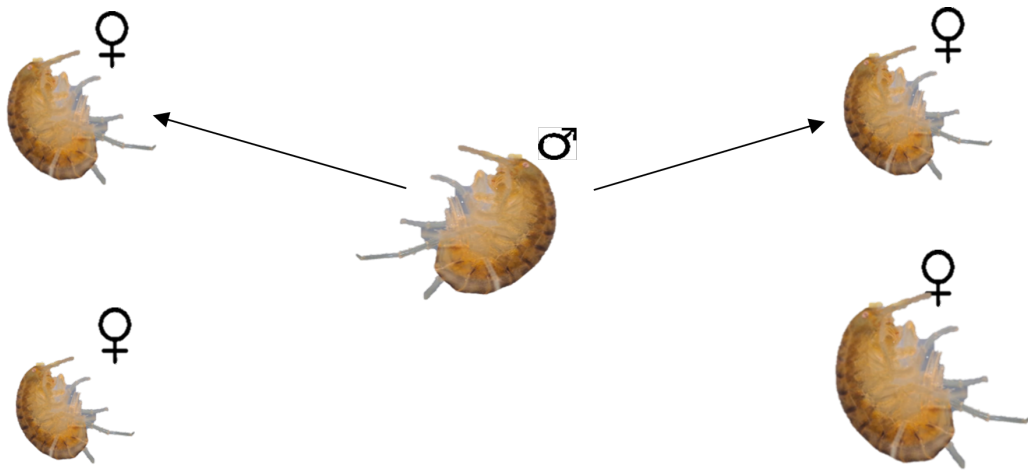


Figura 4. Proporción de sexos sesgada. En la figura muestro una población de *H. azteca* con una proporción de sexos sesgada hacia las hembras en donde el macho (sexo raro) tiene suficientes parejas potencialmente concordantes para aparearse (indicadas con flechas negras). Lo mismo ocurriría en una población sesgada hacia los machos.

que puede poner (Othman y Pascoe 2001), por lo que el beneficio de buscar hembras grandes para reproducirse se vuelve evidente para los machos y hace más difícil separar las causas del apareamiento concordante.

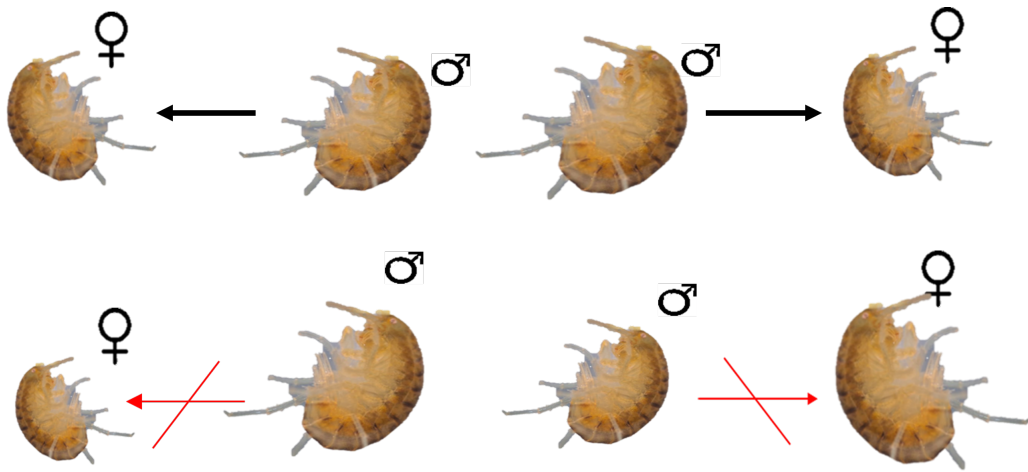


Figura 5. Proporción de sexos equilibrada. En la figura muestro una población de *H. azteca* con una proporción de sexos equilibrada en donde solo algunas parejas pueden formarse (indicadas con flechas negras) y otras estarían impedidas de hacerlo (indicadas con flechas rojas) por la falta de tamaños concordantes.

3. Pregunta de investigación

Con base en lo anterior es relevante preguntar ¿Por qué el éxito en el establecimiento de amplexo disminuye cuando la proporción de sexos se acerca a 0.5?

4. Hipótesis y predicciones

Hipótesis: La proporción de sexos modula el éxito del amplexo por medio del apareamiento concordante. Si esta hipótesis es veraz, esperaríamos encontrar que:

1. Cuando la proporción de sexos esté sesgada, los individuos del sexo

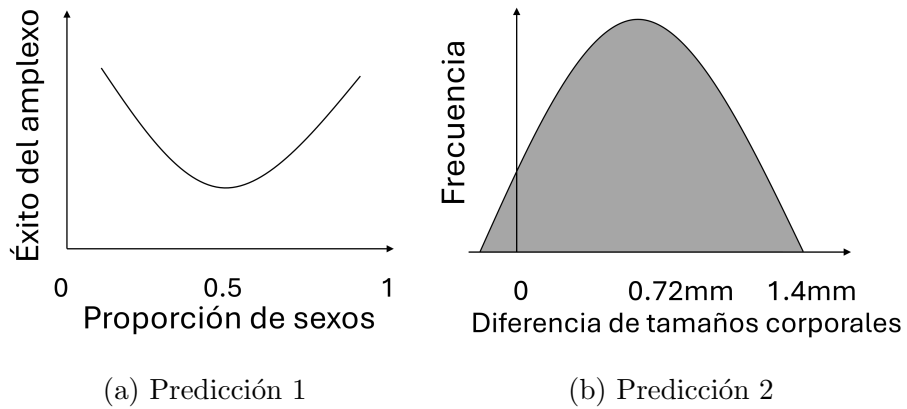


Figura 6. Predicciones

raro tendrán concordancia con más individuos del sexo opuesto, por lo que será más probable que encuentren pareja (ver la [Figura 6a](#)).

- II. Los individuos más dispares en tamaño corporal respecto del sexo opuesto tendrán una probabilidad menor de formar amplexo (ver la [Figura 6b](#)).

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Determinar el efecto de la proporción de sexos en el éxito del amplexo del anfípodo *H. azteca*.

5.2. Objetivos particulares

1. Desarrollar un modelo de simulación que muestre la consistencia de la hipótesis tomando en consideración el apareamiento concordante por tamaño corporal;
2. Establecer un procedimiento experimental para determinar un criterio de selección objetivo de anfípodos adultos e identificar el sexo de los mismos;
3. Emplear un método de medición preciso para determinar la longitud corporal de los anfípodos experimentales;
4. Establecer un arreglo experimental que facilite la observación de los crustáceos experimentales;
5. Manipular la proporción de sexos de los anfípodos adultos en un rango amplio;
6. Ajustar el modelo de simulación a los resultados experimentales

6. Material y métodos

Para el estudio planteé hacer un modelo de simulación y una serie de observaciones experimentales para ponerlo a prueba. A continuación presento la descripción de este modelo; y enseguida presentaré la parte experimental:

6.1. Modelo de simulación

El modelo simula el apareamiento concordante utilizando distribuciones de probabilidad. La formación del amplexo puede ser vista mediante una distribución binomial, porque se forma (“éxito”) o no se forma (“fracaso”) aquél. Los parámetros de una distribución binomial son el número de ensayos ($n \in \mathbb{N}$) y la probabilidad de éxito de cada ensayo ($p \in [0,1]$) (Meester 2008). Para estimar el parámetro ‘n’ utilicé la cantidad de individuos del sexo raro (e.g. si hay 3 machos y 7 hembras entonces $n = 3$). Para estimar el parámetro ‘p’ hice una estimación de 11 valores que cubrieran el rango de la proporción de sexos a simular (ver más abajo). Hice la estimación de ‘p’ utilizando información descrita en el artículo de Beristain-Castillo y Cols. 2023.

La probabilidad de que ocurra amplexo (‘p’) se puede estimar comparando los tamaños de los anfípodos. Los tamaños de los anfípodos de *H. azteca* se distribuyen de forma normal. En las pruebas piloto el tamaño estimado de los machos fue de $5.47\text{mm} \pm 0.58\text{mm}$ (promedio \pm desviación estándar) y el de las hembras fue de $4.96\text{mm} \pm 0.65\text{mm}$. Con estos datos simulé muestreos de tamaños corporales de anfípodos con un generador de números aleatorios en R (R Core Team 2024). La evidencia previa indica una diferencia de tamaño corporal promedio para los anfípodos en amplexo de 0.72mm (tamaño del macho - tamaño de la hembra) (Beristain-Castillo y Cols. 2023). Para incorporar esta información al modelo, fijé en $p=0.5$ la

probabilidad de éxito del amplexo cuando la diferencia de tamaño corporal de una pareja de anfípodos era de 0.72mm y de $p=0.05$ cuando la diferencia era de $0.72\text{mm} \pm 0.72\text{mm}$; Asigné una probabilidad diferente a cada diferencia de tamaños posible utilizando estas dos referencias en una curva de densidad de probabilidad, similar a la propuesta para la segunda predicción (Figura 6b).

Considerando que cada individuo del sexo raro se puede emparejar con un solo individuo del sexo opuesto en un momento determinado, en una población formada por 'x' anfípodos machos y 'y' anfípodos hembras, el número de emparejamientos diferentes para esta población se puede obtener mediante variaciones sin repetición (Wilhelmi 2004). Sin embargo, si el apareamiento concordante por tamaño determina la formación del amplexo, algunos emparejamientos tienen más probabilidades de formar amplexos, y por lo tanto, de ocurrir.

Con esta información desarrollé un algoritmo (ilustrado con una simulación de ejemplo en la Tabla 1) para estimar el parámetro 'p' descrito anteriormente. El algoritmo es el siguiente:

1. Obtención de muestras de anfípodos machos y hembras con base en las estimaciones descritas arriba;
2. Comparación del tamaño de todas las hembras con el tamaño de todos los machos para obtener las diferencias respectivas;

Tabla 1. Ejemplo de una simulación.

	Macho 1	Macho 2	Macho 3
	4.55mm	5.92mm	6.08mm
Hembra 1 4.05mm	Diferencia = 0.50mm p = 0.357	Diferencia = 1.87mm p = 0.037	Diferencia = 2.03mm p = 0.02
Hembra 2 5.20mm	Diferencia = -0.65mm p = 0.0007	Diferencia = 0.72mm p = 0.5	Diferencia = 0.88mm p = 0.41
Hembra 3 3.96mm	Diferencia = 0.59mm p = 0.43	Diferencia = 1.96mm p = 0.0006	Diferencia = 2.12mm p = 0.0002

Nota: para esta simulación de tres anfípodos macho y tres hembras (proporción de sexos = 0.5) el emparejamiento mas probable es el del macho 1 con la hembra 3, el macho 2 con la hembra 2 y el macho 3 con la hembra 1. El resultado de esta simulación es el promedio de tres probabilidades: 'p' = **0.316**. Nótese que el emparejamiento es sin reemplazo porque una hembra no puede emparejarse con dos machos al mismo tiempo, ni un macho puede emparejarse con dos hembras al mismo tiempo.

3. Transformación de estas diferencias de tamaños en probabilidades, de acuerdo con los criterios mencionados arriba;
4. Selección del emparejamiento más probable;
5. Obtención del promedio de las probabilidades del amplexo para cada pareja en este emparejamiento.

El algoritmo fue simulado por computadora, y para estimar con precisión el valor del parámetro 'p' repetí la simulación 10000 veces para cada valor del rango de la proporción de sexos descrito en la [Tabla 2](#) (110000 simulaciones en total). Escribí las instrucciones para simular el algoritmo por

computadora usando el software R versión 4.3.2 (R Core Team 2024) junto con R Studio, versión 2023.06.1 (RStudio Team 2024).

6.2. Parte experimental

6.2.1. Animales de estudio

Para el estudio utilicé una muestra de 924 anfípodos adultos de la especie *H. azteca* (462 machos y 462 hembras). Obtuve esta muestra de la población que actualmente tenemos en cautiverio en el laboratorio de Ecología de la Conducta del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. La población está repartida en 5 peceras (51cm x 26cm x 30cm) con agua destilada reconstituida con sales y minerales esenciales para el crecimiento de los anfípodos. El fondo de las peceras es cubierto con grava como sustrato, musgo acuático; además crecen en ellas planarias pequeñas y caracoles de agua dulce. Las peceras tienen un filtro con un flujo intermitente de aire a través de una piedra difusora que mantiene el agua con un nivel adecuado de oxígeno disuelto ($\geq 80\%$).

Los anfípodos son alimentados *ad libitum* con diversas frutas y verduras tales como manzana, mango, zanahoria, calabaza y pepino. Semanalmente se hacen restituciones parciales del agua de aproximadamente 4 litros del volumen total. El agua de las peceras se mantiene a una temperatura de entre 18°C a 22°C y un pH que varía en un rango de 7.0 a 7.7. El acuario

donde se encuentran los anfípodos permanece con un fotoperiodo de 12h (las luces se encienden a las 7:00 h).

6.2.2. Selección de los anfípodos

Los anfípodos pueden ser clasificados como adultos o juveniles por su tamaño corporal. Es importante advertir que la utilización de un procedimiento de clasificación por tamaño puede sesgar la proporción de sexos de las muestras hacia los machos, debido a que las hembras son en promedio más pequeñas que los machos (Ewers-Saucedo 2019). Sin embargo, puesto que manipulé la proporción de sexos para los experimentos, dicho sesgo de muestreo fue irrelevante para este estudio; Utilicé un criterio de selección por tamaño para obtener anfípodos adultos.

Es posible separar a los anfípodos por tamaños con un procedimiento de tamizado. Utilicé dos tamices: uno con un tamaño de malla de 600 μ m y otro con un tamaño de malla de 250 μ m. Dispuse ambos tamices en serie y consideré como adultos a aquellos anfípodos que permanecían en el tamiz con tamaño de malla de 600 μ m (i.e. anfípodos grandes). El resto de anfípodos, los que eran suficientemente pequeños como para pasar hacia el siguiente tamiz, los descarté de los experimentos y los devolví a las peceras de cautiverio. De esta forma apliqué un criterio confiable y reproducible para seleccionar solo anfípodos adultos. En la [Figura 7](#) muestro fotografías que ejemplifican este criterio de selección.

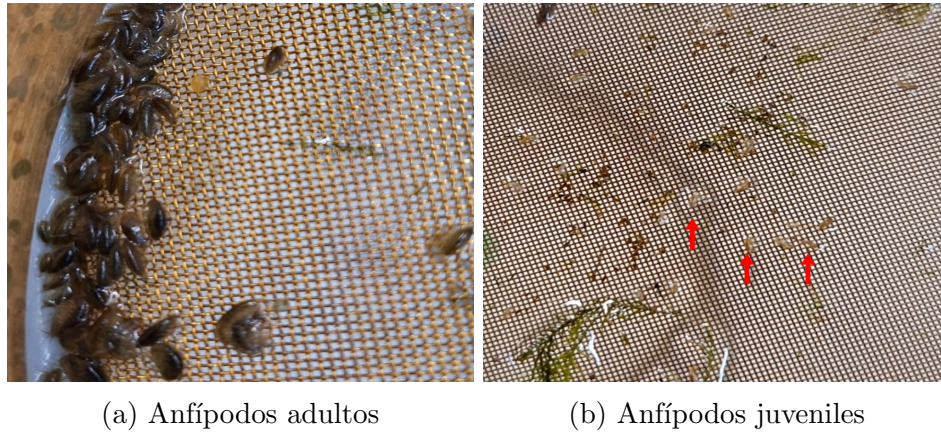


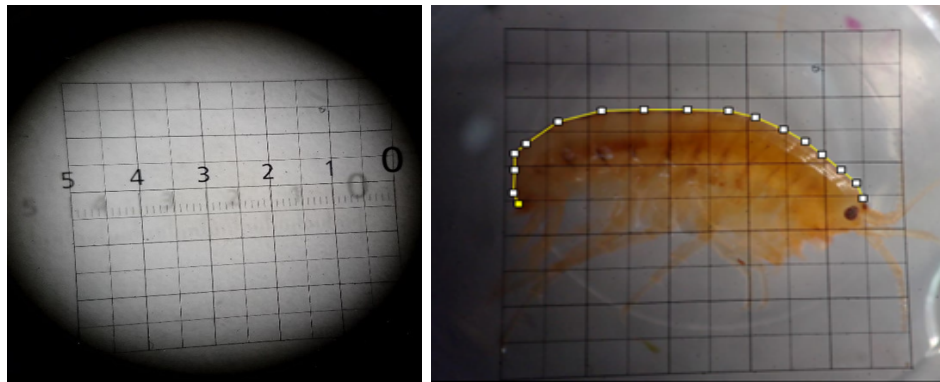
Figura 7. Selección de crustáceos adultos. En la fotografía 7a se pueden observar los anfípodos adultos atrapados en el tamiz con tamaño de malla de $600\mu\text{m}$. En la fotografía 7b se pueden observar los anfípodos juveniles de menor tamaño (señalados con flechas rojas).

6.2.3. Sexo de los anfípodos

Como mencioné en la sección del sustento teórico, *H. azteca* presenta dimorfismo sexual en los caracteres sexuales secundarios al alcanzar la etapa adulta (Figura 3b). Hice la identificación del sexo de los anfípodos con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Zeiss™ stemi 2000-c).

6.2.4. Medición de los anfípodos

El microscopio estereoscópico está equipado con una retícula de medición. Así que solo tuve que fotografiar a los anfípodos bajo el microscopio desde una vista lateral y usar la retícula como una referencia del tamaño corporal. Con las fotografías y el programa ImageJ (versión 1.54d Schneider y Cols. 2012) hice la medición del tamaño de cada anfípodo: la longitud de la base



.. (a) Calibración de la retícula (b) Medición del tamaño de un anfípodo

Figura 8. Procedimiento de medición del tamaño de los anfípodos. En la fotografía 8a muestro la calibración de la retícula de medición. Los números indican milímetros, por lo que la retícula mide 5mm x 5mm. En la fotografía 8b ejemplifico la medición de un anfípodo.

del telson a la base de las antenas. En la [Figura 8](#) describo con fotografías el proceso de la medición.

6.2.5. Diseño experimental

Para poner a prueba el modelo de simulación varié la proporción de sexos. Utilicé un diseño experimental de bloques aleatorizados (7 bloques) y realicé los experimentos entre septiembre del 2023 y febrero del 2024. Cada bloque experimental contenía 11 tratamientos experimentales diferentes, correspondientes a las proporciones de sexos descritas en la [Tabla 2](#). Coloqué cada grupo experimental de anfípodos en tanques de vidrio de 20cm x 17cm x 17cm con condiciones de mantenimiento similares a las de las peceras de cautiverio. En la [Figura 9](#) muestro el arreglo espacial que

Tabla 2. Tratamientos experimentales.

	Tratamientos				
Cantidad de machos	1	2	...	10	11
Cantidad de hembras	11	10	...	2	1

Nota: para manipular la proporción de sexos para los tratamientos, coloqué 1 macho con 11 hembras, 2 machos con 10 hembras y así sucesivamente hasta 11 machos con una hembra. Esto implica que utilicé un rango amplio de proporciones de sexos, desde una proporción muy sesgada hacia las hembras hasta una proporción muy sesgada hacia los machos. Recordar que usé las mismas proporciones de sexos para el modelo de simulación.

utilicé.

Se ha descrito que factores como el pH, nivel de oxigenación, la temperatura, iluminación y los cambios estacionales pueden influenciar el ciclo reproductivo de *H. azteca* (Kruschwitz 1978; Othman y Pascoe 2001; Strong 1972). Para disminuir los efectos de tales factores, que no eran de interés para este estudio, mantuve el nivel de oxigenación del agua ($89\% \pm 1\%$), el pH (7.9 ± 0.1), y la iluminación ($\approx 530 \text{ lumens}$) dentro de límites reducidos.

6.2.6. Recolección de los datos

Cada bloque experimental tuvo una duración de 7 días divididos estos en tres etapas:

1. La primera etapa (día 1) consistió en colocar a los anfípodos en los



(a) Colocación de los tanques experimentales



(b) Condiciones de un tanque experimental

Figura 9. Configuración espacial de los tanques experimentales. Coloqué los tanques experimentales, uno al lado del otro, en un estante ubicado en un cuarto aislado (fotografía 9a). Puse a los tanques experimentales con los tratamientos correspondientes en una secuencia elegida aleatoriamente. Cada tanque experimental contenía un sustrato de papel filtro blanco en el fondo, rocas claras, musgo acuático y alimento (un trozo pequeño de zanahoria), además de una roca de difusión con aireación intermitente para oxigenar el agua. Los tanques experimentales estaban forrados con papel Kraft en tres de sus lados para evitar la interferencia visual contigua y externa. La iluminación del cuarto estaba controlada a 12 horas, como en el acuario.

tanques experimentales y esperar hasta el siguiente día para que se aclimataran a la condición novedosa;

2. En la segunda etapa (días 2-6) un observador voluntario, ajeno a la investigación, registró el número de crustáceos y amplexos observados en cada tanque experimental usando una técnica de muestreo por escaneo instantáneo (Martin y Bateson 2007). Los muestreos fueron realizados tres veces al día, en horas elegidas aleatoriamente entre las 7 hrs y las 18 hrs. Después de cada observación, me encargué de medir la temperatura del agua de 4 tanques elegidos estos aleatoriamente. Así mismo, si había anfípodos muertos los retiraba para registrar su sexo y tamaño corporal.
3. La última etapa (día 7) consistió en retirar a los anfípodos de los tanques experimentales, contar los amplexos existentes, medir los tamaños de los anfípodos (suelos y en amplexo) y registrar el estado reproductivo de la hembra (presencia de huevos y nauplios). Reubicaba a los anfípodos utilizados en una pecera aislada para asegurarme de no volver a utilizarlos en los experimentos siguientes.

6.3. Análisis de los datos

Para el análisis estadístico de los datos usé las siguientes variables:

- Variable independiente: la proporción de sexos.

- Variable dependiente: el éxito del amplexo (el número de parejas encontradas / el número de parejas posibles), y su duración.
- Covariables: bloque experimental, día de observación, número de observación, posición del tanque experimental y temperatura del agua.

Para el modelo de simulación usé una distribución binomial, que luego ajusté a los datos observados.

7. Resultados

Como ya describí en la parte de los materiales y métodos, este estudio incluyó una parte teórica y otra parte experimental. Ambas partes muestran consistencia con la hipótesis propuesta, pues el modelo se ajusta adecuadamente a los datos. A continuación presentaré los resultados obtenidos.

7.1. Resultados del modelo de simulación

La hipótesis del apareamiento concordante ([Figura 4 y 5](#)) y el modelo de simulación son consistentes entre sí. Las estimaciones del éxito del amplexo confirman que hay una reducción de éste cuando la proporción de sexos se acerca a 0.5. En la [Figura 10](#) ilustro el resultado.

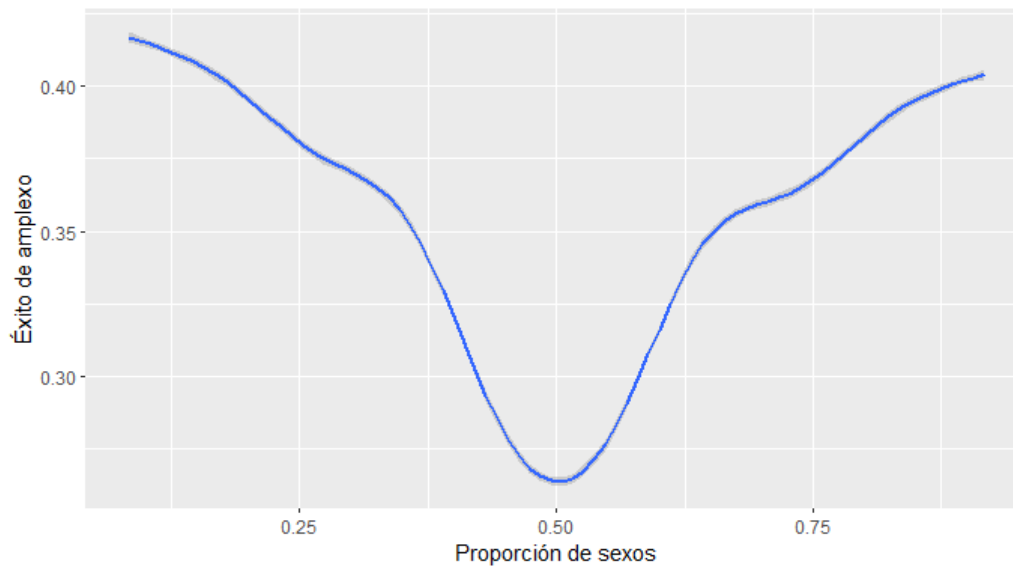


Figura 10. Estimación del éxito del amplexo. El modelo obtenido muestra consistencia con la primera predicción de la hipótesis por la forma de la curva.

El éxito del amplexo depende del contexto social de los anfípodos. Para evaluar el efecto del contexto social clasifiqué las simulaciones en 9 tipos, de acuerdo con el tamaño de los anfípodos simulados, como lo muestro en la [Figura 11](#). Aunque el éxito del amplexo sigue el mismo patrón en los 9 tipos de simulaciones, el contexto social en los grupos de anfípodos dispares (panel superior derecho e inferior izquierdo) tienen una disminución franca en el éxito del amplexo. El contexto social entonces podría favorecer una selección estabilizadora respecto al tamaño corporal de los anfípodos.

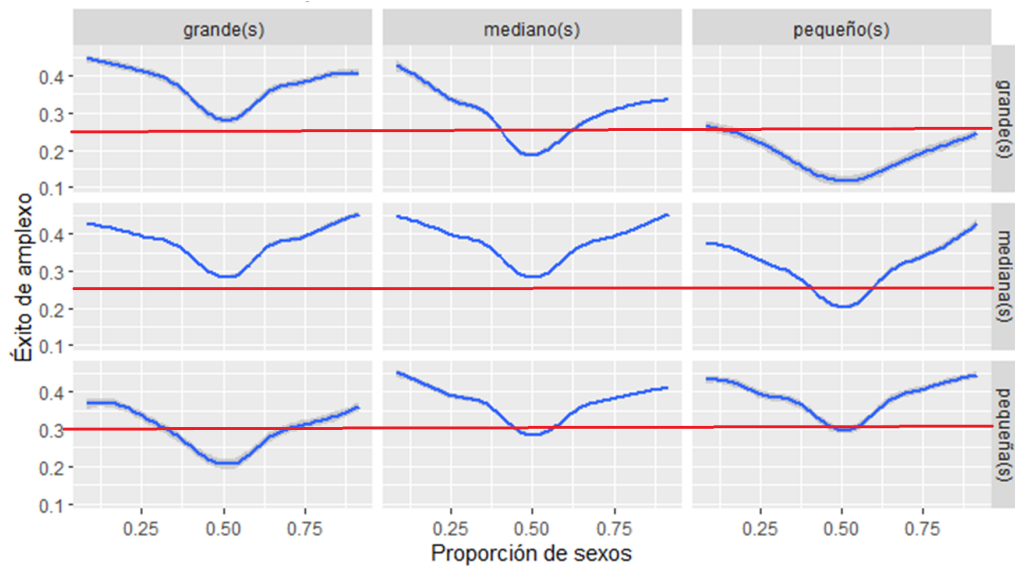


Figura 11. Contexto social en los anfípodos simulados. Para separar a los anfípodos en grandes, medianos y pequeños utilicé lo siguiente: Para ambos sexos, consideré como anfípodos medianos a los anfípodos con un tamaño igual que el promedio \pm media desviación estándar; cualquier valor menor al límite inferior de este intervalo correspondió a anfípodos pequeños y cualquier valor mayor al límite superior de este intervalo correspondió a anfípodos grandes. En las columnas están representados los tamaños de los machos y en las filas están representados los tamaños de las hembras. La línea roja sirve como referencia (arbitraria) para observar la disminución franca en el éxito del amplexo cuando los tamaños corporales de las poblaciones de anfípodos son dispares.

7.2. Resultados experimentales

7.2.1. Descripciones de los anfípodos utilizados

En la [Tabla 3](#) se encuentra una descripción general de los anfípodos usados en este estudio. Al final de los experimentos encontré 878 anfípodos vivos

(95 %) de los 924 utilizados en este estudio. Los anfípodos tienen una esperanza de vida de aproximadamente 185 días (Othman y Pascoe 2001), por lo que la mortalidad observada (5 %) durante los experimentos pudo haber ocurrido por causas naturales. La cantidad de machos hallados muertos fue de cercana al doble que la cantidad de hembras halladas muertas (29 machos muertos contra 17 hembras muertas) lo que indica una mortalidad diferencial entre los sexos.

Tabla 3. Descripción general de los crustáceos experimentales.

Sexo	Tamaño promedio	Coficiente de variación	Tamaño mínimo	Tamaño máximo	Muertos
Machos (n = 462)	6.78mm	14.5 %	3.96mm	10.42mm	29
Hembras (n = 462)	6.34mm	13.7 %	4.28mm	8.99mm	17

Del número total de anfípodos hallados vivos al concluir el estudio, encontré 272 de ellos (31 %) en amplexo; 136 machos y 136 hembras. Por otra parte la diferencia promedio observada en el tamaño corporal de los anfípodos en amplexo fue de 0.45mm. Aunque esta diferencia promedio no es la misma que la reportada en la literatura, sigue el mismo patrón de apareamiento concordante por tamaño. Aunque las hembras grandes hacen amplexo con machos grandes y las hembras chicas lo hacen con machos

chicos, los machos generalmente son más grandes que las hembras. La distribución obtenida de las diferencias de tamaño corporal indica que es poco probable encontrar anfípodos en amplexo con tamaños corporales dispares (Figura 12).

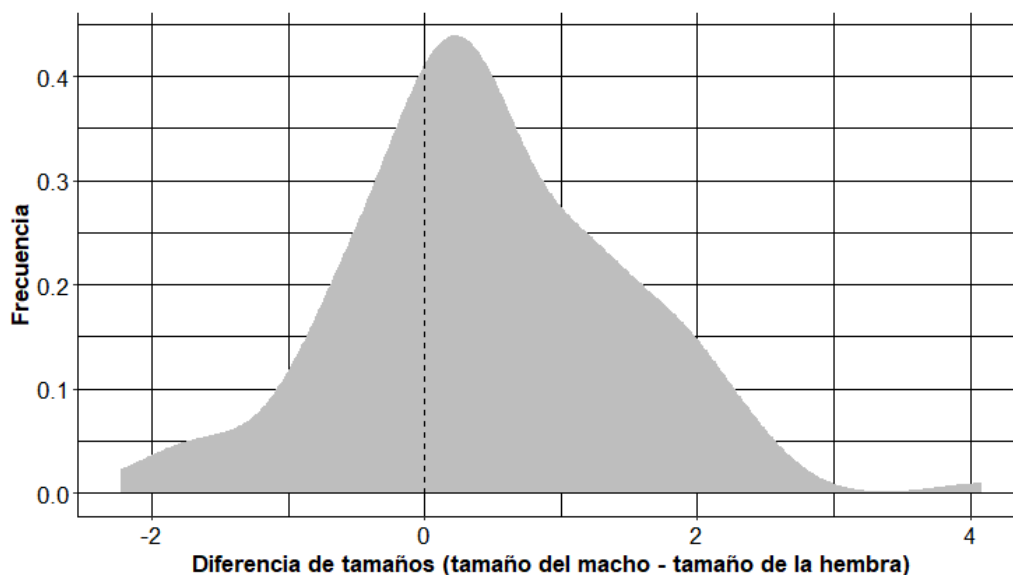


Figura 12. Frecuencia relativa de las diferencias de tamaño corporal de parejas en amplexo. La diferencia promedio fue de 0.45mm. Se puede apreciar que es más probable que los machos grandes (valores por arriba de 0) formen amplexo con hembras más pequeñas (70 % de los datos) que machos pequeños (valores por abajo de 0) formen amplexo con hembras más grandes.

7.2.2. Análisis de las covariables

Para describir el efecto que las covariables pudieran tener en la cantidad de amplexos observados, analicé el número de amplexos observados en función de cada una de ellas. Se puede observar una tendencia de aumento en el

número de amplexos observados con el paso de los días y con el incremento de la temperatura (Figura 13). El efecto del tiempo puede ser explicado porque los anfípodos tienen más oportunidades de interactuar entre sí. En cuanto a la temperatura, se sabe que existe una relación positiva entre ella y la actividad reproductiva de los anfípodos (Strong 1972). En general, el efecto de las covariables no fue importante para ser considerado en el análisis del éxito del amplexo.

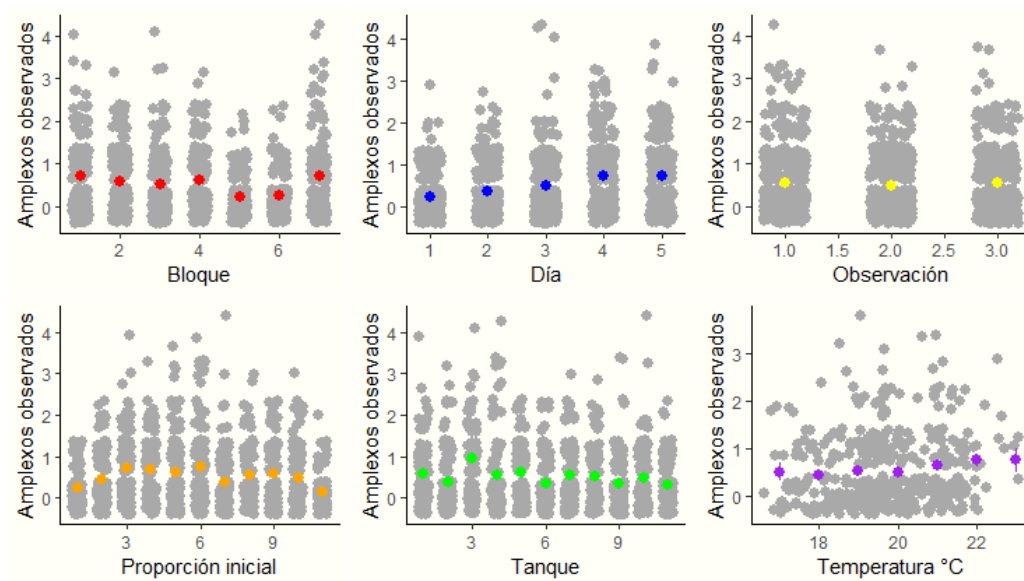


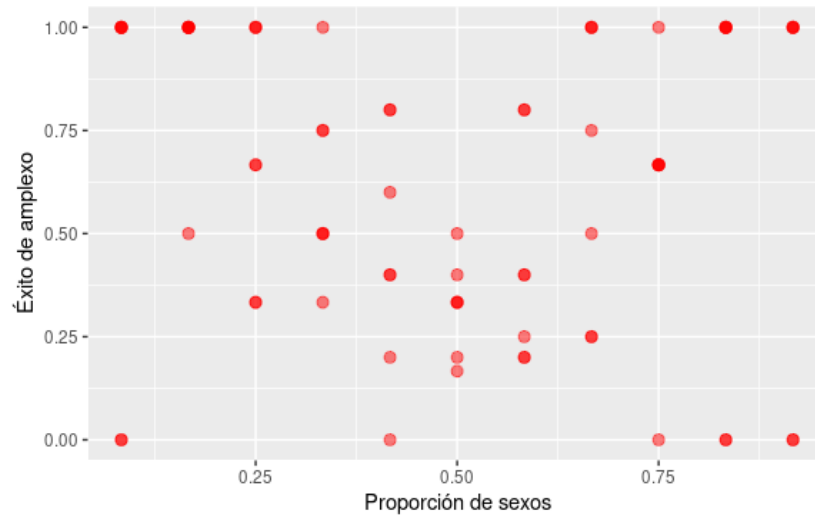
Figura 13. El efecto de las covariables en el número de amplexos observados. Los puntos grises representan los datos crudos y los puntos de colores con líneas verticales representan el promedio de los datos ± 1 desviación estándar del promedio.

7.2.3. Éxito y duración del amplexo

La curva de los resultados experimentales sigue el mismo patrón de disminución del éxito del amplexo cuando la proporción de sexos es igual a 0.5 (Figura 14). Para evaluar el éxito del amplexo en función de la proporción de sexos, utilicé el registro que obtuve el día que cada experimento fue concluido, ya que ese registro es el más confiable respecto al número de amplexos ocurridos en cada tanque experimental. Para tener una idea de la bondad del ajuste del modelo a los datos experimentales, procedí a comparar ambas curvas en una sola gráfica.

Aunque el modelo de simulación (Figura 10) y los datos siguen el mismo patrón (Figura 14b), inicialmente aquel no se ajustó con precisión a los datos experimentales (Figura 15). Originalmente sólo incluí el éxito del amplexo en el modelo de simulación, aunque también había registrado el número de parejas concordantes (Figura 16). No lo consideré como un parámetro del modelo, pues la curva parecía reflejar muy bien el patrón que estaba buscando. Así que hice la modificación correspondiente ponderando el éxito del amplexo con el número de parejas concordantes, y con ello conseguí un mejor ajuste del modelo de simulación. Puesto que el número de parejas concordantes aumenta cuando la proporción de sexos se sesga, el efecto de la proporción de sexos en el éxito del amplexo se acentúa y el modelo de simulación se ajusta con mejor precisión a los datos experimentales (Figura 17).

(a) Datos crudos del éxito del amplexo.



(b) Curva ajustada de los datos.

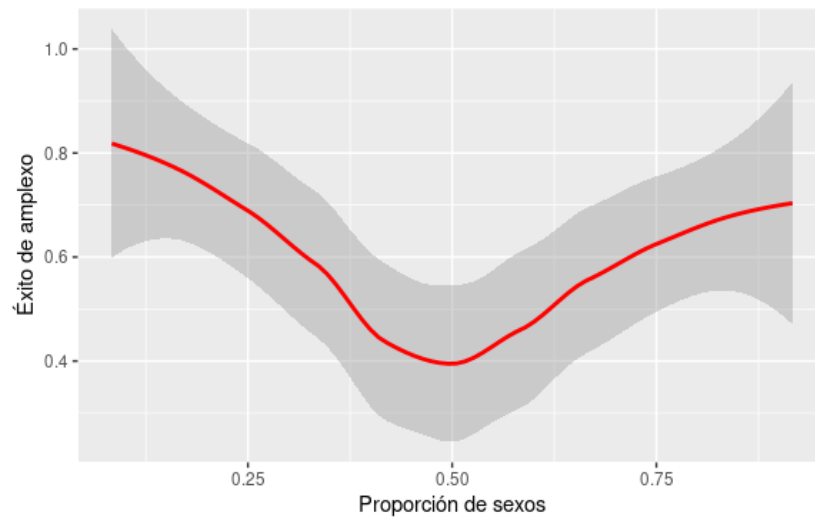


Figura 14. El éxito del amplexo observado en función de la proporción de sexos. En el panel 14a están representados los datos crudos observados ($n = 7$ para cada proporción de sexos). El nivel de transparencia indica la densidad de datos en un punto. Para ver el patrón que siguen estos datos, utilicé un modelo de regresión local ajustado a ellos (panel 14b).

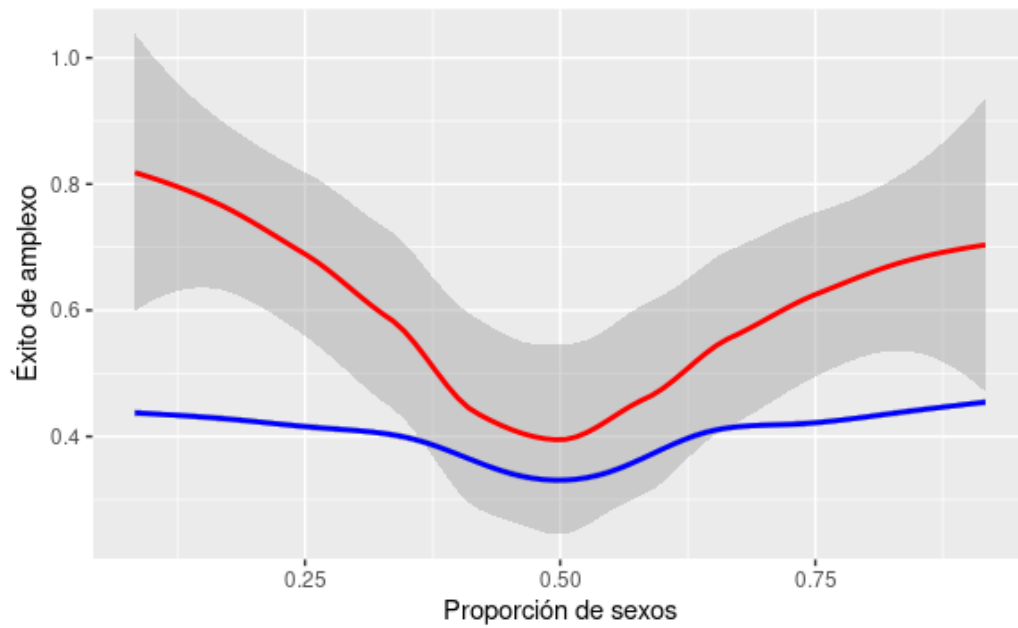


Figura 15. Modelo desajustado a los datos. Se puede apreciar que el modelo de simulación (curva azul) no tiene un buen ajuste a los datos experimentales (curva roja) ya que cae fuera de los intervalos de confianza (banda gris).

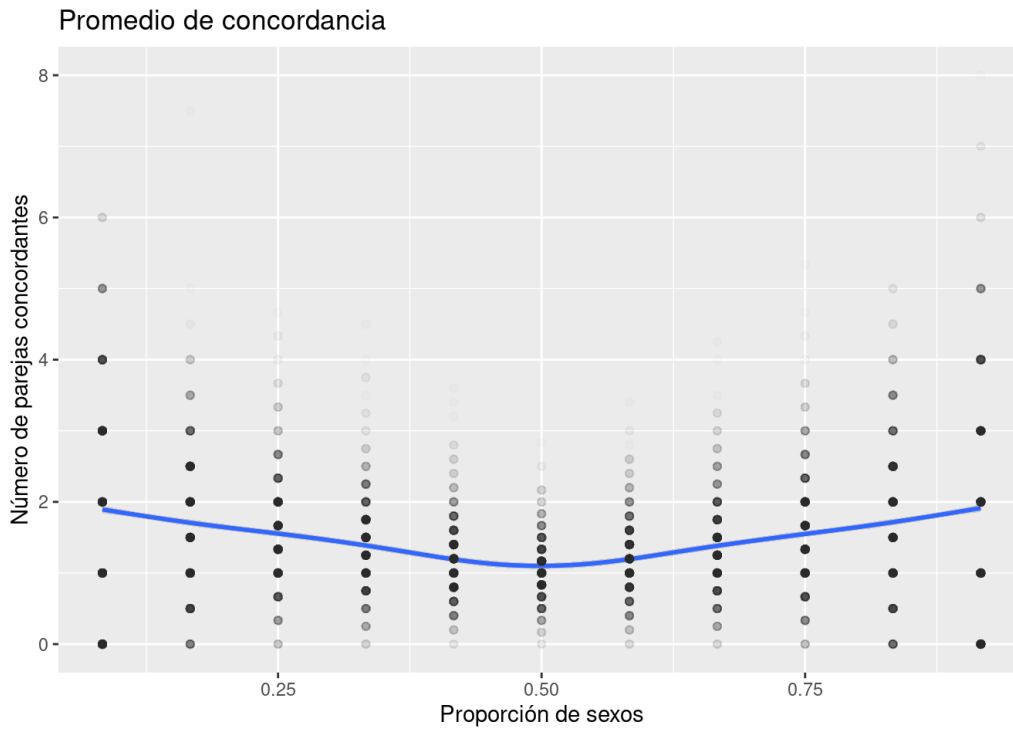


Figura 16. El número de parejas concordantes. Para determinar si un par de anfípodos era concordante, use un rango pequeño de diferencias de tamaño corporal entre los anfípodos emparejados ($0.45\text{mm} \pm 0.20\text{mm}$). El número de parejas concordantes equivale al número de oportunidades que tiene un anfípodo para formar amplexo .

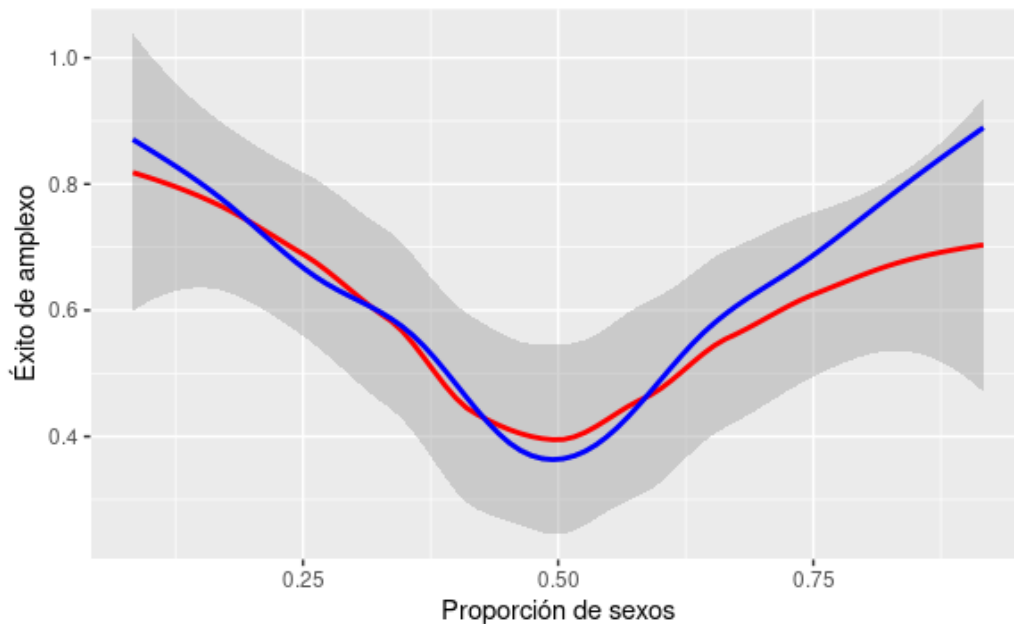


Figura 17. El modelo ajustado a los datos experimentales. Al actualizar los valores en la simulación (tamaño promedio de los anfípodos y diferencia promedio de tamaños de los anfípodos en amplexo) e incluir el número promedio de parejas concordantes como un parámetro adicional del modelo, la curva obtenida por la simulación (curva azul) se ajusta con precisión a los datos experimentales (curva roja).

La curva empírica del éxito del amplexo en función de la proporción de sexos es ligeramente asimétrica. Aunque el éxito del amplexo aumenta cuando la proporción de sexos se sesga, aumenta un poco más cuando se sesga hacia las hembras que cuando se sesga hacia los machos. Esta asimetría puede ser explicada por la acción de dos factores: en primer lugar, se sabe que el potencial reproductivo de los machos es mayor que el de las hembras, por lo que los machos pueden volver a entrar en amplexo más rápido que las hembras. En segundo lugar, la duración del amplexo es mayor

cuando la proporción de sexos está ligeramente sesgada hacia las hembras (0.33), y tiende a disminuir cuando se aleja de este valor (Figura 18).

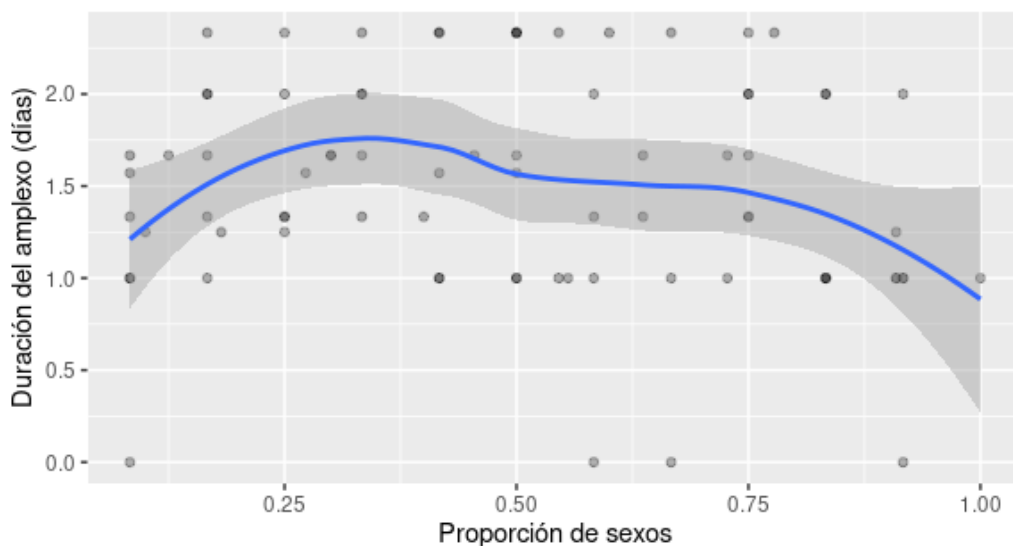


Figura 18. Duración del amplexo. Además de analizar el éxito del amplexo analicé su duración. El aumento en la duración del amplexo observado cuando la proporción de sexos esta ligeramente sesgada hacia las hembras, implica que el amplexo es mas estable en esa condición. La asimetría de la curva sugiere que la resolución de los conflictos de interés intersexual e intrasexual fluctúa en función de la proporción de sexos.

La tendencia de los datos respecto a la duración del amplexo no es muy clara, ya que ésta muestra variación, lo que me impidió encontrar un patrón definido de los datos. Sin embargo, en términos generales parece que la duración del amplexo disminuye cuando la proporción de sexos se sesga hacia los machos.

8. Discusión

Usualmente se cree que los crustáceos son animales con comportamientos simples, carentes de interacciones complejas. Sin embargo, éstos pueden ser utilizados como modelos para poner a prueba hipótesis acerca de la sociabilidad y sexualidad en un amplio rango taxonómico (Duffy y Thiel 2007). La utilización de un modelo de simulación permitió poner a prueba la hipótesis de apareamiento concordante por tamaño para explicar los resultados experimentales obtenidos por Beristain-Castillo y Cols. 2023. Dichos resultados indican que una proporción insesgada de los sexos resulta en una disminución en la probabilidad de hallar anfípodos en amplexo. La caída del éxito del amplexo cuando la proporción de sexos se acerca a 0.5 se debe a la disminución de anfípodos concordantes en tamaño corporal. Además, al clasificar las simulaciones por los tamaños de los anfípodos (Figura 11; 9 tipos de simulaciones) se pudo apreciar que las poblaciones de anfípodos de tamaño mediano no muestran una disminución considerable en el éxito del amplexo. Lo contrario sí ocurre en las simulaciones con poblaciones de anfípodos dispares en tamaño (machos pequeños con hembras grandes y machos grandes con hembras pequeñas). Este hallazgo podría indicar la presencia de una selección natural de tipo estabilizadora (Fox y Wesneat 2010) del tamaño corporal de los crustáceos que presentan este comportamiento.

Aunque el modelo de simulación explica por sí mismo los hallazgos previos (Beristain-Castillo y Cols. 2023), los experimentos realizados en este estudio sirvieron para corroborar su consistencia con la hipótesis planteada. El análisis del efecto de las covariables sirvió para remover fuentes de variación que pudieran mezclarse con los efectos de los tratamientos; en general su efecto fue limitado, lo que sugiere que su influencia fue nula en la respuesta de interés. Por otra parte, estos efectos ya han sido descritos en estudios anteriores (Kruschwitz 1978; Othman y Pascoe 2001; Strong 1972), y solo la proporción de sexos y la fuerza física relativa de los individuos (i.e. diferencia de tamaños corporales) se han establecido como factores determinantes del éxito del amplexo (Yamamura y Jormalainen 1996).

Un hallazgo destacable en el estudio fue la mortalidad diferencial entre los sexos de los anfípodos utilizados. Los resultados muestran que la mortalidad de los anfípodos machos casi dobló el tamaño de la mortalidad de las hembras. Tal disparidad coincide con la mortalidad reportada por Beristain-Castillo y Cols. 2023 para la misma subpoblación. La mortalidad diferencial podría estar favoreciendo una proporción de sexos sesgada hacia las hembras en la población de *H. azteca* usada en este estudio.

Considerando que la mortalidad fue baja y que cada experimento duró sólo 7 días, puede decirse que no hubo un cambio considerable en la proporción de sexos inicial en comparación con la proporción de sexos al final de cada experimento. Aún así, para analizar el efecto de la proporción de sexos

sobre el éxito del amplexo utilicé solamente la observación final, porque era la única observación precisa. Es importante considerar que la mortalidad diferencial podría dificultar el estudio de la proporción de sexos en experimentos de mayor duración, ya que eventualmente la proporción de sexos llegaría a ser diferente de la proporción de sexos inicial.

Aunque una proporción de sexos equilibrada es una característica común en las especies con reproducción sexual (Darwin 1859, Fisher 1930), la proporción de sexos observada en las especies de los crustáceos está generalmente sesgada en favor de uno u otro sexo (Wenner 1972). Los mecanismos que se han propuesto para explicar proporciones de sexos sesgadas en los crustáceos pueden dividirse en dos tipos: los mecanismos evolutivos que sesgan la proporción primaria de sexos (proporción de sexos de los huevos fertilizados o larvas eclosionadas), y los mecanismos ecológicos que sesgan la proporción de sexos a lo largo del crecimiento y desarrollo de los organismos, aunque también podría tratarse de un artefacto del método de muestreo seleccionado (Ewers-Saucedo 2019). Los factores que podrían explicar las proporciones de sexos sesgadas, observadas en los crustáceos adultos son: una mortalidad diferencial, el sesgo en los métodos de muestreo, la heterogeneidad espacial, y los cambios estacionales (Ewers-Saucedo 2019). Con base en los resultados de este estudio podría decirse que hay un factor adicional que favorece proporciones de sexos sesgadas en los crustáceos: apareamiento concordante por tamaño.

Los hallazgos en este estudio acusan la necesidad de estudiar la proporción de sexos en *H. azteca* a profundidad. La proporción de sexos observada en diferentes poblaciones de *H. azteca* varía de proporciones de sexos sesgadas hacia las hembras, equilibradas, a proporciones sesgadas hacia los machos (Strong 1973). La proporción de sexos en la población de *H. azteca* usada en este estudio varía ampliamente, lo que permitió estudiarla de manera fortuita (Beristain-Castillo y Cols. 2023). Todas estas observaciones indican que la proporción de sexos podría estar fluctuando ampliamente en espacio y tiempo, aunque no existe información sobre la proporción de sexos primaria debido a la extrema variedad de mecanismos de determinación sexual de los crustáceos (Ye y Cols. 2023).

El enfoque utilizado en este estudio provee evidencia de la importancia del apareamiento concordante para el éxito del amplexo en *H. azteca*. El ajuste conseguido con el modelo de simulación a los datos experimentales evidencía la capacidad limitada que tienen estos anfípodos para ajustar sus preferencias por individuos dispares en tamaño corporal. La limitación se puede ver en la disminución del éxito del amplexo que va de 0.8 y 0.7 en promedio cuando la proporción de sexos está sesgada hacia las hembras y los machos, respectivamente, a 0.33 cuando la proporción de sexos es de 0.5 en los datos observados. Es preciso enfatizar que esta situación se presenta cuando el número de machos y hembras es igual, lo que en principio haría pensar en la formación de un número igual de amplexos. Las implicaciones

de esta disminución en el éxito del amplexo podrían tener un impacto importante en la continuidad de esta especie si la proporción de sexos siguiera el principio de Fisher (Fisher 1930). El principio es un modelo que explica porqué la proporción de sexos es de 0.5 en la mayoría de las especies que se reproducen sexualmente.

El estudio que aquí presento demuestra que la proporción de sexos modula el éxito del amplexo por medio del apareamiento concordante por tamaño en *H. azteca*, pero aún no se sabe con certeza la razón del mismo. Una hipótesis acerca de este patrón de apareamiento es la restricción mecánica que pueden experimentar las parejas dispares en tamaño para formar amplexo, como ocurre en el anfípodo *Gammarus pulex* (Adams y Greenwood 1983), aunque ya se ha observado que también opera un mecanismo de elección de pareja (Wen 1993). Estos dos mecanismos no son mutuamente excluyentes por lo que es posible que ambos ocurran simultáneamente, pero es necesario hacer más estudios para poner a prueba esta u otras hipótesis.

La duración del amplexo en función de la proporción de sexos no se había estudiado de forma experimental porque la única forma de determinarla requeriría de una observación continua a lo largo de varios días, lo cual es muy complicado de llevar a cabo. El método para estimar la duración del amplexo utilizado en este estudio ha demostrado ser preciso, pero hay otros

factores participantes. Ésto se puede ver en parte por la variación amplia que tienen los datos (Figura 18). La duración del amplexo parece ser mayor cuando la proporción de sexos está ligeramente sesgada hacia las hembras (proporción de sexos = 0.33), y disminuye gradualmente cuando la proporción de sexos se aleja de este valor. Desde una perspectiva teórica la duración óptima del amplexo es diferente para ambos sexos, y puede resolverse con una duración intermedia (Yamamura y Jormalainen 1996). Desde la perspectiva de los machos, el tiempo óptimo de resguardo óptimo sería menor cuando la proporción de sexos está sesgada hacia las hembras, y aumentaría cuando la proporción de sexos está sesgada hacia ellos. En cambio para las hembras esta relación sería inversa (Yamamura y Jormalainen 1996). Los datos experimentales del estudio descrito aquí muestran que la duración del amplexo sigue un patrón más conveniente para los intereses de las hembras, lo que confirma que tienen un rol decisivo en la formación del amplexo (Jormalainen 1998; Sparkes y Keogh 2000).

9. Conclusión

Con base en los resultados de esta investigación, puedo concluir que el sistema de apareamiento concordante por tamaño corporal explica la disminución de la probabilidad de la formación de amplexos en el anfípodo *H. azteca*

Referencias

- Adams, J., & Greenwood, P. J. (1983). Why Are Males Bigger than Females in Pre-Copula Pairs of *Gammarus pulex*? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *13*(4), 239-241.
- Beristain-Castillo, E., Salazar-Bautista, J. L., & Moyaho, A. (2023). Guarding success of the rarest sex in the amphipod *Hyalella azteca* Sausure, 1858 (Amphipoda: Hyalellidae). *Journal of crustacean biology*.
- Borowsky, B. (1986). Laboratory observations of the pattern of reproduction of *Elasmopus levis* (Crustacea: Amphipoda). *Marine Behaviour and Physiology*, *12*(4), 245-256. <https://doi.org/10.1080/10236248609378651>
- Conlan, K. E. (1991). Precopulatory mating behavior and sexual dimorphism in the amphipod Crustacea. *Hydrobiologia*, *223*, 255-282.
- Cooper, W. E. (1965). Dynamics and Production of a Natural Population of a Fresh-Water Amphipod, *Hyalella azteca*. *Ecological Monographs*, *35*, 377-394.
- Darwin, C. (1859). La variación en la naturaleza. En *El origen de las especies*.
- Duan, Y., Guttman, S. I., Oris, J. T., & Bailer, A. J. (2000). Genetic structure and relationships among populations of *Hyalella azteca* and *H. montezuma* (Crustacea: Amphipoda). *Journal of the North American Benthological Society*, *19*(2), 308-320. <https://www.jstor.org/stable/10.2307/1468073>

- Duffy, J. E., & Thiel, M. (2007). En *Evolutionary Ecology of Social and Sexual Systems: Crustaceans as Model Organisms*.
- Ewers-Saucedo, C. (2019). Evaluating reasons for biased sex ratios in Crustacea. *Invertebrate Reproduction and Development*, 63, 222-230.
- Fisher, R. (1930). Sexual reproduction and sexual selection. En *The genetical theory of natural selection*.
- Fox, C. W., & Wesneat, D. F. (2010). Adaptation. En *Evolutionary behavioral ecology*.
- Hickman, C., & Larson, A. (2021). Crustáceos. En *Principios integrales de zoología*.
- Jormalainen, V. (1998). Precopulatory Mate Guarding in Crustaceans: Male Competitive Strategy and Intersexual Conflict. *The Quarterly Review of Biology*, 73(3), 275-304.
- Krebs, J. R., & Davies, N. B. (1993). *An introduction to behavioural ecology* (Third edition). Blackwell Scientific Publications.
- Kruschwitz, L. G. (1978). Environmental factors controlling reproduction of the amphipod *Hyaella azteca*. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, 16-21.
- Lange, S., & Schram, F. R. (1999). Evolución y filogenia de los crustáceos. *Boletín de la sociedad entomológica aplicada*, 26, 235-254.
- Martin, P., & Bateson, P. (2007). Recording methods. En *Measuring behaviour*.

- Meester, R. (2008). Random variables and random vectors. En *A natural introduction to probability theory*.
- Othman, M. S., & Pascoe, D. (2001). Growth, Development and Reproduction of *Hyalella azteca* (Saussure, 1858) in Laboratory Culture. *Crustaceana*, *74*(2), 171-181.
- R Core Team. (2024). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- RStudio Team. (2024). *RStudio: Integrated Development Environment for R*. RStudio, PBC. Boston, MA. <http://www.rstudio.com/>
- Saussure, H. (1858). Mémoire sur divers Crustacés nouveaux des Antilles et du Mexique. *Mémoires de la Société Physique et d'Histoire naturelle de Genève*. <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=sourcedetails&id=156078>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, *9*, 671-675. <https://doi.org/doi:10.1038/nmeth.2089>
- Shedden, M. (1983). The reproductive biology and ecology of *gammarus duebeni*(crustacea: amphipoda) in southern England. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*.
- Sparkes, T. C., & Keogh, D. P. (2000). female resistance and male preference in a stream-dwelling isopod: effects of female molt characteristics. *Behavioural Ecology and Sociobiology*, *47*, 145-155.

- Strong, D. R. (1972). Life History Variation Among Populations of an Amphipod (*Hyalella Azteca*). *Ecology*, *53*(6), 1103-1111.
- Strong, D. R. (1973). Amphipod Amplexus, The Significance of Ecotypic Variation. *Ecology*, *54*(6), 1383-1388.
- Trivers, R. L. (1972). Parental investment and sexual selection. *University of Chicago Press*.
- Väinölä, R., Witt, J. D. S., & Grabowski, M. (2008). Global diversity of amphipods (amphipoda; crustacea) in freshwater. *hydrobiologia*.
- Wen, Y. H. (1993). Sexual Dimorphism and Mate Choice in *Hyalella azteca* (Amphipoda). *The American Midland Naturalist*, *129*, 153-160.
- Wenner, A. M. (1972). Sex Ratio as a Function of Size in Marine Crustacea. *The University of Chicago Press for The American Society of Naturalists*, *106*, 321-350.
- Wilhelmi, R. M. (2004). Permutaciones, variaciones y combinaciones. En *Combinatoria y probabilidad*.
- Witt, J. D. S., Threlhoff, D. L., & Hebert, P. D. (2006). DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. *Mol Ecol*, *15*(10), 3073-3082.
- Yamamura, N., & Jormalainen, V. (1996). Compromised strategy resolves intersexual conflict over pre-copulatory guarding duration. *Evolutionary Ecology*, *10*(6), 661-680.

Ye, Z., Bishop, T., Wang, Y., Shahriari, R., & Lynch, M. (2023). Evolution of sex determination in crustaceans. *Marine Life Science and Technology*, 5, 1-11.