



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“DINÁMICA TEMPORAL Y EFECTOS INDIRECTOS DEL
REFORZAMIENTO DEL AISLAMIENTO REPRODUCTIVO
EN DOS ESPECIES DE CABALLITOS DEL DIABLO”**

Tesis para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta:

BIÓL. ALBA LETICIA JUÁREZ JIMÉNEZ

Directora:

DRA. PALESTINA GUEVARA FIORE

Codirectora:

DRA. ROSA ANA SÁNCHEZ GUILLÉN



Enero 2026

H. Puebla de Z. a 20 de enero de 2026

Asunto: Voto Aprobatorio

Comité Académico del Posgrado

PRESENTE

Por medio de la presente se hace constar que se revisó y aprobó la tesis titulada:

“Dinámica temporal y efectos indirectos el reforzamiento del aislamiento reproductivo en dos especies de caballitos del diablo”

Que presenta el (la) estudiante **Alba Leticia Juárez Jiménez** con número de matrícula **223470516**, aspirante al grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**, de la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: **“Ecología y aprovechamiento de recursos bióticos”**, notificamos que la tesis reúne los requisitos y se aprueba para su réplica oral en el examen de grado.

Por lo tanto, emitimos los **VOTOS APROBATORIOS** como miembros del **Comité de Jurado de Examen de Grado** como a continuación se indica:

Tutor Interno: Dr. José Antonio González Oreja

Tutor Externo: Dr. Oscar Ríos Cárdenas

Revisor: Dr. Luis Rodrigo Arce Valdez

Agradecemos de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Heroica Ciudad de Puebla, 15 de diciembre de 2025

Asunto: Carta de No Plagio

Yo, Alba Leticia Juárez Jiménez, con número de estudiante 223470516, adscrita a la Maestría en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Biológicas perteneciente a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, declaro bajo protesta de decir verdad que el trabajo titulado:

“DINÁMICA TEMPORAL Y EFECTOS INDIRECTOS DEL REFORZAMIENTO DEL AISLAMIENTO REPRODUCTIVO EN DOS ESPECIES DE CABALLITOS DEL DIABLO”

es de mi autoría y constituye producto original de mi propio esfuerzo intelectual y académico.

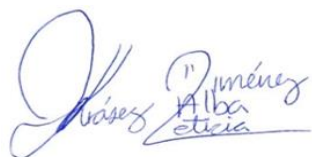
En tal sentido, cuando por necesidades propias del trabajo desarrollado y para clarificar la redacción, ha sido conveniente utilizar textos, imágenes, datos, tablas, diseños o gráficas que pertenecen a otros autores, se han agregado las correspondientes citas y referencias bibliográficas para remitir a la fuente original de donde se tomaron.

Asimismo, certifico que he respetado en todo momento las normas éticas y académicas relacionadas con el uso de información ajena y la propiedad intelectual.

Estoy consciente de que, en caso de detectarse plagio o fraude académico en el contenido de mi tesis, la institución académica está facultada para invalidar mi trabajo y retirar cualquier grado o reconocimiento obtenido, además de aplicar las sanciones correspondientes, conforme a la normativa vigente.

Me responsabilizo completamente por el contenido del presente trabajo y reafirmo mi compromiso con la integridad académica.

Atentamente,



Alba Leticia Juárez Jiménez

Firma

Matrícula: 223470516

Programa: Maestría en Ciencias Biológicas

Institución: Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Correo: aljuarezjimenez@gmail.com

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a mi **familia**: Pedro Juárez, Lilia Jiménez, Ana Juárez, Izel Gutiérrez, Itzá Gutiérrez y Miguel Gutiérrez. Gracias por ser mi base y mi impulso; por su amor infinito, por sostenerme en mis desaciertos y por cada palabra de aliento. Gracias por enseñarme a confiar en mí y a no abandonar mis metas, aun cuando el camino parecía incierto.

A la **Maestría en Ciencias Biológicas (MCB)** de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado en esta institución. Este programa se encuentra incluido en el **Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC)**, con clave **005671**, lo cual fue fundamental para el desarrollo académico y científico de este trabajo.

A la **Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI)**, por el apoyo económico otorgado a través de la beca de maestría, que hizo posible la realización de mis estudios de posgrado y el desarrollo del presente proyecto de investigación.

A la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP)** de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por los apoyos otorgados durante mi formación académica y para el proceso de desarrollo y conclusión de este trabajo.

A la **Dra. Palestina Guevara Fiore**, por su guía, apoyo y confianza. Gracias por motivarme cuando más lo necesitaba; sus impulsos y ánimos me han llevado a donde nunca imaginé llegar.

A la **Dra. Rosa Ana Sánchez Guillén**, mil gracias por permitirme, en tan poco tiempo, ser parte de su laboratorio y de sus proyectos; por los conocimientos, el apoyo, la paciencia y por mostrarme la ciencia desde otra perspectiva y desde otra latitud.

A los doctores **José Antonio González Oreja** y **Óscar Ríos Cárdenas**, por formar parte de mi comité, por sus comentarios, disposición y por acompañar este proceso.

Al **Dr. Rodrigo Arce Valdés**, por su lectura y valiosas observaciones a esta tesis.

Al **Dr. Adolfo Cordero Rivera**, por su recibimiento durante mi estancia, por compartirme su experiencia y por el apoyo brindado.

A la **Dra. Janet Nolasco Soto**, por su apoyo y acompañamiento durante mi estancia en el INECOL, así como por su orientación tanto en los trámites administrativos como durante el desarrollo de los experimentos, los cuales fueron fundamentales para la realización de este proyecto.

Al **Biól. Jesús Ramsés Cruz Ríos**, por su invaluable apoyo en el trabajo de campo, cuya colaboración fue clave para el desarrollo de gran parte de este estudio.

Al apoyo de herramientas de inteligencia artificial (ChatGPT, OpenAI), utilizadas como asistencia en la mejora de la redacción, corrección ortográfica y de estilo del manuscrito, así como en la orientación para la búsqueda de literatura científica relevante y la ayuda para citar paquetes de *R*. Todas las ideas, análisis, resultados, interpretaciones y redacción final presentadas en este trabajo han sido realizadas por la autora.

Al **M. en C. Enrique González Soriano**, por motivarme a continuar mis estudios, por el conocimiento compartido y por despertar mi interés profundo por el orden *Odonata*.

A lo largo de este camino conocí a personas maravillosas de distintos lugares (México, Cuba, España, Colombia), y cada una dejó una huella especial en mí. Desearía mencionar a cada una, porque su amistad, el apoyo personal y académico, las risas y las nuevas formas de ver la vida hicieron de esta etapa algo memorable. Qué fortuna haber coincidido con ustedes; llevan una parte de mi corazón en cada recuerdo de este recorrido. No todos nos hicimos cercanos, pero cada coincidencia aportó algo valioso a este viaje.

A quienes me han acompañado desde hace tiempo y continúan a mi lado, así como a quienes llegaron a mi vida de distintas formas, enseñándome a reconocer mi valor y mis metas. Gracias por mostrarme lo que merezco, lo que puedo lograr y quién quiero ser. Gracias por las lecciones, por el aprendizaje emocional y por recordarme que crecer también implica soltar.

Contenido	
RESUMEN	9
RESUMEN VISUAL.....	11
INTRODUCCIÓN	12
Aislamiento reproductivo.....	12
La hibridación	12
El reforzamiento del aislamiento reproductivo.....	13
El género <i>Ischnura</i> como modelo de estudios evolutivos.....	14
Especies de estudio: <i>Ischnura elegans</i> e <i>Ischnura graellsii</i>	15
ANTECEDENTES	16
JUSTIFICACIÓN.....	20
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	21
HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	21
Hipótesis general	21
Hipótesis específicas	21
PREDICCIONES	22
Predicciones específicas	22
Dirección del cruce y componente temporal del reforzamiento.....	22
OBJETIVOS.....	22
Objetivo general.....	22
Objetivos específicos	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
1. Muestreos y observación del comportamiento reproductivo.....	24
2. Estima de la intensidad de las barreras de aislamiento reproductivo	25
3. Aislamiento reproductivo acumulado total	30
4. Fiabilidad del método de estima del aislamiento mecánico para la formación del tándem.....	30
5. Reforzamiento temporal y aislamiento en simpatría.....	32
6. Efectos del reforzamiento sobre cruces coespecíficos	34
RESULTADOS	36

1. Datos recolectados durante el experimento para la evaluación del aislamiento reproductivo	36
2. Fiabilidad del método de estima del aislamiento mecánico para la formación del tándem.....	37
3. Reforzamiento temporal y aislamiento en simpatria	41
a) <i>Aislamiento precópula mecánico: en la formación del tándem</i>	41
b) <i>Aislamiento postcópula gamético: reducción de la fecundidad</i>	43
c) <i>Aislamiento postcópula gamético: reducción de la fertilidad</i>	43
d) <i>Aislamiento acumulado total</i>	45
4. Efectos del reforzamiento sobre cruces coespecíficos	46
a) <i>Aislamiento precópula: mecánica en la formación del tándem</i>	46
b) <i>Aislamiento postcópula gamética: reducción de la fecundidad</i>	47
c) <i>Aislamiento postcópula gamética: reducción de la fertilidad</i>	48
DISCUSIÓN	50
1. Fiabilidad del método de estima del aislamiento mecánico para la formación del tándem.....	50
2. Reforzamiento temporal y aislamiento en simpatria	51
a) <i>Aislamiento precópula: mecánico en la formación del tándem</i>	51
b) <i>Aislamiento postcópula gamética: reducción de la fecundidad y reducción de la fertilidad</i>	52
3. Efectos del reforzamiento sobre cruces coespecíficos	54
Implicaciones evolutivas en la conservación	56
CONCLUSIONES	57
Fiabilidad del método de estima del aislamiento mecánico para la formación del tándem	57
Reforzamiento temporal y aislamiento en simpatria	57
Efectos del reforzamiento sobre cruces coespecíficos	57
Implicaciones evolutivas y de conservación	58
SÍNTESIS FINAL	59
LITERATURA CITADA.....	60
ANEXO 1. Pruebas de aislamiento mecánico por subgrupo	73
ANEXO 2. Contribución del individuo como efecto aleatorio en los modelos mixtos	77

ANEXO 3. Tablas de contrastes correspondientes a las gráficas de aislamiento reproductivo 78

ANEXO 4. Intervalos de confianza 88

ANEXO 5. Gráficas complementarias 91

ANEXO 6. Divulgación de resultados 95

DINÁMICA TEMPORAL Y EFECTOS INDIRECTOS DEL REFORZAMIENTO DEL AISLAMIENTO REPRODUCTIVO EN DOS ESPECIES DE CABALLITOS DEL DIABLO

RESUMEN

El reforzamiento es un proceso adaptativo en la evolución del aislamiento reproductivo entre especies en simpatria, impulsado por la selección natural para evitar los costos del apareamiento heteroespecífico. Estudios recientes han demostrado que este proceso puede generar patrones asimétricos entre cruces recíprocos, pero todavía existe un vacío de conocimiento sobre cómo estas asimetrías se manifiestan a lo largo del tiempo y cuáles son sus efectos indirectos sobre el aislamiento reproductivo entre poblaciones coespecíficas. El presente estudio investiga el aislamiento reproductivo entre *Ischnura elegans* e *I. graellsii* (Odonata: Coenagrionidae). *Ischnura elegans*, distribuida desde Irlanda hasta Japón, e *I. graellsii*, localizada en la península ibérica y el norte de África, solapan sus áreas de distribución en el norte y centro de España, formando una **extensa región híbrida**. En la zona noroeste de esta región híbrida, se ha detectado **reforzamiento** de una barrera mecánica —precópula—, particularmente en los cruces entre machos de *I. graellsii* y hembras de *I. elegans*, donde se reduce significativamente el éxito en la formación del tándem, que representa el primer contacto físico entre las genitalias secundarias. En contraste, en el cruce recíproco —entre machos de *I. elegans* y hembras de *I. graellsii*—, se ha observado un relajamiento de barreras postcópula gaméticas como la oviposición, la fecundidad y la fertilidad. Este trabajo examina las barreras reproductivas en la zona híbrida del noroeste de España, y persigue tres objetivos principales: (1) determinar el número mínimo de interacciones por individuo necesario para obtener estimaciones confiables de la barrera mecánica implicada en la formación del tándem; (2) analizar la dinámica temporal del aislamiento reproductivo precigótico para inferir la intensidad, dirección y velocidad del reforzamiento; y (3) evaluar los efectos indirectos del reforzamiento a nivel intraespecífico. Nuestros resultados mostraron que dos interacciones por individuo son suficientes para estimar de manera confiable el éxito en la formación del tándem. En cuanto al segundo objetivo, el análisis temporal reveló la presencia de reforzamiento en ambos cruces recíprocos, aunque con intensidades diferentes, mostrando una dirección consistente hacia el aumento del aislamiento reproductivo y una velocidad que indica un proceso evolutivo relativamente acelerado en la zona híbrida. Finalmente, en relación con el tercer objetivo, se identificaron efectos indirectos del reforzamiento a nivel intraespecífico, específicamente en las barreras mecánica, de fecundidad y de fertilidad que influyen en las interacciones dentro de las poblaciones involucradas. El estudio de estas dinámicas resulta especialmente relevante en el contexto del cambio climático, dado que las alteraciones

en la distribución geográfica provocadas por el calentamiento global están facilitando el contacto entre especies previamente alopátricas, generando nuevas zonas de simpatría, especialmente en insectos.

Palabras clave: Zona híbrida, cruces recíprocos, efectos intraespecíficos, *Ischnura elegans* e *Ischnura graellsii*

RESUMEN VISUAL



INTRODUCCIÓN

Aislamiento reproductivo

El flujo genético, o intercambio de genes entre poblaciones, es una fuerza evolutiva fundamental que modifica las frecuencias alélicas tanto dentro como entre especies estrechamente relacionadas (Petit & Excoffier, 2009; Sánchez-Guillén et al., 2022). Las barreras reproductivas pueden impedir este flujo genético, aislando completamente especies entre sí, o permitiendo sólo un intercambio limitado (Koopman, 1950; Sánchez-Guillén et al., 2022). Estas barreras se clasifican según el momento en que actúan. Las barreras precigóticas precópula (geográficas, etológicas o mecánicas o mecánico-táctiles) actúan antes del apareamiento (Coyne & Orr, 2004). Las barreras precigóticas postcópula actúan después del apareamiento y éstas previenen la formación del cigoto (precigóticas gaméticas), y las barreras postcigóticas actúan después de la formación del cigoto —observada en la aptitud de organismos híbridos—, reduciendo la viabilidad (en la generación F_1), fertilidad y vigor híbrido (en la generación F_2) (Sánchez-Guillén et al., 2014; Comeault & Matute, 2016). Frecuentemente, la intensidad de estas barreras es asimétrica en cruces recíprocos entre dos especies, lo que significa que varía dependiendo de si el macho de la especie A se apareó con la hembra de la especie B y viceversa (Sánchez-Guillén et al., 2014; Turelli & Moyle, 2007).

La hibridación

La hibridación se produce cuando las barreras reproductivas no impiden el flujo genético entre poblaciones de diferentes especies, usualmente entre especies incipientes, lo que resulta en la formación de híbridos (Rhymer & Simberloff, 1996). La hibridación es un proceso natural, considerándose común en plantas, en las que 25% hibridan, mientras que en animales es un poco menos frecuente, solamente el 10% se ven envueltos en procesos de hibridación (Mallet, 2005). Los avances en las tecnologías de secuenciación masiva han evidenciado que la hibridación es un fenómeno más común de lo previamente estimado, y en particular, han resaltado su relevancia como fuerza evolutiva en diversos linajes, especialmente en plantas (Folk et al., 2018; Soltis & Soltis, 2009; Walker, 1958; Whitney et al., 2010), insectos (Bock, 1984; Hinojosa et al., 2022; Kuznetsova et al., 2021; Mallet et al., 2007; Matute & Ayroles, 2014; Solano et al., 2018), aves (Drury et al., 2020; Justyn et al., 2020; Ottenburghs, 2023; Randler, 2006) y mamíferos (Adavoudi & Pilot, 2022; Deo et al., 2006). Actualmente, la hibridación es considerada como una fuerza evolutiva con numerosas consecuencias que van desde la extinción a la diversificación de especies. La hibridación, entre otros procesos, incluye la adaptación impulsada por la introgresión genética, facilitando la adaptación a nuevos nichos ecológicos (Arnold et al., 1999; Helén, 2016).

El reforzamiento del aislamiento reproductivo

Las incompatibilidades genéticas de tipo Bateson-Dobzhansky-Muller, adquiridas durante periodos de alopatría, pueden reducir la viabilidad o el éxito reproductivo de los híbridos y generar costos de hibridación que favorecen el reforzamiento del aislamiento reproductivo (Dobzhansky, 1937; Coyne & Orr, 2004).

El reforzamiento ocurre cuando la hibridación entre dos especies incipientes produce híbridos de baja aptitud y la selección natural elimina a los híbridos maladaptativos, lo que favorece características que reducen este tipo de apareamientos. Este proceso suele darse cuando especies estrechamente relacionadas evolucionan en alopatría y entran en contacto secundario (Coyne & Orr, 2004), donde la selección natural favorece rasgos que reducen los costos de la hibridación (Dobzhansky, 1937; Coyne & Orr, 2004; Hopkins, 2013). Convencionalmente, este término hace referencia al aumento en el aislamiento precigótico asociado a la reducción de la producción de híbridos de menor aptitud (Servedio & Noor, 2003; Servedio, 2004; Hoskin et al., 2005; Arce-Valdés et al., 2024). Hoy en día, se cuenta con numerosa evidencia empírica del reforzamiento en taxones tan diversos como plantas (Kay & Schemske, 2008; Hopkins, 2013), insectos (Nosil et al., 2003; Lukhtanov et al., 2005; Matute, 2010), vertebrados (Hoskin et al., 2005; Ahamed, 2006; Moran et al., 2018; John & Fuller, 2021), donde este proceso ha sido evaluado comparando la intensidad del aislamiento reproductivo en contextos de alopatría y simpatría. Un mayor aislamiento en simpatría respecto a alopatría, se interpreta como evidencia de reforzamiento.

Sin embargo, son pocos los estudios empíricos que analizan el reforzamiento comparando la intensidad del aislamiento reproductivo a lo largo del tiempo en zonas híbridas naturales (e.g., Jones, 1973; Urbanelli et al., 2014). Un ejemplo notable es el estudio de los mosquitos *Aedes mariae* y *A. zammitii* (Urbanelli et al., 2014), donde se evaluó si la selección natural podía reducir la tasa de hibridación a cero. Tras 25 años de contacto en una zona de simpatría artificial, los autores encontraron que el aislamiento reproductivo seguía siendo incompleto. Este hallazgo sugiere que el reforzamiento puede ser un proceso lento y limitado, influido por factores como la intensidad de la selección, el tiempo de contacto y las características biológicas de las especies involucradas. Estudios de este tipo son especialmente valiosos para comprender por qué el reforzamiento no siempre culmina en aislamiento completo, ya que permiten evaluar el papel de múltiples factores que determinan su dinámica, tales como el tiempo transcurrido desde el contacto secundario, la magnitud de la selección, la tasa de mutación en los genes asociados al aislamiento reproductivo, el flujo génico entre poblaciones (ver Barton & Hewitt, 1985), la deriva genética y la selección sexual (Anderson et al., 2023).

La estrategia complementaria para abordar esta misma pregunta —es decir, cuánto tiempo se requiere para que el aislamiento reproductivo se complete por reforzamiento— es el enfoque experimental en condiciones controladas. Los estudios de selección artificial aplican distintos niveles de selección para estimar la velocidad con que se intensifica el aislamiento reproductivo (ver Matute & Ortiz-Barrientos, 2014). Este enfoque propuesto por Koopman (1950), conocido como el método “*matar al híbrido*”, es también poco frecuente (Higgie et al., 2000; Matute, 2010). Un ejemplo notable que ilustra cómo varía la dinámica del reforzamiento en distintos sistemas es el de *Drosophila yakuba* y *D. santomea*. En este estudio se observó una rápida intensificación del aislamiento reproductivo en apenas cinco generaciones, a pesar del flujo génico entre especies (Matute, 2010), lo que sugiere que el reforzamiento puede actuar con gran rapidez bajo ciertas condiciones.

Por otro lado, aunque el reforzamiento evoluciona para incrementar el aislamiento reproductivo entre especies, también puede generar efectos colaterales dentro de la misma especie. Estos efectos colaterales conocidos como **efectos en cascada del reforzamiento**, ocurren cuando el reforzamiento induce, de forma incidental, aislamiento reproductivo entre poblaciones coespecíficas (Ortiz-Barrientos et al., 2009; Pfennig & Pfennig, 2009). De este modo, el reforzamiento no solo consolida el aislamiento entre especies, sino que también puede promover la divergencia entre poblaciones de una misma especie e, incluso, contribuir a procesos tempranos de especiación (Comeault & Matute, 2016; Pfennig & Ryan, 2006).

El género *Ischnura* como modelo de estudios evolutivos

Los odonatos son un grupo de insectos acuáticos antiguos bien conocidos y que exhiben una amplia distribución (Corbet, 1980; Gillott, 2005). Actualmente, este orden está representado por 6,405 especies (Paulson et al., 2025). El género *Ischnura*, perteneciente a la familia Coenagrionidae, es uno de los más diversos, con 74 especies descritas hasta el momento (Brooks, 2007; Sánchez-Guillén et al., 2014, 2022; Paulson et al., 2025). Las especies de este género se caracterizan por ser no territoriales (Cordero, 1989; Cooper et al., 1996). El género *Ischnura* ha sido estudiado como grupo clave para comprender y explorar la selección sexual, el polimorfismo de color y la hibridación (Cooper et al., 1996; Cordero, 1989; Nava-Bolaños et al., 2017; Sánchez-Guillén et al., 2012, 2022). Las especies más estudiadas de este género son *I. graellsii* e *I. elegans*, abordándose diversos aspectos, como el polimorfismo (Cordero et al., 1998; Sánchez-Guillén et al., 2020), densidad poblacional (Cordero, 1992a; Cordero & Egido, 1998), territorialidad (Cordero, 2000), variabilidad morfológica (Cordero, 1992b), comportamiento reproductivo (Miller, 1987; Cordero, 1989), competencia espermática (Cordero & Miller, 1992), longevidad (Cooper et al., 1996) e hibridación (Sánchez-Guillén

et al., 2005; Monetti et al., 2002). Además, se han investigado a fondo los mecanismos de aislamiento reproductivo (Sánchez-Guillén et al., 2011, 2012; Sánchez-Guillén et al., 2013a) y su respuesta al cambio climático (Córdoba-Aguilar & Sánchez Guillén, 2012; Sánchez-Guillén et al., 2013b; Nava-Bolaños et al., 2019).

Especies de estudio: *Ischnura elegans* e *Ischnura graellsii*

Ischnura elegans e *I. graellsii* (Figura 1) se consideran especies hermanas, ya que son ecológica, genética y morfológicamente similares (Monetti et al., 2002; Sánchez-Guillén et al., 2011, 2012). Desde una perspectiva filogenética, ambas especies pertenecen al clado de hibridación *elegans* dentro del género *Ischnura*, que ha mostrado señales de una reciente radiación centrada en la cuenca del Mediterráneo (Sánchez-Guillén et al., 2020, 2022). *Ischnura graellsii* tiene una distribución restringida a la península ibérica y norte de África (Askew, 2004). Por otro lado, *I. elegans*, presenta una distribución mucho más amplia, desde Irlanda hasta Japón (Askew, 2004), y en los últimos 200 años ha ampliado su distribución en España (Sánchez-Guillén et al., 2011, 2012, 2014), dando como resultado la hibridación con *I. graellsii* (Monetti et al., 2002; Sánchez-Guillén et al., 2012, 2014).



Figura 1. Especies de estudio. *I. elegans* a la izquierda y a la derecha *I. graellsii*. (Tomado de Hodecek, 2010; EBIOPT, 2015).

Tanto *I. elegans* como *I. graellsii* presentan polimorfismo de color en las hembras, con tres morfos diferentes (Figura 2): uno que imita a los machos, conocido como androcromo, y dos morfos ginocromos, llamados infuscans y aurantiaca (Cordero, 1990, 1992a; Sánchez-Guillén et al., 2005). Este polimorfismo está controlado por un solo locus con tres alelos, que siguen un patrón de dominancia jerárquica (androcroma > infuscans > aurantiaca) (Cordero, 1990; Sánchez-Guillén et al., 2005).



Figura 2. Polimorfismo de color de las hembras en las especies *I. elegans* e *I. graellsii*. 2A: macho de *I. elegans*; 2B: hembra androcroma madura de *I. elegans*; 2C, hembra joven aurantiaca de *I. graellsii*; 2D: hembra joven infuscans de *I. elegans* (Fotografía de Cordero-Rivera et al. 2015).

En los odonatos, la reproducción implica dos puntos de contacto sucesivos. En primer lugar, el macho sujeta a la hembra con sus cercos del pronoto, lo que da lugar a la formación del tándem. Posteriormente, si la hembra acepta la cópula, repliega el abdomen para permitir el contacto entre las genitales primarias de ambos individuos, adoptando la denominada posición de rueda, correspondiente a la cópula (Cordero Rivera, 2002).

ANTECEDENTES

Desde el año 2002 se han publicado diversos estudios sobre barreras reproductivas entre *I. elegans* e *I. graellsii* (Tabla 1). El primero, realizado por Monetti et al. (2002) en la zona híbrida del noroeste de la península ibérica en España, tuvo como objetivo analizar las diferencias morfológicas y de aislamiento reproductivo entre poblaciones simpátricas y alopátricas. Observaron que *I. graellsii* presenta un tamaño corporal menor, tibias cortas y alas más estrechas que *I. elegans*. En simpatría, se encontraron individuos morfológicamente intermedios, lo que sugirió hibridación. Además, durante observaciones de apareamiento, se evidenció una separación temporal y asimetrías en el éxito de cópula: los machos de *I. elegans* lograron aparearse con hembras de *I. graellsii*, pero el cruce recíproco fue casi nulo debido a incompatibilidades mecánicas (Monetti et al., 2002).

El primer estudio sistemático de barreras reproductivas fue realizado por Sánchez-Guillén et al. (2012), quienes cuantificaron 19 barreras potenciales entre ambas especies. Encontraron un aislamiento reproductivo total superior al 95 % en ambos cruces

recíprocos, con una fuerte contribución de barreras precópula, especialmente la incompatibilidad mecánica para formar el tándem (ver Figura 3). Este aislamiento asimétrico sugiere que las barreras precópula son fundamentales para prevenir el flujo génico entre especies.

Sánchez-Guillén et al. (2013a) evaluaron barreras precigóticas gaméticas competitivas entre machos coespecíficos y heteroespecíficos, observando que, si bien no hubo diferencias en la duración de la cópula entre tipos de cruce, el volumen relativo de esperma podría actuar como barrera gamética. En algunos casos, las hembras almacenaron esperma heteroespecífico, lo que sugiere una baja probabilidad de fertilización cruzada.

Arce-Valdés et al. (2024) evaluaron el reforzamiento del aislamiento reproductivo en la zona híbrida del noroeste de la península ibérica en España, encontrando evidencia de reforzamiento atribuible al fortalecimiento de la barrera mecánica en cruces entre machos de *I. graellsii* y hembras de *I. elegans*. También documentaron asimetrías más marcadas en simpatria que en alopatria, lo que constituye evidencia adicional de reforzamiento (Turelli et al., 2014).

En un estudio complementario, Ballen-Guapacha et al. (2024) analizaron el desplazamiento de caracteres reproductivos en dos zonas híbridas (zona noroeste y zona norcentral) de la península ibérica en España, encontrando evidencia morfológica de reforzamiento en los caracteres implicados en la formación del tándem. El desplazamiento de caracteres reproductivos —que consiste en una mayor divergencia de rasgos reproductivos en zonas de simpatria comparado con zonas de alopatria (Howard, 1993)—, suele ocurrir en paralelo con el reforzamiento del aislamiento reproductivo, ya que ambos procesos responden a la selección contra el cruce entre especies. En este caso, detectaron cambios morfológicos consistentes con desplazamiento de caracteres reproductivos en machos de *I. graellsii* y hembras de *I. elegans* en la zona híbrida del noroeste, así como en ambos sexos de *I. elegans* en la zona norcentral.

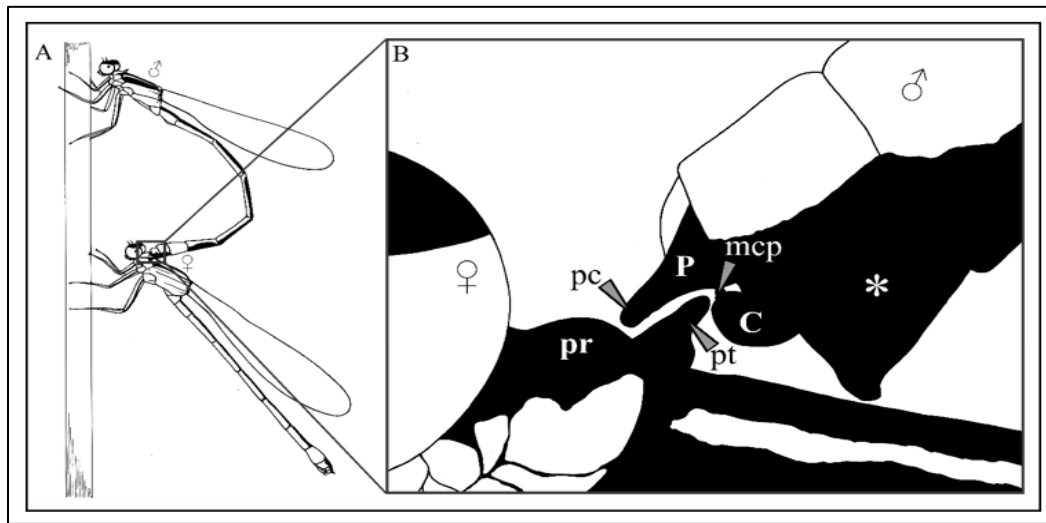


Figura 3. Formación del tándem y estructuras de contacto en caballitos del diablo. A) Primer punto de contacto en posición de apareamiento o tándem de los caballitos del diablo: el macho utiliza sus apéndices caudales para agarrar a la hembra por el tórax utilizando; B) ampliación del punto de contacto: el apéndice caudal, situado en el último segmento del abdomen del macho, y el pronoto, situado en el protórax de la hembra. C = cercos mcp = proceso cercal dirigido medio-ventralmente, P = parapróctos, pc = ganchos paraproctales, Pr = protórax, pt = pronoto, * = décimo segmento abdominal. (Tomado de Ballen-Guapacha et al., 2024).

Fiabilidad en la estimación del aislamiento mecánico durante la formación del tándem

No se han identificado estudios que establezcan un consenso sobre el número mínimo de interacciones necesarias por individuo para evaluar con precisión su aislamiento reproductivo. Los estudios previos realizados en el contexto del aislamiento reproductivo precigótico no han tomado en cuenta el mínimo de interacciones necesarias para obtener datos robustos (Servedio & Noor, 2003; Coyne & Orr, 2004; Sánchez-Guillén et al., 2012).

Tabla 1. Estudios publicados sobre aislamiento reproductivo entre *Ischnura elegans* e *Ischnura graellsii* en zonas de simpatría y alopatría

Estudio	Localización	Ecología	Combinación de sexos	Observaciones sobre barreras
Monetti et al., 2002	Zona híbrida del noroeste, España	Simpatría y alopatría	♂ <i>I. elegans</i> x ♀ <i>I. graellsii</i> ♂ <i>I. graellsii</i> x ♀ <i>I. elegans</i>	*Barreras mecánicas importantes. *Híbridos morfológicamente intermedios observados. *Cruce heteroespecífico casi nulo en machos <i>I. graellsii</i> con hembras <i>I. elegans</i> .
Sánchez-Guillén et al., 2012	Zona híbrida del noroeste, España	Simpatría	♂ <i>I. graellsii</i> x ♀ <i>I. elegans</i> ♂ <i>I. elegans</i> x ♀ <i>I. graellsii</i>	*Aislamiento reproductivo casi completo debido a barreras mecánicas precópula y postcópula. *Las barreras precópula son de gran importancia en la prevención del flujo de genes.
Sánchez-Guillén et al., 2013a	Zona híbrida del noroeste, España	Simpatría	♂ <i>I. graellsii</i> x ♀ <i>I. graellsii</i> ♂ <i>I. elegans</i> x ♀ <i>I. graellsii</i> ♂ <i>I. elegans</i> x ♀ <i>I. elegans</i> ♂ <i>I. graellsii</i> x ♀ <i>I. elegans</i>	*Volumen relativo de esperma puede ser una barrera en estas especies. *Sugieren que no existe sesgo en la paternidad hacia machos coespecíficos.
Arce-Valdés et al., 2024	Zona híbrida del noroeste, España	Alopatría y simpatría	♂ <i>I. graellsii</i> x ♀ <i>I. graellsii</i> ♂ <i>I. elegans</i> x ♀ <i>I. graellsii</i> ♂ <i>I. elegans</i> x ♀ <i>I. elegans</i> ♂ <i>I. graellsii</i> x ♀ <i>I. elegans</i> ♂ y ♀ <i>I. graellsii</i> x híbridos F ₁ ♂ y ♀ <i>I. elegans</i> X híbridos F ₁	*Reforzamiento observado con fortalecimiento de barreras mecánicas para la formación del tándem, efecto unidireccional. *Mayor número de asimetrías en barreras precópula en simpatría que en alopatría.
		Simpatría	Cruces híbridos y retrocruces híbridos de F ₂	
Ballen-Guapacha et al., 2024	Zona híbrida del noroeste y zona híbrida norcentral, España	Alopatría y simpatría	N/A	*Desplazamiento de caracteres reproductivos observado, con evidencia de reforzamiento en ambos sexos de <i>I. elegans</i> en diferentes zonas.

JUSTIFICACIÓN

El reforzamiento es un proceso evolutivo ampliamente documentado que incrementa el aislamiento reproductivo entre especies estrechamente relacionadas, especialmente cuando estas entran en contacto secundario tras una etapa de alopatría. La mayoría de las evidencias provienen de estudios que comparan poblaciones en alopatría y simpatría en un solo momento temporal (Hopkins, 2013; Matute, 2010; Arce-Valdés et al., 2024; Ballen-Guapacha et al., 2024). Estos trabajos han demostrado que la intensidad de las barreras precigóticas suele fortalecerse en zonas de contacto secundario, reduciendo el flujo génico entre especies simpátricas. Sin embargo, aún hay vacíos significativos respecto a cómo y qué tan rápido actúa el reforzamiento y a los posibles costos indirectos sobre el éxito reproductivo coespecífico. Evaluar estos aspectos es fundamental para comprender la estabilidad y evolución de las zonas híbridas, así como los límites del reforzamiento como fuerza de especiación.

La interacción entre *I. graellsii* e *I. elegans* en la zona híbrida noroeste de España, donde *I. elegans* fue detectada por primera vez en 1980, constituye una evidencia importante de reforzamiento asimétrico y desplazamiento de caracteres reproductivos. Esta interacción resulta en una barrera mecánica precópula que impide casi por completo la formación del tándem entre el macho de *I. graellsii* y la hembra de *I. elegans*, pero que permite el flujo génico en la dirección opuesta. Por lo tanto, esta zona permite evaluar la dinámica temporal del reforzamiento en ambos sentidos de cruce, así como sus consecuencias sobre la reproducción intraespecífica.

Desde el 2001, se ha construido una base de datos sobre el aislamiento reproductivo entre *I. elegans* e *I. graellsii* en la zona híbrida del noroeste y la zona híbrida norcentral de España y de alopatría (Francia, Bélgica, Suecia y sur de España). Esta base de datos, aunque aún incompleta, es una herramienta fundamental para evaluar la intensidad y variación espacial y temporal de las barreras reproductivas. En el presente trabajo, esta información histórica actúa como referencia para interpretar los patrones obtenidos mediante el muestreo experimental actual, permitiendo contrastar si las estimaciones contemporáneas del aislamiento mecánico y del reforzamiento se alinean con las tendencias registradas durante las últimas dos décadas. De este modo, la base de datos ha sido utilizada para realizar comparaciones en el contexto temporal necesario para evaluar la dirección, velocidad y consistencia del reforzamiento, y para interpretar los cambios y situar los resultados experimentales dentro de la dinámica evolutiva del sistema.

Comprender cómo evoluciona el aislamiento reproductivo en sistemas en contacto secundario es particularmente relevante en el contexto actual de cambio climático, donde el desplazamiento de las áreas de distribución geográfica puede favorecer la simpatría de especies previamente alopátricas. Este estudio ofrece así una contribución significativa tanto para la biología evolutiva como para la conservación de la diversidad

biológica, al proporcionar evidencia empírica robusta sobre la dinámica, direccionalidad y consecuencias del reforzamiento.

Fiabilidad en la estimación del aislamiento mecánico durante la formación del tándem

Debido a la ausencia de estudios empíricos es necesario evaluar cuántas interacciones por individuo se requieren para obtener estima robusta en este sistema de estudio, lo que permitirá mejorar la fiabilidad estadística del aislamiento reproductivo.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ¿Cuál es el número mínimo de interacciones por individuo necesario para obtener una estimación fiable del aislamiento mecánico involucrado en la formación del tándem, considerando la relevancia de esta barrera mecánica?
- ¿La comparación de la intensidad del reforzamiento del aislamiento reproductivo entre tres periodos temporales en la zona híbrida del noroeste de la península híbrida de España permite inferir su velocidad y dirección?
- Y finalmente, ¿ha afectado el reforzamiento el aislamiento reproductivo al éxito coespecífico en la zona híbrida del noroeste de España?

HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

Hipótesis general

La selección natural, a través del reforzamiento, incrementa progresivamente la intensidad del aislamiento reproductivo precigótico entre *I. elegans* e *I. graellsii* en la zona híbrida del noroeste de España, reflejándose en una disminución progresiva del éxito en la formación de tándems heteroespecíficos y en una reducción del éxito reproductivo coespecífico.

Hipótesis específicas

1. La precisión en la estimación de la intensidad del aislamiento reproductivo depende del número de interacciones registradas por individuo, existiendo un umbral mínimo a partir del cual las mediciones se estabilizan y adquieren confiabilidad estadística.
2. El reforzamiento opera de manera direccional y acumulativa, reduciendo gradualmente el éxito de los cruces heteroespecíficos en ambas direcciones de cruce a lo largo del tiempo.
3. La selección natural contra los apareamientos heteroespecíficos genera efectos colaterales sobre el comportamiento reproductivo, disminuyendo el éxito de los cruces coespecíficos.

PREDICCIONES

Se podrá determinar un umbral mínimo de interacciones por individuo necesarias para estimar el aislamiento con confiabilidad. Además, si el reforzamiento está actuando en la zona híbrida, se espera observar un aumento en la intensidad del aislamiento reproductivo en muestras más recientes, manifestándose en una menor frecuencia de tandems heteroespecíficos exitosos respecto a muestras anteriores. Este patrón permitirá inferir la velocidad a la que se incrementa el aislamiento reproductivo y la dirección del reforzamiento basada en la dinámica temporal. Además, se detectarán cambios en la dinámica de interacciones intraespecíficas vinculados al reforzamiento.

Predicciones específicas

1. Al analizar diferentes interacciones por individuo, se podrá identificar un número mínimo de observaciones necesarias que garantice una estimación confiable del aislamiento reproductivo.
2. La comparación entre momentos temporales mostrará una reducción significativa en la formación de tandems heteroespecíficos en momentos más recientes en la zona híbrida del noroeste de la península ibérica en España.
3. El reforzamiento también afectará a nivel coespecífico, de forma que se verá reducida la proporción de tandems coespecíficos exitosos dentro de cada especie entre alopatria y simpatria.

Dirección del cruce y componente temporal del reforzamiento

En el cruce entre machos de *I. graellsii* y hembras de *I. elegans*, se espera observar la evidencia de reforzamiento reportada por Arce-Valdés et al. (2024). Por lo tanto, se anticipa una disminución progresiva en la frecuencia de estos cruces a lo largo del tiempo, reflejada en un incremento del aislamiento reproductivo entre etapas.

En el cruce recíproco —machos de *I. elegans* con hembras de *I. graellsii*— se espera un mayor éxito en la formación de cruces heteroespecíficos, en comparación con el cruce recíproco, ya que esta dirección ha sido asociada con la producción de híbridos. Sin embargo, podría observarse una ligera disminución en el éxito de la formación del tandem a través del tiempo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el papel del reforzamiento en la evolución del aislamiento reproductivo precigótico entre *Ischnura elegans* e *I. graellsii* en la zona híbrida del noroeste de la

península ibérica en España, considerando tanto los cruces coespecíficos como los heteroespecíficos.

Objetivos específicos

1. Determinar el número mínimo de interacciones por individuo necesarias para obtener una estimación confiable del aislamiento reproductivo en la barrera mecánica.
2. Analizar la dinámica temporal del aislamiento reproductivo para inferir la intensidad, dirección y velocidad del reforzamiento en la zona híbrida del noroeste de España.
3. Evaluar el efecto indirecto del reforzamiento en el éxito reproductivo de los cruces coespecíficos entre la zona híbrida del noroeste de España y la zona de alopatría.

El criterio utilizado para considerar la existencia de evidencia de reforzamiento será la presencia de un mayor aislamiento reproductivo en los cruces heteroespecíficos en simpatría en comparación con los cruces heteroespecíficos de alopatría.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestreos y observación del comportamiento reproductivo

El trabajo de campo se realizó en los meses de julio y agosto de 2024, recolectando individuos tenerales (recién emergidos), jóvenes y adultos inmaduros (vírgenes) de las poblaciones de la zona híbrida del noroeste de España: *I. elegans* de Laxe y Doniños; e *I. graellsii* de Xuño, Cachadas, Riomaior y Louro (Figura 4).

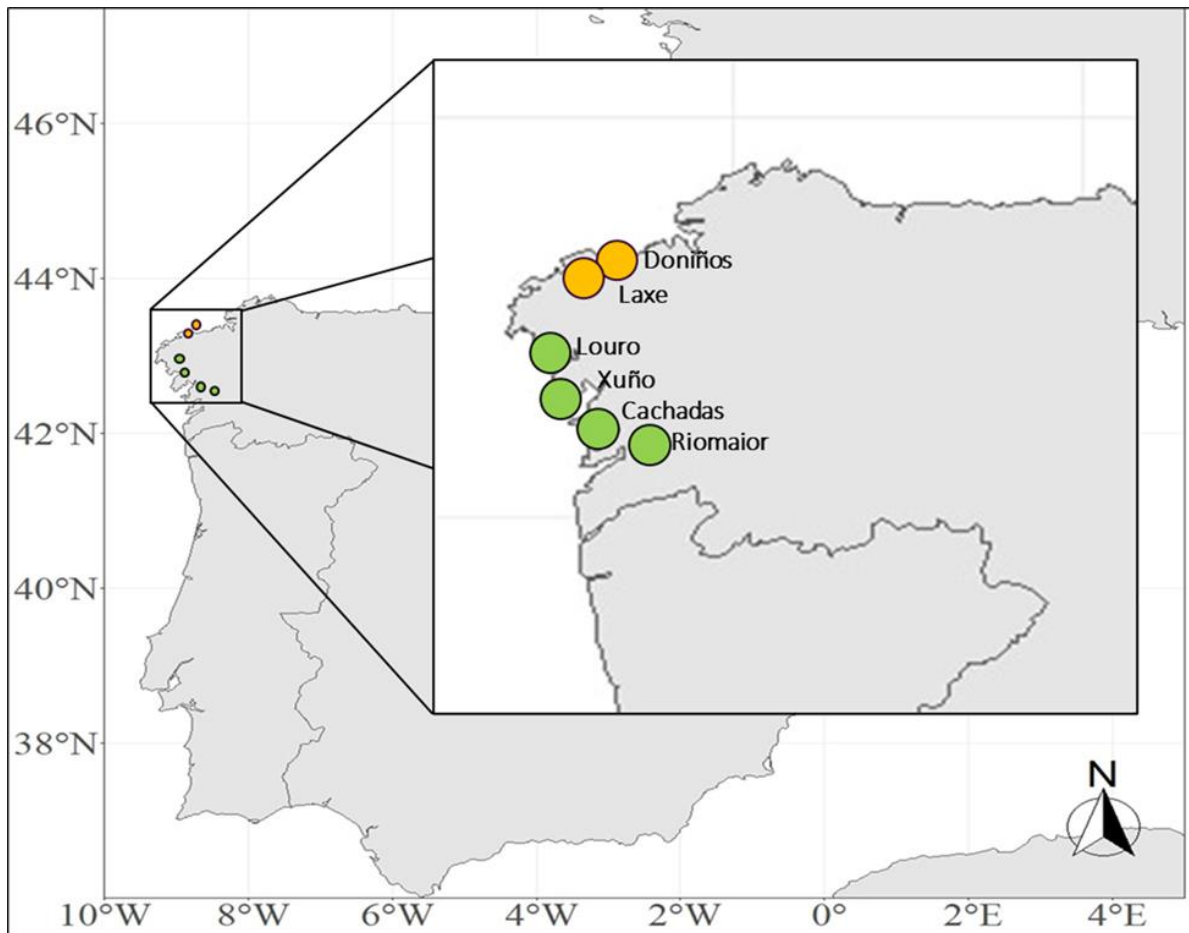


Figura 4. Ubicación geográfica de las localidades donde se realizaron las colectas. Los círculos verdes hacen referencia a las localidades donde se colectaron *I. graellsii*; mientras que los círculos amarillos muestran las localidades donde se colectaron individuos de *I. elegans*.

Estos individuos fueron llevados al laboratorio de Ecología Evolutiva y de la Conservación de la Universidad de Vigo y se mantuvieron aislados por sexos y especie hasta que estuvieron sexualmente maduros (5-6 días), siguiendo la metodología propuesta por Van Gossum et al. (2003) y Sánchez-Guillén et al. (2005). Machos y hembras adultos se mantuvieron separados en insectarios de madera con dimensiones de 50x50x50 cm (Van Gossum et al., 2003) y fueron marcados en el ala posterior con un código para facilitar su identificación y observación (Figura 5A-B).



Figura 5. Instalaciones del laboratorio para la cría, marcaje y estudio de *Ischnura* en condiciones controladas. Adulto marcado en el ala posterior derecha (5A); Insectarios de madera para colocar a los adultos (5B). Fotografía de Juárez-Jiménez (2024).

Los datos de aislamiento generados en estos experimentos fueron agregados a la base de datos histórica del Laboratorio de Ecología Conductual y Evolutiva de Odonatos del INECOL, A.C. El conjunto completo de datos fue usado para los posteriores análisis.

2. Estima de la intensidad de las barreras de aislamiento reproductivo

Durante los experimentos de observación del aislamiento reproductivo (Figura 6A-B), la composición diaria de los grupos experimentales dependió de la disponibilidad de individuos sexualmente maduros en el laboratorio (cinco días para machos y seis días para hembras; Arce-Valdés et al., 2024). Esta condición explica por qué las observaciones no se realizaron siempre con el mismo número de individuos.

Primeramente, en cada insectario se realizaron cruces coespecíficos utilizando individuos de la misma especie y población local. Posteriormente, se establecieron los cruces heteroespecíficos: en un insectario se colocaron los machos de *I. graellsii* y hembras de *I. elegans*, y en el otro los machos de *I. elegans* y hembras de *I. graellsii*. En todos los tipos de cruces —heteroespecíficos y coespecíficos— se mantuvo una proporción de 2-3 machos por cada hembra, lo que nos permitió maximizar las interacciones. Las observaciones se realizaron durante su periodo de actividad reproductiva, de 8:00 a 17:00 horas (Sánchez-Guillén et al., 2014; Arce-Valdés et al., 2024). A todos los individuos se les permitió tener tantas interacciones como fueran posibles durante el periodo de observación.



Figura 6. Observación de interacciones reproductivas entre individuos de *I. elegans* e *I. graellsii*. Individuos en el insectario durante las observaciones de las interacciones (6A); Individuos en cópula heteroespecífica (6B). Fotografía de Juárez-Jiménez (2024b).

El aislamiento reproductivo se evaluó tomando en cuenta cinco barreras, ordenadas según su secuencia durante el proceso reproductivo.

a) *Barrera mecánica (formación del tándem)* (Figura 7A): esta barrera impide que el macho pueda sujetar a la hembra con sus cercos caudales para formar el tándem, una etapa necesaria antes de la cópula. La incompatibilidad morfológica entre los cercos del macho y el pronoto de la hembra puede impedir esta unión física. Se registró el porcentaje de intentos exitosos de formación del tándem en cruces coespecíficos y heteroespecíficos.

b) *Barrera mecánico-táctil (formación de la cópula)* (Figura 7B): una vez formado el tándem, algunas hembras pueden rechazar al macho si no perciben estímulos táctiles adecuados durante esta fase. Si la hembra responde positivamente a dichos estímulos, pliega su abdomen y posiciona sus estructuras reproductivas primarias en el segundo segmento abdominal del macho, adoptando la posición de rueda (Robertson & Paterson, 1982; Rivas Torres, 2019). Se registró el éxito de cópula tras la formación del tándem en ambos tipos de cruces.

c) *Barrera en el éxito de la oviposición* (Figura 7C): después del apareamiento, se evaluó si la hembra realizaba la puesta de huevos. El éxito de oviposición se estimó como el porcentaje de hembras que ovipositaron tras aparearse en ambos tipos de cruces. Esta barrera puede estar influenciada por la calidad del esperma, el comportamiento postcópula o respuestas fisiológicas de la hembra a la estimulación espermática.

d) *Barrera de la reducción de la fecundidad* (Figura 7D): se cuantificó el número de huevos depositados por cada hembra durante las tres primeras puestas, en ambos tipos de cruces. Comparar la fecundidad entre cruces coespecíficos y heteroespecíficos

permite detectar si existe alguna incompatibilidad que afecte la capacidad de producir huevos después del apareamiento heteroespecífico (Sánchez-Guillén et al., 2012, 2014).

d) *Barrera de la reducción de la fertilidad* (Figura 7D): finalmente, se evalúa la proporción de huevos fértiles, es decir, aquellos que eclosionaron o mostraron embriones en desarrollo. Esta medida permite detectar incompatibilidades genéticas entre gametos o efectos postcigóticos tempranos que impidan el desarrollo del embrión (Sánchez-Guillén et al., 2012, 2014).

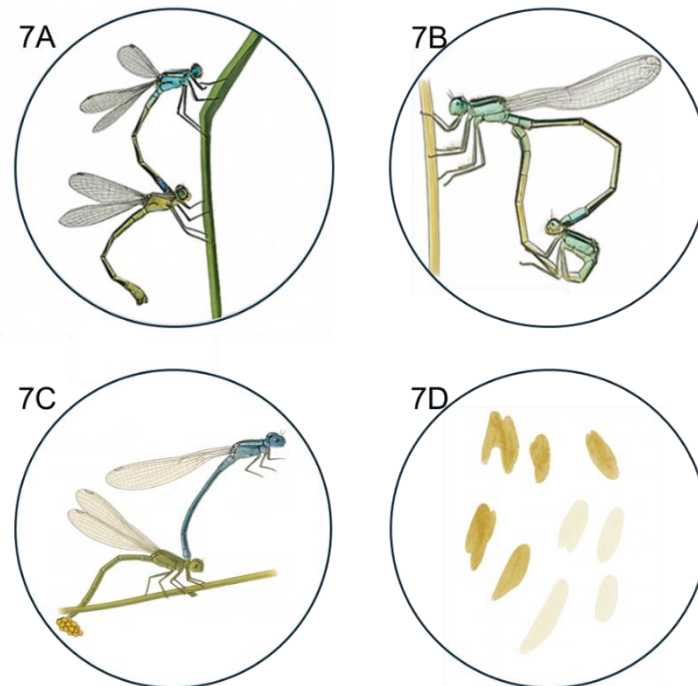


Figura 7. Fases reproductivas de *Ischnura* y las barreras reproductivas que representan según la secuencia del proceso reproductivo. 7A) Tándem (barrera mecánica): el macho, con los cercos, sujeta a la hembra por el pronoto; 7B) Cópula (barrera mecánico-táctil): la hembra repliega el abdomen para que sus genitales primarias entren en contacto con las genitales primarias del macho, ubicadas en el segundo segmento abdominal; 7C: Oviposición y 7D) fecundidad y fertilidad de la puesta (barreras del éxito de la oviposición, fecundidad y fertilidad de las puestas): la hembra realiza la puesta de los huevos y estos huevos pueden o no ser fértiles. Composición y edición: Juárez-Jiménez (2025). Ilustraciones generadas con asistencia de IA -ChatGPT, OpenAI.

Con la finalidad de estandarizar las observaciones experimentales, en este trabajo se utilizaron las siguientes definiciones operativas:

Barrera mecánica:

* Intento de tándem: Es cada ocasión en la que el macho intenta sujetar a la hembra por el pronoto con sus cercos, pero no logra establecer una unión estable.

* Tándem exitoso: La unión estable entre el macho y la hembra cuando el primero sujeta correctamente el pronoto de la hembra con los cercos, permitiendo que ambos permanezcan acoplados y puedan volar de manera sincronizada.

Barrera mecánico-táctil:

* Intento de cópula: Es cada ocasión en la que, tras formar el tándem, la hembra repliega del abdomen hacia el segundo segmento abdominal del macho, pero no logra establecer contacto entre las genitalias primarias de ambos individuos.

* Cópula exitosa: Se define como la unión estable entre las genitalias primarias del macho y la hembra, que ocurre cuando esta repliega el abdomen y mantiene el contacto con el segundo segmento del macho durante un periodo observable de apareamiento.

Cada barrera fue cuantificada mediante cruces heteroespecíficos, utilizando como controles cruces coespecíficos entre poblaciones simpátricas de ambas especies parentales (Sánchez-Guillén, Córdoba-Aguilar, et al., 2013; John & Fuller, 2021; Ordaz-Morales et al., 2025), con el fin de establecer la línea base del éxito reproductivo en ausencia de barreras interespecíficas. La intensidad de cada una de las cinco barreras (detalles en la Tabla 2) se estimó usando la siguiente fórmula (Coyne & Orr, 1989):

$$RI = 1 - \frac{\text{Éxito de la fase reproductiva heteroespecífica}}{\text{Éxito de la fase reproductiva coespecífica}}$$

Esta métrica es particularmente útil para cuantificar el aislamiento reproductivo, ya que permite comparar directamente la frecuencia de las interacciones heteroespecíficas con la de las interacciones coespecíficas.

Al expresar el aislamiento como una proporción de reducción en el éxito en cruces heteroespecíficos relativo al éxito coespecífico, los valores resultantes se interpretan fácilmente: valores superiores a 0 indican un aislamiento reproductivo más fuerte en los cruces heteroespecíficos respecto a los coespecíficos, mientras que valores por debajo de 0 señalan que la barrera favorece la hibridación.

El uso de controles en esta métrica no sólo facilita la comparación entre tipos de cruces, sino que también permite corregir posibles diferencias entre las condiciones del entorno natural de las especies y las del ambiente experimental (Sobel & Chen, 2014). Esto resulta especialmente relevante en la zona híbrida del noroeste de España, donde el éxito de apareamiento coespecífico está considerablemente reducido, al menos en *I. elegans* (ver Arce-Valdés et al., 2024), lo que podría sesgar otras estimaciones si no se controla adecuadamente. Por lo tanto, esta aproximación permite una estimación más robusta y realista del aislamiento precigótico pre- y postcópula, incluso en contextos donde la eficiencia reproductiva de las especies no es equivalente.

Tabla 2.- **Fórmulas de los índices de aislamiento reproductivo (RI) para cada barrera de aislamiento precigóticas.** *El control coespecífico se calcula de la misma forma que en los cruces heteroespecíficos, pero aplicándolo a los cruces coespecíficos.

Barreras precópula	
$RI_{mecanicoI} = 1 -$	$\frac{\text{Número total de tandems exitosos heterospecíficos}}{\frac{\text{Número total de intentos de tandem heterospecíficos}}{\text{Control coespecífico} *}}$
$RI_{mecanicoII} = 1 -$	$\frac{\text{Número total de cópulas exitosas heterospecíficas}}{\frac{\text{Número total de intentos de cópula heterospecíficas}}{\text{Control coespecífico} *}}$
Barreras postcópula	
$RI_{oviposición} = 1 -$	$\frac{\text{Número de hembras que ovipositaron en cruces heterospecíficos}}{\frac{\text{Número total de hembras que se aparearon en cruces heterospecíficos}}{\text{Control coespecífico} *}}$
$RI_{fecundidad} = 1 -$	$\frac{(\sum_{i=1}^n \text{Huevos por puesta}_i)/n}{\text{Control coespecífico} *}$
$RI_{fertilidad} = 1 -$	$\frac{\left(\frac{\sum_{i=1}^n \text{Huevos fértiles}_i}{\frac{\sum_{i=1}^n \text{Huevos totales}_i}{n}} \right) \text{ en cruces heterospecíficos}}{\text{Control coespecífico} *}$

En las fórmulas correspondientes a las barreras de fertilidad y fecundidad, n representa el número de hembras evaluadas en cada tipo de cruce. La sumatoria (Σ) es el total de huevos contabilizados por hembra.

Las barreras binarias (mecánica, mecánico-táctil y oviposición) fueron representadas mediante gráficas de barras de éxito y fracaso; mientras, las barreras reproductivas medidas como variables continuas (fecundidad y fertilidad) se representaron mediante gráficos de violín.

3. Aislamiento reproductivo acumulado total

Este tipo de aislamiento es la suma de todas las barreras reproductivas que impiden el flujo génico. El aislamiento reproductivo actúa de manera secuencial, de tal forma que cada barrera reduce la probabilidad de que dos individuos produzcan descendencia viable (Ramsey et al., 2003; Castillo, 2017). El grado de aislamiento reproductivo total entre especies se estimó mediante el aislamiento reproductivo acumulado a lo largo de la secuencia de barreras reproductivas. Este aislamiento reproductivo acumulado se calcula mediante la integración de la contribución de cada barrera considerando el aislamiento ya impuesto por las barreras anteriores (Ramsey et al., 2003).

4. Fiabilidad del método de estima del aislamiento mecánico para la formación del tándem

Se aprovechó la riqueza del conjunto de datos (los datos producidos en este estudio y los datos históricos) para determinar el número mínimo de interacciones reproductivas necesarias por individuo que permita obtener estimaciones confiables del aislamiento mecánico, fortaleciendo así la robustez metodológica del estudio.

Para estimar el aislamiento reproductivo (RI) a nivel individual, se empleó la fórmula:

$$RI = 1 - \frac{\text{número total de tandems exitosos}}{\text{número total de intentos de tandem}}$$

Esta fórmula permitió evaluar la progresión del aislamiento reproductivo a medida que el individuo participa en más interacciones, es decir, esta fórmula se calculó para la primera interacción, para la suma de la primera y la segunda, para la suma de las tres primeras interacciones y así, sucesivamente. Por ejemplo, si un individuo tuvo tres interacciones, el valor de RI se calculó primero considerando únicamente la primera interacción, luego las dos primeras, y finalmente las tres. De esta forma, se obtiene un valor acumulado de aislamiento para cada interacción. El número de interacciones por individuo en el conjunto de datos varió entre una y doce.

Se clasificaron por especie (*I. elegans* o *I. graellsii*) y sexo (hembra o macho), tipo de interacción (coespecífico, heteroespecífico e híbridos) y ecología (alopatría o simpatría) obteniendo 28 grupos en total (tabla 3): seis combinaciones para los machos de *I. elegans*, seis para las hembras de *I. elegans*, seis para los machos de *I. graellsii*, seis para las hembras de *I. graellsii*, dos para los machos híbridos y dos para las hembras híbridas.

Tabla 3. Grupos de cruce en *Ischnura elegans*, *I. graellsii* e híbridos

	<i>Ischnura elegans</i>	<i>Ischnura graellsii</i>	híbrido
	elegans-alopatría-coespecífico	graellsii-alopatría-coespecífico	
	elegans-alopatría-heteroespecífico	graellsii-alopatría-heteroespecífico	
	elegans-alopatría-postcigótico	graellsii-alopatría-postcigótico	híbrido-alopatría-postcigótico
♂	elegans-simpatría-coespecífico	graellsii-simpatría-coespecífico	
	elegans-simpatría-heteroespecífico	graellsii-simpatría-heteroespecífico	
	elegans-simpatría-postcigótico	graellsii-simpatría-postcigótico	híbrido-simpatría-postcigótico
	elegans-alopatría-coespecífico	graellsii-alopatría-coespecífico	
	elegans-alopatría-heteroespecífico	graellsii-alopatría-heteroespecífico	
	elegans-alopatría-postcigótico	graellsii-alopatría-postcigótico	híbrido-alopatría-postcigótico
♀	elegans-simpatría-coespecífico	graellsii-simpatría-coespecífico	
	elegans-simpatría-heteroespecífico	graellsii-simpatría-heteroespecífico	
	elegans-simpatría-postcigótico	graellsii-simpatría-postcigótico	híbrido-simpatría-postcigótico

Los análisis se realizaron con el programa R (R Core Team, 2025). Para el manejo y la organización de los datos se utilizó el paquete tidyverse (Wickham et al., 2019).

Para evaluar si el grado de aislamiento mecánico varía al aumentar el número de interacciones entre individuos, se compararon los niveles de aislamiento obtenidos tras sucesivas cantidades de interacciones (por ejemplo, el aislamiento tras una interacción se comparó con el obtenido tras dos interacciones; luego, el de dos con el de tres, y así sucesivamente). Estas comparaciones se realizaron mediante dos enfoques complementarios: la prueba *t* de Student pareada y modelos lineales mixtos (LMM).

La prueba *t* pareada se aplicó únicamente a individuos que contaban con datos en ambas interacciones consecutivas y cuyos valores cumplieran con el supuesto de normalidad, por lo que el valor de *n* en cada comparación representa el número de pares completos disponibles. En contraste, los modelos LMM permitieron incluir todos los datos

disponibles, incluso aquellos provenientes de individuos con información incompleta, incorporando además un efecto aleatorio por individuo para controlar la variación interindividual.

Esta diferencia metodológica explica que los valores de n sean generalmente mayores en los LMM que en la prueba de t pareada. Mientras la prueba t pareada proporciona una evaluación más estricta y conservadora, el uso de LMM mejora la potencia estadística (statistical power) al aprovechar un mayor volumen de datos. En ambos análisis se aplicó un ajuste por comparaciones múltiples mediante el método de Holm, con el fin de controlar el error tipo I acumulado. Este ajuste se implementó dentro de cada subgrupo, considerando únicamente las comparaciones válidas realizadas en cada caso. Las comparaciones post hoc entre interacciones consecutivas se realizaron mediante contrastes consecutivos utilizando el paquete emmeans (Lenth, 2018). Los modelos LMM fueron ajustados con el paquete lme4 (Bates et al., 2015), asumiendo una distribución normal de los residuos.

Para evaluar si el éxito del tándem estaba influenciado por efecto del individuo, se elaboraron dos modelos por subgrupo, uno sin el efecto aleatorio y el otro con este efecto. Se incorporó el efecto aleatorio en los modelos mixtos generalizados (GLMM) utilizando una distribución binomial (éxito/fracaso) con la función de enlace logit. Ambos modelos incluyeron como efecto fijo el número de interacción y fueron comparados entre sí.

La comparación de ambos modelos se realizó mediante una prueba de razón de verosimilitud (LRT), y se estimó también la varianza atribuida al individuo, así como los coeficientes de determinación marginal (R^2 marginal, efectos fijos) y condicional (R^2 condicional, efectos fijos + aleatorios) utilizando la función r.squaredGLMM() del paquete MuMIn (Bartoń, 2025).

5. Reforzamiento temporal y aislamiento en simpatria

La dinámica temporal del aislamiento reproductivo se analizó en las cinco barreras reproductivas (explicadas en el apartado anterior) entre *I. elegans* e *I. graellsii* en la zona híbrida del noroeste de la península ibérica de España. Esto permitió identificar si ha habido un incremento en la intensidad del aislamiento reproductivo a lo largo del tiempo, e inferir la dirección y velocidad de dicho proceso, aspectos clave para comprender su papel en la evolución de las interacciones interespecíficas.

Los datos obtenidos en este estudio se integraron con registros históricos (Tabla 4). Con el propósito de evaluar la variación temporal en la intensidad del aislamiento reproductivo, los datos disponibles se agruparon en tres etapas definidas por la disponibilidad temporal de los registros existentes: etapa I, correspondiente a “la fase temprana del contacto” (2000–2001); etapa II “fase intermedia” (2014–2019); y la etapa III que representa a la

“fase reciente” (2020–2024). La ausencia de datos experimentales entre el año 2002 y el 2013 responde a la falta de estudios realizados durante ese periodo, y no a una ausencia de interacciones reproductivas entre las especies.

Tabla 4. Cantidad de interacciones registradas por tipo de cruce y tiempo en condiciones de simpatria. IE = *I. elegans*; IG = *I. graellsii*. T = etapa temprana; I = etapa intermedia; R = etapa reciente.

	Simpatria											
	Coespecíficos						Heteroespecíficos					
	<i>I. elegans</i>			<i>I. graellsii</i>			♂IE x ♀IG			♂IG x ♀IE		
	T	I	R	T	I	R	T	I	R	T	I	R
Intento de tándem	4	30	69	43	43	43	8	63	179	4	19	152
Tándem	2	24	41	35	35	35	8	50	83	3	2	8
Cópula	2	16	29	30	30	30	8	40	57	3	1	3
Oviposición	7	17	45	45	45	45	18	54	22	3	4	2
Fecundidad	7	17	45	45	45	45	18	54	22	3	4	2
Fertilidad	7	17	45	45	45	45	18	54	22	3	4	2

Al no contar con datos coespecíficos de *I. graellsii* para las etapas temprana e intermedia, y considerando que los cruces coespecíficos en alopatria se mantienen relativamente constantes a lo largo del tiempo, fueron utilizados los datos coespecíficos más recientes de esta especie para la comparación del aislamiento reproductivo heteroespecífico en estas etapas.

Con los datos obtenidos de las interacciones coespecíficas y heteroespecíficas para cada cruce recíproco, se construyeron GLMs con el fin de evaluar la asociación entre distintas barreras reproductivas, los tipos de cruces (coespecífico o heteroespecífico), la dirección del cruce (♂ *I. elegans* × ♀ *I. graellsii*, ♂ *I. graellsii* × ♀ *I. elegans*, ♂ *I. elegans* × ♀ *I. elegans*, ♂ *I. graellsii* × ♀ *I. graellsii*,) y el tiempo (etapa temprana, intermedia o reciente), así como su interacción (tipo * cruce * tiempo).

Las barreras: mecánica, mecánico-táctil, éxito de la oviposición y fertilidad fueron modeladas bajo una distribución binomial, al tratarse de variables de respuesta dicotómicas (éxito/fracaso). En contraste, la fecundidad fue analizada mediante una distribución gamma, apropiada para variables continuas y con distribución asimétrica.

Para garantizar la adecuación y el ajuste de los modelos, se simulaban residuos con la función simulateResiduals() del paquete DHARMA (Hartig, 2025), lo que permitió verificar

el cumplimiento de los supuestos del modelo. Se consideró como modelo óptimo aquel con el menor valor del criterio de información corregido de Akaike (AICc).

6. Efectos del reforzamiento sobre cruces coespecíficos

Con el fin de evaluar si el reforzamiento del aislamiento reproductivo genera efectos indirectos sobre la compatibilidad coespecífica, se analizó el éxito reproductivo de cruces coespecíficos en poblaciones simpátricas y se comparó con el observado en cruces coespecíficos entre poblaciones alopátricas. Este enfoque permite detectar posibles costos colaterales del reforzamiento, tales como una reducción en el éxito reproductivo dentro de las especies en zonas de contacto secundario.

Para este análisis se integraron los datos obtenidos en el presente estudio con registros históricos disponibles (Tabla 5), lo que permitió evaluar diferencias en el desempeño reproductivo de los cruces coespecíficos en función del contexto ecológico (alopatría vs. simpatría) y, cuando fue posible, de la dinámica temporal.

La disponibilidad de datos históricos coespecíficos difirió entre especies, por lo que el análisis temporal no pudo realizarse con el mismo alcance para ambas. En *Ischnura elegans*, se contó con información suficiente para evaluar la dinámica temporal a lo largo de las tres etapas (temprana, intermedia y reciente), incorporando además la condición ecológica (alopatría o simpatría) y la interacción entre ambos factores. En contraste, para *I. graellsii* no se dispuso de datos coespecíficos correspondientes a las etapas temprana e intermedia; por ello, las comparaciones se restringieron a la etapa reciente (2020–2024), en la cual existen datos tanto para poblaciones alopátricas como simpátricas.

A partir de los datos de cruces coespecíficos en condiciones de alopatría y simpatría, se construyeron Modelos Lineales Generalizados (GLMs) para evaluar la relación entre diversas barreras reproductivas y las variables explicativas: especie involucrada (*I. elegans* o *I. graellsii*) y su condición ecológica (alopatría o simpatría), así como su interacción (especie * ecología).

Las barreras: mecánica, mecánico-táctil, éxito de la oviposición y fertilidad fueron modeladas bajo una distribución binomial, al tratarse de variables de respuesta dicotómicas (éxito/fracaso). En contraste, la fecundidad fue analizada mediante una distribución gamma, apropiada para variables continuas y con distribución asimétrica.

La idoneidad y ajuste de los modelos fueron evaluados mediante simulación de residuos utilizando la función `simulateResiduals()` del paquete DHARMA (Hartig, 2025). El modelo con el menor valor de AICc fue considerado el más adecuado.

Tabla 5. Distribución de interacciones coespecíficas por tiempo y condición ecológica (alopatría vs simpatría). T = etapa temprana; I = etapa intermedia; R = etapa reciente.

	Coespecíficos							
	Alopatría				Simpatría			
	<i>I. elegans</i>		<i>I. graellsii</i>		<i>I. elegans</i>		<i>I. graellsii</i>	
	T	I	R	R	T	I	R	R
Intentos de tándem	36	36	36	87	5	41	38	43
Tándems	33	33	33	65	3	34	17	35
Cópula	30	30	30	59	3	25	13	30
Oviposición	54	54	54	88	10	30	22	45
Fecundidad	54	54	54	88	10	30	22	45
Fertilidad	54	54	54	88	10	30	22	45

RESULTADOS

1. Datos recolectados durante el experimento para la evaluación del aislamiento reproductivo

Se realizaron cruces coespecíficos en dos localidades de *I. elegans* (Doniños y Laxe) y en dos de *I. graellsii* (Louro y Xuño), todas dentro de la zona híbrida del noroeste de la península ibérica de España y en dos localidades alopátricas de *I. graellsii* (Riomaior y Cachadas). También se realizaron cruces heteroespecíficos entre machos de *I. elegans* y hembras de *I. graellsii*, y viceversa, entre individuos de tres localidades de la zona híbrida del noroeste de España: Doniños, Laxe y Xuño, así como con la localidad alopátrica Riomaior.

En este estudio se obtuvieron datos correspondientes a 553 parejas, siendo 518 interacciones para la barrera mecánica y 209 para la barrera mecánico táctil (ver Tabla 6). Mientras que se obtuvieron 252 interacciones para las barreras de oviposición (n= 86 hembras), fertilidad (n= 83 hembras) y fecundidad (n= 83 hembras) (Tabla 6).

Tabla 6. Interacciones reproductivas entre *I. elegans* e *I. graellsii* generadas en los experimentos de este proyecto. IE: *Ischnura elegans*; IG: *Ischnura graellsii*.

	Coespecíficos		Heteroespecíficos	
	<i>I. elegans</i>	<i>I. graellsii</i>	♂ IE x ♀ IG	♂ IG x ♀ IE
Intentos de tándem	23	49	173	162
Tándems	5	30	69	7
Intentos de cópula	6	40	80	13
Cópula	2	26	40	2
Oviposición	15	30	40	1
Fecundidad	15	56	11	1
Fertilidad	15	56	11	1

Los datos generados en estos experimentos fueron integrados a la base de datos del Laboratorio de Ecología Conductual y Evolutiva de Odonatos, junto con los registros previamente recopilados por Sánchez-Guillén et al. (2005; 2012) y Arce-Valdés et al. (2024).

La tabla 7 muestra la totalidad de los datos utilizados para los análisis estadísticos de este proyecto, es decir, los generados en este proyecto sumados a los encontrados en la base de datos de este laboratorio.

Tabla 7. Interacciones reproductivas entre *I. elegans* e *I. graellsii* de la base de datos del Laboratorio de Ecología Conductual y Evolutiva de Odonatos (INECOL, A.C.), que incluye los datos generados y utilizados para los análisis de este proyecto. IE: *Ischnura elegans*; IG: *Ischnura graellsii*.

	Coespecíficos		Heteroespecíficos	
	<i>I. elegans</i>	<i>I. graellsii</i>	♂ IE x ♀ IG	♂ IG x ♀ IE
Intentos de tándem	62	13	141	66
Tándems	50	13	111	7
Intentos de cópula	50	13	111	7
Cópula	40	13	88	5
Oviposición	50	12	108	8
Fecundidad	47	12	101	8
Fertilidad	47	12	101	8

2. Fiabilidad del método de estima del aislamiento mecánico para la formación del tándem

El conjunto de datos incluyó individuos con entre una y doce interacciones reproductivas con diferentes parejas, integrando observaciones históricas y datos obtenidos en el presente estudio. En los experimentos más recientes, el número de interacciones por individuo aumentó considerablemente, alcanzando un 71.7 % de individuos con más de una interacción. Este incremento se debió, en parte, a ajustes en el diseño experimental que permitieron registrar múltiples intentos por individuo —principalmente, en los experimentos realizados durante este proyecto—, así como a factores biológicos asociados a la madurez sexual y a la actividad reproductiva observada durante el periodo experimental. Como el objetivo de este análisis fue evaluar la robustez del método de estimación del aislamiento mecánico a partir del conjunto de datos disponibles, no se excluyó ninguno de los registros históricos independientemente del número de intentos por individuo.

Se analizaron 28 grupos—según especie, sexo, tipo de interacción y ecología—, y la mayoría no mostró diferencias significativas en el número de interacciones necesarias para estimar el aislamiento mecánico (implicado en la formación del tándem), lo que indica que una sola interacción por individuo es generalmente suficiente para obtener estimaciones confiables del aislamiento reproductivo. No obstante, en algunos grupos el tamaño de muestra en cada nivel de número de interacciones fue reducido, lo que se refleja en intervalos de confianza más amplios y, en ciertos casos, de forma irregular.

Sin embargo, cuatro subgrupos presentaron diferencias significativas entre la primera y la segunda interacción, lo que sugiere que en ciertos contextos ecológicos o genéticos el aislamiento mecánico requiere más de un intento para reflejar adecuadamente la capacidad de formación del tándem. Estas diferencias se detectaron mediante modelos

lineales mixtos (LMM), mientras que las pruebas *t* pareadas no mostraron resultados significativos tras el ajuste por comparaciones múltiples (ver Anexo 1 y Anexo 2).

Los subgrupos que presentaron diferencias significativas fueron:

Grupo 1) Hembras de *Ischnura elegans* en cruces coespecíficos alopátricos (LMM, $p = 0.019$; Figura 8); Grupo 2) Hembras de *Ischnura elegans* en cruces coespecíficos simpátricos (LMM, $p = 0.017$; Figura 9); Grupo 3) Machos de *I. elegans* en cruces con hembras híbridas simpátricas (LMM, $p = 0.021$; Figura 10); y Grupo 4) Hembras de *I. graellsii* en cruces heteroespecíficos alopátricos (LMM, $p = 0.009$; Figura 11).

Los intervalos de confianza al 95 % (IC95 %) presentaron áreas más cuando el tamaño muestral fue bajo amplias —reflejando una mayor incertidumbre estadística—, especialmente en los casos con un número elevado de interacciones por individuo, ya que es poco frecuente que un macho intente aparearse más de dos o tres veces, lo que limita la disponibilidad de datos. Por otro lado, cuando los intervalos, cuando incluyen el valor 0 (Figura 8, Figura 10 y Figura 11), también sugieren que el número de interacciones no fue suficiente para obtener estimaciones confiables. En la Figura 9, la reducción en la amplitud del IC95 % conforme aumenta el número de interacciones indica que la estimación se estabiliza, lo que permite identificar el número mínimo de interacciones necesario para una estimación robusta.

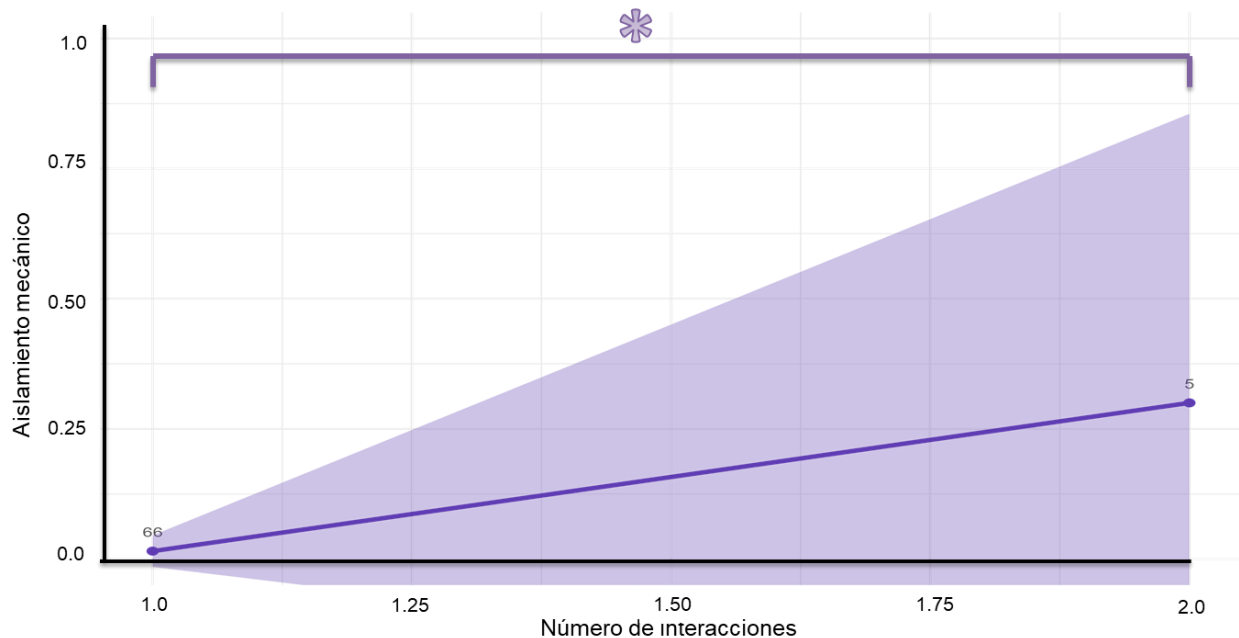


Figura 8. Aislamiento mecánico en hembras alopátricas de *I. elegans* en cruces coespecíficos. El número sobre cada punto indica el tamaño de muestra (*n*) utilizado en la prueba *t* pareada. El área sombreada señala el intervalo de confianza (IC95%) de la estimación del aislamiento mecánico. El símbolo (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre las interacciones.

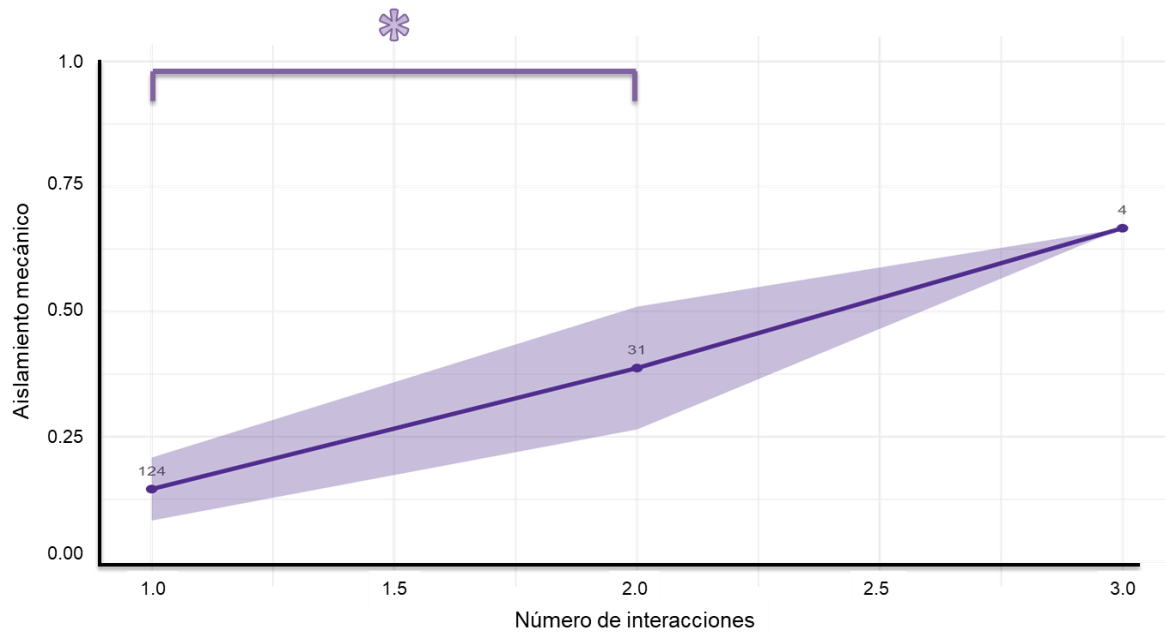


Figura 9. Aislamiento mecánico en hembras simpátricas de *I. elegans* en cruces coespecíficos. El número sobre cada punto indica el tamaño de muestra (n) utilizado en la prueba t pareada. El área sombreada señala el intervalo de confianza (IC95%) de la estimación del aislamiento mecánico. El símbolo (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre las interacciones.

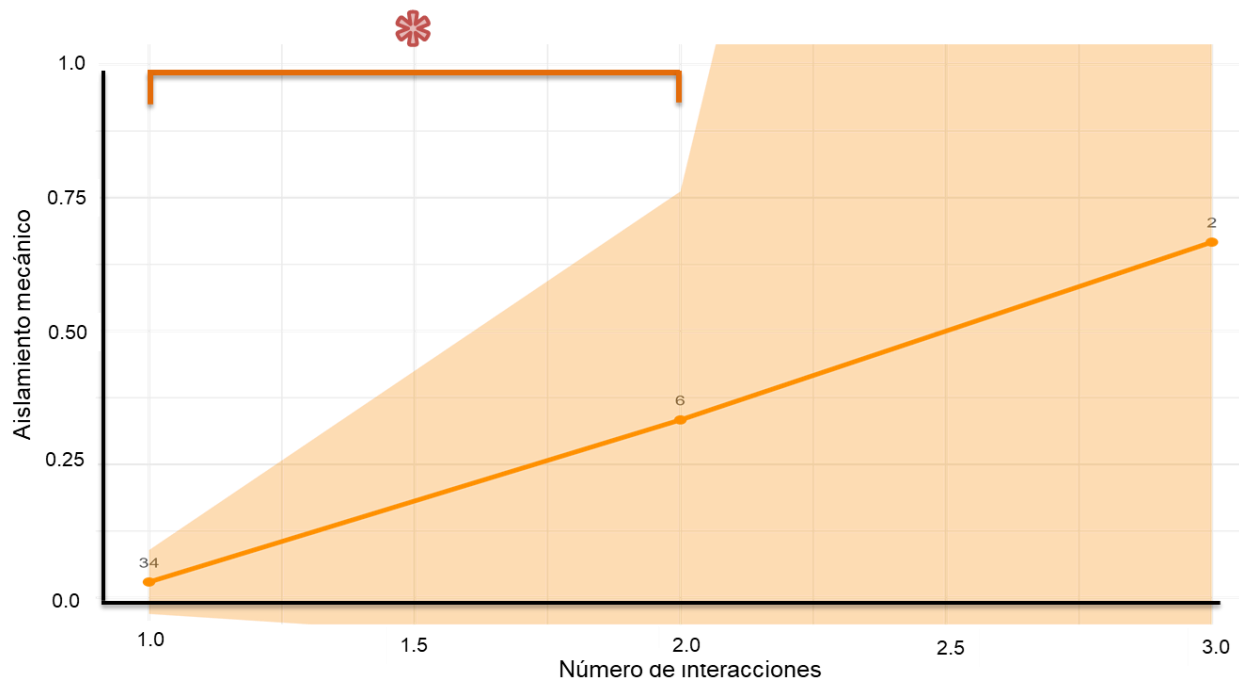


Figura 10. Aislamiento mecánico en machos simpátricos de *I. elegans* en cruces con hembras híbridas. El número sobre cada punto indica el tamaño de muestra (n) utilizado en la prueba t pareada. El área sombreada señala el intervalo de confianza (IC95 %) de la estimación del aislamiento mecánico. El símbolo (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre las interacciones.

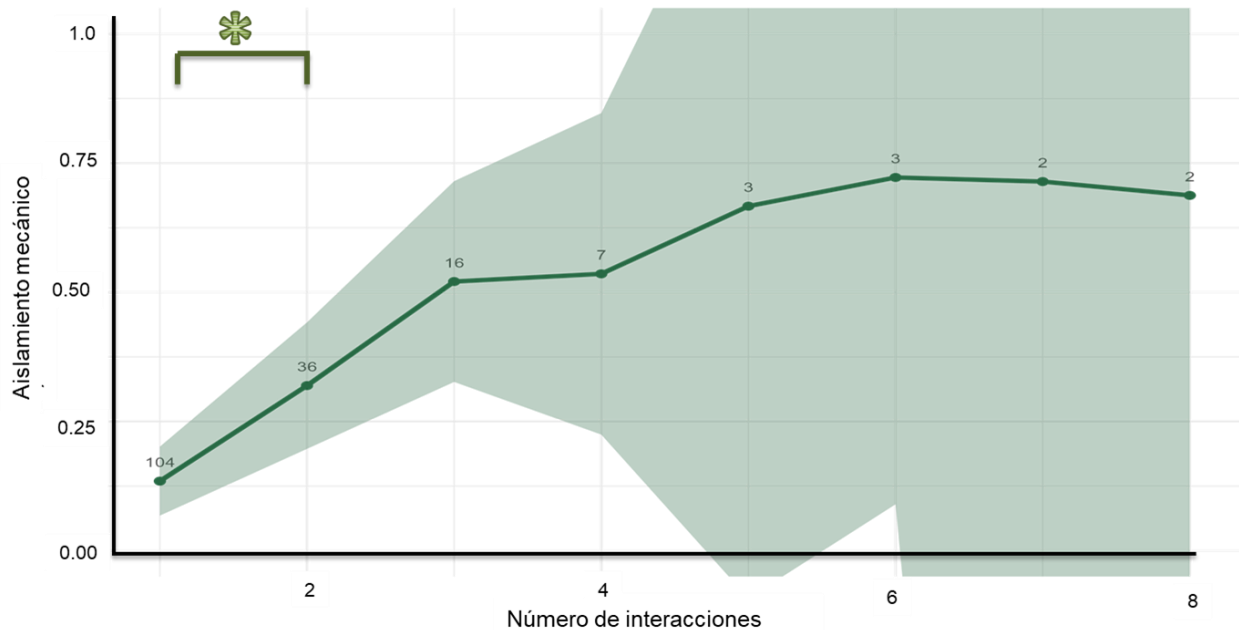


Figura 11. Aislamiento mecánico en hembras alopátricas de *I. graellsii* en cruces heteroespecíficos. El número sobre cada punto indica el tamaño de muestra (n) utilizado en la prueba t pareada. El área sombreada señala el intervalo de confianza (IC95%) de la estimación del aislamiento mecánico. El símbolo (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre las interacciones.

Con respecto a la evaluación del individuo como efecto aleatorio, en la mayoría de los subgrupos analizados, la varianza atribuible al individuo fue distinta de cero, con valores que estuvieron en un rango entre 0 y 6704.72 (Tabla 9; Anexo 2). En particular, algunos subgrupos presentaron valores elevados de varianza individual, como *I. graellsii* alopátrico ♂ heteroespecífico (varianza = 2320.58) e *I. elegans* simpátrico ♀ postcigótico (varianza = 6704.72).

Los valores de R^2 marginal fueron generalmente bajos (≤ 0.15), lo que indica una contribución limitada de los efectos fijos por sí solos al ajuste del modelo. En varios subgrupos, el R^2 condicional fue mayor que el R^2 marginal correspondiente, lo que refleja la contribución adicional del efecto aleatorio del individuo al ajuste del modelo (Tabla 9; Anexo 2). En algunos casos, esta diferencia fue pequeña, particularmente en subgrupos con varianza individual cercana a cero.

3. Reforzamiento temporal y aislamiento en simpatría

A continuación, se presentan los resultados de los análisis estadísticos de las barreras reproductivas que mostraron diferencias significativas a lo largo del tiempo: mecánica, fecundidad y fertilidad. Los resultados completos de estos análisis, incluidos los contrastes y las estimaciones detalladas, se presentan en los Anexos 3 y 4. En el Anexo 5 se incluyen los resultados correspondientes a las barreras que no mostraron resultados significativos (barrera mecánico-táctil y oviposición).

a) Aislamiento precópula mecánico: en la formación del tándem

En cruces que involucran a la hembra de *I. elegans*, se observó una reducción en la formación del tándem heteroespecífico en la etapa intermedia ($p < 0.001$) y en la etapa reciente ($p < 0.001$; Tabla 10, Anexo 3; Tabla 13, Anexo 4; Figura 12). De igual forma, se observa un mayor índice de aislamiento en cruces heteroespecíficos en la etapa intermedia ($IR_{coesp} = 0.018$, $RI_{hetesp} = 0.865$) y en la etapa reciente ($IR_{coesp} = 0.076$, $RI_{hetesp} = 0.968$). De manera similar, en los cruces heteroespecíficos entre machos de *I. elegans* y hembras de *I. graellsii*, se observó un menor éxito en los cruces heteroespecíficos, aunque sólo en la etapa reciente ($p = 0.001$; Tabla 10, Anexo 3; Tabla 13, Anexo 4; Figura 11). De manera similar, el índice de aislamiento es mayor el encontrado en cruces heteroespecíficos a lado de los cruces coespecíficos ($IR_{coesp} = -0.076$, $RI_{hetesp} = 0.419$).

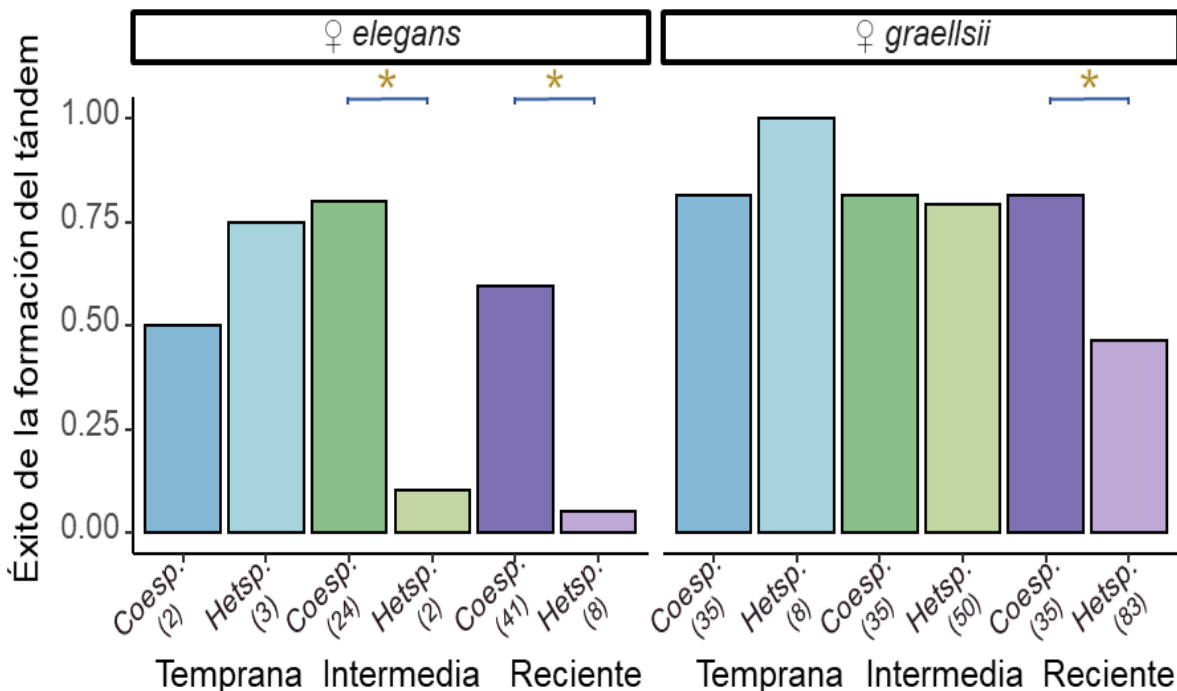


Figura 12. Éxito en la formación del tándem entre cruces coespecíficos y heteroespecíficos en simpatría a lo largo del tiempo. Coesp. = coespecífico, Hetsp. = heteroespecífico. Temprana = etapa temprana; Intermedia = Etapa intermedia; Reciente = Etapa reciente. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas. El número entre paréntesis indica el tamaño de muestra (n) de cada grupo.

Además, se evaluaron los cambios en el éxito de formación del tándem entre las tres etapas temporales en cada tipo de cruce heteroespecífico.

En el cruce heteroespecífico entre macho *I. graellsii* y hembra *I. elegans*, la disminución observada en la formación de tándems heteroespecíficos se observó entre la etapa temprana y la reciente ($p < 0.001$; $IR_{temprana} = 0.750$, $IC95\% = 0.200 - 1.667$; $RI_{reciente} = 0.017$, $IC95\% = 0.006 - 0.031$; Tabla 11, Anexo 3; Tabla 14, Anexo 4; Figura 13), lo cual indica un fortalecimiento de la barra mecánica. Las etapas temprana e intermedia no mostraron diferencias estadísticamente significativas debido, probablemente, a la limitación del tamaño de muestra (Figura 13).

En el cruce recíproco —machos de *I. elegans* con hembras de *I. graellsii*— también se detectó una intensificación de la barrera, evidenciada por una diferencia estadísticamente significativa entre las etapa intermedia y reciente ($p = 0.006$; $IR_{intermedia} = 0.426$, $IC95\% = 0.317 - 0.577$; $R_{reciente} = 0.314$, $IC95\% = 0.246 - 0.396$; Tabla 11, Anexo 3; Tabla 14, Anexo 4; Figura 13). En este caso, la diferencia entre la etapa temprana y la reciente no fue estadísticamente significativa, probablemente por restricciones en el tamaño de muestra.

Ambos tipos de cruces heteroespecíficos mostraron una tendencia al reforzamiento de la barrera mecánica a través del tiempo. El patrón de acción sugiere que dicho reforzamiento ocurrió antes en el cruce de machos de *I. graellsii* y hembras de *I. elegans* y de forma más reciente en el cruce recíproco.

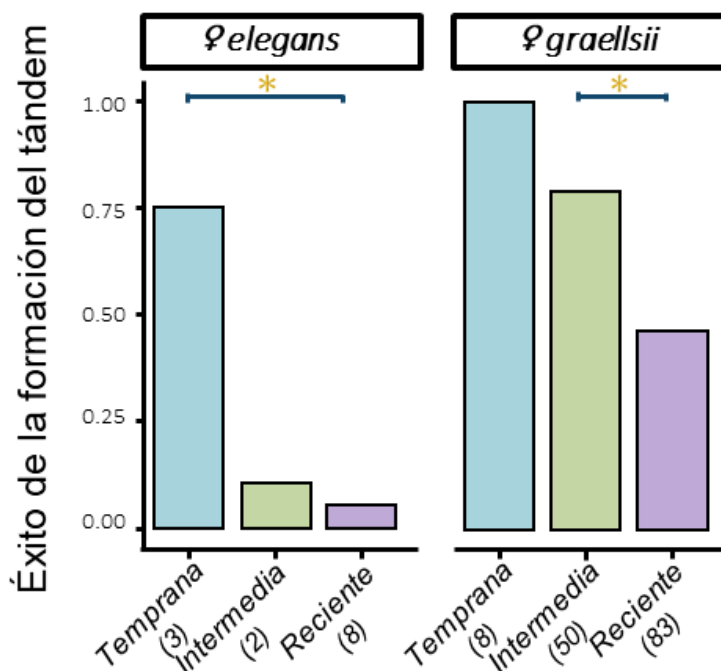


Figura 13. Éxito en la formación del tándem entre cruces heteroespecíficos en simpatria a lo largo del tiempo. Temprana = etapa temprana; Intermedia = etapa intermedia; Reciente = Etapa reciente. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre etapas temporales. El número entre paréntesis indica el tamaño de muestra (n) de cada grupo.

b) Aislamiento postcópula gamético: reducción de la fecundidad

En la barrera de la fecundidad, la diferencia significativa detectada fue en los cruces entre machos de *Ischnura elegans* y hembras de *I. graellsii* en la etapa intermedia, donde se observa que la fecundidad de los cruces heteroespecíficos fue menor que en los cruces coespecíficos ($p < 0.001$; Figura 14). En estos últimos, el índice de aislamiento fue igual a cero ($IR_{\text{coesp}} = 0.0$, $IC95 \% = 0-0$), lo que indica una fecundidad consistentemente alta y sin variación detectable en los cruces coespecíficos. Por otro lado, los cruces heteroespecíficos presentaron un aislamiento positivo ($RI_{\text{hetsp}} = 0.446$, $IC95 \% = 0.148-0.675$), reflejando una reducción significativa en la fecundidad (Tabla 10, Anexo 3; Tabla 13, Anexo 4; Figura 14).

Al comparar la fecundidad en cruces que involucran a la hembra de *I. elegans*, a lo largo de las tres etapas temporales, no se observaron diferencias significativas (Tabla 10, Anexo 3; Tabla 13, Anexo 4).

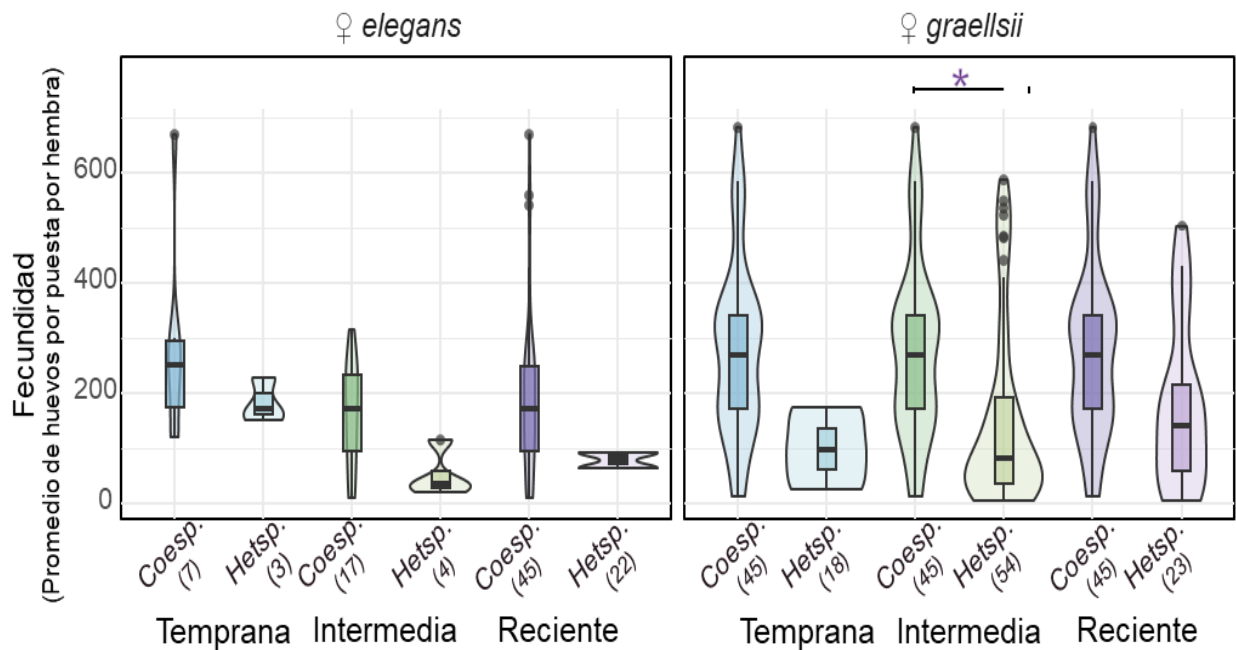


Figura 14. Fecundidad entre cruces coespecíficos y heteroespecíficos en simpatria a lo largo del tiempo. Coesp. = coespecífico, Hetsp. = heteroespecífico). Temprana = etapa temprana; Intermedia = Etapa intermedia; Reciente = Etapa reciente. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas. El número entre paréntesis indica el tamaño de muestra (n) de cada grupo.

c) Aislamiento postcópula gamético: reducción de la fertilidad

La fertilidad mostró variación a lo largo del tiempo entre en cruces coespecíficos y heteroespecíficos, tanto en hembras de *Ischnura elegans* como de *I. graellsii*. En ambos cruces, el patrón temporal sugiere un cambio entre la etapa intermedia y la reciente.

En la etapa intermedia se observa que los cruces heteroespecíficos presentan menor fertilidad en el área de simpatria en hembras de *I. elegans* ($p < 0.001$; Figura 15) y, también, en hembras de *I. graellsii* ($p < 0.001$; Figura 15). Sin embargo, durante la etapa reciente el patrón cambió, ya que los cruces heteroespecíficos presentaron valores de fertilidad similares o ligeramente superiores a los coespecíficos ($p < 0.001$ tanto para *I. elegans* como para *I. graellsii*), lo que se refleja en índices de aislamiento cercanos a cero o negativos, con intervalos de confianza que indican una reducción en la magnitud del aislamiento (Figura 15; Tabla 11, Anexo 3; Tabla 14, Anexo 4).

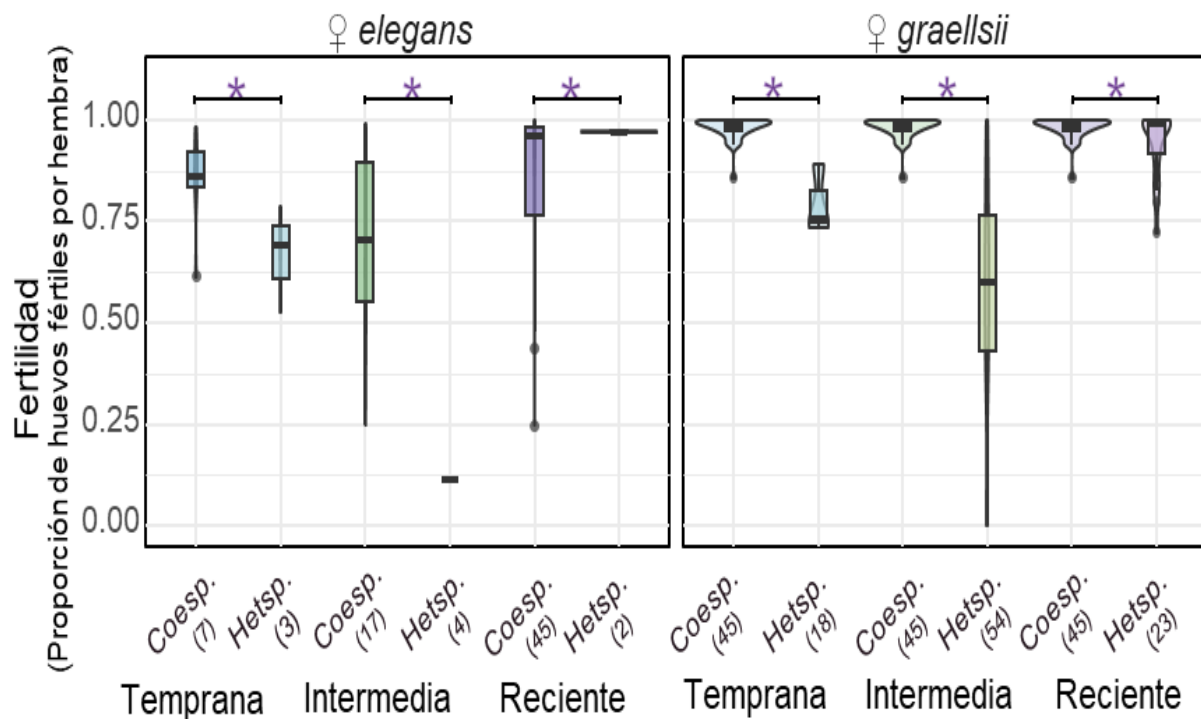


Figura 15. Proporción de huevos fértiles por hembra entre cruces coespecíficos y heteroespecíficos en simpatria en tres etapas temporales. Coesp. = coespecífico, Hetsp. = heteroespecífico. Temprana = etapa temprana; Intermedia = Etapa intermedia; Reciente = Etapa reciente. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas.

Al comparar la fertilidad entre las tres etapas temporales en los cruces heteroespecíficos, ambos cruces recíprocos mostraron un aumento significativo en la etapa reciente en comparación con las etapas temprana e intermedia, tanto en hembras de *Ischnura elegans* como de *I. graellsii* ($p < 0.001$ en todos los casos; Figura 16). Este incremento se reflejó en valores más bajos del índice de aislamiento en fertilidad en la etapa reciente en comparación con las etapas previas.

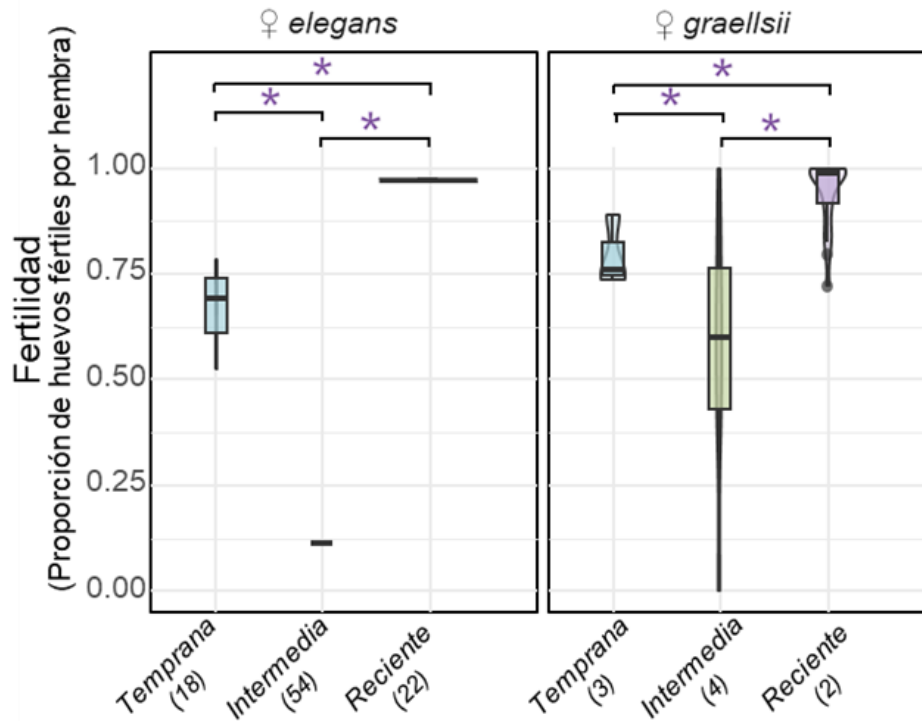


Figura 16. Proporción de huevos fértiles por hembra entre cruces heteroespecíficos entre *I. elegans* e *I. graellsii* en condiciones de simpatria a lo largo del tiempo. Temprana = etapa temprana; Intermedia = Etapa intermedia; Reciente = Etapa reciente. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre etapas.

d) Aislamiento acumulado total

En ambos tipos de cruces heteroespecíficos, el aislamiento reproductivo se ha intensificado con el tiempo, aunque con diferencias en el momento y tipo de barrera que actúa.

En el cruce entre machos de *I. graellsii* y hembras de *I. elegans*, el aislamiento ocurre de manera temprana en la secuencia reproductiva, actuando principalmente a través de la barrera mecánica. En contraste en el cruce recíproco, —machos de *I. elegans* con hembras de *I. graellsii*—, el aislamiento aparece en etapas más tardías, asociado a barreras postcópula como la fecundidad y fertilidad (Figura 17).

El cruce entre los machos de *I. elegans* y las hembras de *I. graellsii* el aislamiento acumulado aumentó progresivamente a lo largo del tiempo ($RI_{etapa\ temprana} = 0.416$; $RI_{etapa\ intermedia} = 0.578$; $RI_{etapa\ reciente} = 0.703$; Figura 17), impulsado principalmente por fortalecimiento gradual de la barrera mecánica ($RI_{etapa\ temprana} = -0.522$, $RI_{etapa\ intermedia} = 0.016$, $RI_{etapa\ reciente} = 0.341$). Este patrón indica que el cruce ha pasado de ser relativamente compatible a mostrar un aislamiento más marcado en etapas recientes, especialmente en las barreras postcópula.

Por su parte, el cruce entre los machos de *I. graellsii* y las hembras de *I. elegans* (Figura 17) alcanzó niveles muy altos de aislamiento reproductivo en la etapa intermedia (RI_{etapa}

intermedia = 0.995) y reciente ($RI_{\text{etapa reciente}} = 0.982$) reflejando un aislamiento casi completo (Figura 17). Este rápido incremento fue consecuencia del reforzamiento notable de la barrera mecánica ($RI_{\text{etapa temprana}} = -0.141$, $RI_{\text{etapa intermedia}} = 0.869$, $RI_{\text{etapa reciente}} = 0.925$), lo que sugiere que el reforzamiento en este cruce ha ocurrido de manera rápida, aunque aún no ha alcanzado aislamiento reproductivo completo.

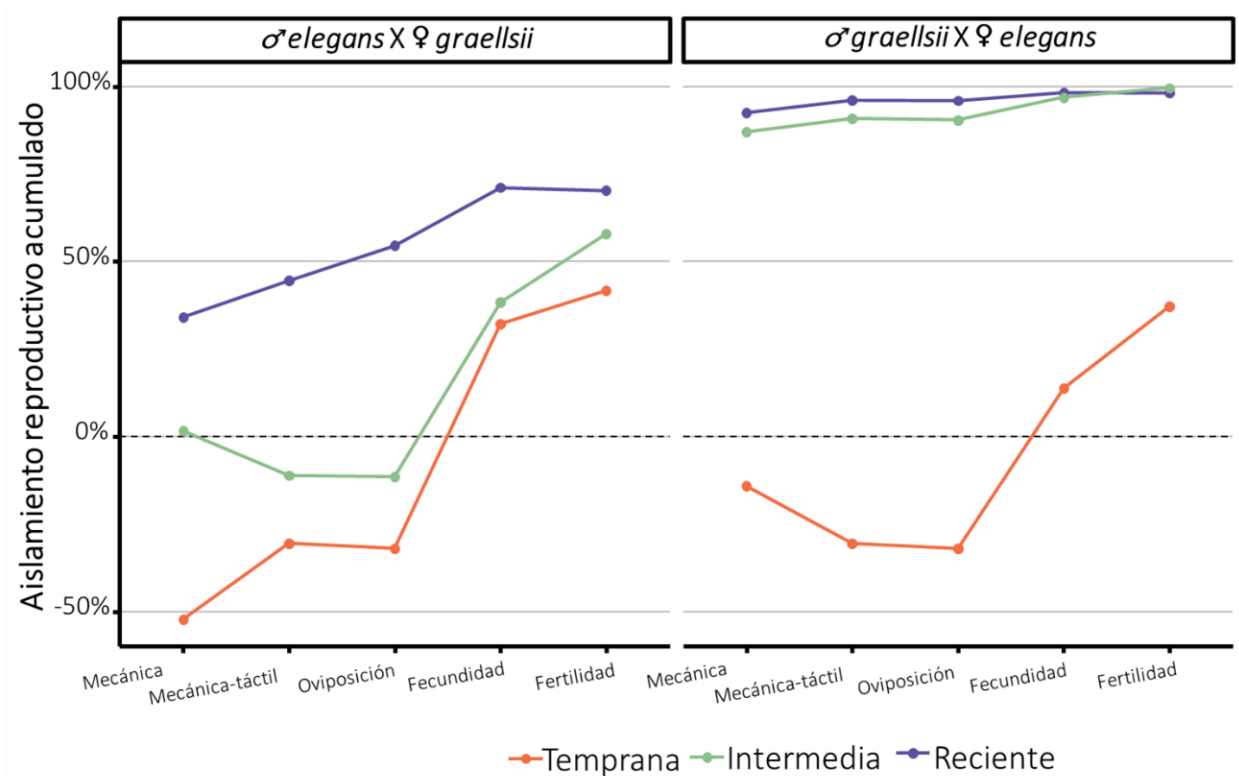


Figura 17. Aislamiento reproductivo acumulado en función del tipo de barrera y bloque temporal

4. Efectos del reforzamiento sobre cruces coespecíficos

En concordancia con la hipótesis inicial, el reforzamiento no solo afectó las interacciones entre especies, sino también la variación coespecífica. En ambos cruces coespecíficos se detectaron diferencias significativas en la barrera mecánica asociada a la formación del tándem, y en componentes postcópula gaméticas, como la fecundidad y la fertilidad.

a) Aislamiento precópula: mecánica en la formación del tándem

Los cruces coespecíficos de *Ischnura elegans* en simpatria, es decir, el éxito en la formación del tándem varió entre etapas temporales, pero en la etapa reciente fue donde mostró diferencias significativas en comparación con los cruces coespecíficos alopátricos ($p = 0.001$; Tabla 12, Anexo 3; Tabla 15, Anexo 4; Figura 18).

En contraste, en *I. graellsii* no se detectaron diferencias significativas entre poblaciones simpátricas y alopátricas en la etapa reciente ($IR_{alo} = -0.116$; $IR_{NO} = 0.278$; Tabla 12, Anexo 3; Tabla 15, Anexo 4; Figura 18).

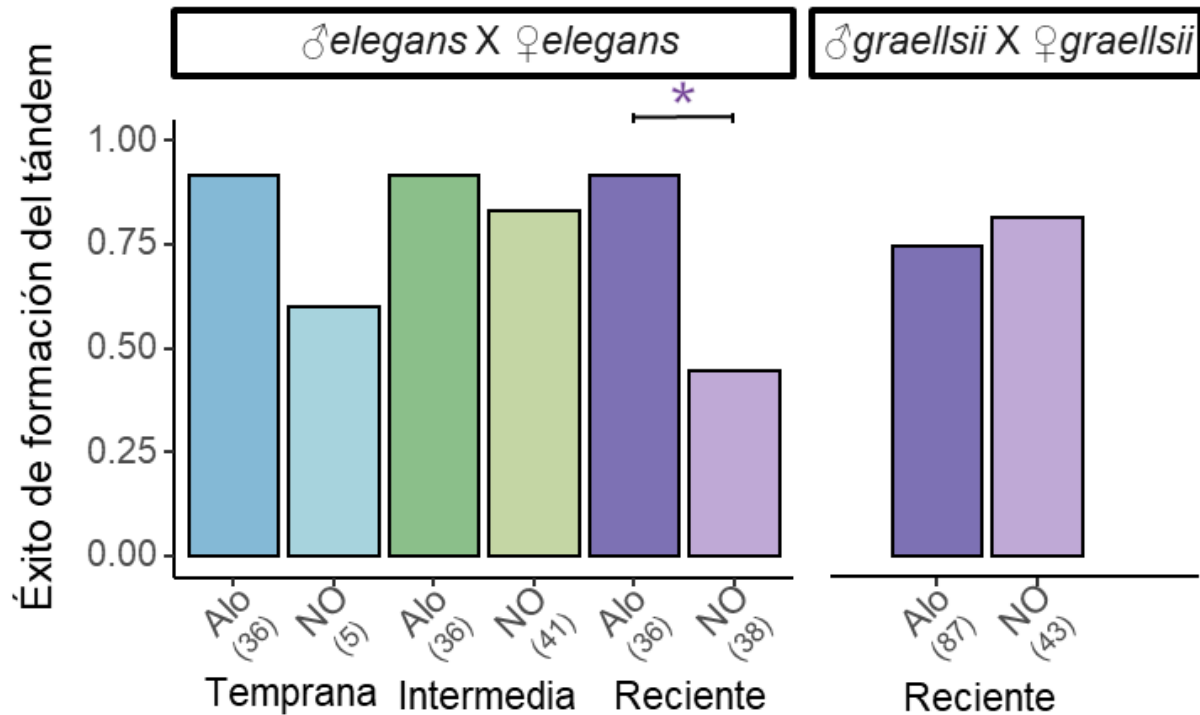


Figura 18. Éxito de la barrera mecánica en la formación del tándem en cruces coespecíficos de alopatria y simpatria a través del tiempo. Alo = Alopatria; NO = zona híbrida del noroeste de España. Temprana = etapa temprana; Intermedia = Etapa intermedia; Reciente = Etapa reciente. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas.

b) Aislamiento postcópula gamética: reducción de la fecundidad

Como se observa en la Figura 19, en *I. elegans*, la fecundidad de los cruces coespecíficos provenientes de poblaciones simpátricas no presentó valores significativos de fecundidad en comparación con los cruces alopátricos.

Por el contrario, en *I. graellsii*, sí se detectaron diferencias entre poblaciones simpátricas y alopátricas ($p < 0.001$; Figura 19), siendo la fecundidad mayor en simpatria. Mas, al existir índices de aislamiento cercanos a cero en ambas ecologías ($IR_{alo} = 0.0$; $IR_{NO} = 0.0$) e intervalos de confianza amplios que incluyeron al cero (Tabla 12, Anexo 3; Tabla 15, Anexo 4), se podría decir que la magnitud de este aislamiento es reducida en la etapa reciente.

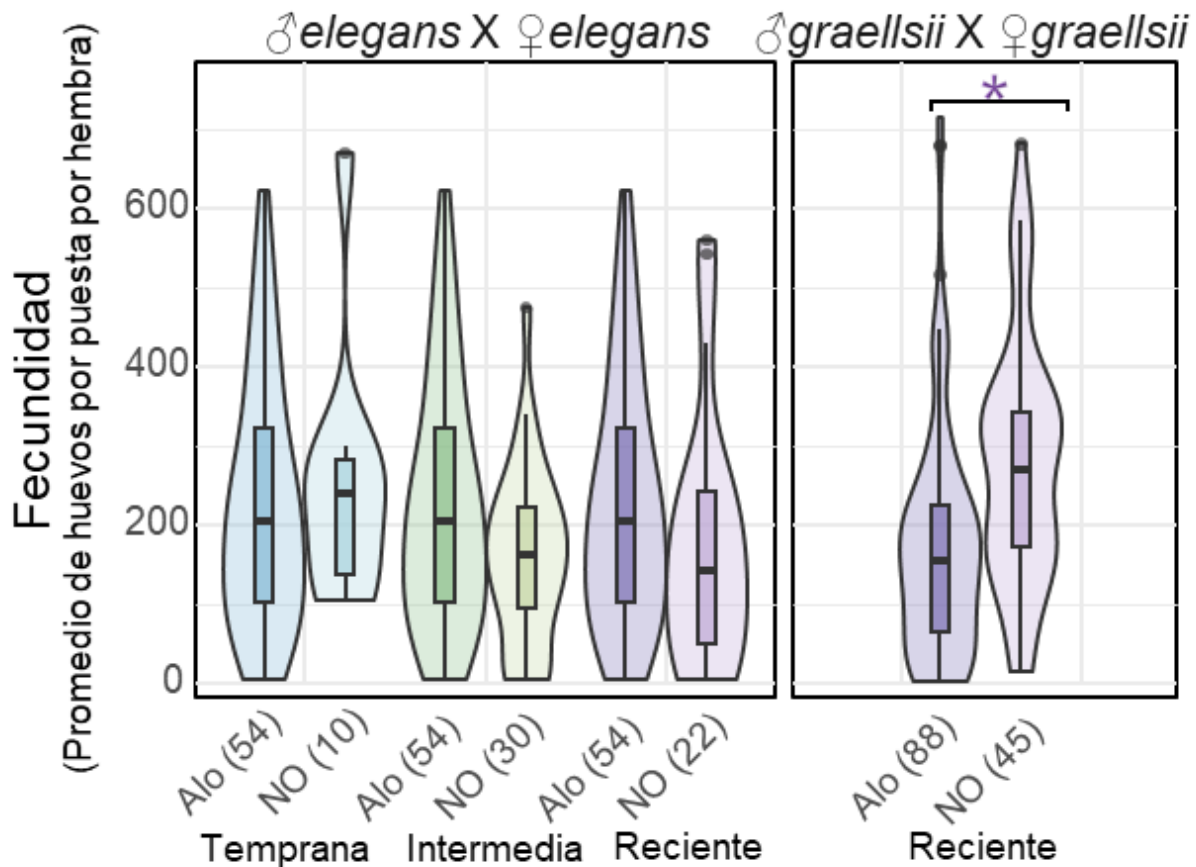


Figura 19. Fecundidad en cruces coespecíficos en alopatria y simpatria a lo largo del tiempo. Alo = Alopatria; NO = zona híbrida del noroeste de España. Temprana = etapa temprana; Intermedia = Etapa intermedia; Reciente = Etapa reciente. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas.

c) Aislamiento postcópula gamética: reducción de la fertilidad

En *Ischnura elegans*, la fertilidad en cruces coespecíficos difirió significativamente entre ecologías en todas las etapas temporales analizadas (Figura 20). En la etapa temprana, la fertilidad fue mayor en los cruces provenientes de la zona de simpatria (NO) en comparación con los de alopatria ($p < 0.001$; $IR_{alo} = 0.064$, $IC95\% = -0.045 - 0.179$; $IR_{NO} = 0.092$, $IC95\% = -0.048 - 0.285$). Este patrón se invirtió en la etapa intermedia ($p < 0.001$; $IR_{alo} = 0.064$, $IC95\% = -0.045 - 0.181$; $IR_{NO} = 0.144$, $IC95\% = -0.002 - 0.295$) y volvió a ser mayor la fertilidad de los cruces coespecíficos de simpatria en comparación con los de alopatria en la etapa reciente ($p < 0.001$; $IR_{alo} = 0.064$, $IC95\% = -0.048 - 0.180$; $IR_{NO} = -0.089$, $IC95\% = -0.202 - 0.115$). Esto indica diferencias en la fertilidad coespecífica entre poblaciones alopátricas y simpátricas a lo largo del tiempo.

De forma similar, en *I. graellsii* se observó una diferencia significativa de la fertilidad de los cruces coespecíficos entre ecologías durante la etapa reciente ($p < 0.001$; Figura 20). En esta etapa, la fertilidad fue menor en las poblaciones alopátricas en comparación con

las simpátricas de la zona híbrida del noroeste ($IR_{alo} = -0.193$, $IC95\% = -0.287 - -0.099$; $IR_{NO} = -0.147$, $IC95\% = -0.259 - -0.071$; Tabla 12, Anexo 3; Tabla 15, Anexo 4).

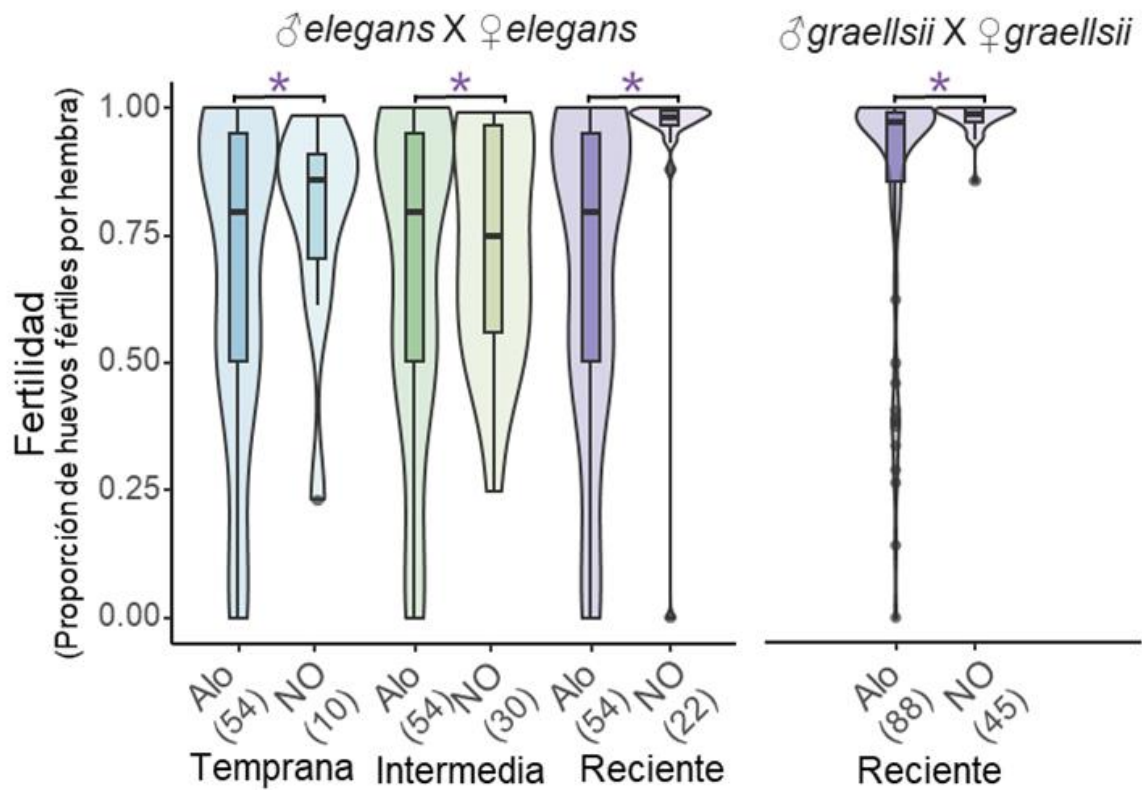


Figura 20. Proporción de huevos fértiles por hembra en cruces coespecíficos de alopatria y simpatria a través del tiempo. Alo = Alopatria; NO = zona híbrida del noroeste de España. Temprana = etapa temprana; Intermedia = Etapa intermedia; Reciente = Etapa reciente. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas

DISCUSIÓN

En este estudio evaluamos la robustez de los datos obtenidos a partir de las interacciones reproductivas y la hipótesis de que la selección natural, a través del reforzamiento, incrementa a lo largo del tiempo la intensidad del aislamiento reproductivo precigótico entre *I. elegans* e *I. graellsii* en la zona híbrida del noroeste de la península ibérica de España. Nuestros resultados muestran una reducción progresiva en el éxito de la formación de tandems heteroespecíficos, consistente con un fortalecimiento precigótico.

En los cruces coespecíficos, los distintos componentes del éxito reproductivo mostraron respuestas contrastantes en simpatría: mientras que el éxito mecánico tendió a disminuir en algunas etapas temporales, la fecundidad no mostró una reducción paralela, e incluso aumentó en ciertos periodos. En conjunto, estos hallazgos sugieren que el reforzamiento continúa actuando como una fuerza evolutiva activa, moldeando la interacción entre estas especies.

1. Fiabilidad del método de estima del aislamiento mecánico para la formación del tandem

El análisis de robustez realizado en este trabajo permitió establecer que en la mayoría de los subgrupos es suficiente una interacción, pero para cuatro subgrupos dos interacciones por individuo fueron necesarias para obtener una estimación confiable del aislamiento. Esto se corroboró mediante comparaciones repetidas del valor acumulado de aislamiento a lo largo de la secuencia de interacciones, evaluando diferencias estadísticamente significativas dentro de cada subgrupo.

Aunque algunos individuos llegaron a registrar hasta doce interacciones, los patrones generales de éxito o fracaso en la formación del tandem tendieron a estabilizarse desde la primera interacción para 24 subgrupos y a partir de la segunda interacción para los cuatro restantes, independientemente de ser cruces coespecíficos o heteroespecíficos o postcigóticos. Los cambios significativos se concentraron entre la primera y la segunda interacción, y no se detectaron variaciones sistémicas en interacciones posteriores, lo que indica que la información crítica sobre la capacidad reproductiva de un individuo puede capturarse con un número reducido de observaciones.

La literatura disponible no aborda de manera explícita el número mínimo de interacciones necesarias por individuo para obtener estimaciones robustas, particularmente para el aislamiento reproductivo precigótico. En este estudio, se estima un umbral mínimo de interacciones que permite evaluar la robustez de las estimaciones de la barra mecánica, considerada una de las principales barreras precigóticas en este sistema. La práctica habitual en estudios de aislamiento reproductivo ha sido asumir que pocas interacciones son suficientes para obtener datos confiables, sin evaluar el efecto de las estimaciones conforme aumenta el número de observaciones (Servedio & Noor, 2003; Coyne & Orr, 2004). De manera paralela, trabajos de comportamiento han mostrado que, cuando la

repetibilidad individual es alta, un número reducido de observaciones puede ser suficiente para caracterizar el desempeño de los individuos (Bell et al., 2009), en concordancia con los patrones observados en este estudio. En contraste, el aprendizaje o efectos de experiencia podría generar cambios sistemáticos con interacciones adicionales (Dukas, 2005), lo cual no fue evidente en nuestros resultados.

A diferencia de lo esperado bajo un escenario de aprendizaje o efectos de la experiencia, que predecirían cambios sistemáticos con interacciones adicionales (Dukas, 2005), nuestros resultados no muestran dicha tendencia. En cambio, el patrón observado es más compatible con una barrera mecánica, en la que la compatibilidad depende de rasgos morfológicos individuales relativamente fijos en machos y hembras, resultando en una consistencia individual del éxito reproductivo. El enfoque metodológico propuesto, basado en la estimación de un umbral mínimo de interacciones por individuo, podría extenderse a otros sistemas biológicos caracterizados por múltiples interacciones reproductivas. Sin embargo, su aplicabilidad a otras barreras reproductivas estará condicionada por la naturaleza de dichas barreras y su repetibilidad a nivel individual.

Finalmente, estos resultados indican que los datos históricos recopilados por el laboratorio desde el año 2000 presentan la calidad y la consistencia necesarias para sustentar análisis evolutivos robustos, tanto en este estudio como en investigaciones futuras.

2. Reforzamiento temporal y aislamiento en simpatría

a) Aislamiento precópula: mecánico en la formación del tándem

El reforzamiento continúa incrementando el aislamiento reproductivo en ambos cruces recíprocos. Nuestros resultados muestran que la intensidad del aislamiento reproductivo asociado a la barrera mecánica implicada en la formación del tándem aumenta a lo largo del tiempo, sobre todo en los periodos más recientes.

Un hallazgo novedoso de este estudio es la evidencia de un reforzamiento mecánico que muestra una transición desde una fase unilateral hacia una bidireccionalidad en *Ischnura*. Detectamos un incremento en la intensidad del aislamiento mecánico tanto en cruces entre machos de *I. elegans* y hembras de *I. graellsii*, como en la dirección opuesta (machos de *I. graellsii* y hembras de *I. elegans*), siendo esta última dirección la que ya presentaba un reforzamiento unilateral desde etapas intermedias (ver Arce-Valdés et al., 2024).

En particular, observamos una reducción significativa en la formación de tándems heteroespecíficos exitosos desde la etapa intermedia hasta la reciente, lo que indica un aumento progresivo del aislamiento mecánico en ambas direcciones.

Este patrón es consistente con la teoría del reforzamiento (Dobzhansky, 1937; Coyne & Orr, 2004), la cual predice la intensificación de barreras precópula en la zona de simpatría

para prevenir la formación de híbridos de menor aptitud. Nuestros hallazgos refuerzan estudios previos de este sistema: Sánchez-Guillén et al. (2012, 2013, 2014) documentaron el inicio de un reforzamiento unilateral en la dirección macho *I. graellsii*–hembra *I. elegans*, posteriormente confirmado y ampliado por Arce-Valdés et al. (2024), quienes evidenciaron un fortalecimiento del aislamiento reproductivo en la zona híbrida del noroeste de la península ibérica en España.

Comparaciones con otros sistemas muestran patrones similares. En *Drosophila subquinaria* y *D. recens*, el reforzamiento mecánico es unilateral (Dyer et al., 2018) mientras que en *D. yakuba* y *D. santomea* se observan indicios de bidireccionalidad (Matute, 2010). Modelos teóricos apoyan que este proceso puede originarse de forma unilateral y, con el tiempo, extenderse a ambas especies cuando los costos de la hibridación afectan a ambas especies o cruces por igual (Servedio & Noor, 2003). En aves del género *Ficedula*, también se ha documentado un reforzamiento que evoluciona desde fases unilaterales hacia una bidireccionalidad (Stre et al., 1997).

En *Ischnura*, los estudios de Arce-Valdés et al. (2024) y Ballén-Guapacha et al. (2024) documentaron patrones unilaterales de reforzamiento y desplazamientos de caracteres reproductivos en ambas especies, pero no reportaron formalmente una transición completa en el tiempo hacia una bidireccionalidad. Por tanto, este estudio representa el primer caso bien documentado en insectos donde se observa un paso de reforzamiento mecánico asimétrico a la bidireccionalidad, evidenciado por el aumento significativo del aislamiento mecánico en ambas direcciones, probablemente impulsado por la intensificación del desplazamiento de caracteres reproductivos descrita por Ballén-Guapacha et al. (2024).

Este estudio no sólo confirma patrones previamente observados en *Ischnura*, sino que también amplía nuestra comprensión del reforzamiento mecánico al mostrar su intensificación en ambos sentidos de cruce, y establece un vínculo directo entre estos patrones y los cambios morfométricos genitales que subyacen a las barreras reproductivas, documentado a lo largo del tiempo. La intensidad acumulada de las barreras precópula muestra un aumento en ambos cruces heteroespecíficos, estando casi completa en machos de *I. graellsii* con hembras de *I. elegans*, mientras que en la dirección opuesta se detecta en el periodo más reciente, funcionando como una primera barrera de defensa frente a la hibridación. Estos hallazgos sugieren que el reforzamiento sigue fortaleciendo las barreras mecánicas en ambas direcciones, incrementando la divergencia entre estas especies en la zona híbrida del noroeste de la península ibérica en España.

b) Aislamiento postcópula gamética: reducción de la fecundidad y reducción de la fertilidad

A diferencia de las barreras precópula mecánicas, las barreras postcópula —fertilidad y fecundidad— no muestran un aumento progresivo del aislamiento en simpatría. La fertilidad mostró una disminución en la etapa intermedia, seguida de un aumento en la etapa reciente, lo cual sugiere una recuperación o incluso una relajación del aislamiento postcópula. De manera similar, la fecundidad presentó una caída significativa en la etapa intermedia solo para cruces heteroespecíficos con hembras de *I. graellsii*, patrón que no persistió en la etapa más reciente, indicando que estas manifestaciones del aislamiento podrían ser transitorias y no reflejar un reforzamiento estable. Este comportamiento contrasta con la hipótesis clásica del reforzamiento, que predice un aumento sostenido del aislamiento reproductivo en zonas de contacto híbrido. Estudios en otros sistemas, como *Drosophila yakuba* y *D. santomea*, muestran un reforzamiento rápido de barreras postcópula tras pocas generaciones de simpatría (Matute, 2010), lo que subraya la diferencia con lo observado en *Ischnura*.

Estos hallazgos se alinean con la idea de que las barreras precópula, como la mecánica, tienden a evolucionar más rápidamente bajo presión de selección directa, mientras que las barreras postcópula —incluyendo fertilidad y fecundidad— presentan una dinámica más lenta, variable y menos predecible (Matute, 2010; Sweigart, 2010).

Una posible explicación para la recuperación observada en la fertilidad durante la etapa reciente es la purga de incompatibilidades genéticas mediante selección natural. En escenarios de hibridación recurrente, el flujo génico heteroespecífico permite que incompatibilidades genéticas de ambas especies se expresen conjuntamente en genomas híbridos, donde pueden generar una reducción en la aptitud. La selección natural actúa entonces eliminando combinaciones genéticas incompatibles, lo que con el tiempo puede reducir la carga de incompatibilidades y favorecer una recuperación parcial de la fertilidad o fecundidad (Dobzhansky, 1937; Muller, 1942; Coyne & Orr, 2004; Sweigart, 2010).

En este contexto, la evidencia de introgresión genética documentada para la zona híbrida del noroeste (Sánchez-Guillén et al., 2011, 2012; Arce-Valdés et al., 2024) indica que la hibridación entre *Ischnura elegans* e *I. graellsii* ha ocurrido de manera sostenida, lo que hace plausible que procesos de purga de incompatibilidades hayan contribuido a los patrones observados en las barreras postcópula.

En conjunto, estos resultados indican que las barreras postcópula —fertilidad y fecundidad— no siguen un patrón consistente de reforzamiento en este sistema. La recuperación de la fertilidad heteroespecífica y la transitoriedad de la disminución de la fecundidad sugieren que estas barreras pueden relajarse evolutivamente cuando las barreras precópula son suficientemente efectivas (Dobzhansky, 1937; Coyne & Orr, 2004).

Este patrón es consistente con la teoría del reforzamiento, la cual propone que la selección natural favorece mecanismos que evitan cruces costosos una vez que existen incompatibilidades postcigóticas que reducen la aptitud de los híbridos (Dobzhansky, 1937; Coyne & Orr, 2004). En este contexto, las barreras precópula, como la barrera mecánica, pueden reforzarse más intensamente porque permiten evitar la hibridación desde las primeras etapas de la reproducción, reduciendo una inversión energética considerable asociada a la cópula, la oviposición y la producción de descendencia de baja aptitud.

Así, aunque los costos postcigóticos son el origen último del reforzamiento, el aislamiento reproductivo puede organizarse de manera no equivalente entre barreras, con un predominio de las barreras precópula en la determinación de la intensidad y estabilidad del aislamiento reproductivo entre *I. elegans* e *I. graellsii*.

3. Efectos del reforzamiento sobre cruces coespecíficos

En *Ischnura elegans*, se observó evidencia de efectos coespecíficos tanto en la barrera mecánica como en la de fecundidad durante la etapa reciente. En *I. graellsii*, la evidencia se detectó en las barreras de fecundidad y fertilidad, también correspondientes a la etapa reciente.

En sistemas donde hay reforzamiento, la selección natural actúa principalmente sobre barreras precópula para evitar cruces heteroespecíficos costosos (Coyne & Orr, 2004), es decir, los rasgos implicados en estas barreras, como los involucrados en la formación del tándem, han llegado a afectar a las interacciones coespecíficas. En *Ischnura*, se ha observado que el éxito mecánico del tándem depende de estructuras reproductivas que están sujetas a una fuerte selección y que son sensibles a la variación morfológica, de esta forma, las modificaciones que se encuentran asociadas al contacto heteroespecífico, pueden afectar el desempeño reproductivo incluso entre individuos de la misma especie (Sánchez-Guillén et al., 2012; Sánchez-Guillén et al., 2013).

De esta forma, los cambios indirectos en el éxito reproductivo coespecífico, como consecuencia indirecta del reforzamiento, se ve reflejado en una menor eficiencia reproductiva en comparación con poblaciones alopátricas (Barton, 2001; Harrison & Larson, 2014). Este patrón es coherente con lo observado en *I. elegans* en la barrera mecánica, donde las poblaciones simpátricas presentan un menor éxito en la formación del tándem en comparación con las alopátricas. Este efecto no implica necesariamente un proceso de especiación incipiente, ya que puede representar una consecuencia colateral de la selección sobre rasgos reproductivos. La ausencia de un patrón equivalente en *I. graellsii* sugiere que las respuestas a estos procesos pueden ser asimétricas entre especies, dependiendo de su historia evolutiva y de la sensibilidad de los rasgos implicados en la reproducción (Harrison & Larson, 2014).

En *I. elegans*, la fertilidad coespecífica mostró una disminución en la etapa intermedia seguida de su recuperación en la etapa reciente, mientras que la fecundidad no presentó diferencias significativas, aunque con una tendencia decreciente en simpatría. Estos patrones reflejan una reducción temporal en la eficiencia reproductiva coespecífica, posiblemente vinculada al contacto con heteroespecíficos y a la historia de mezcla genética con *I. graellsii* (Sánchez-Guillén et al., 2011, 2012).

Por otro lado, *I. graellsii* presentó mayor fertilidad y fecundidad en poblaciones simpátricas respecto a las alopátricas, lo que podría indicar una mejora en la eficiencia reproductiva, posiblemente derivada de la purga de incompatibilidades genéticas o de procesos de selección estabilizadora tras un contacto prolongado con *I. elegans* (Sánchez-Guillén et al., 2011, 2012).

En conjunto, estos hallazgos muestran que el flujo heteroespecífico puede generar efectos unilaterales sobre la reproducción coespecífica. Mientras que *I. elegans* experimenta una disminución temporal en la fertilidad, *I. graellsii* presenta un aumento en fecundidad, mostrando respuestas contrarias frente al contacto sostenido con heteroespecíficos.

Implicaciones evolutivas en la conservación

Los resultados de este estudio muestran que el reforzamiento no solo actúa como un mecanismo que reduce la hibridación entre especies, sino que también puede generar efectos indirectos sobre el desempeño reproductivo coespecífico en poblaciones simpátricas. En particular, los cambios observados en la formación del tándem y en componentes del éxito reproductivo en *Ischnura elegans*, así como los patrones contrastantes observados en *I. graellsii*, evidencian que el contacto heteroespecífico sostenido puede tener consecuencias evolutivas relevantes a nivel poblacional.

En un contexto de cambio climático, propensos a la expansión de rangos de distribución y de alteración de hábitats, los eventos de contacto secundario entre especies son cada vez más frecuentes. El sistema *Ischnura elegans*–*Ischnura graellsii* constituye un ejemplo bien documentado de cómo estos procesos pueden dar lugar a hibridación, reforzamiento y respuestas evolutivas diferenciadas entre especies. Si bien este estudio no tiene como objetivo proponer herramientas directas de gestión, sus resultados aportan un marco conceptual que funcionará para comprender cómo el reforzamiento puede influir en la dinámica reproductiva de poblaciones naturales.

Desde una perspectiva de conservación, estos hallazgos resaltan la importancia de considerar procesos evolutivos dinámicos —como el reforzamiento y sus efectos colaterales— al evaluar poblaciones en zonas de simpatría. La variación observada entre especies sugiere que las respuestas al contacto heteroespecífico pueden ser altamente contextuales y unilaterales, lo que refuerza la necesidad de estudios comparativos en diferentes sistemas.

Aunque los odonatos, y en particular el género *Ischnura*, ya se han consolidado como modelos relevantes en la biología evolutiva, continúan siendo poco integrados en enfoques de conservación aplicada. Estudios futuros que combinen datos evolutivos, ecológicos y demográficos podrían aprovechar los patrones aquí descritos, contribuyendo a una comprensión integral de la conservación de la biodiversidad en escenarios de cambio global.

CONCLUSIONES

Fiabilidad del método de estima del aislamiento mecánico para la formación del tándem

Los resultados de este estudio indican que, en la mayoría de los subgrupos analizados, una sola interacción por individuo es suficiente para obtener estimaciones confiables del aislamiento mecánico. Únicamente en cuatro subgrupos fue necesario registrar al menos dos interacciones por individuo: (a) hembras de *Ischnura elegans* en cruces coespecíficos en alopatría, (b) hembras de *I. elegans* en cruces coespecíficos en simpatría, (c) machos de *I. elegans* en cruces con hembras híbridas en simpatría y (d) hembras de *I. graellsii* en cruces heteroespecíficos en simpatría.

En conjunto, estos resultados respaldan la hipótesis de que existe un número mínimo de interacciones que nos permiten obtener información sobre la capacidad reproductiva individual, y permiten concluir que la base de datos histórica, construida desde el año 2000, es robusta y confiable para los análisis evolutivos realizados en este estudio, así como para investigaciones futuras.

Reforzamiento temporal y aislamiento en simpatría

De acuerdo con las predicciones planteadas, los resultados muestran que el aislamiento reproductivo precópula, observado en la barrera mecánica, se ha intensificado a lo largo del tiempo en la zona híbrida del noroeste, disminuyendo el éxito de la formación del tándem heteroespecífico. En particular, se detectó un mayor aislamiento mecánico en el cruce recíproco entre machos de *I. graellsii* y hembras de *I. elegans* desde el periodo intermedio, y por primera vez se observó un incremento en la intensidad del aislamiento reproductivo en la dirección contraria (macho de *I. elegans* × hembra de *I. graellsii*) durante el periodo reciente.

Estos patrones son consistentes con la hipótesis de que el reforzamiento continúa actuando en este sistema de manera acumulativa, consolidando la barrera mecánica en ambas direcciones recíprocas. En contraste, las barreras de fertilidad y fecundidad no mostraron un reforzamiento estable a lo largo del tiempo, lo que confirma que la barrera mecánica desempeña un papel predominante en la reducción de los cruces heteroespecíficos en este sistema.

Se evidencia una transición desde un reforzamiento unilateral hacia la bidireccionalidad, siendo este estudio el primer caso documentado en insectos que muestra este patrón.

Efectos del reforzamiento sobre cruces coespecíficos

Con base en el tercer objetivo del estudio, se evaluó si el reforzamiento y el contacto heteroespecífico sostenido podían generar efectos colaterales sobre el éxito reproductivo coespecífico. Los resultados obtenidos respaldan parcialmente esta hipótesis, al evidenciar respuestas diferenciadas entre especies y barreras reproductivas.

En *I. elegans*, se observaron fluctuaciones temporales en la formación del tándem, siendo significativamente menor el éxito en la etapa reciente para poblaciones simpátricas en comparación con las alopátricas. Esto sugiere que la intensificación del aislamiento mecánico heteroespecífico puede estar asociado a una reducción indirecta en el éxito mecánico coespecífico en simpatría. En contraste, *I. graellsii* no mostró un patrón equivalente en la formación del tándem, lo que evidencia una respuesta asimétrica a los mismos procesos evolutivos.

En cuanto a las barreras postcópula, *I. elegans* presentó una disminución temporal en la fertilidad durante la etapa intermedia, seguida de una recuperación en la etapa reciente, mientras que *I. graellsii* mostró mayores valores de fertilidad y fecundidad en poblaciones simpátricas respecto a las alopátricas. Estos resultados indican que el contacto heteroespecífico puede generar efectos indirectos sobre la reproducción coespecífica.

Estos resultados dan certeza de la complejidad de los efectos indirectos del reforzamiento derivados del contacto heteroespecífico, los cuales pueden manifestarse de manera asimétrica y son dependientes de la barrera considerada. En este sistema, dichos efectos resultan más evidentes en *I. elegans*, particularmente en la barrera mecánica, que constituye un componente clave para la reducción de cruces heteroespecíficos.

Implicaciones evolutivas y de conservación

Los resultados de este estudio indican que el reforzamiento mecánico actúa como un mecanismo efectivo para reducir la formación de híbridos entre *Ischnura elegans* e *I. graellsii*; sin embargo, también puede generar efectos colaterales sobre la reproducción coespecífica, particularmente en poblaciones simpátricas. Estos efectos, observados de manera más consistente en *I. elegans*, sugieren que el reforzamiento no solo influye en la separación entre especies, sino que también puede afectar la cohesión reproductiva dentro de las especies.

Desde una perspectiva evolutiva, la dinámica temporal del reforzamiento en las barreras reproductivas pone en manifiesto que el contacto heteroespecífico a lo largo del tiempo puede generar consecuencias divergentes entre especies, dependiendo de su historia evolutiva. Este hallazgo es particularmente relevante en escenarios de simpatría secundaria, como aquellos derivados de expansiones de rango de distribución o de cambios ambientales, donde el contacto entre especies previamente alopátricas puede intensificarse.

En términos de conservación, estos resultados resaltan la importancia de considerar procesos evolutivos dinámicos —como el reforzamiento y sus efectos indirectos— al evaluar la viabilidad a largo plazo de poblaciones naturales. En lugar de asumir que el reforzamiento actúa exclusivamente como un mecanismo protector frente a la hibridación,

este estudio muestra que sus consecuencias pueden ser complejas y asimétricas, lo que subraya la necesidad de integrar enfoques evolutivos en el estudio y seguimiento de poblaciones en zonas de contacto interespecífico.

SÍNTESIS FINAL

El estudio demuestra que el reforzamiento mecánico es una fuerza evolutiva activa en el sistema *Ischnura elegans*-*Ischnura graellsii*, capaz de generar aislamiento bidireccional a lo largo del tiempo. En contraste, las barreras postcópula reflejan principalmente la historia de contacto heteroespecífico y flujo genético entre estas especies.

La combinación de estos procesos revela que el reforzamiento no solo contribuye a la reducción de cruces heteroespecíficos, sino que también puede generar efectos indirectos y unilaterales sobre la reproducción coespecífica en poblaciones simpátricas. Estos resultados ponen de manifiesto la complejidad de las respuestas evolutivas al contacto secundario entre especies y subrayan la relevancia de considerar tanto los efectos directos como los colaterales del reforzamiento para comprender la dinámica reproductiva y la persistencia de poblaciones naturales en contextos ambientales cambiantes.

LITERATURA CITADA

- Adavoudi, R., & Pilot, M. (2022). Consequences of Hybridization in Mammals: A Systematic Review. *Genes*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/genes13010050>
- Ahamed, M. R. A. (2006). *Reproductive isolation in the striped mouse Rhabdomys: A case for reinforcement?* <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.31504.40964>
- Anderson, C. B., Ospina, O., Beerli, P., Lemmon, A. R., Banker, S. E., Hassinger, A. B., Dye, M., Kortyna, M. L., & Lemmon, E. M. (2023). The population genetics of speciation by cascade reinforcement. *Ecology and Evolution*, 13(2), e9773. <https://doi.org/10.1002/ece3.9773>
- Arce-Valdés, L. R., Ballén-Guapacha, A. V., Rivas-Torres, A., Chávez-Ríos, J. R., Wellenreuther, M., Hansson, B., & Sánchez Guillén, R. A. (2024). Testing the predictions of reinforcement: Long-term empirical data from a damselfly mottled hybrid zone. *Journal of Evolutionary Biology*, voae124. <https://doi.org/10.1093/jeb/voae124>
- Arnold, M. L., Bulger, M. R., Burke, J. M., Hempel, A. L., & Williams, J. H. (1999). Natural Hybridization: How Low Can You Go and Still Be Important? *Ecology*, 80(2), 371-381. <https://doi.org/10.2307/176618>
- Askew, R. (2004). *The Dragonflies of Europe (Revised Edition)*.
- Ballén-Guapacha, A., Ospina-Garcés, S., Guevara, R., & Sánchez Guillén, R. (2024). Reproductive character displacement: Insights from genital morphometrics in damselfly hybrid zones. *Heredity*, 133. <https://doi.org/10.1038/s41437-024-00719-9>
- Bartoń, K. (2025). *MuMIn: Multi-Model Inference*. <https://CRAN.R-project.org/package=MuMIn>
- Barton, N. H. (2001). The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology*, 10(3), 551-568. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2001.01216.x>
- Barton, N. H., & Hewitt, G. M. (1985). Analysis of Hybrid Zones. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16, 113-148.

- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1-48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Bell, A. M., Hankison, S. J., & Laskowski, K. L. (2009). The repeatability of behaviour: A meta-analysis. *Animal Behaviour*, 77(4), 771-783. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2008.12.022>
- Bock, I. R. (1984). Interspecific Hybridization in the Genus *Drosophila*. En M. K. Hecht, B. Wallace, & G. T. Prance (Eds.), *Evolutionary Biology: Volume 18* (pp. 41-70). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6977-0_3
- Brooks, S. (2007). The dragonflies of Europe. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 149(1), 139. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2006.00265.x>
- Castillo, D. M. (2017). Factors contributing to the accumulation of reproductive isolation: A mixed model approach. *Ecology and Evolution*, 7(15), 5808-5820. <https://doi.org/10.1002/ece3.3093>
- Comeault, A. A., & Matute, D. R. (2016). Reinforcement's incidental effects on reproductive isolation between conspecifics. *Current Zoology*, 62(2), 135-143. <https://doi.org/10.1093/cz/zow002>
- Cooper, G., Holland, P. W. H., & Miller, P. L. (1996). Captive breeding of *Ischnura elegans* (Vander Linden): Observations on longevity, copulation and oviposition (Zygoptera: Coenagrionidae). *Odonatologica*, 25(3), 261-273.
- Corbet, P. S. (1980). Biology of Odonata. *Annual Review of Entomology*, 25(1), 189-217. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.25.010180.001201>
- Cordero, A. (1989). Reproductive behaviour of *Ischnura graellsii* (Rambur) (Zygoptera: Coenagrionidae). *Odonatologica*, 18(3), 237-244.
- Cordero, A. (1990). The inheritance of female polymorphism in the damselfly *Ischnura graellsii* (Rambur) (Odonata: Coenagrionidae). *Heredity*, 64(3), 341-346. <https://doi.org/10.1038/hdy.1990.42>

- Cordero, A. (1992a). Density-Dependent Mating Success and Colour Polymorphism in Females of the Damselfly *Ischnura graellsii* (Odonata: Coenagrionidae). *Journal of Animal Ecology*, 61(3), 769-780. <https://doi.org/10.2307/5630>
- Cordero, A. (1992b). *Morphological variability, female polymorphism and heritability of body length in Ischnura graellsii* (Rambur) (Zygoptera: Coenagrionidae). <http://archive.org/details/odonatologica-21-409-419>
- Cordero, A. (2000). An analysis of multivariate selection in a non-territorial damselfly (Odonata, Coenagrionidae). *Etología: Revista de La Sociedad Española de Etología*, 8, 37-41.
- Cordero, A., Carbone, S. S., & Utzeri, C. (1998). Mating opportunities and mating costs are reduced in androchrome female damselflies, *Ischnura elegans* (Odonata). *Animal Behaviour*, 55(1), 185-197. <https://doi.org/10.1006/anbe.1997.0603>
- Cordero, A., & Egido, F. J. (1998). Mating frequency, population density and female polychromatism in the damselfly *Ischnura graellsii*: An analysis of four natural populations. *Etología: Revista de La Sociedad Española de Etología*, 6, 61-67.
- Cordero, A., & Miller, P. L. (1992). Sperm transfer, displacement and precedence in *Ischnura graellsii* (Odonata: Coenagrionidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 30(3), 261-267. <https://doi.org/10.1007/BF00166711>
- Cordero Rivera, A. (2002). Influencia de la selección sexual sobre el comportamiento reproductor de los Odonatos. *Evolución : la base de la biología*, 2002, ISBN 84-8254-139-0, págs. 497-508, 497-508. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1005035>
- Cordero-Rivera, A., Ecoevo, G., de Vigo, U., & Xunqueira, A. (2015). *El género Ischnura en España y Portugal: Guía de identificación a partir de fotografías*.
- Córdoba-Aguilar, A., & Sánchez Guillén, R. (2012). El sexo en tiempos de cambio climático. *OIKOS (UNAM)*.

- Coyne, J. A., & Orr, H. A. (1989). PATTERNS OF SPECIATION IN DROSOPHILA1. *Evolution*, 43(2), 362-381. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb04233.x>
- Coyne, J. A., & Orr, H. A. (2004). *Speciation*. Oxford University Press.
- Deo, M., Yu, J.-Y., Chung, K.-H., Tippens, M., & Turner, D. L. (2006). Detection of mammalian microRNA expression by in situ hybridization with RNA oligonucleotides. *Developmental Dynamics*, 235(9), 2538-2548. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20847>
- Dobzhansky, T. (1937). *Genetics and the Origin of Species: Columbia Classics edition* (p. 364 Pages). Columbia University Press.
- Drury, J. P., Cowen, M. C., & Grether, G. F. (2020). Competition and hybridization drive interspecific territoriality in birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(23), 12923-12930. <https://doi.org/10.1073/pnas.1921380117>
- Dukas, R. (2005). Learning affects mate choice in female fruit flies. *Behavioral Ecology*, 16(4), 800-804. <https://doi.org/10.1093/beheco/ari057>
- Dyer, K. A., Bewick, E. R., White, B. E., Bray, M. J., & Humphreys, D. P. (2018). *Data from: Fine-scale geographic patterns of gene flow and reproductive character displacement in drosophila subquinaria and d. recens* (Versión 1, p. 869250 bytes) [Dataset]. Dryad. <https://doi.org/10.5061/DRYAD.80C3Q54>
- EBIOPT. (2015). Foto 23216380, (c) EBIOPT, todos los derechos reservados, subido por EBIOPT · *NaturaLista Colombia*. NaturaLista Colombia. <https://colombia.inaturalist.org/photos/23216380>
- Folk, R. A., Visger, C. J., Soltis, P. S., Soltis, D. E., & Guralnick, R. P. (2018). Geographic Range Dynamics Drove Ancient Hybridization in a Lineage of Angiosperms. *The American Naturalist*, 192(2), 171-187. <https://doi.org/10.1086/698120>

- Gillott, C. (Ed.). (2005). Paleoptera. En *Entomology* (pp. 127-145). Springer Netherlands.
https://doi.org/10.1007/1-4020-3183-1_6
- Harrison, R. G., & Larson, E. L. (2014). Hybridization, Introgression, and the Nature of Species Boundaries. *Journal of Heredity*, 105(S1), 795-809. <https://doi.org/10.1093/jhered/esu033>
- Hartig, F. (2025). *DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models* [Software]. <https://github.com/florianhartig/dharma>
- Helén, B. C. (2016). *Phenotypic Divergence in a Hybrid Species: The roles of Isolation, Drift and Selection* [Master thesis]. <https://www.duo.uio.no/handle/10852/52378>
- Higgie, M., Chenoweth, S., & Blows, M. W. (2000). Natural selection and the reinforcement of mate recognition. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5491), 519-521.
<https://doi.org/10.1126/science.290.5491.519>
- Hinojosa, J. C., Dapporto, L., Pitteloud, C., Koubínová, D., Hernández-Roldán, J., Vicente, J. C., Alvarez, N., & Vila, R. (2022). Hybridization fuelled diversification in *Spialia* butterflies. *Molecular Ecology*, 31(10), 2951-2967. <https://doi.org/10.1111/mec.16426>
- Hodecek, J. (2010). Foto 67913859, (c) Jiri Hodecek, algunos derechos reservados (CC BY-NC), subido por Jiri Hodecek · NaturaLista Colombia. NaturaLista Colombia.
<https://colombia.inaturalist.org/photos/67913859>
- Hopkins, R. (2013). Reinforcement in plants. *New Phytologist*, 197(4), 1095-1103.
<https://doi.org/10.1111/nph.12119>
- Hoskin, C. J., Higgie, M., McDonald, K. R., & Moritz, C. (2005). Reinforcement drives rapid allopatric speciation. *Nature*, 437(7063), 1353-1356. <https://doi.org/10.1038/nature04004>
- Howard, D. J. (1993). Reinforcement: Origin, Dynamics, and Fate of an Evolutionary Hypothesis. En R. G. Harrison (Ed.), *Hybrid Zones and the Evolutionary Process* (p. 0). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780195069174.003.0003>

- John, M. E., & Fuller, R. C. (2021). Asymmetric reinforcement in *Lucania killifish*: Assessing reproductive isolation when both sexes choose. *Current Zoology*, 67(2), 215-224.
<https://doi.org/10.1093/cz/zoaa049>
- Jones, J. M. (1973). EFFECTS OF THIRTY YEARS HYBRIDIZATION ON THE TOADS *BUFO AMERICANUS* AND *BUFO WOODHOUSII FOWLERI* AT BLOOMINGTON, INDIANA¹. *Evolution*, 27(3), 435-448. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1973.tb00690.x>
- Juárez-Jiménez, A. L. (2024a). *Figura 5. Instalaciones del laboratorio para la cría, marcaje y estudio de Ischnura en condiciones controladas* [Fotografía].
- Juárez-Jiménez, A. L. (2024b). *Figura 6. Observación de interacciones reproductivas entre individuos de I. elegans e I. graellsii* [Fotografía].
- Juárez-Jiménez, A. L. (2025). *Figura 7. Fases reproductivas de Ischnura y las barreras reproductivas que representan según la secuencia del proceso reproductivo* [Ilustración digital].
- Justyn, N. M., Callaghan, C. T., & Hill, G. E. (2020). Birds rarely hybridize: A citizen science approach to estimating rates of hybridization in the wild*. *Evolution*, 74(6), 1216-1223.
<https://doi.org/10.1111/evo.13943>
- Kay, K. M., & Schemske, D. W. (2008). NATURAL SELECTION REINFORCES SPECIATION IN A RADIATION OF NEOTROPICAL RAINFOREST PLANTS. *Evolution*, 62(10), 2628-2642.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00463.x>
- Koopman, K. F. (1950). Natural Selection for Reproductive Isolation Between *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila persimilis*. *Evolution*, 4(2), 135-148.
<https://doi.org/10.2307/2405390>
- Kuznetsova, V., Maryńska-Nadachowska, A., Anokhin, B., Shapoval, N., & Shapoval, A. (2021). Chromosomal analysis of eight species of dragonflies (Anisoptera) and damselflies (Zygoptera) using conventional cytogenetics and fluorescence in situ hybridization: Insights

- into the karyotype evolution of the ancient insect order Odonata. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 59(2), 387-399. <https://doi.org/10.1111/jzs.12429>
- Lenth, R. V. (2018). emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. *Journal of Statistical Software*, 34(1), 1-28. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.emmeans>
- Lukhtanov, V. A., Kandul, N. P., Plotkin, J. B., Dantchenko, A. V., Haig, D., & Pierce, N. E. (2005). Reinforcement of pre-zygotic isolation and karyotype evolution in *Agrodiaetus* butterflies. *Nature*, 436(7049), Article 7049. <https://doi.org/10.1038/nature03704>
- Mallet, J. (2005). Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in ecology & evolution*, 20, 229-237. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.02.010>
- Mallet, J., Beltrán, M., Neukirchen, W., & Linares, M. (2007). Natural hybridization in heliconiine butterflies: The species boundary as a continuum. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 28. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-28>
- Matute, D. R. (2010). Reinforcement of Gametic Isolation in *Drosophila*. *PLOS Biology*, 8(3), e1000341. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000341>
- Matute, D. R., & Ayroles, J. F. (2014). Hybridization occurs between *Drosophila simulans* and *D. sechellia* in the Seychelles archipelago. *Journal of Evolutionary Biology*, 27(6), 1057-1068. <https://doi.org/10.1111/jeb.12391>
- Matute, D. R., & Ortiz-Barrientos, D. (2014). Speciation: The Strength of Natural Selection Driving Reinforcement. *Current Biology*, 24(19), R955-R957. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.08.033>
- Miller, P. L. (1987). An examination of the prolonged copulations of *Ischnura elegans* (Vander Linden) (Zygoptera: Coenagrionidae). *Odonatologica*, 16(1), 37-56.
- Monetti, L., Sánchez-Guillén, R. A., & Cordero Rivera, A. (2002). Hybridization between *Ischnura graellsii* (Vander Linder) and *I. elegans* (Rambur) (Odonata: Coenagrionidae): are they

- different species? *Biological Journal of the Linnean Society*, 76(2), 225-235.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2002.tb02084.x>
- Moran, R. L., Zhou, M., Catchen, J. M., & Fuller, R. C. (2018). Hybridization and postzygotic isolation promote reinforcement of male mating preferences in a diverse group of fishes with traditional sex roles. *Ecology and Evolution*, 8(18), 9282-9294.
<https://doi.org/10.1002/ece3.4434>
- Muller, H. J. (1942). Isolating mechanisms, evolution, and temperature. *Biology Symposium*, 6(71-125). <https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=791907>
- Nava-Bolaños, A., Sánchez-Guillén, R. A., Munguía-Steyer, R., & Córdoba-Aguilar, A. (2017). Isolation barriers and genetic divergence in non-territorial *Argia* damselflies. *Biological Journal of the Linnean Society*, 120(4), 804-817. <https://doi.org/10.1111/bij.12916>
- Nava-Bolaños, A., Sánchez-Guillén, R. A., Wellenreuther, M., Muñoz, J., Torres-Pachón, M., Novelo-Gutiérrez, R., & Córdoba-Aguilar, A. (2019). Predicting hybridisation as a consequence of climate change in damselflies. *Insect Conservation and Diversity*, 12(5), 427-436.
<https://doi.org/10.1111/icad.12354>
- Nosil, P., Crespi, B. J., & Sandoval, C. P. (2003). Reproductive isolation driven by the combined effects of ecological adaptation and reinforcement. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1527), 1911-1918.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2457>
- Ordaz-Morales, J. E., Juárez-Jiménez, A. L., Stand-Pérez, M., Arce-Valdés, L. R., Ballen-Guapacha, A. V., Chávez-Ríos, J. R., Cordero-Rivera, A., & Sánchez-Guillén, R. A. (2025). *Alternative reproductive strategies explain asymmetric reinforcement of reproductive isolation in two Ischnura damselfly species* (p. 2025.05.04.652146). bioRxiv.
<https://doi.org/10.1101/2025.05.04.652146>

- Ortiz-Barrientos, D., Greal, A., & Nosil, P. (2009). The Genetics and Ecology of Reinforcement. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1168(1), 156-182.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04919.x>
- Ottenburghs, J. (2023). How common is hybridization in birds? *Journal of Ornithology*, 164(4), 913-920. <https://doi.org/10.1007/s10336-023-02080-w>
- Paulson, S., Martin, Abbott, John, B.-S., Cornelio, & Cyrille, D., Klass-Douwe Deliry,. (2025). *Odonata Central—World Odonata List*. <https://www.odonatacentral.org/app/#/wol/>
- Petit, R. J., & Excoffier, L. (2009). Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(7), 386-393. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.02.011>
- Pfennig, K. S., & Pfennig, D. W. (2009). Character displacement: Ecological and reproductive responses to a common evolutionary problem. *The Quarterly Review of Biology*, 84(3), 253-276. <https://doi.org/10.1086/605079>
- Pfennig, K. S., & Ryan, M. J. (2006). Reproductive character displacement generates reproductive isolation among conspecific populations: An artificial neural network study. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1592), 1361-1368.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3446>
- R Core Team. (2025). *R: A language and environment for statistical computing*. Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Ramsey, J., Bradshaw, H. D., & Schemske, D. W. (2003). Components of reproductive isolation between the monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae). *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 57(7), 1520-1534. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00360.x>
- Randler, C. (2006). Behavioural and ecological correlates of natural hybridization in birds. *Ibis*, 148(3), 459-467. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2006.00548.x>

- Rhymer, J. M., & Simberloff, D. (1996). Extinction by Hybridization and Introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27(1), 83-109. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.27.1.83>
- Rivas Torres, A. (2019). Etodiversidad: Estudio de la variabilidad del comportamiento sexual en el orden odonata [Http://purl.org/dc/dcmitype/Text, Universidad de Vigo]. En *Etodiversidad: Estudio de la variabilidad del comportamiento sexual en el orden odonata*. https://portalcientifico.uvigo.gal/documentos/606d0007f03b0f3e32bedf00?utm_source=chatgpt.com
- Robertson, H. M., & Paterson, H. E. H. (1982). Mate Recognition and Mechanical Isolation in *Enallagma* Damselflies (Odonata: Coenagrionidae). *Evolution*, 36(2), 243-250. <https://doi.org/10.2307/2408042>
- Sánchez-Guillén, R. A., Ceccarelli, S., Villalobos, F., Neupane, S., Rivas-Torres, A., Sanmartín-Villar, I., Wellenreuther, M., Bybee, S. M., Velásquez-Vélez, M. I., Realpe, E., Chávez-Ríos, J. R., Dumont, H. J., & Cordero-Rivera, A. (2020). The evolutionary history of colour polymorphism in *Ischnura* damselflies (Odonata: Coenagrionidae). *Odonatologica*, 49(3-4), 333-370. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4268559>
- Sánchez-Guillén, R. A., Córdoba-Aguilar, A., & Cordero-Rivera, A. (2013). An examination of competitive gametic isolation mechanisms between the damselflies *Ischnura graellsii* and *I. elegans*. *International Journal of Odonatology*, 16(3), 259-267. <https://doi.org/10.1080/13887890.2013.821868>
- Sánchez-Guillén, R. A., Córdoba-Aguilar, A., Cordero-Rivera, A., & Wellenreuther, M. (2014). Rapid evolution of prezygotic barriers in non-territorial damselflies. *Biological Journal of the Linnean Society*, 113(2), 485-496. <https://doi.org/10.1111/bij.12347>

- Sánchez-Guillén, R. A., Muñoz, J., Rodríguez-Tapia, G., Arroyo, T. P. F., & Córdoba-Aguilar, A. (2013). Climate-Induced Range Shifts and Possible Hybridisation Consequences in Insects. *PLOS ONE*, 8(11), e80531. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080531>
- Sánchez-Guillén, R. A., Van Gossum, H., & Cordero Rivera, A. (2005). Hybridization and the inheritance of female colour polymorphism in two ischnurid damselflies (Odonata: Coenagrionidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 85(4), 471-481. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00506.x>
- Sánchez-Guillén, R. A., Vega-Sánchez, Y. M., & Sánchez-Herrera, M. (2022). Genetic structure, cryptic species, and hybridization: Causes and evolutionary consequences in Odonata. En A. Cordoba-Aguilar, C. Beatty, & J. Bried (Eds.), *Dragonflies and Damselflies: Model Organisms for Ecological and Evolutionary Research* (p. 0). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780192898623.003.0009>
- Sánchez-Guillén, R. A., Wellenreuther, M., & Cordero Rivera, A. (2012). Strong Asymmetry in the Relative Strengths of Prezygotic and Postzygotic Barriers Between Two Damselfly Sister Species. *Evolution*, 66(3), 690-707. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01469.x>
- Sánchez-Guillén, R. A., Wellenreuther, M., Cordero-Rivera, A., & Hansson, B. (2011). Introgression and rapid species turnover in sympatric damselflies. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 210. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-210>
- Servedio, M. R. (2004). THE EVOLUTION OF PREMATING ISOLATION: LOCAL ADAPTATION AND NATURAL AND SEXUAL SELECTION AGAINST HYBRIDS. *Evolution*, 58(5), 913-924. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2004.tb00425.x>
- Servedio, M. R., & Noor, M. A. F. (2003). The Role of Reinforcement in Speciation: Theory and Data. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), 339-364. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132412>

- Sobel, J. M., & Chen, G. F. (2014). Unification of Methods for Estimating the Strength of Reproductive Isolation. *Evolution*, 68(5), 1511-1522. <https://doi.org/10.1111/evo.12362>
- Solano, E., Hardersen, S., Audisio, P., Amorosi, V., Senczuk, G., & Antonini, G. (2018). Asymmetric hybridization in *Cordulegaster* (Odonata: Cordulegastridae): Secondary postglacial contact and the possible role of mechanical constraints. *Ecology and Evolution*, 8(19), 9657-9671. <https://doi.org/10.1002/ece3.4368>
- Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2009). The Role of Hybridization in Plant Speciation. *Annual Review of Plant Biology*, 60(1), 561-588. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092039>
- Stre, G.-P., Moum, T., Bureš, S., Král, M., Adamjan, M., & Moreno, J. (1997). A sexually selected character displacement in flycatchers reinforces premating isolation. *Nature*, 387, 589-592. <https://doi.org/10.1038/42451>
- Sweigart, A. L. (2010). The genetics of postmating, prezygotic reproductive isolation between *Drosophila virilis* and *D. americana*. *Genetics*, 184(2), 401-410. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.111245>
- Turelli, M., Lipkowitz, J. R., & Brandvain, Y. (2014). On the Coyne and Orr-Igin of Species: Effects of Intrinsic Postzygotic Isolation, Ecological Differentiation, X Chromosome Size, and Sympatry on *Drosophila* Speciation. *Evolution*, 68(4), 1176-1187. <https://doi.org/10.1111/evo.12330>
- Turelli, M., & Moyle, L. C. (2007). Asymmetric postmating isolation: Darwin's corollary to Haldane's rule. *Genetics*, 176(2), 1059-1088. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.065979>
- Urbanelli, S., Porretta, D., Mastrantonio, V., Bellini, R., Pieraccini, G., Romoli, R., Crasta, G., & Nascetti, G. (2014). Hybridization, natural selection, and evolution of reproductive isolation: A 25-years survey of an artificial sympatric area between two mosquito sibling species of the *Aedes mariae* complex. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 68(10), 3030-3038. <https://doi.org/10.1111/evo.12490>

- Van Gossum, H., Sánchez, R., & Cordero Rivera, A. (2003). Observations on rearing damselflies under laboratory conditions. *Animal Biology*, 53(1), 37-45.
<https://doi.org/10.1163/157075603769682567>
- Walker, T. G. (1958). Hybridization in Some Species of *Pteris* L. *Evolution*, 12(1), 82-92.
<https://doi.org/10.2307/2405906>
- Whitney, K. D., Ahern, J. R., Campbell, L. G., Albert, L. P., & King, M. S. (2010). Patterns of hybridization in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 12(3), 175-182. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2010.02.002>
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., François, R., Golemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hestres, J., Kuhn, M., Pedersen, T., Miller, E., Brache, S., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D., Spinu, V., ... Yutani, H. (2019). Welcome to the {tidyverse}. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>

ANEXO 1. Pruebas de aislamiento mecánico por subgrupo

Tabla 8. Resultados estadísticos por subgrupo en pruebas de aislamiento mecánico. Se indican los valores p obtenidos por prueba t pareada y modelo lineal mixto (LMM) para cada interacción consecutiva). Los valores significativos se encuentran subrayados y resaltados en gris. NA = indica que no hubo datos para esa interacción.

Subgrupo	Interacción 1 - 2		Interacción 2- 3		Interacción 3 - 4		Interacción 4 - 5	
	T	LMM	T	LMM	T	LMM	T	LMM
Coespecífico_hembra_elegans_alopatría	0.374	<u>0.019</u>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Coespecífico_hembra_elegans_Simpatría	0.651	<u>0.017</u>	0.761	0.130	NA	NA	NA	NA
Coespecífico_hembra_graellsii_Alopatría	1.000	0.202	1.000	1.000	NA	1.000	NA	1.000
Coespecífico_hembra_graellsii_Simpatría	0.809	1.000	0.809	1.000	0.809	1.000	NA	1.000
Coespecífico_macho_elegans_Alopatría	0.332	0.607	NA	0.108	NA	NA	NA	NA
Coespecífico_macho_elegans_Simpatría	0.228	0.092	0.312	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Coespecífico_macho_graellsii_Alopatría	1.000	0.139	0.676	0.242	1.000	1.000	1.000	1.000
Coespecífico_macho_graellsii_Simpatría	0.163	0.095	0.704	0.978	NA	0.629	NA	NA
Heteroespecífico_hembra_elegans_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Heteroespecífico_hembra_elegans_Simpatría	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Heteroespecífico_hembra_graellsii_Alopatría	0.052	<u>0.009</u>	0.797	0.825	0.797	1.000	0.797	1.000
Heteroespecífico_hembra_graellsii_Simpatría	0.980	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Heteroespecífico_macho_elegans_Alopatría	0.124	0.556	0.736	1.000	0.367	0.909	NA	1.000
Heteroespecífico_macho_elegans_Simpatría	0.664	0.117	0.564	0.595	1.000	1.000	1.000	1.000
Heteroespecífico_macho_graellsii_Alopatría	0.339	0.923	NA	1.000	NA	1.000	NA	1.000
Heteroespecífico_macho_graellsii_Simpatría	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Postcigótico_hembra_elegans_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_hembra_elegans_Simpatría	0.356	1.000	NA	1.000	NA	1.000	NA	NA
Postcigótico_hembra_graellsii_Alopatría	1.000	0.893	NA	0.893	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_hembra_graellsii_Simpatría	NA	0.880	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_hembra_híbrido_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_hembra_híbrido_Simpatría	1.000	1.000	0.609	1.000	1.000	1.000	NA	1.000
Postcigótico_macho_elegans_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Postcigótico_macho_elegans_Simpatría		0.175	0.021	NA	0.683	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_macho_graellsii_Alopatría	NA		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_macho_graellsii_Simpatría	NA		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_macho_híbrido_Alopatría		0.666	1.000	0.666	1.000	NA	1.000	NA	1.000
Postcigótico_macho_híbrido_Simpatría		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.140	0.380

Tabla 8.2 (Continuación). **Resultados estadísticos por subgrupo en pruebas de aislamiento mecánico.** Se indican los valores p obtenidos por prueba t pareada y modelo lineal mixto (LMM) para cada interacción consecutiva.). (*) Significativo; (**) Muy significativo. NA = indica que no hubo datos para esa interacción.

Subgrupo	Interacción 5 - 6		Interacción 6 - 7		Interacción 7 - 8		Interacción 8 - 9	
	T	LMM	T	LMM	T	LMM	T	LMM
Coespecífico_hembra_elegans_alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Coespecífico_hembra_elegans_Simpatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Coespecífico_hembra_graellsii_Alopatría	NA	1.000	NA	1.000	NA	1.000	NA	1.000
Coespecífico_hembra_graellsii_Simpatría	NA	1.000	NA	1.000	NA	1.000	NA	NA
Coespecífico_macho_elegans_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Coespecífico_macho_elegans_Simpatría	NA	1.000	NA	1.000	NA	NA	NA	NA
Coespecífico_macho_graellsii_Alopatría	NA	1.000	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Coespecífico_macho_graellsii_Simpatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Heteroespecífico_hembra_elegans_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Heteroespecífico_hembra_elegans_Simpatría	1.000	1.000	1.000	1.000	0.927	1.000	1.000	1.000
Heteroespecífico_hembra_graellsii_Alopatría	0.797	1.000	NA	1.000	NA	1.000	NA	NA
Heteroespecífico_hembra_graellsii_Simpatría	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Heteroespecífico_macho_elegans_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Heteroespecífico_macho_elegans_Simpatría	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Heteroespecífico_macho_graellsii_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Heteroespecífico_macho_graellsii_Simpatría	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	NA	1.000
Postcigótico_hembra_elegans_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_hembra_elegans_Simpatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Postcigótico_hembra_graellsii_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_hembra_graellsii_Simpatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_hembra_híbrido_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_hembra_híbrido_Simpatría	NA	1.000	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_macho_elegans_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_macho_elegans_Simpatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_macho_graellsii_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_macho_graellsii_Simpatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_macho_híbrido_Alopatría	NA	1.000	NA	1.000	NA	1.000	NA	NA
Postcigótico_macho_híbrido_Simpatría	NA	1.000	NA	1.000	NA	NA	NA	NA

Tabla 8.3 (Continuación). **Resultados estadísticos por subgrupo en pruebas de aislamiento mecánico.** Se indican los valores p obtenidos por prueba t pareada y modelo lineal mixto (LMM) para cada interacción consecutiva.). (*) Significativo; (**) Muy significativo. NA = indica que no hubo datos para esa interacción.

Subgrupo	Interacción 9 - 10		Interacción 10 - 11		Interacción 11 -12	
	T	LMM	T	LMM	T	LMM
Coespecífico_hembra_elegans_alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Coespecífico_hembra_elegans_Simpatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Coespecífico_hembra_graellsii_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Coespecífico_hembra_graellsii_Simpatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Coespecífico_macho_elegans_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Coespecífico_macho_elegans_Simpatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Coespecífico_macho_graellsii_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Coespecífico_macho_graellsii_Simpatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Heteroespecífico_hembra_elegans_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Heteroespecífico_hembra_elegans_Simpatría	1.000	1.000	NA	1.000	NA	NA
Heteroespecífico_hembra_graellsii_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Heteroespecífico_hembra_graellsii_Simpatría	1.000	1.000	0.494	1.000	NA	1.000
Heteroespecífico_macho_elegans_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Heteroespecífico_macho_elegans_Simpatría	NA	1.000	NA	1.000	NA	NA
Heteroespecífico_macho_graellsii_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Heteroespecífico_macho_graellsii_Simpatría	NA	1.000	NA	1.000	NA	1.000
Postcigótico_hembra_elegans_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_hembra_elegans_Simpatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_hembra_graellsii_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_hembra_graellsii_Simpatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_hembra_híbrido_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_hembra_híbrido_Simpatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_macho_elegans_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_macho_elegans_Simpatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_macho_graellsii_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_macho_graellsii_Simpatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_macho_híbrido_Alopatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Postcigótico_macho_híbrido_Simpatría	NA	NA	NA	NA	NA	NA

ANEXO 2. Contribución del individuo como efecto aleatorio en los modelos mixtos

Se presentan los valores de varianza explicada por el individuo, así como los coeficientes de determinación marginal y condicional para cada subgrupo. La columna “p_LRT” fue omitida debido a problemas técnicos de convergencia y colinealidad que impidieron su estimación confiable

Tabla 9. Varianza y R² estimados por subgrupo. Varianza del efecto aleatorio (individuo), R² marginal (solo efectos fijos) y R² condicional (efectos fijos + aleatorios) para cada subgrupo analizado. La inclusión del individuo como efecto aleatorio estuvo justificada en la mayoría de los casos, donde $R^2_{condicional} > R^2_{marginal}$.

Subgrupo	Varianza	R ² Marginal	R ² Condicional
Híbrido_Alopatría_Macho_Postcigótico	0.000	0.033	0.008
Híbrido_Simpatría_Hembra_Postcigótico	228.912	0.001	0.000
Híbrido_Simpatría_Macho_Postcigótico	0.665	0.038	0.030
elegans_Alopatría_Hembra_Coespecífico	4989.069	0.003	0.000
elegans_Alopatría_Hembra_Heteroespecífico	2152.733	1.000	0.000
elegans_Alopatría_Hembra_Postcigótico	0.000	0.125	0.077
elegans_Alopatría_Macho_Coespecífico	5192.169	0.009	0.000
elegans_Alopatría_Macho_Heteroespecífico	1.029	0.118	0.061
elegans_Simpatría_Hembra_Coespecífico	0.000	0.145	0.085
elegans_Simpatría_Hembra_Heteroespecífico	25.173	0.001	0.001
elegans_Simpatría_Hembra_Postcigótico	6704.720	0.012	0.000
elegans_Simpatría_Macho_Coespecífico	1.514	0.080	0.053
elegans_Simpatría_Macho_Heteroespecífico	0.246	0.047	0.034
elegans_Simpatría_Macho_Postcigótico	42.001	0.027	0.000
graellsii_Alopatría_Hembra_Coespecífico	0.000	0.059	0.027
graellsii_Alopatría_Hembra_Heteroespecífico	2.374	0.077	0.056
graellsii_Alopatría_Hembra_Postcigótico	0.000	0.033	0.010
graellsii_Alopatría_Macho_Coespecífico	2.006	0.148	0.083
graellsii_Alopatría_Macho_Heteroespecífico	2320.578	0.053	0.000
graellsii_Simpatría_Hembra_Coespecífico	146.799	0.003	0.000
graellsii_Simpatría_Hembra_Heteroespecífico	0.792	0.006	0.004
graellsii_Simpatría_Macho_Coespecífico	71.222	0.025	0.024
graellsii_Simpatría_Macho_Heteroespecífico	50.555	0.001	0.000
graellsii_Simpatría_Macho_Postcigótico	0.000	0.000	0.000

ANEXO 3. Tablas de contrastes correspondientes a las gráficas de aislamiento reproductivo

Tabla 10. Contrastes estadísticos entre cruces coespecíficos y heteroespecíficos de *Ischnura elegans* e *I. graellsii* en condiciones de simpatria, comparados a lo largo del tiempo. Se presentan los resultados de los contrastes post hoc obtenidos a partir de modelos logísticos generalizados. Se muestran la razón de momios (OR), el error estándar (EE), grados de libertad (dg), valor nulo (null), estadístico z (z.ratio), valor p (p.value), el umbral corregido por Holm (holm_threshold) y la significancia bajo este criterio (holm_significant). Tipo de aislamiento indica el tipo de barrera reproductiva evaluada.

Contraste	OR	EE	gl	null	z.ratio	p.value	holm_threshold	holm_significant	Tipo de aislamiento
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> -Late / ♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Late	26.357	11.551	Inf	1	7.466	0	0.008	TRUE	Mecánica
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> -Middle / ♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Middle	34	29.78	Inf	1	4.026	0	0.017	TRUE	Mecánica
♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>graellsii</i> -Late / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Late	5.06	2.123	Inf	1	3.864	0.001	0.025	TRUE	Mecánica
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> -Early / ♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Early	0.333	0.509	Inf	1	-0.719	1	0.033	FALSE	Mecánica
♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>graellsii</i> -Early / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Early	0	0.003	Inf	1	-0.023	1	0.042	FALSE	Mecánica
♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>graellsii</i> -Middle / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Middle	1.138	0.569	Inf	1	0.257	1	0.05	FALSE	Mecánica
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> -Late / ♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Late	3.718	2.985	Inf	1	1.635	0.612	0.008	FALSE	Mecánica-táctil
♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>graellsii</i> -Late / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Late	1.947	0.821	Inf	1	1.58	0.684	0.017	FALSE	Mecánica-táctil

♂elegansX♀elegans-Early / ♂graellsiiX♀elegans-Early	1	1328.59	Inf	1	0	1	0.025	FALSE	Mecánica-táctil
♂elegansX♀elegans-Middle / ♂graellsiiX♀elegans-Middle	2	2.958	Inf	1	0.469	1	0.033	FALSE	Mecánica-táctil
♂graellsiiX♀graellsii-Early / ♂elegansX♀graellsii-Early	0	0.001	Inf	1	-0.01	1	0.0417	FALSE	Mecánica-táctil
♂graellsiiX♀graellsii-Middle / ♂elegansX♀graellsii-Middle	0.75	0.381	Inf	1	-0.566	1	0.05	FALSE	Mecánica-táctil
♂graellsiiX♀graellsii-Late / ♂elegansX♀graellsii-Late	11.739	13.032	Inf	1	2.219	0.159	0.008	FALSE	Oviposición
♂elegansX♀elegans-Early / ♂graellsiiX♀elegans-Early	1	4501.048	Inf	1	0	1	0.017	FALSE	Oviposición
♂elegansX♀elegans-Middle / ♂graellsiiX♀elegans-Middle	0	0	Inf	1	-0.005	1	0.025	FALSE	Oviposición
♂elegansX♀elegans-Late / ♂graellsiiX♀elegans-Late	0	0.001	Inf	1	-0.003	1	0.033	FALSE	Oviposición
♂graellsiiX♀graellsii-Early / ♂elegansX♀graellsii-Early	0	0.002	Inf	1	-0.004	1	0.0417	FALSE	Oviposición
♂graellsiiX♀graellsii-Middle / ♂elegansX♀graellsii-Middle	1.667	2.069	Inf	1	0.412	1	0.05	FALSE	Oviposición

♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>graellsii</i> -Middle / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Middle	-0.003	0.001	280	NA	-3.749	0.001	0.008	TRUE	Fecundidad
♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>graellsii</i> -Late / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Late	-0.002	0.001	280	NA	-2.094	0.223	0.017	FALSE	Fecundidad
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> -Middle / ♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Middle	-0.013	0.007	280	NA	-1.777	0.46	0.025	FALSE	Fecundidad
♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>graellsii</i> -Early / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Early	-0.006	0.004	280	NA	-1.477	0.845	0.033	FALSE	Fecundidad
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> -Early / ♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Early	-0.002	0.002	280	NA	-0.738	1	0.042	FALSE	Fecundidad
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> -Late / ♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Late	-0.007	0.007	280	NA	-1.104	1	0.05	FALSE	Fecundidad
♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>graellsii</i> -Middle / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Middle	26.07	1.46	Inf	1	58.237	0	0.008	TRUE	Fertilidad
♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>graellsii</i> -Early / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Early	13.874	1.559	Inf	1	23.409	0	0.017	TRUE	Fertilidad
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> -Early / ♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Early	4.578	0.373	Inf	1	18.663	0	0.025	TRUE	Fertilidad
♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>graellsii</i> -Late / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Late	2.172	0.166	Inf	1	10.127	0	0.033	TRUE	Fertilidad

♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> -Middle / ♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Middle	21.293	7.582	Inf	1	8.589	0	0.042	TRUE	Fertilidad
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> -Late / ♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Late	0.283	0.096	Inf	1	-3.722	0.001	0.05	TRUE	Fertilidad

Tabla 11. Contrastes estadísticos entre cruces heteroespecíficos de *Ischnura elegans* e *I. graellsii* en condiciones de simpatria, comparados a lo largo del tiempo. Se presentan los resultados de los contrastes post hoc obtenidos a partir de modelos logísticos generalizados. Se muestran la razón de momios (OR), el error estándar (EE), grados de libertad (dg), valor nulo (null), estadístico z (z.ratio), valor p (p.value), el umbral corregido por Holm (holm_threshold) y la significancia bajo este criterio (holm_significant). Tipo de aislamiento indica el tipo de barrera reproductiva evaluada.

Contraste	OR	EE	gl	null	z.ratio	p.value	holm_threshold	holm_significant	Tipo de aislamiento
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Middle / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Late	4.449	1.537	Inf	1	4.32	0	0.008	TRUE	Mecánica
♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Early / ♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Late	54	65.366	Inf	1	3.295	0.006	0.017	TRUE	Mecánica
♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Early / ♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Middle	25.5	35.077	Inf	1	2.354	0.111	0.025	FALSE	Mecánica
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Early / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Middle	4069353.84	486150463	Inf	1	0.015	1	0.033	FALSE	Mecánica
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Early / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Late	2449943.14	2162671094	Inf	1	0.017	1	0.047	FALSE	Mecánica
♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Middle / ♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Late	2.118	1.76	Inf	1	0.903	1	0.033	FALSE	Mecánica
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Middle / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Late	2.596	1.069	Inf	1	2.317	0.123	0.008	FALSE	Mecánica-táctil
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Early / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Middle	3912840.23	9389035262	Inf	1	0.006	1	0.017	FALSE	Mecánica-táctil
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Early / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Late	10159655.3	24378547528	Inf	1	0.007	1	0.025	FALSE	Mecánica-táctil

♂graellsiiX♀elegans-Early / ♂graellsiiX♀elegans-Middle	15651360.7	21683058817	Inf	1	0.012	1	0.033	FALSE	Mecánica-táctile
♂graellsiiX♀elegans-Early / ♂graellsiiX♀elegans-Late	26085601.2	36138417553	Inf	1	0.012	1	0.042	FALSE	Mecánica-táctile
♂graellsiiX♀elegans-Middle / ♂graellsiiX♀elegans-Late	1.667	2.653	Inf	1	0.321	1	0.05	FALSE	Mecánica-táctile
♂elegansX♀graellsii-Middle / ♂elegansX♀graellsii-Late	7.044	6.012	Inf	1	2.287	0.133	0.008	FALSE	Oviposición
♂elegansX♀graellsii-Early / ♂elegansX♀graellsii-Middle	4283288.64	16130210623	Inf	1	0.004	1	0.017	FALSE	Oviposición
♂elegansX♀graellsii-Early / ♂elegansX♀graellsii-Late	30169250.4	1.13E^11	Inf	1	0.005	1	0.025	FALSE	Oviposición
♂graellsiiX♀elegans-Early / ♂graellsiiX♀elegans-Middle	1	4981.748	Inf	1	0	1	0.033	FALSE	Oviposición
♂graellsiiX♀elegans-Early / ♂graellsiiX♀elegans-Late	1	5954.327	Inf	1	0	1	0.042	FALSE	Oviposición
♂graellsiiX♀elegans-Middle / ♂graellsiiX♀elegans-Late	1	5648.771	Inf	1	0	1	0.05	FALSE	Oviposición
♂elegansX♀graellsii-Early / ♂elegansX♀graellsii-Middle	0.004	0.006	82	NA	0.607	1	0.008	FALSE	Fecundidad
♂elegansX♀graellsii-Early /	0.004	0.006	82	NA	0.743	1	0.017	FALSE	Fecundidad

♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Late									
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Middle / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Late	0.001	0.002	82	NA	0.56	1	0.025	FALSE	Fecundidad
♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Early / ♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Middle	-0.014	0.01	82	NA	-1.374	1	0.033	FALSE	Fecundidad
♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Early / ♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Late	-0.007	0.009	82	NA	-0.772	1	0.042	FALSE	Fecundidad
♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Middle / ♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Late	0.006	0.013	82	NA	0.494	1	0.05	FALSE	Fecundidad
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Middle / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Late	0.083	0.005	Inf	1	-41.925	0	0.008	TRUE	Fertilidad
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Early / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Late	0.157	0.018	Inf	1	-16.263	0	0.017	TRUE	Fertilidad
♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Middle / ♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Late	0.004	0.002	Inf	1	-11.438	0	0.025	TRUE	Fertilidad
♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Early / ♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Late	0.048	0.017	Inf	1	-8.827	0	0.033	TRUE	Fertilidad
♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Early / ♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>elegans</i> -Middle	13.025	4.674	Inf	1	7.153	0	0.042	TRUE	Fertilidad
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Early / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>graellsii</i> -Middle	1.879	0.19	Inf	1	6.225	0	0.05	TRUE	Fertilidad

Tabla 12. Contrastes estadísticos entre cruces coespecíficos de *Ischnura elegans* e *I. graellsii* en condiciones de simpatria y alopatria, comparados a lo largo del tiempo. Se presentan los resultados de los contrastes post hoc obtenidos a partir de modelos logísticos generalizados. Se muestran la razón de momios (OR), el error estándar (EE), grados de libertad (dg), valor nulo (null), estadístico z (z.ratio), valor p (p.value), el umbral corregido por Holm (holm_threshold) y la significancia bajo este criterio (holm_significant). Tipo de aislamiento indica el tipo de barrera reproductiva evaluada.

Contraste	OR	EE	gl	null	z.ratio	p.value	holm_threshold	holm_significant	Tipo de aislamiento
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> Allopatry Late / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> NW Late	13.588	9.316	Inf	1	3.806	0.001	0.012	TRUE	Mecánica
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> Allopatry Early / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> NW Early	7.333	8.023	Inf	1	1.821	0.274	0.025	FALSE	Mecánica
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> Allopatry Middle / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> NW Middle	2.265	1.658	Inf	1	1.117	1	0.037	FALSE	Mecánica
♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>graellsii</i> Allopatry Late / ♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>graellsii</i> NW Late	0.675	0.313	Inf	1	-0.848	1	0.05	FALSE	Mecánica
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> Allopatry Middle / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> NW Middle	3.6	2.59	Inf	1	1.78	0.3	0.012	FALSE	Mecánica-táctil
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> Allopatry Late / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> NW Late	3.846	3.086	Inf	1	1.679	0.372	0.025	FALSE	Mecánica-táctil
♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>graellsii</i> Allopatry Late / ♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>graellsii</i> NW Late	1.788	0.878	Inf	1	1.183	0.947	0.037	FALSE	Mecánica-táctil

♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> Allopatry Early / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> NW Early	0	0.002	Inf	1	-0.016	1	0.05	FALSE	Mecánica-táctil
♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>graellsii</i> Allopatry Late / ♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>graellsii</i> NW Late	0.196	0.208	Inf	1	-1.533	0.501	0.0125	FALSE	Oviposición
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> Allopatry Early / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> NW Early	0	0	Inf	1	-0.019	1	0.025	FALSE	Oviposición
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> Allopatry Middle / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> NW Middle	0.72	0.624	Inf	1	-0.379	1	0.037	FALSE	Oviposición
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> Allopatry Late / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> NW Late	0.491	0.552	Inf	1	-0.633	1	0.05	FALSE	Oviposición
♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>graellsii</i> Allopatry Late / ♂ <i>graellsii</i> X♀ <i>graellsii</i> NW Late	0.002	0.001	526	NA	3.559	0.002	0.012	TRUE	Fecundidad
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> Allopatry Middle / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> NW Middle	-0.002	0.001	526	NA	-1.799	0.29	0.025	FALSE	Fecundidad
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> Allopatry Early / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> NW Early	0	0.001	526	NA	0.45	1	0.037	FALSE	Fecundidad
♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> Allopatry Late / ♂ <i>elegans</i> X♀ <i>elegans</i> NW Late	-0.001	0.001	526	NA	-1.15	1	0.05	FALSE	Fecundidad

<i>♂elegansX♀elegans Allopatry Late</i> <i>/ ♂elegansX♀elegans NW Late</i>	0.077	0.005	Inf	1	-38.467	0	0.012	TRUE	Fertilidad
<i>♂graellsiiX♀graellsii Allopatry Late</i> <i>/ ♂graellsiiX♀graellsii NW Late</i>	0.187	0.011	Inf	1	-29.894	0	0.025	TRUE	Fertilidad
<i>♂elegansX♀elegans Allopatry</i> <i>Early / ♂elegansX♀elegans NW</i> <i>Early</i>	0.637	0.027	Inf	1	-10.57	0	0.037	TRUE	Fertilidad
<i>♂elegansX♀elegans Allopatry</i> <i>Middle / ♂elegansX♀elegans NW</i> <i>Middle</i>	0.759	0.032	Inf	1	-6.643	0	0.05	TRUE	Fertilidad

ANEXO 4. Intervalos de confianza

Este anexo reúne los intervalos de confianza al 95% (IC95%) de los índices de aislamiento reproductivo estimados para los distintos cruces analizados en este estudio. Los valores corresponden a los percentiles 2.5% y 97.5% obtenidos mediante remuestreo bootstrap (10,000 iteraciones).

Tabla 13. Intervalos de confianza al 95% (IC95%) de los índices de aislamiento reproductivo en la comparación entre cruces coespecíficos y heteroespecíficos en simpatria a través del tiempo. RI indica el índice de aislamiento de cada barrera. Los valores corresponden a los percentiles 2.5%(Lower) y 97.5% (Upper).

Group	Mecánica			Mecánica-táctil			Oviposición			Fecundidad			Fertilidad		
	RI	Lower	Upper	RI	Lower	Upper	RI	Lower	Upper	RI	Lower	Upper	RI	Lower	Upper
<i>♀ elegans</i>															
Coespecífico – Temprana	0,076	-0,595	1,000	-0,577	-0,816	-0,140	-0,011	-0,037	0,000	0,000	0,000	0,000	0,070	0,016	0,152
Heteroespecífico – Temprana	-0,386	-3,167	0,715	0,533	-0,771	1,000	-0,011	-0,038	0,000	0,347	-0,301	0,647	0,271	0,114	0,444
Coespecífico – Intermedia	-0,018	-0,317	0,281	0,177	-0,081	0,420	0,018	-0,032	0,091	0,000	0,000	0,000	0,166	0,062	0,299
Heteroespecífico – Intermedia	0,865	0,639	1,000	0,513	-1,377	1,000	-0,040	-0,120	0,000	0,673	0,050	0,896	0,866	0,852	0,878
Coespecífico – Reciente	0,076	-0,205	0,353	-0,023	-0,256	0,213	0,011	-0,025	0,050	0,000	0,000	0,000	0,070	0,023	0,130
Heteroespecífico – Reciente	0,968	0,939	0,988	0,494	-0,597	0,891	-0,033	-0,078	0,000	0,585	0,365	0,726	-0,060	-0,117	-0,011
<i>♀ graellsii</i>															
Coespecífico – Temprana	-0,076	-1,000	0,594	0,577	0,123	1,000	0,011	0,000	0,037	0,000	0,000	0,000	-0,070	-0,152	-0,013
Heteroespecífico – Temprana	-0,848	-4,838	0,499	0,221	-1,238	1,000	-0,011	-0,037	0,000	0,486	0,218	0,692	0,140	0,014	0,285
Coespecífico – Intermedia	0,018	-0,281	0,317	-0,177	-0,420	0,081	-0,018	-0,091	0,032	0,000	0,000	0,000	-0,166	-0,299	-0,061
Heteroespecífico – Intermedia	0,281	-0,091	0,540	-0,537	-1,178	-0,058	-0,003	-0,092	0,071	0,446	0,148	0,675	0,317	0,169	0,454
Coespecífico – Reciente	-0,076	-0,353	0,205	0,023	-0,213	0,256	-0,011	-0,050	0,025	0,000	0,000	0,000	-0,070	-0,130	-0,023
Heteroespecífico – Reciente	0,419	0,163	0,603	0,421	0,187	0,607	0,181	0,032	0,345	0,365	-0,633	0,954	-0,029	-0,129	0,136

Tabla 14. Intervalos de confianza al 95% (IC95%) de los índices de aislamiento reproductivo en los cruces heteroespecíficos en simpatria a través del tiempo. RI indica el índice de aislamiento de cada barrera. Los valores corresponden a los percentiles 2.5%(Lower) y 97.5% (Upper).

Grupo	Mecánica			Mecánica-táctil			Oviposición			Fecundidad			Fertilidad		
	RI	Lower	Upper	RI	Lower	Upper	RI	Lower	Upper	RI	Lower	Upper	RI	Lower	Upper
<i>♂ graellsii X ♀ elegans</i>															
Temprana	0,750	0,200	1,667	1,333	0,600	5,000	1,000	1,000	1,000	184,778	153,000	229,333	0,668	0,526	0,785
Intermedia	0,080	0,000	0,208	0,500	0,000	Inf	1,000	1,000	1,000	52,500	21,000	116,000	0,113	0,113	0,113
Reciente	0,017	0,006	0,031	0,625	0,143	2,000	1,000	1,000	1,000	79,250	64,500	94,000	0,971	0,969	0,973
<i>♂ elegans X ♀ graellsii</i>															
Temprana	1,000	0,417	2,500	2,222	1,333	5,000	1,000	1,000	1,000	143,148	88,019	202,665	0,788	0,660	0,879
Intermedia	0,426	0,317	0,577	1,577	1,254	2,024	0,964	0,909	1,000	154,105	94,799	222,122	0,574	0,470	0,677
Reciente	0,314	0,246	0,396	0,716	0,545	0,931	0,793	0,636	0,931	176,656	13,000	430,000	0,943	0,797	1,000

Tabla 15. Intervalos de confianza al 95% (IC95%) de los índices de aislamiento reproductivo en los cruces coespecíficos de poblaciones simpátricas y alopátricas a través del tiempo. RI indica el índice de aislamiento de cada barrera. Los valores corresponden a los percentiles 2.5%(Lower) y 97.5% (Upper). NO hace referencia a la zona híbrida del noroeste de España.

Grupo	Mecánica			Mecánica-táctil			Oviposición			Fecundidad			Fertilidad		
	RI	Lower	Upper	RI	Lower	Upper	RI	Lower	Upper	RI	Lower	Upper	RI	Lower	Upper
<i>♂ elegans X ♀ elegans</i>															
Alopatría - Temprana	-0,116	-0,514	0,228	-0,040	-0,316	0,182	-0,005	-0,067	0,067	0,000	-0,217	0,214	0,064	-0,045	0,179
NO - Temprana	-0,072	-1,173	1,000	-1,143	-2,186	-0,294	-0,033	-0,072	-0,005	NA	-0,567	0,385	0,092	-0,048	0,285
Alopatría – Intermedia	-0,116	-0,502	0,227	-0,040	-0,313	0,188	-0,005	-0,067	0,064	0,000	-0,215	0,206	0,064	-0,045	0,181
NO – Intermedia	-0,165	-0,739	0,334	0,517	0,209	1,000	0,032	-0,029	0,111	0,287	-0,367	0,335	0,144	-0,002	0,295
Alopatría – Reciente	-0,116	-0,509	0,224	-0,040	-0,315	0,187	-0,005	-0,068	0,067	0,000	-0,212	0,205	0,064	-0,048	0,180
NO – Reciente	0,278	-0,207	0,653	0,223	-0,401	1,000	0,012	-0,043	0,097	0,212	-0,769	0,615	-0,089	-0,202	0,115
<i>♂ graellsii X ♀ graellsii</i>															
Alopatría – Reciente	0,348	0,121	0,544	0,121	-0,062	0,292	0,014	-0,043	0,075	0,000	-0,244	0,212	-0,193	-0,287	-0,099
NO - Reciente	-0,041	-0,615	0,418	0,403	0,015	1,000	-0,011	-0,056	0,037	0,000	-0,224	0,214	-0,147	-0,259	-0,071

ANEXO 5. Gráficas complementarias

A continuación, se presentan las gráficas correspondientes a las barreras reproductivas evaluadas que no mostraron diferencias significativas.

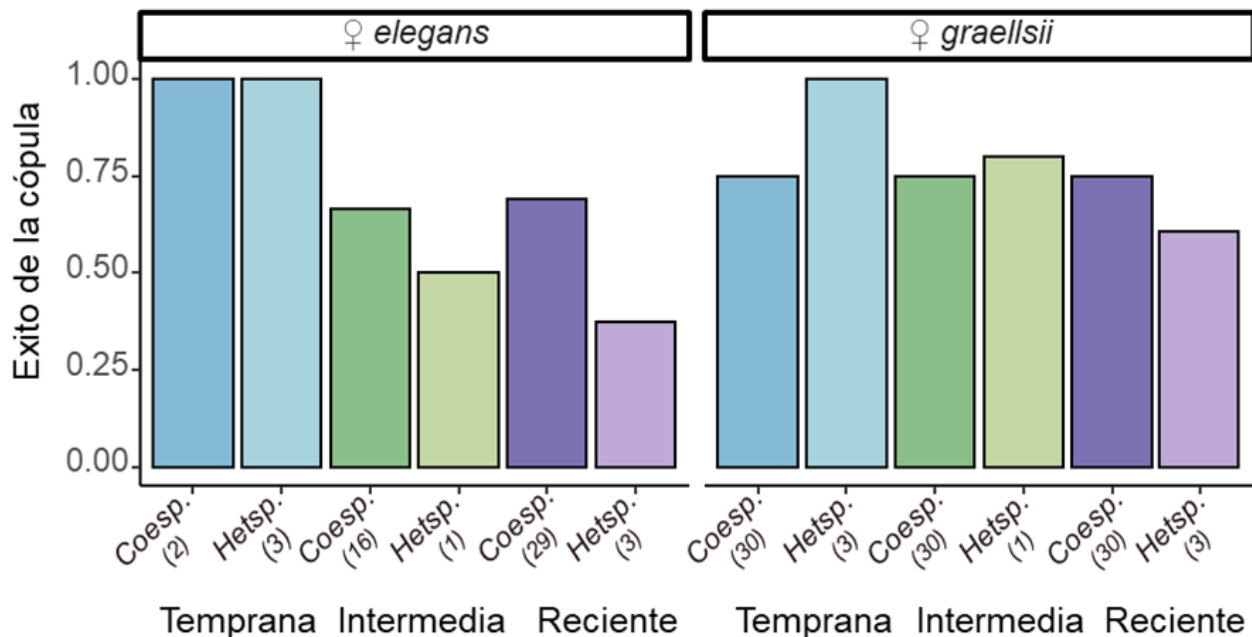


Figura 21. Éxito en la formación de la cópula entre cruces coespecíficos y heteroespecíficos en simpatria. Consp = Coespecíficos; Hetsp. = Heteroespecíficos. Temprana = etapa temprana; Intermedia = Etapa intermedia; Reciente = Etapa reciente.

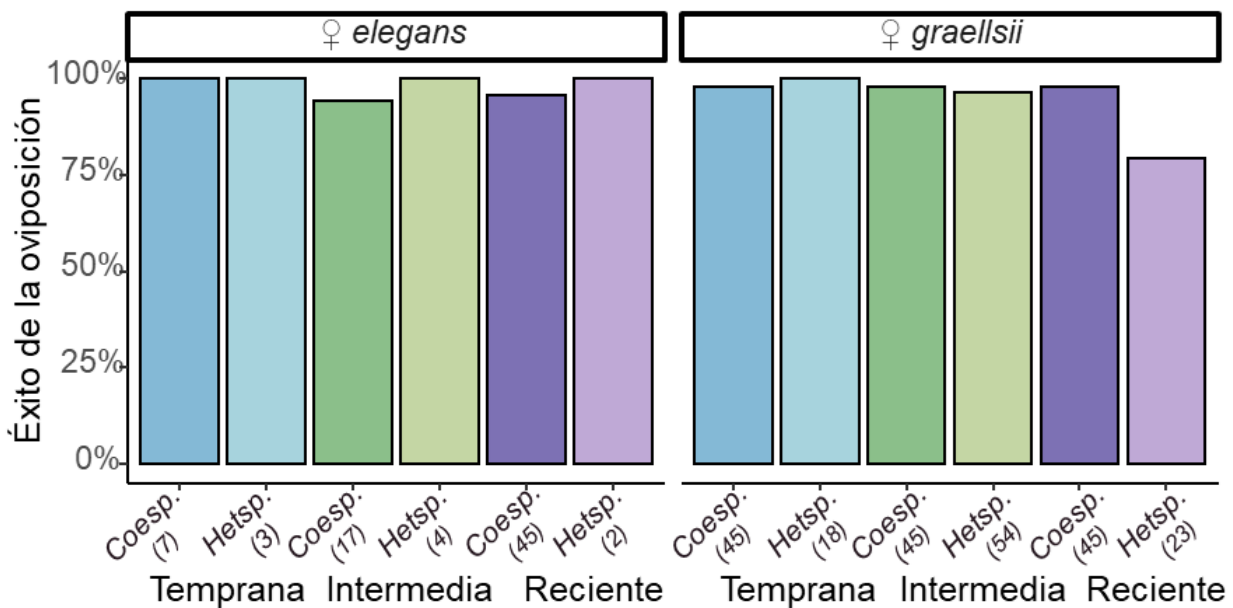


Figura 22. Éxito de oviposición en hembras de *I. elegans* e *I. graellsii* en cruces coespecíficos y heteroespecíficos en simpatria a lo largo del tiempo. Consp = Coespecíficos; Hetsp. = Heteroespecíficos. Temprana = etapa temprana; Intermedia = Etapa intermedia; Reciente = Etapa reciente.

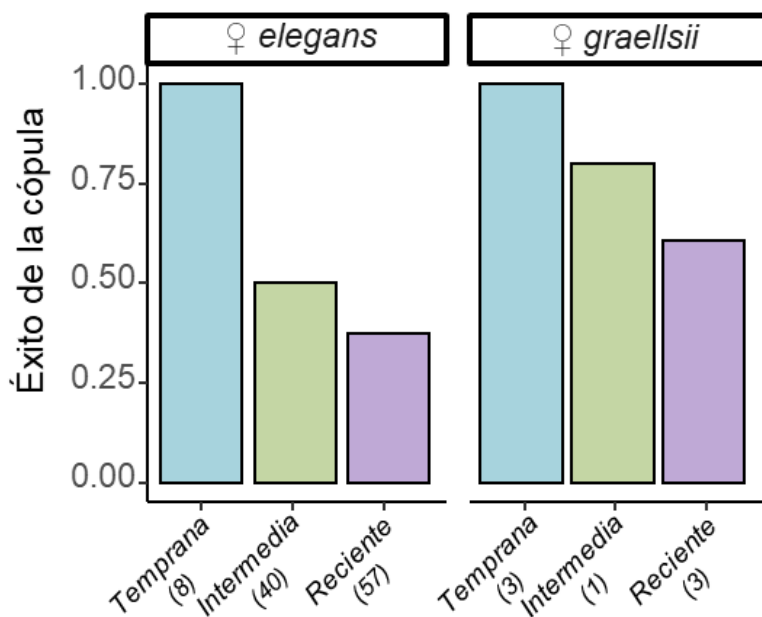


Figura 23. Éxito en la formación de la cópula entre cruces heteroespecíficos a lo largo del tiempo. Temprana = etapa temprana; Intermedia = Etapa intermedia; Reciente = Etapa reciente.

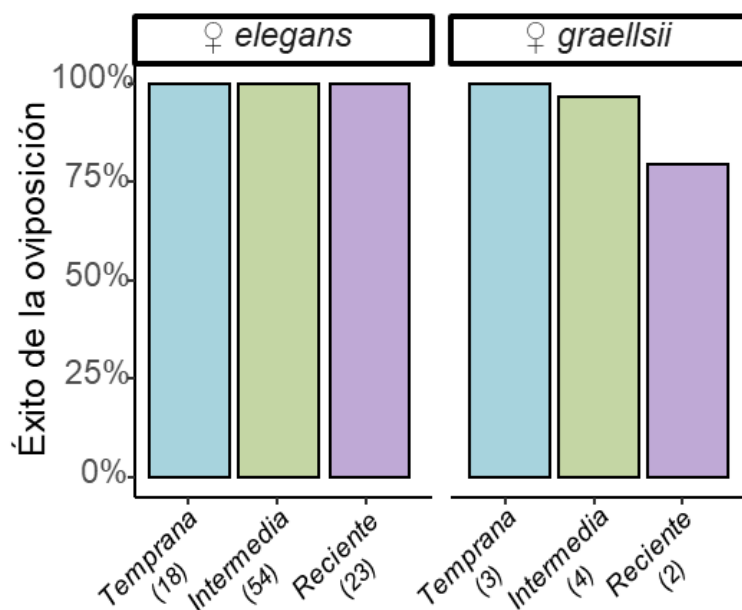


Figura 24. Éxito de oviposición en hembras de *I. elegans* e *I. graellsii* en cruces heteroespecíficos en simpatria a lo largo del tiempo. Temprana = etapa temprana; Intermedia = Etapa intermedia; Reciente = Etapa reciente.

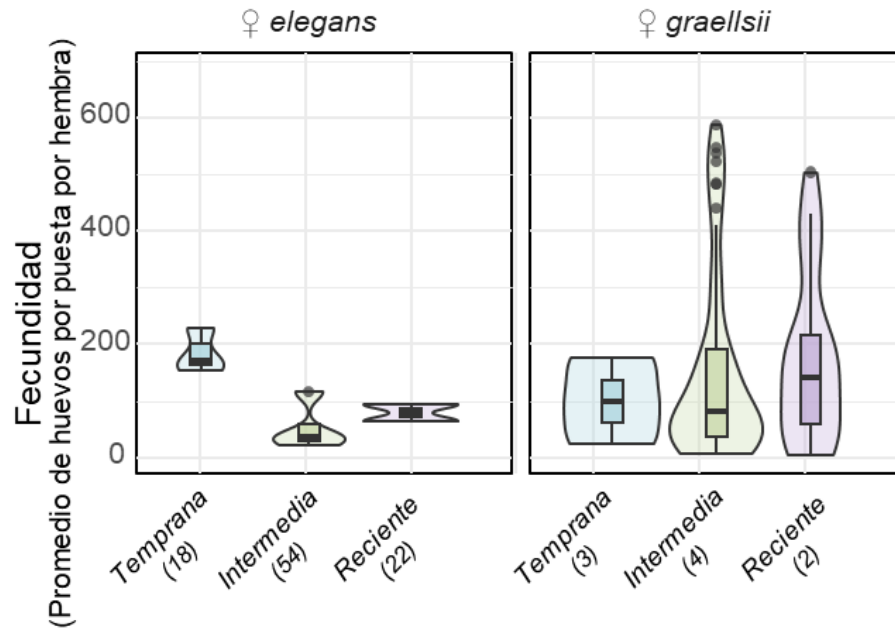


Figura 25. Proporción de huevos fértiles por hembra en cruces heteroespecíficos en simpatria a lo largo del tiempo. Temprana = etapa temprana; Intermedia = Etapa intermedia; Reciente = Etapa reciente.

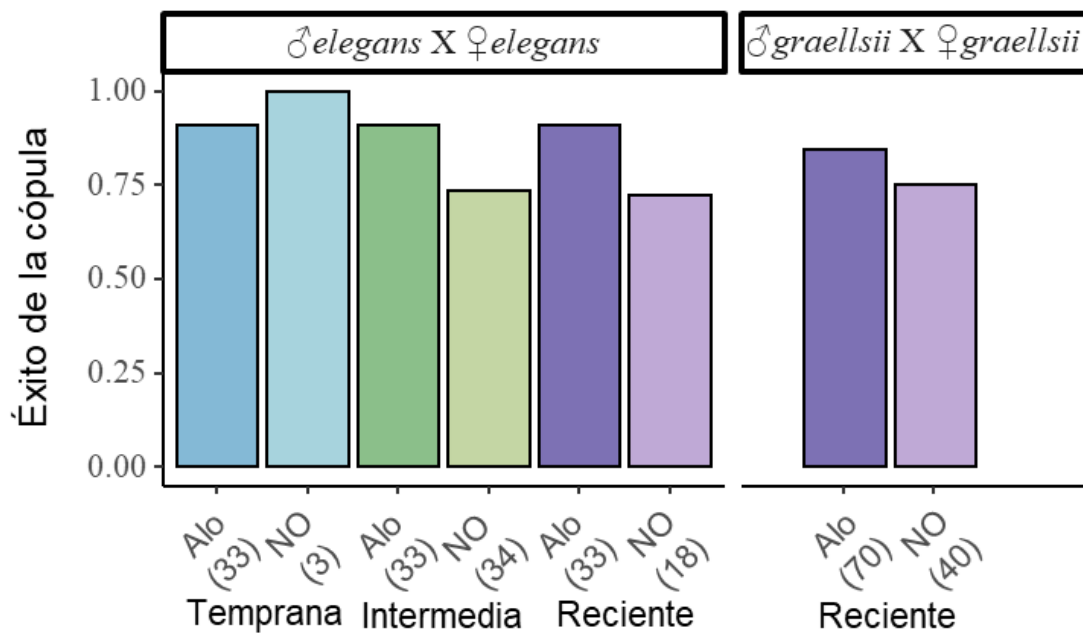


Figura 26. Éxito en la formación de la cópula entre cruces coespecíficos en alopatría y simpatria a lo largo del tiempo. Alo = Alopatría; NO = zona híbrida del noroeste de España. Temprana = etapa temprana; Intermedia = Etapa intermedia; Reciente = Etapa reciente.

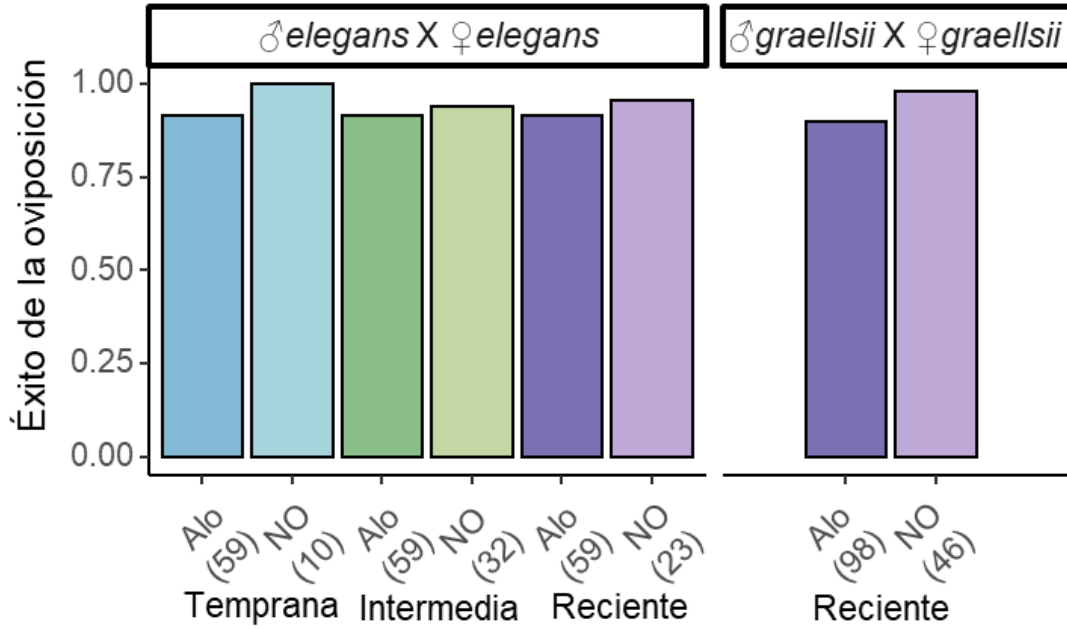


Figura 27. Éxito de oviposición en hembras de *I. elegans* e *I. graellsii* en cruces coespecíficos entre alopatria y simpatria. Alo = Alopatria; NO = zona híbrida del noroeste de España. Temprana = etapa temprana; Intermedia = Etapa intermedia; Reciente = Etapa reciente.

ANEXO 6. Divulgación de resultados

Esta sección presenta las actividades de divulgación, comunicación y presentación de resultados derivadas de este proyecto de investigación. Su propósito es documentar la difusión del conocimiento generado, tanto en espacios académicos especializados como en actividades dirigidas al público general.

Congresos y coloquios

- **II Coloquio de la Maestría en Ciencias Biológicas, BUAP (2023).** Presentación de cartel titulado *“Cuantificación de la prevalencia de la hibridación o del reforzamiento en dos especies de Ischnura”*.



- **III Coloquio de la Maestría en Ciencias Biológicas, BUAP (2024).** Presentación oral titulada *“Reforzamiento del aislamiento reproductivo: un estudio experimental sobre la intensificación de las barreras precigóticas entre especies de Ischnura (Odonata: Coenagrionidae)”*.



- **IV Congreso de la Asociación Mexicana de Sistemática de Artrópodos (2025).**
Presentación oral del trabajo “Aislamiento reproductivo y su reforzamiento: un estudio experimental sobre el aislamiento precigótico entre especies de *Ischnura* (Odonata: Coenagrionidae).”



Talleres y actividades de divulgación

- **II Coloquio de la Maestría en Ciencias Biológicas, BUAP (2023).**
Actividad de divulgación científica dirigida al público general, titulada “¿Emparejados?”, enfocada en explicar las barreras reproductivas y la importancia de la biodiversidad.



- **III Coloquio de la Maestría en Ciencias Biológicas, BUAP (2024).**
Actividad de divulgación científica dirigida al público general, titulada “¿Ligué? Explorando las barreras reproductivas”, centrada en la explicación de las barreras reproductivas y su relevancia para la conservación de la biodiversidad.



- **Celebración de la Semana de la Biología (2025).**
Conferencia titulada “¿Qué estudia un ecólogo evolutivo?”, orientada a estudiantes universitarios e interesados en la investigación ecológica y evolutiva.

