

# Comportamiento reproductivo y fisiología del lenguado senegalés, (*Solea Senegalensis*) en cautividad

## Reproductive Behaviour and Physiology of Senegalese Sole, (*Solea Senegalensis*) Broodstock in Captivity

Ignacio Carazo Ortega



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**

**COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO Y FISIOLÓGIA DEL  
LENGUADO SENEGALÉS, (*SOLEA SENEGALENSIS*) EN  
CAUTIVIDAD.**

---

**REPRODUCTIVE BEHAVIOUR AND PHYSIOLOGY OF  
SENEGALESE SOLE, (*SOLEA SENEGALENSIS*) BROODSTOCK  
IN CAPTIVITY.**

---

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**IRTA**

PROGRAMA DE DOCTORADO

EN FISIOLÓGIA

*MEMORIA PRESENTADA POR*

**IGNACIO CARAZO ORTEGA**



*PARA OPTAR AL GRADO DE*

**DOCTOR POR LA UNIVERSITAT DE BARCELONA**

Supervisor de la Tesis en **IRTA**:

Dr. Neil J. Duncan



Tutor en la Universidad de Barcelona:

Dr. Josep Planas



BARCELONA, noviembre 2012



*A mis padres*

*A mis amigos*

*A mí mismo*



# AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración de muchas personas y entidades.

Quisiera agradecer la ayuda y el apoyo tanto económico como logístico que me han proporcionado:

El INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria) primero y realmente importante por la concesión de la beca de doctorado que me ha permitido realizar todo este proyecto y luego a través del proyecto RTA2005-00113-00-00, titulado “Estudio del efecto del ambiente (temperatura) y del comportamiento (densidad poblacional) en la puesta de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) nacido en cautividad (generación G1).” Coordinado por Neil Duncan.

El Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR), mediante el Plan Nacional Cultivo del Lenguado II, titulado “Análisis y estudio de factores de cultivo que condicionan la producción industrial del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*)”. Coordinador Nacional: Pedro Cañavate, Coordinador Cataluña: Neil Duncan.

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR), mediante el plan Nacional Cultivo del Lenguado III, titulado “Bases para el control de la reproducción y conocimiento del sistema de defensas naturales en el lenguado (*Solea senegalensis*)”. Coordinador Nacional: Pedro Cañavate, Coordinador Cataluña: Neil Duncan

La XRAq (Xarxa de acuicultura) que me prestó un apoyo imprescindible para la asistencia a congresos:

Xarxa de Referència d'R+D+I en Aquicultura de la Generalitat de Catalunya (XRAq) y por supuesto a la Universidad de Barcelona (UB).

Esta tesis fue desarrollada y mayormente completada en IRTA Sant Carles de La Rápita (IRTA-SCR, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries) y agradezco el apoyo institucional que durante estos años me han prestado.

Gracias a todo el personal del IRTA, comenzando por su Directora Dolors Furones, su jefa de administración Maite Caballer, y a todo el personal que denominamos de soporte, aun no tengo muy claro si se refiere al soporte que nos dan (del cual no tengo ninguna queja) o a lo que nos soportan (de lo que tampoco tengo ninguna queja, solo agradecimiento).

Para la realización del capítulo segundo de la tesis, conté con la inestimable ayuda de varias personas, unos en el desarrollo de los experimentos Neil Duncan, Fernando Norambuena, Carles García, Mireia Andrés, Catarina Oliveira, Francisco Javier Sánchez-Vázquez, otros en el desarrollo de la logística y el cuidado de los animales, imprescindibles, Rafael Gras, Xavi Ingla, Joaquín Canoura, Mike Hites. Alguno para todo, Albert Rovira.

La complejidad del tercer capítulo me llevó cerca de casa, pudiendo disfrutar de la maravillosa tierra Cántabra, pero contando con un gran apoyo desde Cataluña, a su vez, gracias a Neil Duncan, Nacho Martín, Olvido Chereguini, Cristina Fernández, para luego irme a Escocia y poder contar con tu experiencia, con tus conocimientos y con una actitud, frente a la vida, digna de admiración: Dra. Felicity Huntingford.

Claro que, preparar todo el despliegue de medios hubiera sido una aventura sin vuestra ayuda, Rafael Gras, Xavi Ingla, Josep Luis Celades.

La realización del cuarto capítulo no hubiera sido posible sin la colaboración del personal del Instituto de acuicultura de Torre de la Sal (CSIC) María José Bayarri y Vanesa y sin el apoyo y los conocimientos del Dr. Evaristo Mañanos y mi director Neil Duncan, con los que además guardaré recuerdos inolvidables de congresos y presentaciones. Y por supuesto al personal de soporte que

mantuvieron en perfecto estado a los animales mientras trabajaba con ellos: Rafael Gras, Xavi Ingla, Joaquín Canoura, Miriam Matas, Sandra Molas y Nuria Soler.

Una de las experiencias más impresionantes de mi vida, la cual por supuesto he de agradecerla en gran parte a Neil, fue la estancia en Trømso, en ella, además de aprender con Børge Damsgård y Helge Tveiten, me encontré conmigo mismo (menos mal que no encontré a otro) en las perdidas islas del mar del norte.

Otra de las grandes experiencias que me ha aportado este doctorado, fue la realización de la estancia en Faro, donde Peter Hubbard y Mar Huertas me dieron una auténtica lección de acogida al llegar y posteriormente otra del trabajo bien hecho y compartido. Trabajo que de nuevo hubiera sido imposible sin la colaboración de varias personas como Neil, Nacho Martin, Olvido Chereguini, Noelia Gras, Marta Sastre y Margarita Fernández a la cual le agradezco especialmente ya que fue la persona que me puso en contacto con Neil durante el año 2006.

Finalmente quiero hacer referencia a varias personas que me ayudaron en las diferentes etapas, Ana Roque, Laurence Elandalousi, Fernando Norambuena, Alicia Estévez, Jorge Diogene, Eduardo Barata, David Izquierdo, todos ellos grandes trabajadores que no dudaron en apoyarme cuando lo necesité.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

Bueno, lo primero, y más importante, es agradecer a mis padres Beatriz e Iñaki y a mi tutor, Neil, toda su ayuda, apoyo, consejos, energía y porque no decirlo el dinero que han invertido en que pudiera llegar al final de este periodo, a la entrega de este trabajo. Y sobre todo, gracias por vuestra paciencia.

Sin ellos, tengo muy claro que no hubiera sido posible llegar a buen puerto.

Los siguientes a los que les quiero agradecer su ayuda son amigos que han soportado frustraciones, cabreos, inseguridades y muchos, muchos buenos

momentos, sin cuya presencia, sin sus ánimos y sin las fiestas compartidas, todo este periodo hubiera sido increíblemente complicado, monótono y estresante a la vez. María Toldrá, gran amiga que ha actuado casi como madre, dándome un soporte espléndido siendo mi confidente y amiga, Albert Rovira, que me ha ayudado, soportado, acompañado, reñido, tanto en el trabajo como en la vida personal y claro, Magda Monllaó cuyo interés y paciencia me han mantenido a flote en los momentos más oscuros. Carles García y Mireia Andrés, todo un ejemplo, de ánimo, de ilusión por la vida y cariño compartido. Sandra Molas, que puedo decir Sandreta que no te haya dicho ya, gracias por tu energía, por ser mi amiga aun cuando no lo he merecido, gracias por todo lo que me has dado, de verdad. Gracias

Miriam Matas & Ron, no podría imaginar mi vida en La Rápita sin vuestra presencia, sin tu risa y tus masajes. Mar Marcos y Marta Pimentel que aportaron al ron de mi vida una pizca de limón y azúcar moreno viendo ponerse el sol. Pablo Varela, hay pableras, llegaste tarde pero tu presencia desde Francia fue una constante imprescindible así como una forma de ver que el mundo es demasiado pequeño para sentirme solo. Daniel Cacabelos que me acompañó desde la Universidad, cuantos años han pasado, cuantos viajes, fiesta, baños en lagos helados, cuanto apoyo somos capaces de dar para lo pequeños que somos.

Carmen López, Andrea Suarez y Amandine Caillaud, para mi siempre seréis las tres gemelas un punto de locura, otro de excentricidad, un punto de fiesta y otro de trabajo. Y claro, gracias Jim McChesney y Felicity Huntingford, vuestro apoyo en Glasgow no tuvo precio, a todos los niveles.

Y un montón más, ya que expresar en tan breve espacio 5 años de relaciones, encuentros, desencuentros, alegrías y enfados, me resultaría más difícil si cabe que escribir uno de los capítulos, (además de esto no he tomado notas y seguro que sería poco preciso y nada elegante).

GRACIAS!!

Gràcies!!

Merci!!

Thanks!!

Obrigado!!

Takk!!

Namaste!!

Por cierto, no me olvido, gracias a esos maravillosos animalitos, que me han soportado lo insoportable, que me han ayudado a realizar este proyecto y que han sido objeto de mi trabajo, de mi observación, de mi obsesión durante tanto tiempo. A los lenguados, aunque no lo aprecien, GRACIAS!! por todo.....

*Iñaki*

The studies included in this thesis have been financially supported by INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria), grant and travel allowance.



## • PRÓLOGO

Esta tesis se divide en 3 partes, en la primera, tras una introducción general que pretende señalar un punto de inicio para nuestro trabajo, se han revisado y adaptado las condiciones del cultivo de lenguado al estudio del comportamiento (Capítulo 2 y Anexo 4), y preparado el resto de los estudios. En la segunda parte, utilizando la metodología y logística estudiada en la primera parte, se ha investigado y descrito el comportamiento reproductivo del lenguado senegalés (Capítulo 3 y Anexo 2), haciendo hincapié en las diferencias entre grupos con éxito en la reproducción y grupos con disfunciones reproductivas desconocidas. En la tercera parte del estudio (Capítulo 4), se describen diversos intentos de provocar el comportamiento reproductivo y la puesta en ejemplares con disfunciones reproductivas, asimismo (Capítulo 5) se ha estudiado el reconocimiento químico conoespecífico en el lenguado como posible vía en la sincronización necesaria para la realización de puestas exitosas.

La hipótesis inicial de esta tesis fue entender y buscar soluciones al problema reproductivo del lenguado senegalés criado en cautividad. A diferencia de los lenguados salvajes mantenidos en cautividad, el lenguado senegalés nacido y mantenido en condiciones de cultivo es incapaz de efectuar una puesta de adecuada calidad. A principios del 2007, al inicio de este trabajo, las razones o causas de este problema eran totalmente desconocidas.

El objetivo principal de este trabajo ha sido profundizar en el conocimiento del comportamiento reproductivo del lenguado senegalés a fin de encontrar alguna relación entre dicho comportamiento y la falta de puestas viables de los individuos cultivados. Así, una vez descrito el comportamiento por primera vez en este trabajo, buscar las razones de su ausencia en los individuos nacidos en cautividad (primera generación o G1) y colaborar con la industria en la obtención de puestas regulares en animales reproductores criados en cautividad, evitando así la necesidad de partir de individuos capturados en el

medio natural. Para ello, esta tesis ofrece un estudio detallado del comportamiento, compaginándolo con estudios de naturaleza más fisiológica y con el uso de antiguas y nuevas tecnologías en estos campos, como puede ser el Electroolfatograma (con más de 40 años de desarrollo) o programas de estudio informático de comportamiento (tecnología que se encuentra aun hoy en desarrollo).

## CONTENIDOS.

AGRADECIMIENTOS.	I
PROLOGO.	VII
CONTENIDOS.	IX
CONTENIDOS GENERALES.	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
RESUMEN	1
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN GENERAL	7
DESCRIPCIÓN GENERAL DEL LENGUADO SENEGALÉS ( <i>S. SENEGALENSIS</i> ).	9
TAXONOMÍA.	9
BIOLOGÍA FAMILIA SOLEIDAE.	10
MORFOLOGÍA DEL LENGUADO ( <i>S. SENEGALENSIS</i> , KAUP 1858).	11
DISTRIBUCIÓN Y MODO DE VIDA.	12
DISFUNCIONES REPRODUCTIVAS.	12
DISFUNCIÓN REPRODUCTIVA EN EL LENGUADO SENEGALÉS.	13
INVESTIGACIÓN EN EL ÁMBITO DEL COMPORTAMIENTO Y DE LA FISIOLÓGÍA	
REPRODUCTIVA DEL LENGUADO SENEGALÉS.	15
GENERALIDADES SOBRE FEROMONAS Y HORMONAS EN PECES.	17
OBJETIVOS.	22
BIBLIOGRAFÍA.	25
2. INFLUENCIA DE LA ILUMINACIÓN EN EL ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO NOCTURNO DEL LENGUADO SENEGALÉS ( <i>SOLEA SENEGALENSIS</i> , KAUP 1858) CRIADO EN CAUTIVIDAD.	33
2.1. INTRODUCCIÓN.	34
2.1.1. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS LUCES.	36
2.1.1.1. ACTIVIDAD (TIPO CIRCADIANO).	36
2.1.1.2. COMPORTAMIENTO.	37
2.1.1.3. FISIOLÓGÍA Y MELATONINA – EFECTO DE INTENSIDAD Y LONGITUD DE ONDA.	38
2.2. MATERIAL Y MÉTODOS.	40
2.2.1.- ESTABULACIÓN DE LOS PECES.	40
2.2.2.- DISEÑO EXPERIMENTAL.	42
2.2.3.- EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO.	42
2.2.4.- EVALUACIÓN DE MELATONINA EN SANGRE.	45
2.2.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	46
2.3. RESULTADOS.	47
2.3.1.- CALIDAD VISUAL OBTENIDA.	47
2.3.2.- CICLOS DE ACTIVIDAD.	48
2.3.3.- ANÁLISIS DE COMPORTAMIENTO.	50
2.3.4.- MELATONINA.	52
2.4. DISCUSIÓN.	55
2.5. CONCLUSIONES.	61
BIBLIOGRAFÍA:	62

<b>3. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO DEL LENGUADO SENEGALÉS (SOLEA SENEGALENSIS, KAUP 1858) CRIADO EN CAUTIVIDAD.</b>	<b>67</b>
<b>3.1. INTRODUCCIÓN:</b>	<b>68</b>
3.1.1. ETOLOGÍA Y ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO.	68
3.1.2. EL COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO EN PECES PLANOS.	70
<b>3.2. MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	<b>73</b>
3.2.1. ESTABULACIÓN DE PECES Y RECOGIDA DE PUESTAS.	73
3.2.2. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO.	75
<b>3.3. RESULTADOS.</b>	<b>79</b>
3.3.1. PUESTAS RECOGIDAS.	79
3.3.2. DIFERENCIAS DE ACTIVIDAD DE LOS GRUPOS.	80
3.3.3. ETOGRAMA DEL LENGUADO SENEGALÉS CRIADO EN CAUTIVIDAD.	81
<b>ETOGRAMA DE LA REPRODUCCIÓN DEL LENGUADO SENEGALÉS.</b>	<b>81</b>
3.3.4. DESCRIPCIÓN DEL CORTEJO DEL LENGUADO.	86
A) COMPARACIÓN DE COMPORTAMIENTO SALVAJES EN NOCHES CON PUESTA VS NOCHES SIN PUESTA.	91
B) COMPARACIÓN DE COMPORTAMIENTO SALVAJES EN NOCHES SIN PUESTA VS G1.	92
C) COMPARACIÓN DE COMPORTAMIENTO SALVAJES VS MEZCLA.	93
<b>3.4. DISCUSIÓN.</b>	<b>95</b>
<b>3.5. CONCLUSIONES.</b>	<b>100</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>101</b>
<b>4. COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO EN LENGUADO SENEGALÉS INDUCIDO HORMONALMENTE.</b>	<b>105</b>
<b>4.1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>106</b>
INDUCCIÓN HORMONAL.	106
<b>4.2. MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	<b>111</b>
4.2.1. SISTEMAS DE CULTIVO Y ZOOTECNIA.	111
4.2. ANÁLISIS Y COLECCIÓN DE DATOS.	111
4.2.2.A ANÁLISIS DE MADUREZ.	111
4.2.2.B. RECOGIDA Y ANÁLISIS DE LA PUESTA.	112
4.2.2.C. ANÁLISIS DE COMPORTAMIENTO Y ACTIVIDAD.	113
4.2.3. EXPERIMENTOS DE INDUCCIÓN.	113
4.2.3.1. INDUCCIÓN GNRHA	113
4.2.3.2. INDUCCIÓN GNRH – HCG.	114
4.2.3.3. INDUCCIÓN GNRH –PG.	115
4.2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO APLICADO.	116
<b>4.3. RESULTADOS.</b>	<b>117</b>
4.3.1. ANÁLISIS DE LAS PUESTAS	119
4.3.1.A. INDUCCIÓN CON GNRHA	119
4.3.1.B INDUCCIÓN GNRH – HCG.	120
4.3.1.C INDUCCIÓN GNRH –PG.	120
4.3.2. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD Y COMPORTAMIENTOS REPRODUCTIVOS ASOCIADOS A LA PUESTA	121
1) CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD	121
2)CORTEJO	122

3) <i>COMPORTAMIENTOS DESPLEGADOS TRAS LA INDUCCIÓN</i>	122
<b>4.4. DISCUSIÓN.</b>	<b>124</b>
<b>4.5. CONCLUSIONES.</b>	<b>126</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>127</b>
<b>5. PERCEPCIÓN QUÍMICA CONESPECÍFICA EN EL LENGUADO SENEGALÉS (SOLEA SENEGALENSIS, KAUP 1858)</b>	<b>131</b>
<b>5.1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>132</b>
<b>5.2. MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	<b>137</b>
<b>5.2.1 MUESTRAS.</b>	137
5.2.1.1 ANIMALES DE MUESTREO.	137
5.2.1.2 TOMA DE MUESTRAS.	138
MUESTRA DE AGUA.	139
MUESTRAS DE ANIMALES INDUCIDOS HORMONALMENTE.	141
<b>5.2.2 EOG.</b>	141
<b>5.2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.</b>	143
<b>5.3. RESULTADOS.</b>	145
5.3.1 MUESTRA DE AGUA.	145
5.3.2 MUESTRA DE MUCUS.	145
5.3.3 RESPUESTA OLFATIVA A DIFERENTES DISOLUCIONES DE HECES.	146
5.3.4 RESPUESTA OLFATIVA A LA ORINA.	147
<b>5.4. PERCEPCIÓN QUÍMICA CONESPECÍFICA EN LA TRUCHA ÁRTICA, ARCTIC CHARR (SALVELINUS ALPINUS). USO DE TECNOLOGÍAS ACCESORIAS EN EL ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO ANIMAL.</b>	<b>151</b>
5.4.1. META Y JUSTIFICACIÓN DEL EXPERIMENTO EN RELACIÓN A LA TESIS.	151
5.4.2 ESTABULACIÓN DE PECES.	152
5.4.3 ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO (ETHOVISION).	153
5.4.4. RESULTADOS.	156
POR TRATAMIENTO APLICADO.	157
POR SEXOS EN CADA TRATAMIENTO.	158
<b>5.5. DISCUSIÓN.</b>	<b>160</b>
<b>5.6. CONCLUSIONES.</b>	<b>164</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>165</b>
<b>6. DISCUSIÓN GENERAL.</b>	<b>171</b>
<b>7. CONCLUSIONES GENERALES.</b>	<b>183</b>
<b>8. TRANSLATION.</b>	<b>189</b>
<b>8.1. BRIEF INTRODUCTION</b>	<b>190</b>
THE SOLE IN AQUACULTURE	190
REPRODUCTIVE DISORDERS	191
RESEARCH IN THE FIELD OF BEHAVIOUR	192
OVERVIEW OF PHEROMONES AND HORMONES	194
<b>8.2. GENERAL OBJECTIVES</b>	<b>198</b>
<b>8.3 FINAL DISCUSSION.</b>	<b>200</b>
REPRODUCTIVE DYSFUNCTION OF SENEGALESE SOLE	200
INDUCTION OF BEHAVIOUR	204
<b>8.4 CONCLUSIONS.</b>	<b>207</b>

<i>BIBLIOGRAFÍA GENERAL.</i>	<i>B-1</i>
<i>GLOSARIO DE TÉRMINOS.</i>	<i>G-1</i>
<i>ABREVIATURAS.</i>	<i>G-8</i>
<i>ESPECIES CITADAS.</i>	<i>G-9</i>
<u><i>ANEXOS</i></u>	
<u><i>1 - ARTÍCULO EN REVISIÓN.</i></u>	<u><i>A-1</i></u>
<i>THE EFFECT OF NIGHT ILLUMINATION, RED AND INFRARED LIGHT, ON MELATONIN, LOCOMOTOR ACTIVITY AND BEHAVIOUR OF SENEGALESE SOLE (SOLEA SENEGALENSIS) BROODSTOCK.</i>	<i>A-2</i>
<i>FIGURES.</i>	<i>A-21</i>
<u><i>2 - ETOGRAMA</i></u>	
<i>JUSTIFICACIÓN Y PROPÓSITO DEL ETOGRAMA GENERAL DEL LENGUADO.</i>	<i>A-26</i>
<i>DESCRIPCIÓN DE COMPORTAMIENTOS.</i>	<i>A-26</i>
<i>MATERIALES.</i>	<i>A-27</i>
<b><i>OTROS RECURSOS.</i></b>	<b><i>A-27</i></b>
<i>ETOGRAMA.</i>	<i>A-28</i>
<i>PERMANECER QUIETO.</i>	<i>A-28</i>
<i>QUIETO.</i>	<i>A-28</i>
<i>NATACIÓN.</i>	<i>A-29</i>
<i>PERSECUCIONES.</i>	<i>A-32</i>
<i>TEMBLOR.</i>	<i>A-32</i>
<i>ACCIONES ENTRE INDIVIDUOS.</i>	<i>A-33</i>
<i>SECUENCIAS DE COMPORTAMIENTO.</i>	<i>A-37</i>
<u><i>3 - PROTOCOLOS.</i></u>	<u><i>A-38</i></u>
<b><i>PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE Y PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ESTEROIDES.</i></b>	<b><i>A-38</i></b>
<b><i>EXTRACCIÓN DE PLASMA PARA EL ANÁLISIS DE ESTEROIDES (E2, T Y 11KT) POR EIA.</i></b>	<b><i>A-41</i></b>
<b><i>PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE ALETA.</i></b>	<b><i>A-43</i></b>
<i>MATERIALES.</i>	<i>A-43</i>
<b><i>PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE AGUA, HECES, ORINA Y MUCUS.</i></b>	<b><i>A-45</i></b>
<i>MATERIALES.</i>	<i>A-45</i>
<i>LAS MUESTRAS RECOGIDAS POR GRUPO.</i>	<i>A-45</i>
<i>MATERIALES.</i>	<i>A-46</i>
<i>TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.</i>	<i>A-46</i>
<b><i>PROTOCOLOS DE INDUCCIÓN.</i></b>	<b><i>A-48</i></b>
<i>MATERIALES GENERALES PARA LA INDUCCIÓN HORMONAL.</i>	<i>A-48</i>
<i>METODOLOGÍA DE INDUCCIÓN HORMONAL (PROTOCOLO DE INDUCCIÓN) GNRH HCG.</i>	<i>A-48</i>
<i>METODOLOGÍA DE INDUCCIÓN HORMONAL (PROTOCOLO DE INDUCCIÓN) GNRH.</i>	<i>A-49</i>
<u><i>4 - PARENTESCO GENÉTICO.</i></u>	<u><i>A-51</i></u>
<b><i>MATERIAL.</i></b>	<b><i>A-51</i></b>
<u><i>5- OTROS TRABAJOS REALIZADOS A LO LARGO DE LA TESIS: PERIODO 2007-2011.</i></u>	<u><i>A-58</i></u>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1-1</b> LENGUADO SENEGALÉS, SOLEA SENEGALENSIS (KAUP, 1858)	12
<b>FIGURA 2-1:</b> GRÁFICAS INTENSIDAD LUMÍNICA CON FILTRO.	41
<b>FIGURA 2-2:</b> TRASLADO DE LOS PECES.	42
<b>FIGURA 2-3:</b> CALIDAD VISUAL.	47
<b>FIGURA 2-4:</b> COMPARATIVA, CICLO DIARIO.	49
<b>FIGURA 2-5:</b> COMPORTAMIENTOS OBSERVADOS DURANTE EL DÍA	50
<b>FIGURA 2-6:</b> COMPORTAMIENTOS OBSERVADOS DURANTE LA NOCHE	51
<b>FIGURA 2-7:</b> MELATONINA (A-D)	52-54
<b>FIGURA 3-1:</b> DISTRIBUCIÓN LUCES Y CÁMARAS, TANQUE RECTANGULAR Y TANQUE CIRCULAR.	75
<b>FIGURA 3-2:</b> DISPOSICIÓN DE CÁMARAS Y LUCES EN TANQUE TRONCOCÓNICO	75
<b>FIGURA 3-3:</b> PERFILES DE ACTIVIDAD DE 3 DE LOS 5 GRUPOS ESTUDIADOS:	80
<b>FIGURA 3-4:</b> ANIMALES QUIETOS SIN INTERACCIÓN APARENTE	81
<b>FIGURA 3-5:</b> 2 MOMENTOS EN PERSECUCIONES. EN AMBOS CASOS SOLO MACHOS	82
<b>FIGURA 3-6:</b> PAREJA REPRODUCTORA NADANDO ACOPLADOS HACIA LA SUPERFICIE	82
<b>FIGURA 3-7:</b> TABLA DE OBSERVACIONES DEL ETOGRAMA	83
<b>FIGURA 3-8:</b> ESQUEMA: PASOS 1 A 3 DEL CORTEJO DEL LENGUADO SENEGALÉS.	86
<b>FIGURA 3-9:</b> DETALLE DEL COMPORTAMIENTO DE APOYAR LA CABEZA	86
<b>FIGURA 3-10:</b> ESQUEMA DE COMPORTAMIENTOS	87
<b>FIGURA 3-11:</b> COMPORTAMIENTO DE GUARDIÁN FRENTE A OTRO MACHO.	89
<b>FIGURA 3-12:</b> EL CORTEJO DEL LENGUADO SENEGALÉS	90
<b>FIGURA 3-13:</b> SECUENCIA DE LA PUESTA: (A-E)	90
<b>FIGURA 3-14:</b> COMPARACIÓN DE COMPORTAMIENTOS SALVAJES CON Y SIN PUESTA	91
<b>FIGURA 3-15:</b> COMPARACIÓN DE COMPORTAMIENTOS	92
<b>FIGURA 3-16:</b> REPETICIONES DE COMPORTAMIENTOS EN EL CORTEJO	94
<b>FIGURA 4-1</b> EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GÓNADAS. (ADAPTADO DE MUÑOZ-CUETO & GONZÁLEZ MARTÍNEZ, 2005)	107
<b>FIGURA 4-2.</b> (ADAPTADO Y TRADUCIDO DE: © STACEY & SORENSEN, 2003).	108
<b>FIGURA 4-3</b> TIEMPO MEDIO DE MOVIMIENTO Y % DE MOVILIDAD DEL ESPERMA EXTRAÍDO DE LOS MACHOS UTILIZADOS EN LOS EXPERIMENTOS	117

<b>FIGURA 4-4</b> PORCENTAJE DE MOVILIDAD Y TIEMPO MEDIO DE MOVIMIENTO DEL ESPERMA EXTRAÍDO DE LOS MACHOS UTILIZADOS EN LOS EXPERIMENTOS	118
<b>FIGURA 4-5</b> VARIACIÓN DEL ÍNDICE G DE LAS HEMBRAS ENTRE EL PRIMER DÍA Y EL DÍA 14	119
<b>FIGURA 4-6</b> HUEVOS DE LENGUADO OBSERVADOS A LA LUPA. FOTOGRAFÍA DE IGNACIO CARAZO.	119
<b>FIGURA 4-7</b> <i>VOLUMEN (V) DE PUESTAS DE HEMBRAS INDUCIDAS</i>	121
<b>FIGURA 4-8</b> DIFERENCIAS DE ACTIVIDAD ENTRE MACHOS Y HEMBRAS.	121
<b>FIGURA 4-9</b> <i>PORCENTAJE DE PECES MANIFESTANDO LOS DISTINTOS TIPOS DE COMPORTAMIENTO</i>	123
<b>FIGURA 5-1:</b> ROSETA OLFATIVA AL DESCUBIERTO EN EL LENGUADO PARA MEDICIONES CON EL EOG (I. CARAZO, 2010).	133
<b>FIGURA 5-2:</b> MUESTRAS DE ORINA Y HECES RECOLECTADAS .	139
<b>FIGURA 5-3:</b> MUESTRAS DE AGUA Y MUCUS RECOLECTADAS	140
<b>FIGURA 5-4:</b> SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS EXCRETADOS TRAS LA INDUCCIÓN. TIEMPOS DE TOMA DE MUESTRA	141
<b>FIGURA 5-5:</b> MUESTRAS RECOLECTADAS PARA LA SECUENCIACIÓN DE ANIMALES INDUCIDOS	141
<b>FIGURA 5-6:</b> DIAGRAMA DEL FRACCIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE ORINA. FILTRACIÓN POR PESO MOLECULAR. ADAPTADO DE HUERTAS ET AL, 2007.	142
<b>FIGURA 5-7:</b> LAMELAS OLFATIVAS TRAS RETIRAR EL EPITELIO DE LA NARINA	142
<b>FIGURA 5-8:</b> SOPORTE Y LOGÍSTICA DEL EOG	142
<b>FIGURA 5-9:</b> SITUACIÓN ELECTRODOS EOG	143
<b>FIGURA 5-10:</b> GRÁFICA DE RESPUESTA A UNA MUESTRA.	143
<b>FIGURA 5-11:</b> COMPARATIVA ENTRE LOS 3 FLUIDOS ESTUDIADOS. CONCENTRACIÓN 1/1000.	145
<b>FIGURA 5-12:</b> : RESPUESTA POR MADUREZ: GRÁFICO SEMILOGARÍTMICO. MACHO MADURO, HEMBRA MADURA, MACHO INMADURO, HEMBRA INMADURA. RESPUESTA A MUESTRAS DE HECES	145
<b>FIGURA 5-13:</b> RESPUESTA POR SEXO: GRÁFICO SEMILOGARÍTMICO. MACHO MADURO, HEMBRA MADURA, MACHO INMADURO, HEMBRA INMADURA . RESPUESTA A MUESTRAS DE HECES	147
<b>FIGURA 5-14:</b> RESPUESTA POR SEXO: GRAFICO SEMILOGARÍTMICO, MACHO MADURO, HEMBRA MADURA, MACHO INMADURO, HEMBRA INMADURA. RESPUESTA A MUESTRAS DE ORINA A DIFERENTES DILUCIONES.	147
<b>FIGURA 5-15:</b> RESPUESTA POR MADUREZ GRÁFICO SEMILOGARÍTMICO. MUESTRAS DE ORINA DE MACHO MADURO, HEMBRA MADURA, MACHO INMADURO (n) HEMBRA INMADURA. RESPUESTA POR MADUREZ A MUESTRAS DE ORINA A DIFERENTES DILUCIONES.	148
<b>FIGURA 5-16:</b> RESPUESTA POR MADUREZ GRAFICO SEMILOGARÍTMICO. MACHO MADURO, HEMBRA MADURA, MACHO INMADURO, HEMBRA INMADURA.	149

<b>FIGURA 5-17:</b> MEDIA DE LAS AMPLITUDES REGISTRADAS EN LENGUADOS INMADUROS (N=10) EN RESPUESTA A LA EXTRACCIÓN FRACCIONADA EN FASE SÓLIDA DE ORINA DE MACHOS Y HEMBRAS CONESPECÍFICOS A DIFERENTES ESTADOS DE MADURACIÓN	149
<b>FIGURA 5-18:</b> SISTEMA PARA GRABACIÓN Y EXPERIMENTACIÓN.	152
<b>FIGURA 5-19:</b> ESQUEMA DEL SISTEMA DE GRABACIÓN Y EL SISTEMA DE INYECCIÓN DE MUESTRAS.	153
<b>FIGURA 5-20:</b> INSTANTÁNEA DEL LA GRABACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE 4 INDIVIDUOS SIMULTÁNEAMENTE	153
<b>FIGURA 5-21:</b> DISTANCIA AL PUNTO DE INYECCIÓN DEL TRATAMIENTO. HEMBRA INMADURA, MACHO INMADURO, MACHO MADURO	158
<b>FIGURA 5-22:</b> DISTANCIA NATACIÓN TOTAL. HEMBRA INMADURA, MACHO INMADURO, MACHO MADURO.	159
<b>FIGURA 5-23:</b> VELOCIDADES DE NATACIÓN EN CM/S. HEMBRA INMADURA, MACHO INMADURO, MACHO MADURO	159



# Resumen

---

En el presente trabajo de tesis doctoral se presenta y describe por primera vez el comportamiento reproductivo del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) de origen salvaje mantenido en cautividad, trabajando con un total de 15 cortejos. El cortejo del lenguado senegalés se inicia mediante una serie de contactos entre machos y hembras seguido de una serie de comportamientos de tipo competitivo observados exclusivamente en los machos. Posteriormente un macho centra su atención sobre una determinada hembra, apoyando su cabeza sobre la zona dorsal, la aleta caudal y la gónada de la hembra, hasta que ésta comienza a nadar, momento en el que el macho se sitúa debajo de ella. A continuación ambos individuos nadan de forma sincronizada hacia la superficie, y tras unos segundos comienzan a liberar los gametos. Los comportamientos considerados como más relevantes en el estudio del cortejo se han denominado: “apoyar la cabeza”, “temblor”, “seguir a”, “seguido por”, “separarse”, “quieto”, “nadar solo”, “quieto con acciones sobre el”. Además de la descripción del comportamiento reproductivo de los lenguados salvajes, en este trabajo se han estudiado otros grupos de peces: la primera generación de lenguados criados en cautividad G1, mezcla de G1 y salvajes (machos salvajes – hembras G1 y machos G1- hembras salvajes) y G1 sometidos a inducción hormonal a fin de estudiar la existencia o no de comportamientos similares a los descritos previamente de lenguados salvajes. Como resultado de dichos estudios se ha podido establecer por primera vez que el problema reproductivo de los lenguados G1 es de naturaleza comportamental y se ha descrito la ausencia de comportamiento reproductivo en los lenguados nacidos y criados en cautividad (G1). Se ha descrito la ausencia total de una serie de comportamientos imprescindibles para el cortejo del lenguado como “seguir a”, “seguido por”, la incitación de apoyar la cabeza y todos los pasos posteriores del cortejo. Sin embargo sí que se pudo observar y describir un comportamiento reproductivo normal en grupos mezcla de machos salvajes y hembras G1, con

la descripción de 2 cortejos completos en este grupo tan solo 3 meses después de su formación , obteniendo un total de 30 ml de huevos flotantes con un 50% de fecundación, lo que a pesar de ser valores bajos, demuestra que con esta composición de individuos no hay disfunción reproductiva, lo que centra el problema en los machos G1. En los ensayos de inducción hormonal de lenguados G1, usando distintos tipos de hormonas, hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), gonadotropina coriónica humana (HCG), y prostaglandina (PGF2 $\alpha$ ) se observó también una ausencia total de cortejo y/o de los comportamientos asociados, observándose incluso una menor actividad en los animales inducidos.

Considerando el nulo efecto de las hormonas exógenas (GnRH, HCG y PGF2 $\alpha$ ), para inducir el comportamiento reproductivo normal bajo condiciones experimentales del presente estudio, se examinaron a continuación las posibles vías de comunicación química implicadas en el control del comportamiento reproductivo. Mediante el uso del electroolfatograma, se estudió el efecto de una serie de sustancias/aromas a la hora de inducir una respuesta en individuos juveniles de lenguado. Así se pudo observar que orina y heces produjeron un aumento estadísticamente significativo de respuesta mediante la cual los juveniles podían distinguir no sólo el sexo ( $P < 0,05$ ) sino la madurez gonadal (también con diferencias significativas  $P < 0,05$ ) de individuos conespecíficos. La señal detectada fue significativamente mas alta para heces y orina de machos maduros y hembras maduras que para machos inmaduros y hembras inmaduras.

Por último se realizó un experimento con trucha ártica (Arctic char), a fin de estudiar el efecto de ciertas sustancias químicas exógenas introducidas en el agua sobre el reconocimiento conespecífico y el comportamiento, obteniendo diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) en cuanto a la reacción que provocan esas sustancias. Así, se observaron cambios en la velocidad de natación, distancia recorrida y acercamiento al punto de inserción de la señal, para tratamientos con prostaglandinas (PGF2 $\alpha$  y su análogo el D-Coprostenol) y fluidos ováricos

(registros EthoVision). Se observó que los machos maduros, tras la introducción de fluidos ováricos, aumentaron su actividad en el área de la “nube” de los fluidos ováricos. En comparación se observó un efecto similar en animales inmaduros a la introducción de agua de un tanque de otros animales induciendo un aumento en actividad en el área del “nube” de agua de otros animales, pero no hubo reacción por parte de los individuos inmaduros (machos y hembras) a fluidos ováricos.

El conjunto de ensayos realizados en la tesis, así como los resultados obtenidos, centran el problema reproductivo en una disfunción del comportamiento reproductivo en los machos G1. Bajo las condiciones de este estudio, el uso de hormonas exógenas GnRH, hCG y PGF2 $\alpha$ , no indujo dicho comportamiento aunque sí se pudo constatar la existencia de una comunicación química conespecífica a través de la orina y las heces, lo que puede estar involucrado en el control del comportamiento reproductivo del lenguado como ha sido descrito en otras especies de peces. La identificación del tipo de control fisiológico del comportamiento reproductivo permitirá en el futuro poder solucionar la disfunción reproductiva o incluso inducir o controlar de dicho comportamiento mediante el uso de las sustancias químicas más adecuadas.

# Abstract

---

The present doctoral thesis has described for the first time the reproductive behaviour of wild Senegalese sole (*Solea senegalensis*) held in captivity based on a total of 15 observed courtships. Senegalese sole courtship was initiated with a series of contacts between males and females followed by a series of competitive type behaviours observed exclusively between males. After these behaviours a male focused on a particular female, resting his head on the dorsal area, caudal fin and ovary, until the female began to swim, at which time the male would situate below the female. The male and female then swam in synchrony to the surface and after a few seconds began to release the gametes. The behaviours considered most relevant to the courtship were named "support the head," "trembling", "follow", "followed by", "separate", "still", "swim alone," and "stay quiet with actions on it". In addition to the description of the reproductive behaviour of wild sole, the present thesis has studied other groups of fish: the first generation of captive-bred G1 sole, mixed G1 and wild (wild males with G1 females and G1 males with wild females) and G1 fish that were induced with hormones, all with the aim to study the existence or not of behaviours similar to those previously described for wild Senegalese sole. These studies established for the first time that the reproductive problem of G1 Senegalese sole was based in behavioural aspects and in particular the complete absence of reproductive behaviour in the Senegalese sole hatched and reared in captivity (G1). A number of behaviours essential for Senegalese sole courtship were absent, including "follow", "followed by" incidence of support the head and all the subsequent steps of courtship. However, normal reproductive behaviour was observed and described in the mixed group wild males and G1 females, with the description of two complete courtship sequences only 3 months after the mixed group was formed. This mixed group produced a total of 30 ml of floating eggs with 50% fertilization, which despite being low values demonstrated that this mix of organs (G1 females and wild males) did not exhibit total reproductive dysfunction and, therefore, focused the problem in G1 males. In trials with hormonal induction of G1 Senegalese sole, using

different types of hormones, gonadotropin-releasing hormone (GnRH), human chorionic gonadotropin (HCG) and prostaglandin (PGF2a), there again was a complete absence of courtship and / or associated behaviours, with a reduction in activity in the induced animals.

Considering the null effect of exogenous hormones (GnRH, HCG and PGF2a), under the present experimental conditions to induce normal reproductive behaviour, a study was undertaken to examine the possible pathways of chemical communication involved in the control of behaviour. The electroolfatogram was used to study the effect of a number of substances / aromas for inducing a response in individual juvenile Senegalese sole. Thus it was observed that urine and faeces produced a significant increase ( $P = 0.05$ ) in response by which juveniles could distinguish not only sex but also gonadal maturity ( $P < 0.05$ ) of conspecific individuals. The detected signal was significantly higher for faeces and urine of mature males and mature females compared to immature males and immature females.

Finally an experiment was conducted with arctic char (*Salvelinus alpinus*), to study the effect of certain exogenous chemicals introduced into the water on conspecific recognition and behaviour, obtaining significant differences ( $P < 0.001$ ) in terms of the reaction caused by the substances. Thus, prostaglandin (PGF2 $\alpha$  and its analogue D-Coprostenol) and ovarian fluid were observed to significantly change individuals swimming speed, distance swam and closeness to the point where the substances were introduced (EthoVision records). Mature males were observed to, after the introduction of ovarian fluids, increase activity in the area where a "cloud" of ovarian fluids was formed. Similar observations were found with immature fish when water from a tank with other Charr was introduced and fish were observed to increased activity in the area where a "cloud" of water from a tank with other Charr was formed, but there was no reaction in immature fish (males and females) to the introduction of ovarian fluids.

Taken altogether the experiments in the present thesis indicated that the reproductive problem was centred in a behavioural reproductive dysfunction in G1 male Senegalese sole. Under the conditions of the present study, the use of

exogenous hormones GnRH $\alpha$ , hCG and PGF2 $\alpha$ , did not induce reproductive behaviour although it was found that there was a conspecific chemical communication through urine and faeces, which may be involved in the control of reproductive behaviour of sole as has described in other fish species. The identification of the physiological control of reproductive behaviour in the future may lead to a solution of the reproductive dysfunction or the control or induction of the reproductive behaviour by using appropriate chemicals.



# Capítulo 1

---

## Introducción general

La acuicultura es actualmente una industria de gran relevancia frente a la situación actual de la demanda de productos de la industria pesquera y al estado actual de nuestros mares y océanos, en la que por un lado muchas especies se encuentran sobreexplotadas y por otro el grado de contaminación del mar es cada vez mayor. Así, según la FAO (2012), la acuicultura proporciona el 41,3% de la producción actual de productos marinos de la industria pesquera: peces, moluscos y crustáceos exceptuando productos vegetales. Lo que comparándolo con los datos de 1970 en los que la acuicultura representaba el 3,9 % del total de la producción mundial (FIGIS-FAO, 2004) supone un aumento importante. En 2011 la acuicultura produjo 63,3 millones de toneladas de peces, moluscos y crustáceos para el consumo humano (FAO, 2012). Este aumento en la producción acuícola se ha logrado tanto por avances en los conocimientos de la biología de los organismos cultivados como por el desarrollo de la tecnología para su cultivo.

Dentro de la producción de peces cabe destacar el cultivo de peces planos (Pleuronectiformes), teleósteos marinos que presentan una gran demanda y alcanzan un elevado valor de mercado. En España, la producción de lenguado de acuicultura, rondaba las 170 toneladas (73,7 t de lenguado senegalés y 96,7 t de lenguado común) en 2011 (FAO, 2012) con un precio de producción en torno a los 8-9 € y un precio de mercado de 13€ (Howell et al., 2011). Actualmente el lenguado senegalés se cultiva en granjas de la costa atlántica portuguesa, islas Canarias, noroeste de España y Francia, hay también algunos puntos de cultivo en la costa mediterránea española y es a su vez un cultivo secundario desde hace varios años en los esteros de Andalucía en régimen extensivo (Andalucía, 2010) .

Desde finales de los años 70 se han llevado a cabo multitud de estudios sobre la biología de estas especies, encaminados a desarrollar su cultivo intensivo,

abordando esencialmente temas como la reproducción (Dinis, 1986; Cañavate y Fernández-Díaz, 1999; Dinis *et al.*, 1999; García-López *et al.*, 2005; Agulleiro *et al.*, 2006), nutrición (Ribeiro *et al.*, 1999; Conceição *et al.*, 2007) y el cultivo larvario (Vázquez *et al.*, 1994; Cañavate y Fernández-Díaz, 1999; Dinis *et al.*, 1999; Fernández-Díaz *et al.*, 2001; Conceição *et al.*, 2007). Aunque durante los últimos 35 años se han dedicado numerosos esfuerzos para cultivar el lenguado senegalés, la producción comenzó en torno al año 1991, cuando desde las instalaciones del IFAPA El Toruño (Junta de Andalucía) se comienza a suministrar una producción estable de alevines (Cañavate 2005). Diversos problemas limitan su producción, convirtiéndolo en un cultivo solo parcialmente aceptado por las empresas de acuicultura (Howell *et al.*, 2011); Howell (2011) identificó algunos de los problemas: el desarrollo de dietas adecuadas, sistemas adecuados de recirculación y cultivo y particularmente las patologías y el control de la reproducción. Los problemas patológicos son varios, principalmente Tenacibaculosis (*Tenacibaculum* ssp) y Vibriosis (*Vibrios* SSP) pero también pasteurelosis (*Photobacterium damsela*, subsp. *Piscicida*), el virus de la linfocistis (*Lymphocystivirus*) y septicemia hemorrágica vírica (rabdovirus VHSV) (Padrós *et al.*, 2005; Howell *et al.*, 2011); sin embargo, el desarrollo de vacunas está ofreciendo soluciones (Howell *et al.*, 2011). El problema del control de la reproducción se debe principalmente a que las puestas de los lenguados nacidos en cautividad (generación G1) son infrecuentes y de mala calidad comparado con las obtenidas a partir de lenguados salvajes que realizan la puesta sin problema alguno tras aclimatarse a las condiciones de cautividad (Ánguis y Cañavate, 2005; García-López *et al.*, 2006). En esta situación la industria no se sustenta ya que depende del suministro de reproductores fértiles del medio salvaje impidiendo así la posible mejora de su stock mediante el uso de programas de mejora genética. El objetivo del presente trabajo es describir el problema reproductivo e investigar posibles soluciones al control de reproducción de los lenguados G1 nacido en cautividad para apoyar la industria en su camino para lograr una producción sostenible y de calidad para la creciente población mundial.

## Descripción general del lenguado senegalés (*S. Senegalensis*)

### Taxonomía.

Reino: Animalia

Subreino: Metazoa

Phylum: Chordata

Subfilo: Vertebrata(Craniata)

- Subtipo: Gnathostomata
  - Superclase: Pisces
  - Clase: Osteichthyes (Actinopterygii)
  - Infraclasse: TELEOSTEI
    - Orden: Pleuronectiformes (Heterostomata)
    - Suborden: Pleuronectoidei
    - Infraorden: Soleoidei
      - Familia: Soleidae
      - Subfamilia: Soleinae

➤ Género: Solea

❖ Especies:

Actualmente se consideran 11 especies válidas en este género

- ❖ *Solea bleekeri* (Boulenger, 1898)
- ❖ *Solea capensis* (Kaup, 1858)
- ❖ *Solea elongata* (Day, 1877)

- ❖ *Solea fulvomarginata* (Gilchrist, 1904)
  - ❖ *Solea heinii* (Steindachner, 1903)
  - ❖ *Solea humilis* (Cantor, 1849)
  - ❖ *Solea ovata* (Richardson, 1846)
  - ❖ *Solea stanalandi* (Randall & McCarthy, 1989)
  - ❖ *Solea senegalensis* (Kaup, 1858)
  - ❖ *Solea solea* (Linnaeus, 1758) - Lenguado común (antiguamente *Solea vulgaris* (Quensel 1806))
  - ❖ *Solea aegyptiaca* (Chabanaud, 1927)
- *Sistemática extraída de (Bauchot y Pras, 1980)*

### **Biología Familia soleidae:**

Se conocen formas de transición de peces planos fosilizados con una edad aproximada de 55 millones de años. Son criaturas submarinas, fosilizadas durante el Eoceno en sedimentos calizos. En los fósiles encontrados, se observa ya un desplazamiento parcial del ojo, producido durante la evolución debido al desarrollo característico del cerebro asimétrico que presentan estas especies. Los géneros más antiguos conocidos son *Amphistium* y *Heteronectes* (Friedman, 2008).

Los soleidos se caracterizan por presentar un hocico redondo y carnoso (Bentuvia, 1990). Su boca es pequeña, arqueada y con la abertura hacia abajo, sin dientes palatinos y con una mandíbula superior más desarrollada que la inferior. Los ojos son muy pequeños y próximos. Tras la metamorfosis típica de este grupo, ambos ojos se sitúan en el lado derecho del pez (unos 30 géneros incluidos en el orden Heterostomata (Pleuronectiformes) son dextrógiros, los 89 géneros restantes son levógiros). Este flanco (lado ocular) es el superior en

reposo, siendo el izquierdo (lado ciego) el que se encuentra en contacto con el sustrato. La línea lateral es evidente a ambos lados del pez. Su cuerpo es oval y alargado. Las escamas del tronco continúan por la cabeza.



**Figura 1-1** Lenguado senegalés, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) Lenguado hembra de cultivo. Fotografía de I. Carazo. 2008.

**Morfología del lenguado (*S. Senegalensis*, Kaup 1858). Descripción sintetizada de Ben-Tuvia, 1990.**

El lenguado senegalés (*S. senegalensis*, Kaup 1858) es un pez de la clase Actinopterygii (peces con aletas ralladas), del orden Pleuronectiformes y de la familia soleidae. Presenta ambos ojos en el lado derecho de la cabeza. Tras la metamorfosis típica de este grupo pierde la simetría bilateral. El número de vértebras a lo largo del cuerpo oscila entre 44 y 46. El nostril (apertura al exterior de los órganos nasales) del lado ciego es de un tamaño inferior al del ocular (la mitad aproximadamente) y está situado más cercano al margen frontal de la cabeza. Esta distancia es ligeramente superior a la que separa el nostril de la boca (proporción 1:1-1,4). La aleta pectoral del lado ocular tiene una mancha negra que ocupa la totalidad de la mitad distal de la aleta, mientras que la del lado ciego es blanca.

## **Distribución y modo de vida**

El lenguado senegalés es una especie de pez plano, marino, demersal, cuyo hábitat más frecuente se encuentra entre los 12 y los 65 m de profundidad aunque también se adentran en estuarios de ríos. Se alimentan de poliquetos y diversos crustáceos de pequeño tamaño (Arias y Moyano, 1990). Su distribución geográfica se restringe al Atlántico oriental, desde Senegal hasta La Rochelle (Lagardère *et al.*, 1979) y al Mediterráneo (Ben-Tuvia, 1990). Es un pez gonocórico sin caracteres sexuales externos diferenciales, madura por primera vez al tercer año de vida con unos 25-30 cm de longitud (Dinis, 1986). Su reproducción en el medio natural puede darse durante todo el año, presentando un pico en primavera. Las larvas son pelágicas hasta la metamorfosis (entre 10 y 20 días de la eclosión) en la que se produce la migración del ojo izquierdo hacia el costado derecho, con la consiguiente modificación del cráneo y algunas de sus conexiones nerviosas, haciéndose el pez (juvenil) asimétrico y bentónico (Dinis *et al.*, 1999)

## **Disfunciones reproductivas**

Algunas especies de peces cultivadas presentan ciertas disfunciones reproductivas a la hora de su introducción como especie de cultivo. Los machos pueden presentar problemas de disminución de la cantidad de esperma, o en la calidad de éste (Zohar y Mylonas 2001). Han sido descritas tres tipos de disfunción reproductiva en las hembras de algunas especies, incluyendo los peces planos. La disfunción reproductiva tipo 1 en las hembras consiste en el fallo de la vitelogénesis, se ha observado por ejemplo en anguilas (*Anguilla ssp*) mantenidas en cautividad, o en múgiles (*Múgil cephalus*, L., 1758) mantenidos en agua salada (Valdebenito *et al.*, 2011). en otras especies se produce la disfunción reproductiva tipo 2 en la que los oocitos postvitelogénicos no maduran finalmente, convirtiéndose en atrésicos (Zanuy y Carrillo, 1987; Mylonas *et al.*, 2010), por ejemplo en la lubina europea (*Dicentrarchus Labrax*) (Mañanós *et al.*, 2009) y corvina (*Argyrosomus regius*) (Duncan *et al.*, 2012) El tercer tipo de disfunción es la ausencia de desove al final del ciclo reproductivo,

los oocitos maduran normalmente produciéndose la ovulación en respuesta a los estímulos fisiológicos y ambientales (Zohar y Mylonas, 2001), pero los óvulos no son liberados durante el proceso de puesta. La causa de esta disfunción puede ser de tipo ambiental (ausencia de sustrato de desove o falta de espacio) o debido a la ausencia de un estímulo social adecuado (Duncan *et al.*, in press). Como consecuencia de esta falta de estímulos los óvulos o son reabsorbidos o son liberados fuera del contexto de la puesta, es decir sin fecundación. La falta de espacio o el estímulo social parecen ser las causas de esta disfunción en peces planos (Duncan *et al.*, in press).

El tipo 3 de disfunción reproductiva se ha resuelto en algunos casos con la inclusión de un sustrato adecuado para el desove (en el caso de la carpa), o mediante la obtención manual de los gametos, por presión abdominal o “stripping” tal como se hace de forma habitual en la reproducción de salmónidos o en peces planos cultivados como el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y el halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) (Mañanós *et al.*, 2009; Duncan *et al.*, en prensa). En el caso del rodaballo, en los años 70 se utilizaron extractos hipofisarios de carpa a fin de inducir la puesta natural (Flüchter, 1972). mas tarde se utilizaron modificaciones en la temperatura y en el fotoperiodo los cuales también fueron suficientes para provocar la ovulación y espermiación en cautividad (Devauchelle *et al.*, 1988). En 2011, la industria de rodaballo produjo 68.889 toneladas utilizando la presión abdominal para la obtención de gametos en relación a ciclos de ovulaciones naturales y la fecundación artificial para controlar la reproducción (Mañanós *et al.*, 2009).

Sin embargo en el caso del lenguado senegalés (*S. senegalensis*) añadir sustrato en los tanques de cultivo no ha sido suficiente mientras que la extracción manual de los gametos, aunque permite la obtención de huevos fertilizados, no resuelve la disfunción en sí misma por lo que la G1 sigue sin reproducirse.

## Disfunciones reproductivas en el lenguado senegalés

El lenguado senegalés, capturado en el medio marino y trasladado a condiciones de cautividad, presenta puestas con características adecuadas de calidad y cantidad para su uso por la industria acuícola (Dinis *et al.*, 1999; Ánguis y Cañavate, 2005; Howell *et al.*, 2011) Sin embargo, la primera generación (G1) criada en cautividad no presenta puestas adecuadas para esta industria. La situación es generalizada en los diferentes centros y empresas (Dinis *et al.*, 1999; Howell *et al.*, 2011). El lenguado senegalés, presenta una disfunción reproductiva tipo 3 en la primera generación producida en cautividad (G1). Además se ha comprobado que los lenguados G1 producen gametos con calidad suficiente para la producción de huevos fecundados. Los machos producen esperma viable aunque se ha caracterizado una baja producción de esperma para la especie (Cabrita, *et al.*, 2006) (media <80µl cada macho) esto es generalizado tanto para machos de origen salvaje como machos G1. Rasines, *et al.*, (2011), logro el “stripping” y fertilización artificial de lenguados G1 consiguiendo buenas calidades, en cuanto a cantidad y viabilidad de huevos. Sin embargo en lenguado senegalés G1 no se completó la puesta por lo que no es posible producir de forma natural huevos de la calidad y cantidad necesario para la industria acuícola (Dinis *et al.*, 1999; Howell *et al.*, 2011).

Como fue indicado previamente, el tipo 3 de disfunción reproductiva se ha resuelto en algunos casos con la inclusión de un sustrato o ambiente adecuado o la obtención manual de los gametos por presión abdominal o “stripping” (Duncan *et al.*, en prensa). La causa de la disfunción reproductiva tipo 3 en los lenguados G1, no parece ser ambiental porque los lenguados G1 no completan la puesta en las mismas condiciones ambientales en las que los lenguados salvajes completan la puesta con éxito. La comparación de éxito de la puesta entre lenguados G1 y salvajes mantenidos en la misma condiciones ambientales fue publicado en el informe del 3<sup>er</sup> taller de estudios del cultivo de Solea (Howell *et al.*, 2006). Además, existen muchos ejemplos de centros que han

experimentado esta situación y que incluyen IEO Santander (comunicación personal Dra. Olvido Chereguini) IEO Vigo (comunicación personal Dr. Peleteiro) y IFAPA (comunicación personal Dr. Cañavate). Por lo que parece probable que la disfunción reproductiva del lenguado G1 sea provocada por razones sociales o de comportamiento. El trabajo desarrollado en esta tesis examinó el comportamiento para describir por la primera vez el comportamiento reproductivo de los dos grupos salvajes y G1 e identificar los posibles problemas sociales o de comportamiento que resultan en la disfunción reproductiva observada en los lenguados G1.

### **Investigación en el ámbito del comportamiento y de la fisiología reproductiva del Lenguado Senegalés.**

La etología es el estudio de la conducta de un animal vivo en su medio natural siendo complementaria a otras ramas de la ciencia. No basta con describir las reacciones motoras o los cambios fisiológicos tal como aparecen, sino también el contexto en el que ocurren y, sobre todo, la función biológica que cumplen. El etograma es una herramienta experimental que refleja ciertos aspectos específicos de la etología como disciplina. Martin y Bateson (1993) lo definen como "un catálogo de patrones de comportamientos discretos, típicos de las especie-objeto, que forman el repertorio comportamental básico de la especie". Así, para el estudio del comportamiento de los peces que es especialmente complicado de observar para el ser humano, ha sido poco utilizado. Las primeras descripciones del comportamiento reproductivo de un pez plano que encontramos fueron realizadas por Butler (1895) durante la reproducción del lenguado común (*Solea solea*) y Breder (1922) sobre la platija americana (*Pseudopleuronectes americanus*).

En esta tesis, la especie objeto de estudio, el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) es una especie nocturna que muestra picos de actividad principalmente durante el crepúsculo y la noche, (Bayarri *et al.*, 2004a; Oliveira *et al.*, 2009). Habita en zonas que no reciben mucha iluminación siendo muy sensibles a la iluminación de baja intensidad (Oliveira *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*,

2010). Al igual que otros animales bentónicos, los lenguados presentan una mayor sensibilidad al tipo de radiación que llega a su hábitat y menos sensibilidad a longitudes de onda que no atraviesan los primeros metros de agua (Montgomery y Pankhurst, 1997).

La luz tiene un papel fundamental en los ritmos biológicos de los peces (Bromage *et al.*, 2001) ya que varía al aumentar la profundidad del medio acuático. Así, las longitudes de onda corta >400nm presentan una gran penetración en el agua pudiendo llegar en aguas oceánicas claras a los 800m-1000m (Denton, 1990) por el contrario longitudes de onda mayores (>600 nm; correspondientes a la fracción roja e infrarroja) se pierden rápidamente en los primeros metros de agua (4-8 m) debido a la absorción (Marín-Galvín, 2003; Wozniak y Dera, 2007). En el caso de plantas y animales cultivados de forma artificial para el consumo humano, el uso de luce artificial es muy habitual ya que su manipulación tanto en cuanto a intensidad como en cuanto al fotoperiodo (numero de horas de luz y de oscuridad) permite controlar los ritmos biológicos circadianos o circanuales que controlan el crecimiento (Boeuf y Le Bail; 1999b; Duncan *et al.*, 2002), la maduración sexual (Porter *et al.*, 1999; Bromage *et al.*, 2001), así como procesos relacionados con la esmoltificación en salmónidos (Duston y Saunders, 1992; Duncan y Bromage, 1998) y la reproducción (Bromage *et al.*, 2001) provocando puestas fuera de temporada. En el caso de los peces planos, se ha conseguido obtener puestas fuera de la temporada natural en el fletan o halibut (*H. hippoglossus*) (Björnsson *et al.*, 1998). Además, mediante la manipulación de las condiciones de luz se puede suprimir la reproducción evitando pérdidas en el crecimiento debidas a la maduración no deseada durante el engorde de algunas especies (Bromage *et al.*, 2001). Existe una clara relación entre los ciclos día-noche con la actividad y el comportamiento de un organismo (Goldman, 2001; Bayarri *et al.*, 2004b; Vera *et al.*, 2005; Falcón *et al.*, 2007). El lenguado senegalés no es una excepción y está afectado por los cambios en iluminación. Así presenta una acrofase de actividad reproductiva en el último cuarto del día y el primer tramo de la noche (Oliveira

et al., 2009) que junto con bajas actividades en las últimas horas de la noche y las primeras horas del día, lo convierten en un animal crepuscular o nocturno. La descripción del cortejo de *S. Solea* (Baynes *et al.*, 1994) y de otros peces planos (Gibson, 1997; 2005), nos indican que comparten algunos de los comportamientos del cortejo son comunes a todos ellos por ejemplo la necesidad de nadar sincrónicamente con los poros genitales muy juntos y enfrentados. También se observan algunas diferencias bien en la selección de pareja como en el caso de *Tarphops oligolepis* (Manabe y Shinomiya, 2001) en el sistema de harén observado en el pedas (*Bothus podas*) con un macho y varias hembras en su territorio (Carvalho *et al.*, 2003); o como el comportamiento social con machos territoriales y varias hembras asociadas observado en el lenguado de charco (*Bothus ocellatus*), lenguado ocelado (*Bothus lunatus*) y *Bothus ellipticus* (Konstantinou y Shen, 1995).

#### ***Generalidades sobre feromonas y hormonas en peces***

En los vertebrados, las hormonas reproductivas tienen dos funciones críticas, la sincronización de la maduración sexual y el control de las interacciones sexuales entre individuos de la misma especie (Pfaff, 2005). Las hormonas actúan en el cerebro para inducir la sincronía entre el comportamiento reproductivo y la maduración de los gametos de un individuo. De esta forma las hormonas actúan en los efectores para generar comportamientos y otras señales que inducen la sincronía reproductiva entre individuos de la misma especie.

Sin embargo las hormonas pueden causar un tercer grupo de acciones: después de ser liberadas al ambiente, pueden servir como feromonas sexuales. Muchos esteroides sexuales, prostaglandinas y sus metabolitos son detectados con gran sensibilidad y especificidad por algunas especies de peces como carpas salmónidos y gobios (Stacey *et al.*, 2002; Stacey y Sorensen, 2006) y ejercen un efecto clave en el comportamiento reproductivo y en la fisiología de estos taxones. Una posible vía de estudio para entender el problema reproductivo en

el lenguado senegalés es llevar a cabo modificaciones en los ritmos hormonales de la G1 para estudiar posibles diferencias de comportamiento con los animales salvajes que sí practican el cortejo y se reproducen.

De acuerdo a la definición de Karlson y Luscher (1959) las feromonas son “Substancias excretadas por un individuo y recibidas por un segundo individuo, en el que causan una reacción específica, como por ejemplo un comportamiento definido o un proceso de desarrollo.” La definición más actual, define las feromonas como “un “olor” o mezcla de sustancias olorosas, liberadas por un individuo (emisor) que provocan en individuos de la misma especie (receptores) adaptaciones específicas y respuestas típicas de cada especie. La expresión de estas reacciones “no requiere una experiencia previa o aprendizaje” (Sorensen y Stacey, 1999). Y su detección por parte del individuo receptor se produce a través de los sentidos del olfato y del gusto.

Las feromonas se diferencian de las hormonas en que no se almacenan, si no que son sintetizadas y automáticamente liberadas por lo que su rango de vida, es también muy corto (Sorensen y Stacey, 2004). Aunque las feromonas sexuales y su función en la reproducción de los peces se conoce desde hace tiempo, la evidencia de que pueden ser esteroides y/o prostaglandinas es, en comparación, reciente.

En vertebrados, el olfato y el gusto son los sentidos mas sensibles para la detección e identificación de los estímulos químicos del ambiente (Hagino-Yamagishi *et al.*, 2008). El sentido del olfato en peces presenta una considerable diversidad posiblemente reflejando la enorme variedad de hábitats y los diferentes caminos evolutivos tomados por este grupo animal (Laberge, F. *et al.*, 2001). La información química percibida en la roseta olfativa presente en las fosas nasales es en este caso transmitida directamente al sistema nervioso central.

Por otro lado, la reproducción en los peces está regulada por una serie de reacciones fisiológicas del eje cerebro-pituitaria-gónadas (Mañanós et al., 2009) en las que las hormonas juegan un papel fundamental. Las hormonas son producidas por los organismos para regular el funcionamiento de si mismo y pueden ser controladas mediante el uso de técnicas de inducción hormonal, aplicando hormonas o derivados artificiales (análogos) que inducen la maduración y puesta. La inducción hormonal es una técnica muy utilizada en acuicultura para provocar la puesta fuera de la época natural y en algunos casos para eliminar posibles disfunciones reproductivas derivadas del mantenimiento en cautividad de una determinada especie. En la mayoría de los casos, la maduración de los oocitos, la ovulación y el desove pueden ser estimulados mediante tratamiento hormonal con gonadotropinas o agonistas de la gonadotropina (GnRH<sub>a</sub>), ya sea en forma de inyección o implante de liberación sostenida (Zohar y Mylonas, 2001; Mylonas y Zohar, 2008; Mylonas *et al.*, 2010). En el caso de *S. senegalensis* el uso tanto en machos como en hembras, de implantes de GnRH<sub>a</sub> o varias inyecciones de GnRH<sub>a</sub> resultaron efectivos para obtener desoves, pero sin fertilización (Agulleiro *et al.*, 2006; Guzmán *et al.*, 2011a). La inducción, con GnRH, gonadotrofina coriónica humana (hCG) o hormona luteinizante (LH) es una práctica muy estudiada cuyos efectos fisiológicos, es decir su acción sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, es bien conocido y ha sido ampliamente descrito (Agulleiro *et al.*, 2006; Agulleiro *et al.*, 2007; Cross *et al.*, 2009; Guzmán *et al.*, 2009; Guzmán *et al.*, 2011b; Rasines *et al.*, 2011; Mechaly *et al.*, 2012). Siendo este un proceso generalizado en empresas y centros de investigación.

Norman Stacey y Peter Sorensen (2004) describieron en el pez rojo (*Carassius auratus auratus*) los diferentes ciclos hormonales a lo largo del desarrollo gonadal, mostrando la variación en la producción de distintas hormonas como el estradiol (E<sub>2</sub>), la Adenocorticotropina (AD) o la LH, la maduración de las gónadas y la liberación final de los gametos. A lo largo del ciclo de maduración de los oocitos y durante su liberación al medio, el estado del ciclo es señalizado por parte de las hembras de peces mediante la liberación al medio de una serie

de sustancias tales como sales biliares (Hara, 1994; Zhang *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Huertas *et al.*, 2007), moléculas esteroideas (Arbuckle *et al.*, 2005; Barata *et al.*, 2008) y prostaglandinas (Vélez *et al.*, 2009; Hubbard, 2012), que forman parte de los fluidos excretados (orina, mucus, heces) y que actúan como mensaje para el resto de los individuos.

En un pez plano marino como el lenguado que, como hemos señalado anteriormente, está adaptado a condiciones de baja o nula iluminación, la percepción química del entorno tiene una gran importancia y se basa principal, aunque no exclusivamente, en el olfato. Algunas de las moléculas presentes en el agua que los peces son capaces de distinguir son esteroides, prostaglandinas, hormonas y feromonas así como otros compuestos que aún no han sido identificados (Sorensen y Stacey, 2004).

Vélez *et al.* (2005) estudiaron la diferente sensibilidad que presenta el lenguado senegalés en ambas narinas. La narina de la cara oculta (cara ciega) presenta una mayor sensibilidad a compuestos relacionados con la comida y el substrato mientras que la narina de la cara superior (cara ocular) presenta más sensibilidad a compuestos relacionados con el entorno y con la percepción de otros individuos de la misma especie. Esta percepción conespecífica es cuantificable mediante el uso de electroolfatogramas. Tras la recepción de la señal, el pez puede tener una respuesta a corto o medio plazo. A corto plazo con una modificación del comportamiento y a medio plazo mediante alteraciones hormonales en el animal receptor.

Por esta dinámica de acción (emisión de unos compuestos al medio por un emisor) y reacción (captación de los compuestos, por un receptor, que implican una respuesta a corto o medio plazo de éste) estos hechos se consideran relacionados con una comunicación química conespecífica que produce una modificación del comportamiento inmediato y prepara, mediante cambios hormonales y fisiológicos, futuros cambios de comportamiento.

Algunas de las sustancias emitidas y/o recibidas son las sales biliares (Hara, 1994; Zhang *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Huertas *et al.*, 2007), las hormonas de naturaleza esteroide (Arbuckle *et al.*, 2005; Barata *et al.*, 2008) y las prostaglandinas. Estas últimas, han resultado ser, no solo importantes como señalizadoras de la maduración sexual, sino que además en los estudios con animales acuáticos presentan nuevas e importantes características en la comunicación entre individuos (Sorensen, 1987; Sorensen y Goetz, 1993; Stacey *et al.*, 2002; Sorensen y Stacey, 2004; Stacey y Sorensen, 2006; Appelt y Sorensen, 2007).

## Objetivos

El objetivo general de esta tesis doctoral fue estudiar el comportamiento reproductivo del lenguado senegalés, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858), e investigar el papel de las feromonas y el olfato en la comunicación conespecífica para determinar y buscar soluciones a la disfunción reproductiva del lenguado senegalés nacido y criado en cautividad (G1). Principalmente, se ha estudiado el cortejo del lenguado (salvajes y G1), el efecto en el comportamiento de hormonas y feromonas y las influencias de fluidos corporales como la orina y las heces en el reconocimiento de conespecíficos.

Las cuestiones específicas de esta tesis fueron:

- En primer lugar, ¿cómo estudiar el comportamiento del lenguado senegalés?, ¿cómo estudiar el comportamiento nocturno? y ¿cómo adaptar nuestros sistemas a ese estudio?
- ¿Cómo es el comportamiento reproductivo del lenguado? ¿Cuántos individuos están implicados? ¿Cuáles son los puntos destacables y los momentos críticos para la reproducción?
- ¿Cuáles son las diferencias en el comportamiento reproductivo entre los animales de origen salvaje y los obtenidos en cautividad? ¿Qué falla o quien falla? ¿Es un componente estructural o un componente social?
- ¿Es una disfunción sexual o de maduración? ¿Cómo se visualiza ese fallo? ¿Es un fallo en el intercambio de información y la comunicación? ¿Existe ese intercambio de información / comunicación? ¿Qué tipo de cambios provoca ese intercambio de información / comunicación? ¿Cómo podemos aumentar ese intercambio de información / comunicación? ¿Cuál es el mecanismo para percibir esta emisión de información / comunicación?

Los objetivos específicos para los experimentos realizados fueron:

- Estudio sobre la iluminación nocturna en el lenguado senegalés, para futuros estudios de comportamiento.

Determinar un sistema de iluminación que no afectase al comportamiento nocturno y la fisiología del lenguado senegalés para su posterior uso en el estudio del comportamiento nocturno del lenguado senegalés.

- Estudio sobre el comportamiento reproductivo del lenguado senegalés. Desarrollo del etograma reproductivo.

Describir el cortejo del lenguado senegalés salvaje, los cuales presentan puestas fecundadas en cautividad y el comportamiento del lenguado criado en cautividad, los cuales no presentan puestas fecundadas, los comportamientos que lo forman y los comportamientos más destacados relacionados con este, para realizar un etograma.

- Inducción hormonal del lenguado senegalés para provocar el comportamiento reproductivo

Describir el comportamiento del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) de generación 1 criada en cautividad (G1), a los que se les aplicó varios tratamientos de inducción hormonal. Utilizar el etograma desarrollado en el capítulo 3 para describir hasta que punto de este comportamiento reproductivo llega el lenguado G1 tras la aplicación de hormonas y feromonas.

- Percepción química conespecífica en el lenguado senegalés. Con un breve apunte de la trucha ártica

Determinar la percepción de diferentes fluidos que probablemente contienen feromonas para la comunicación conespecífica mediante el uso del Electroolfatograma (EOG) en el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Determinar el efecto de algunas de estas moléculas y fluidos en el comportamiento de la trucha ártica (*Salvelinus alpinus*).

## Bibliografía

- Agulleiro, M. J., Anguis, V., Cañavate, P., Martínez-Rodríguez, G., Mylonas, C. C. y CERDA, J. (2006). *Induction of spawning of captive-reared Senegal sole (Solea senegalensis) using different administration methods for gonadotropin-releasing hormone agonist*. Amsterdam, PAYS-BAS: Elsevier.
- Agulleiro, M. J., Cerdà, J., Duncan, N., Mylonas, C. y Scott, A. P. (2007). Treatment of GnRH $\alpha$ -implanted Senegalese sole (*Solea senegalensis*) with 11-ketoandrostenedione stimulates spermatogenesis and increases sperm motility.
- Andalucía, J. d. (2010). <http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/areas-tematicas/pesca-y-acuicultura/acuicultura/el-sector-acuicola-en-andalucia/los-sistemas-de-cultivo.html>. In *Sector acuícola de Andalucía*.
- Ánguis, V. y Cañavate, J. P. (2005). Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture* **243**, 133-145.
- Appelt, C. W. y Sorensen, P. W. (2007). Female goldfish signal spawning readiness by altering when and where they release a urinary pheromone. *Animal Behaviour* **74**, 1329-1338.
- Arbuckle, W. J., Bălănescu, A. J., Corkum, L. D., Zielinski, B. S., Li, W., Yun, S.-S., Bachynski, S. y Scott, A. P. (2005). In vitro biosynthesis of novel reduced steroids by the testis of the round goby, *Neogobius melanostomus*. *General and Comparative Endocrinology* **140**, 1-13.
- Arias, A. y Moyano, P. D. (1990). Estados juveniles de la ictiofauna en los caños de las salinas de la bahía de Cádiz. *Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía*.
- Barata, E., Fine, J., Hubbard, P., Almeida, O., Frade, P., Sorensen, P. y Canário, A. (2008). A Sterol-Like Odorant in the Urine of Mozambique Tilapia Males Likely Signals Social Dominance to Females. *Journal of Chemical Ecology* **34**, 438-449.
- Bauchot, M. L. y Pras, A. (1980). *Guide des poissons marins d'Europe*. France.
- Bayarri, M. J., Muñoz-Cueto, J. A., López-Olmeda, J. F., Vera, L. M., Rol de Lama, M. A., Madrid, J. A. y Sánchez-Vázquez, F. J. (2004a). Daily locomotor activity and melatonin rhythms in Senegal Sole (*Solea senegalensis*). *Physiology & Behavior*. **81**, 577-583.
- Bayarri, M. J., Rodríguez, L., Zanuy, S., Madrid, J. A., Sánchez-Vázquez, F. J., Kagawa, H., Okuzawa, K. y Carrillo, M. (2004b). Effect of photoperiod manipulation on the daily rhythms of melatonin and reproductive hormones in caged European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **136**, 72-81.
- Baynes, S. M., Howell, B. R., Beard, T. W. y Hallam, J. D. (1994). A description of spawning behaviour of captive Dover sole, *Solea solea* (L.). *Netherlands Journal of Sea Research* **32**, 271-275.
- Ben-Tuvia, A. (1990). a taxonomic reappraisal of the Atlanto-Mediterranean soles *Solea solea*, *S. senegalensis* and *S. lascaris*. *Journal of Fish Biology* **36**, 947-960.

- Björnsson, B. T., Halldórsson, Ó., Haux, C., Norberg, B. y Brown, C. L. (1998). Photoperiod control of sexual maturation of the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): plasma thyroid hormone and calcium levels. *Aquaculture* **166**, 117-140.
- Boeuf, G. y Le Bail, P.-Y. (1999a). Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture* **177**, 129-152.
- Breder, C. (1922). Description of the spawning habits of *Pseudopleuronectes americanus* in captivity. *American Society of Ichthyologists and Herpetologists (ASIH)*, 3-4.
- Bromage, N. R., Porter, M. y Randall, C. (2001). The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture* **197**, 63-98.
- Butler, G. W. (1895). Report on the spawning of the common sole (*Solea vulgaris*) in the aquarium of the Marine Biological Association's Laboratory at Plymouth, during April and May, 1895. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **4**, 3-9.
- Cañavate, J. P. y Fernández-Díaz, C. (1999). Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture* **174**, 255-263.
- Carvalho, N., Alfonso, P. y Santos, R. S. A. (2003). The harem mating system and mate choice in the wide-eyed flounder, *Bothus podas*. *Environmental Biology of Fishes* **66**, 249-258.
- Conceição, L. E. C., Ribeiro, L., Engrola, S., Aragao, C., Morais, S., Lacuisse, M., Soares, F. y Dinis, M. T. (2007). Nutritional physiology during development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* **268**, 64-81.
- Cross, I., Guzmán, J. M., Kight, K., Klenke, U., Mañanós, E. L., Ortiz-Delgado, J. B., Rebordinos, L., Ríaza, A., Rubio, M., Sánchez-Ramos, I. y Sarasquete, C. (2009). Comparative gene expression of gonadotropins (FSH and LH) and peptide levels of gonadotropin-releasing hormones (GnRHs) in the pituitary of wild and cultured Senegalese sole (*Solea senegalensis*) broodstocks. *Comparative Biochemistry and Physiology - A - Molecular and Integrative Physiology* **153**, 266-277.
- Denton, E. J. (1990). Light and vision at depths greater than 200 meters. *Light and Life in the Sea*, 127-148.
- Devauchelle, N., Alexandre, J. C., Lecorre, N. y Letty, Y. (1988). Spawning of turbot (*Scophthalmus-maximus*) in captivity. *Aquaculture* **69**, 159-184.
- Dinis, M. T. (1986). Quatre Soleidae de l'Estuaire du Tage. Reproduction et Croissance. Essai d'Élevage de *Solea senegalensis* Kaup 1858 Thèse d'État ès-Sciences Naturelles. *Université de Bretagne Occidentale, France*.
- Dinis, M. T., Ribeiro, L., Soares, F. y Sarasquete, C. (1999). A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture* **176**, 27-38.
- Duncan, N., Estévez, A., Porta, J., Carazo, I., Norambuena, F., Aguilera, C., Gairin, I. y Bucci, F. (2012). Reproductive development, GnRHa-induced spawning and egg quality of wild

- meagre (*Argyrosomus regius*) acclimatised to captivity. *Fish physiology and Biochemistry* **38**, 1273-1286.
- Duncan, N. J. y Bromage, N. (1998). The effect of different periods of constant short days on smoltification in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **168**, 369-386.
- Duncan, N. J., Sonesson, A. K. y Chavanne, H. (in press). Principles of finfish broodstock management in aquaculture: control of reproduction and genetic improvement. In *Advances in aquaculture hatchery technology* (Allan, G. B., ed.). Cambridge (U.K.): Woodhead Publishing Limited.
- Duncan, N. J., Thrush, M. A., Elliott, J. A. K. y Bromage, N. R. (2002). Seawater growth and maturation of Atlantic salmon (*Salmo solar*) transferred to sea at different times during the year. *Aquaculture* **213**, 293-309.
- Duston, J. y Saunders, R. L. (1992). Effect of 6-month, 12-month, and 18-month photoperiod cycles on smolting and sexual-maturation in juvenile atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **49**, 2273-2280.
- Falcón, J., Besseau, L., Sauzet, S. y Boeuf, G. (2007). Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* **18 No.2**.
- Fernández-Díaz, C., Yýfera, M., Cañavate, J. P., Moyano, F. J., Alarcón, F. J. y Díaz, M. (2001). Growth and physiological changes during metamorphosis of Senegal sole reared in the laboratory. *Journal of Fish Biology* **58**, 1086-1097.
- Flüchter, J. (1972). Inducing of spawning in the turbot (*Rhombus maximus* L.) by injection of hypophyseal suspensions. *Aquaculture* **1**, 285-287.
- Friedman, M. (2008). The evolutionary origin of flatfish asymmetry. *Nature* **454**, 209-212
- García-López, A., Martínez-Rodríguez, G. y Sarasquete, C. (2005). Male reproductive system in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup): Anatomy, histology and histochemistry. *Histology and histopathology* **20**.
- García-López, A., Pascual, E., Sarasquete, C. y Martinez-Rodriguez, G. (2006). Disruption of gonadal maturation in cultured Senegalese sole *Solea senegalensis* Kaup by continuous light and/or constant temperature regimes. *Aquaculture* **261**, 789-798.
- Gibson, R. N. (1997). Behaviour and the distribution of flatfishes. *Journal of Sea Research* **37**, 241-256.
- Gibson, R. N. (2005). *Flatfishes: biology and exploitation*.
- Goldman, B. D. (2001). Mammalian photoperiodic system: Formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *Journal of Biological Rhythms* **16**, 283-301.
- Guzmán, J. M., Bayarri, M. J., Ramos, J., Zohar, Y., Sarasquete, C. y Mananos, E. L. (2009). Follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression during larval development in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology- A Molecular & Integrative Physiology* **154**, 37-43.

- Guzmán, J. M., Cal, R., García-López, á., Chereguini, O., Kight, K., Olmedo, M., Sarasquete, C., Mylonas, C. C., Peleteiro, J. B., Zohar, Y. y Mañanós, E. L. (2011a). Effects of in vivo treatment with the dopamine antagonist pimozide and gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH<sub>a</sub>) on the reproductive axis of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* **158**, 235-245.
- Guzmán, J. M., Ramos, J., Mylonas, C. C. y Mañanós, E. L. (2011b). Comparative effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH<sub>a</sub>) treatments on the stimulation of male Senegalese sole (*Solea senegalensis*) reproduction. *Aquaculture* **316**, 121-128.
- Hara, T. J. (1994). The diversity of chemical stimulation in fish olfaction and gustation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **4**, 1-35.
- Howell, B. R., Prickett, R., Canavate, J. P., Mañanós, E., Dinis, M. T., Conceicao, L. y Valente, L. (2011). The cultivation of soles. *Reprort of the 5th Workshop. EAS Spec. Publ.* **36**, 3.
- Hubbard, P. C. (2012). Pheromones in marine fish and their culture. In *Unpublished Chapter Book*.
- Huertas, M., Hubbard, P. C., Canario, A. V. M. y Cerda, J. (2007). Olfactory sensitivity to conspecific bile fluid and skin mucus in the European eel *Anguilla anguilla* (L.). *Journal of Fish Biology* **70**, 1907-1920.
- Karlson, P. y Luscher, M. (1959). /`Pheromones/': a New Term for a Class of Biologically Active Substances. *Nature* **183**, 55-56.
- Konstantinou, H. y Shen, D. C. (1995). The social and reproductive behavior of the eyed flounder, *Bothus ocellatus*, with notes on the spawning of *Bothus lunatus* and *Bothus ellipticus*. *Environmental Biology of Fishes* **44**, 311-324.
- Lagardère, F., Decamps, P. y Quero, J.-C. (1979). Découverte les long des costes de la Charente-Maritime d'une population de *Solea senegalensis* Kaup, 1858 (Soleidae, Pleuronectiformes). *Ann. Soc. Sci. Nat. Charente-Maritime* **6**, 563-572.
- Li, W., Alexander P. Scott, Michael J. Siefkes, Honggao Yan, Qin Liu, Sang-Seon Yun y Gage, D. A. (2002). Bile Acid Secreted by Male Sea Lamprey That Acts as a Sex Pheromone. *Science (New York, N.Y.)* **296** 138-141.
- Manabe, H. y Shinomiya, A. (2001). Two spawning seasons and mating system of the bastard halibut, *Tarphops oligolepis*. *Ichthyological Research* **48**, 421-424.
- Mañanós, E., N.J., D., Mylonas, C., Cabrita, E., Robles, V. y Harraez, P., eds. (2009). *Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish*. Boca Raton, USA: Press Taylor and Francis Group.
- Marín-Galvín, R. (2003). *Fisicoquímica y microbiología de los medios acuáticos*. Madrid.
- Mechaly, A. S., Viñas, J. y Piferrer, F. (2012). Sex-specific changes in the expression of kisspeptin, kisspeptin receptor, gonadotropins and gonadotropin receptors in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) during a full reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* **162**, 364-371.

- Montgomery, J. y Pankhurst, N. W. (1997). Sensory Physiology. In *Deep-Sea Fishes* (Press, A., ed.), p. 378. San Diego, California: Academic Press.
- Mylonas, C. C., Fostier, A. y Zanuy, S. (2010). Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology* **165**, 516-534.
- Mylonas, C. C. y Zohar, Y. (2008). Controlling reproduction in aquaculture. In: Burnell, G., Allan, G. (Eds.). *New Technologies in Aquaculture: Improving Production Efficiency, Quality and Environmental Management* Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK, 001-038.
- Oliveira, C., Duncan, N. J., Pousao-Ferreira, P., Mananos, E. y Sanchez-Vazquez, F. J. (2010). Influence of the lunar cycle on plasma melatonin, vitellogenin and sex steroids rhythms in Senegal sole, *Solea senegalensis*. *Aquaculture* **306**, 343-347.
- Oliveira, C., García, E. M., Lopez-Olmeda, J. F. y Sánchez-Vázquez, F. J. (2009). Daily and circadian melatonin release in vitro by the pineal organ of two nocturnal teleost species: Senegal sole (*Solea senegalensis*) and tench (*Tinca tinca*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* **153**, 6.
- Oliveira, C., Ortega, A., Lopez-Olmeda, J. F., Vera, L. M. y Sanchez-Vazquez, F. J. (2007). Influence of constant light and darkness, light intensity, and light spectrum on plasma melatonin rhythms in senegal sole. *Chronobiology International* **24**, 615-627.
- Padrós, F., C. Zarza, A. Estévez, S. Crespo y Furones, M. D. (2005). Patología como factor limitante para el desarrollo del cultivo del lenguado. *IX Congreso Nacional de Acuicultura (Cádiz, mayo 2003). La acuicultura como actividad económica en las zonas costeras: Libro de Actas (12-16 de mayo, 2003. Cádiz, España): 343-345. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía. Sevilla, España.*
- Pfaff, D. (2005). Hormone-driven mechanisms in the central nervous system facilitate the analysis of mammalian behaviours. *Journal of Endocrinology* **184**, 447-453.
- Porter, M. J. R., Duncan, N. J., Mitchell, D. y Bromage, N. R. (1999). The use of cage lighting to reduce plasma melatonin in Atlantic salmon *Salmo salar* / and its effects on the inhibition of grilising. *Aquaculture* **176**, 237-244.
- Rasines, I., Gómez, M., Martín, I., Rodríguez, C., Mañanós, E. y Chereguini, O. (2011). Artificial fertilization of Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Hormone therapy administration methods, timing of ovulation and viability of eggs retained in the ovarian cavity. *Aquaculture* **326-329**, 129-135.
- Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J. L., Cahu, C. y Dinis, M. T. (1999). Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture* **179**, 465-473.
- Sorensen, P. W., Chamberlain, K.J., Stacey, N.E., Hara, T.J. (1987). Differing roles of Prostaglandin F2a and its metabolites in goldfish reproductive behavior. In *Reproductive Physiology of Fish* (Idler, D. R., Crim, L.W., Walsh, J.M., ed.), p. 164. Newfoundland, (Canadá).
- Sorensen, P. W. y Goetz, F. W. (1993). *Pheromonal and reproductive function of F prostaglandins and their metabolites in teleost fish*. Amsterdam, PAYS-BAS: Elsevier.

- Sorensen, P. W. y Stacey, N. E. (1999). Evolution and specialization of fish hormonal pheromones. In *Advances in chemical signals in vertebrates*. (Johnston, R. E., Muller-Schwarze, D. & Sorensen, P. W., eds.), pp. 15-47: Kluwer Academic & Plenum Publishers.
- Sorensen, P. W. y Stacey, N. E. (2004). Brief review of fish pheromones and discussion of their possible uses in the control of non-indigenous teleost fishes. In *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, pp. 399-417: Taylor & Francis.
- Stacey, N. y Sorensen, P. (2006). Reproductive pheromones. *Fish Physiology* **24**, 359-412.
- Stacey, N., Sorensen, P., Donald, W. P., Arthur, P. A., Susan, E. F., Anne, M. E. y Robert, T. R. (2002). Hormonal Pheromones in Fish. In *Hormones, Brain and Behavior*, pp. 375-434. San Diego: Academic Press.
- Valdebenito, I., Paiva, L. y Berland, M. (2011). Atresia folicular en peces teleósteos: una revisión. Follicular atresia in teleost fish: a review. *Arch Med vet.* **43**, 11-25.
- Vázquez, R., González, S., Rodríguez, A. y Mourente, G. (1994). Biochemical composition and fatty acid content of fertilized eggs, yolk sac stage larvae and first-feeding larvae of the Senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Aquaculture* **119**, 273-286.
- Vélez, Z., Hubbard, P., Welham, K., Hardege, J., Barata, E. y Canário, A. (2009). Identification, release and olfactory detection of bile salts in the intestinal fluid of the Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **195**, 691-698.
- Vélez, Z., Hubbard, P. C., Barata, E. N. y Canario, A. V. M. (2005). Evidence for functional asymmetry in the olfactory system of the Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Physiological and Biochemical Zoology* **78**, 756-765.
- Vera, L. M., Lopez-Olmeda, J. F., Bayarri, M. J., Madrid, J. A. y Sanchez-Vazquez, F. J. (2005). Influence of light intensity on plasma melatonin and locomotor activity rhythms in tench. *Chronobiology International* **22**, 67-78.
- Wozniak, B. y Dera, J., eds. (2007). *Light absorption in seawater*. Springer.
- Zanuy, S. y Carrillo, M. (1987). La reproducción de los peces teleósteos y su aplicación en acuicultura. *Reproducción en acuicultura*. CAICYT. Madrid. J. Labarta U (eds). 1-131.
- Zhang, C., Brown, S. y Hara, T. (2001). Biochemical and physiological evidence that bile acids produced and released by lake char (*Salvelinus namaycush*) function as chemical signals. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* **171**, 161-171.
- Zohar, Y. y Mylonas, C. C. (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* **197**, 99-136.



## Capítulo 2

---

## **2. Influencia de la iluminación en el estudio del comportamiento nocturno del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) criado en cautividad**

### **2.1. Introducción**

En el medio acuático, la luz varía con la profundidad. Así, las longitudes de onda corta que pertenecen a la fracción del azul, violeta y ultravioleta (cercano: 400-340nm y lejano: <340nm) presentan una gran penetración en el agua (a partir de 80 m son las únicas radiaciones a excepción de la bioluminiscencia) pudiendo llegar en aguas oceánicas claras a los 800m-1000m (Denton, 1990). Por el contrario longitudes de onda mayores (>600 nm; correspondientes a la fracción roja e infrarroja) se pierden rápidamente en los primeros metros de agua (4-8 m) debido a la absorción de la energía por las moléculas de agua y los diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos en disolución y suspensión (Marín-Galvín, 2003; Wozniak *et al.*, 2007).

La luz tiene un papel fundamental en los ritmos biológicos de los animales. Los ritmos circadianos son controlados por el cambio de día a noche mientras que los ritmos circanales son controlados por el termoperíodo y el fotoperíodo o lo que es lo mismo por el cambio de días cortos en invierno a días largos durante el verano.

El uso de luces artificiales es habitual tanto en la investigación con animales y como en las plantas de producción de animales (granjas) para el consumo humano. Sus funciones son diversas. Por un lado, representan un intento de reproducir en instalaciones cerradas las condiciones del medio natural sin afectar los ritmos biológicos y manteniendo el desarrollo natural. Por otro lado, en investigación se usan para estudiar aspectos de la biología de un determinado organismo como son el crecimiento, el engorde y la reproducción, independientemente de las condiciones cambiantes del medio natural, pudiendo llevar a cabo dichos estudios fuera de los ciclos circanales de la especie estudiada. De esta manera, la manipulación de la luz / fotoperíodo

permite controlar los ritmos biológicos circadianos o circanuales que controlan el crecimiento (Boeuf *et al.*, 1999; Duncan *et al.*, 2002), procesos relacionados con los cambios fisiológicos necesarios para adaptarse a la salinidad, (Duston *et al.*, 1992; Duncan *et al.*, 1998) y la reproducción pudiéndose mantener el periodo de engorde estable y continuado o provocar la puesta fuera de temporada (Porter *et al.*, 1999; Bromage *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que el incremento en la duración del día o de las horas de luz aumentan el crecimiento en multitud de especies, tanto marinas como de agua dulce (Boeuf *et al.*, 1999). Por ejemplo en el salmón se ha observado un aumento de la ingesta y una mejor eficiencia en la conversión del alimento (Boeuf *et al.*, 1999). Asimismo al modificar la longitud de onda emitida hacia el ultravioleta cercano (340-400nm) se permite incrementar o disminuir la predación en algunas especies de peces como por ejemplo en *Onchorhynchus sp.*, al aumentar el contraste de las presas con el fondo, y favorecer así la detección de éstas (Browman *et al.*, 1994).

En muchas especies la reproducción es un proceso que está controlado por el fotoperiodo por lo que su control puede desplazar la época de puesta (adelantando o retrasando la maduración en los animales para tener puestas fuera de época) (Bromage *et al.*, 2001). Por ejemplo en peces planos, se ha provocado la puesta fuera de temporada en el fletan (*Hippoglossus hippoglossus*) (Björnsson *et al.*, 1998). Además, se ha podido suprimir la reproducción y evitar las pérdidas de crecimiento por la maduración no deseada durante el engorde (Bromage *et al.*, 2001).

Existe una clara relación entre los ciclos día-noche con la actividad y el comportamiento de un organismo (Goldman, 2001; Bayarri *et al.*, 2004c; Vera *et al.*, 2005; Falcón *et al.*, 2007). El lenguado senegalés no es una excepción y está afectado por los cambios en la iluminación.

### 2.1.1. Evaluación del efecto de la iluminación

#### 2.1.1.1. Actividad (tipo circadiano)

La nocturnidad, característica de los seres vivos con hábitos de vida en condiciones de escasa o nula iluminación, es una variante que está ampliamente representada en todos los reinos animales y vegetales. La nocturnidad es un mecanismo adaptativo a diversas situaciones: ocupar un nuevo nicho ecológico (cuya separación es temporal en vez de espacial), evitar la predación o aumentar el éxito reproductivo llevando a cabo las puestas en condiciones adversas para los depredadores (Campbell *et al.*, 1999).

El uso de luces artificiales es habitual en el manejo de animales. Sin embargo una manipulación inadecuada puede tener efectos no deseados en el cultivo. Así, la instalación y el uso de iluminación nocturna en los estudios de comportamiento presenta varios riesgos entre los que destaca el hecho de que se puede llegar a modificar la actividad natural de los animales alterando los ritmos circadianos. Si el pez percibe la luz nocturna, la actividad será diferente a la que presentaría en el medio natural. Esta variación de actividad puede no ser significativa en cuanto al ritmo circadiano (se puede mantener un fotoperiodo que permita mejorar el engorde) sin embargo puede verse afectado tremendamente el ciclo circannual, al modificarse los periodos de maduración y puesta de los animales pudiendo quedar anulados.

Las diferencias en el ciclo también pueden deberse a los horarios de iluminación diurna que suelen estar adaptados a las necesidades del investigador, del centro de investigación, o del productor. También pueden derivarse de la iluminación artificial nocturna, su la intensidad y la longitud de onda en función de las necesidades experimentales (Oliveira *et al.*, 2007)

El Lenguado senegalés es un animal de actividad principalmente crepuscular y nocturna (Bayarri *et al.*, 2004b; Oliveira *et al.*, 2009) que habita zonas de baja iluminación siendo muy sensible a la iluminación de baja intensidad (Oliveira *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2010).

En este estudio, sin embargo, es la propia luz, el tipo de iluminación, la intensidad y su buen uso lo que más nos interesa, ya que no existen estudios previos sobre su efecto en el comportamiento del lenguado. Un mal uso de la iluminación puede provocar tanto el retraso en la maduración sexual incluso con reabsorción gonadal como una desincronización en la maduración sexual entre machos y hembras (Bromage *et al.*, 2001; García-López *et al.*, 2006).

#### 2.1.1.2. Comportamiento

La capacidad de percepción de un animal de superficie no es igual a la de un animal de fondo ya que están adaptados a distintas condiciones. Los animales de fondo presentan diferente sensibilidad en cuanto al tipo de radiación, así son menos sensibles a longitudes de onda que atraviesan solo las primeras capas del agua (pocos metros) y mucho mas sensibles a aquellas que llegan al fondo (Montgomery *et al.*, 1997). Cada especie percibe el ambiente de una manera distinta de ahí que cada nuevo sistema ha de ser medido y ajustado para la especie en cuestión. Estudios previos llevados a cabo con en diferentes especies de peces han demostrado que la luz artificial si se manipula de forma incorrecta puede llegar a provocar situaciones de estrés (medida como la producción de colesterol y o aumento de la frecuencia respiratoria) así como variaciones en el comportamiento social e individual, reacciones de escape, atracción o repulsión hacia la fuente de iluminación (Weinberg *et al.*, 1999), dependiendo de la intensidad de la luz y de la longitud de onda emitida (Marchesan *et al.*, 2005). Luces de color azul no provocan aparentemente ningún tipo de estrés en la tilapia (*Oncorhynchus niloticus*) aunque se detecta un aumento en la concentración de cortisol sanguíneo cuando se compara con longitudes de onda correspondientes al verde o al blanco (Volpato *et al.*, 2001). En el caso del salmón (*Salmo salar*) y la jundiá (*Rhamdia quelen*) es la luz de color azul la que provoca mayores niveles de estrés. Medido como aumento en la frecuencia respiratoria, frente a luces de color verde (Sánchez Hernández, 2008). Sin embargo, tras la exposición a la luz roja e infrarroja no se observan cambios en el comportamiento ni en los niveles de estrés (niveles de cortisol y frecuencia respiratoria) frente al control (sin luz nocturna) de las especies estudiadas,

*Salmo salar* y *Liza aurata* (Migaud *et al.*, 2007; Sánchez Hernández, 2008). todos estos estudios demuestran que el efecto de las diferentes longitudes de onda sobre el comportamiento de los pece dependen de la especie y su hábitat natural.

#### 2.1.1.3. Fisiología y melatonina – efecto de intensidad y longitud de onda

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una neuro-hormona derivada de la serotonina, sintetizada principalmente por la glándula pineal y de forma minoritaria en otras partes del cuerpo como en los ojos (Iigo *et al.*, 1997), situándose los receptores de la melatonina en diversas zonas del cerebro: tectum óptico, telencéfalo, cerebelo, hipotálamo, bulbo olfatorio y bulbo raquídeo (Oliveira *et al.*, 2008a). El aumento en los niveles de melatonina coincide con la actividad en animales nocturnos y con la inactividad, el sueño o el descanso en animales diurnos (Campbell *et al.*, 1999). La producción de melatonina en todas las especies de peces estudiadas tiene un perfil de tipo circadiano, con niveles altos de producción durante las horas de oscuridad y niveles bajos durante las horas de luz (Collin *et al.*, 1989) lo que indica una relación entre la secreción de melatonina y la regulación del ritmo circadiano. (Reiter, 1993; Alonso-Gómez *et al.*, 1995; Iigo *et al.*, 2006) tanto diario como estacional (Oliveira *et al.*, 2008b), en este último caso en íntima relación con las variaciones de temperatura. Los ritmos circadianos de fotoperiodo y las variaciones de temperatura son factores habitualmente utilizados por la industria acuícola para el control de la biología de los peces (Thrush *et al.*, 1994; Porter *et al.*, 1999; Bromage *et al.*, 2001; Falcon *et al.*, 2010).

En el caso del lenguado la mayor liberación de melatonina se produce en condiciones de oscuridad (del orden de 70-80 pg /ml de sangre) disminuyendo en presencia de luz (del orden de 15-20 pg/ml de sangre) (Oliveira *et al.*, 2009), en la trucha (*Oncorhynchus mykiss*) una especie de hábitos diurnos, la máxima actividad coincide con el mínimo de melatonina, lo que indica que la secreción de melatonina es independiente de la actividad del pez y se ciñe exclusivamente a un ritmo circadiano (Uz *et al.*, 2003). Entre las distintas

especies de peces estudiadas se han observado ambos tipos de diurnos y nocturnos (Bayarri *et al.*, 2002; Bayarri *et al.*, 2004c) entre ellos el del lenguado senegalés (Bayarri *et al.*, 2004b; Oliveira *et al.*, 2009; Sánchez Vázquez, 2010).

Actualmente existen en el mercado una gran variedad de equipos de filmación para el estudio del comportamiento de los peces (Ingolfsson *et al.*, 2006; Queirolo *et al.*, 2010). Su uso en condiciones de baja iluminación es muy restringido, por lo que para el estudio del comportamiento de animales con hábitos nocturnos es imprescindible contar con cámaras de extrema sensibilidad (Jamieson *et al.*, 2006), o con fuentes de iluminación alternativas que permitan que los sistemas tradicionales de grabación registren la imagen con la calidad suficiente para su posterior estudio (Albert *et al.*, 2003).

En una serie de estudios realizados por Arnold *et al.* (1974) y Batty (1983) se utilizaron luces infrarrojas para la observación del comportamiento de larvas de peces, aunque debido a su pequeño tamaño la imagen en negativo se proyectaba sobre una superficie clara (Arnold *et al.*, 1974; Batty, 1983). En animales de mayor tamaño (Faleiro *et al.*, 2008) la observación nocturna ha sido eliminada al considerarse que la iluminación podía afectar al comportamiento (Moran *et al.*, 2007). En lenguado común (*S. solea*) se han utilizado luces rojas a baja intensidad (1 lux) para la descripción del comportamiento reproductivo (Baynes *et al.*, 1994) el enterramiento y el escape (Durieux *et al.*, 2010) en el medio natural. Se ha observado que la aplicación de un pulso de 1 hora de luz roja de  $5.3 \text{ mW} \cdot \text{cm}^2$  durante la noche no cambia de forma significativa la liberación de melatonina en sangre (Oliveira *et al.*, 2007). Tampoco presenta diferencias significativas en la melatonina de lenguados senegaleses expuestos a luz roja (Oliveira *et al.*, 2007). Así, el primer objetivo de este trabajo de tesis ha sido utilizar distintos tipos de luz, para establecer el sistema de iluminación más adecuado para llevar a cabo filmaciones digitales y poder así estudiar el comportamiento nocturno del lenguado senegalés. El objetivo de este estudio fue utilizar distintos tipos de luces para determinar un sistema de iluminación que no afectase el comportamiento nocturno y la fisiología del lenguado senegalés y con el fin de estudiar el comportamiento nocturno a través de grabaciones digitales de la actividad nocturna del lenguado senegalés.

## 2.2. Material y métodos.

### 2.2.1.- Estabulación de los peces

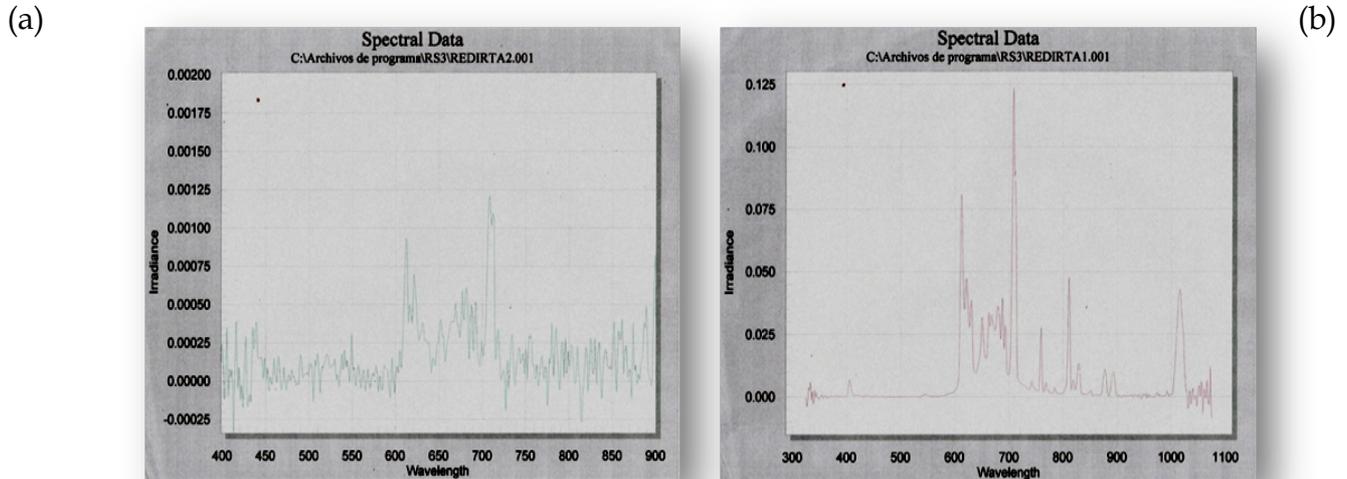
Para la realización del experimento se utilizaron 48 individuos reproductores de lenguado senegalés, con un peso medio de  $689,87 \pm 113,21\text{g}$ , cultivados en el IRTA a partir de huevos procedentes del IFAPA (Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera; El Toruño, Puerto de Santa María, Cádiz). Los reproductores fueron escogidos al azar y agrupados en 4 tanques circulares de fibra de vidrio de color blanco, con un diámetro de 1.7 m y una capacidad de 2 m<sup>3</sup> conectados a un sistema de recirculación, 12 individuos en cada tanque (biomasa de  $8278,5 \pm 135,78\text{ g}$  por tanque). La tasa de renovación de agua fue de  $250\text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$  y por tanque. Los peces fueron alimentados seis días de la semana entre las 15:00 y las 16:00 h, de los cuales 3 días se suministró pienso en raciones de 0,5% del peso corporal total (dos días: vitalis repro 8mm, y un día: elite 7mm, ambos de Skretting España S.A., Burgos) y tres días alimento fresco: un día mejillón (*Mytilus edulis*), otro calamar (*Loligo gahi* capturado en Falkland island) y otro poliqueto (*Nereis virens* obtenido en Topsy Baits, Zeeland, Holland), en raciones del 0,7% del peso corporal total.

Durante el periodo de estudio se simuló el ciclo natural de luz usando un fotoperiodo de 12 horas de luz blanca para el día (de 07:00 en la mañana a 19:00 en la noche) y una temperatura del agua constante a  $15^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Cada tanque contaba con un toldo aislante superior para mantener las condiciones programadas de luz y temperatura. En la parte superior interna de las lonas, se instalaron luces fluorescentes blancas de 58w programadas para encenderse y apagarse mediante un temporizador.

Para la iluminación nocturna se instalaron tres tipos distintos de luces a excepción del tanque control (C) en el que no se instaló iluminación nocturna.

Las luces instaladas fueron:

- **Tratamiento RA:** Luz roja de alta intensidad (50 lux, intensidad 10 veces superior a la mínima intensidad necesaria para la correcta visualización del interior del tanque; inferior a la intensidad medida en superficie en periodo diurno con un fluorescente de luz blanca). Se utilizaron fluorescentes de 58 w



**Figura 2-1:** Gráficas intensidad lumínica con filtro. Respuesta del filtro ROSCO supergel con luces fluorescentes de 58W. Estudio mediante radiómetro [Irradiancia ( $W/m^2$ ) -  $\lambda$ ]. En intensidad mínima (5 Lux) (a) y máxima (>50 Lux) (b)

cubiertos con un filtro rojo (supergel ROSCO IBERICA S.A. Madrid, España). Este filtro solo permite el paso de radiaciones infrarrojas y de rojo profundo (>720 nm) (Fig.: 2-1.b). La intensidad de emisión se ajustó a 50 lux.

- **Tratamiento Rb:** Luz roja de baja intensidad (5 lux, intensidad mínima que necesitan las cámaras para la visualización correcta del interior del tanque), Se utilizaron fluorescentes de 58 w cubiertos con un filtro rojo supergel ROSCO, que solo permite el paso de radiaciones infrarrojas y de rojo profundo >720 nm (fig. 2-1.a). La intensidad de emisión se ajustó a 5 lux (10 veces menor que el tratamiento RA).
- **Tratamiento IR:** Iluminación infrarroja de dos cañones de Led infrarrojos (TIR-8001 Outdoor Infrared Illuminator (Taiwán Regular Electronics Co. Ltd.). Características de emisión: directa 1.0 Lux/indirecta 0 Lux a 850nm de longitud de onda)
- **Tanque C:** Al grupo control no se le aplicó ninguna iluminación nocturna por lo que durante la noche había oscuridad total.

### 2.2.2.- Diseño experimental

Día (1)	Comienzo (2)	Fin (3)	Tratamiento RA	Tratamiento Rb	Tratamiento IR	Tratamiento C
05/03	(12/3 - 19/3)		1	2	3	4
19/03	(26/3 - 02/4)		4	1	2	3
02/04	(09/4 - 16/4)		3	4	1	2
16/04	(23/4 - 30/4)		2	3	4	1

*Figura 2-2: Traslado de los peces. Descripción de los traslados por tratamiento: Tratamiento RA, Tratamiento Rb, Tratamiento IR y tratamiento control. (1) Inicio de la aclimatación previa al tratamiento y (2) Inicio del periodo de tratamiento analizado. (3) fin de la replica*

Los cuatro grupos de peces recibieron los 3 tratamientos de iluminación nocturna y el tratamiento control. Cada tratamiento fue aplicado por un periodo de dos semanas. La primera semana se utilizó como periodo de adaptación; mientras que la segunda semana se utilizó como periodo de estudio.

**Replicas:** Finalizadas las dos semanas, los peces de cada tanque fueron trasladados a otro tanque para analizar su respuesta bajo el nuevo tipo de luz. A final de los dos meses y tres traslados, los cuatro grupos de peces habían sido expuestos a cada uno de los tratamientos (Fig.: 2-1); teniendo por tanto 4 replicas de cada tratamiento.

### 2.2.3.- Evaluación del comportamiento

El comportamiento de los lenguados se estudió a partir de: 1) análisis de filmaciones de video y 2) sensores de movimiento.

**1) Análisis de filmaciones de video:** Se realizaron una serie de filmaciones mediante cámaras digitales sumergibles modelo F60B/N80-50G (Praesentis S.L., Barcelona, España) conectadas a una grabadora DVR.0804HB (Praesentis, Barcelona, España) de 8 canales y situadas en el interior de los tanques. Las cámaras de filmación registran tanto en el espectro visible como en el espectro infrarrojo. Las grabaciones fueron continuas en los cuatro tratamientos, eliminando las correspondientes al periodo nocturno del tanque control ya que no había posibilidad de observar el interior del tanque. Paralelamente, se anotó

la facilidad de visualizar e identificar los peces en cada tratamiento de luz nocturna por parte de tres diferentes observadores, clasificándose en:

- 1, Claramente visible e identificable
- 2, Visible pero no identificable
- 3, Difícil de visualizar, imposible identificar con certeza
- 4, No visible, no identificable.

A partir de los registros de videos se definieron, cuantificaron y analizaron 4 tipos de comportamientos seleccionados por su relación con el cortejo y la reproducción: 1) *Apoyar la cabeza*: el comportamiento de apoyar la cabeza sobre el cuerpo de otro ejemplar de lenguado; 2) *Temblor*: acción en la que el pez produce una vibración-sacudida a lo largo de todo el cuerpo; 3) *Separarse*: alejarse de otro individuo después de un contacto o alejarse cuando otro individuo se aproxima; 4) *persecución competición*: comportamiento de natación en que un lenguado o más, sigue(n) a otro lenguado o lenguados. A su vez los 4 tipos de comportamiento mencionados se distribuyeron en dos grupos de comportamiento:

#### **2.2.3.1.- Interacciones individuales aversivas<sup>1</sup>:**

En las que su aumento dificulta la interacción grupal, son las denominadas “Temblor” y “Separarse”. El Temblor es una internalización de estrés o sobresalto. El Separarse, forma parte de las reacciones de rechazo a interacciones entre individuos.

#### **2.2.3.2.- Interacciones individuales apetitivas<sup>2</sup>:**

En las que su aumento favorece las interacciones grupales, necesarias en esta especie para el cortejo y la reproducción. Son las denominadas “Reposar la cabeza” y “Persecución, Competición”. En muchos casos se pueden considerar

---

<sup>1</sup> Aversivas en cuanto al significado que presenta frente al cortejo, son respuestas de rechazo a la interacción entre individuos. Craig, W. (1918)

<sup>2</sup> Apetitivas en cuanto al significado en el contexto del cortejo. Son parte o consecuencia de la aceptación a la interacción.

acciones de aceptación de la (Pitcher *et al.*, 1993). El apoyar la cabeza es el comportamiento más común a la hora de iniciar una interacción entre individuos de distinto sexo. En grupos que llevan a cabo el cortejo de forma espontánea apoyar la cabeza deriva, cuando se dan las condiciones adecuadas, en las persecuciones.

- Interacciones competitivas: acciones de persecución o juegos preliminares e imprescindibles para la puesta de huevos fertilizada.

A partir de las filmaciones se cuantificaron los 4 tipos de comportamientos durante 4 periodos de 30 minutos a las 16:00-16:30h, 18:00-18:30h, 22:00-22:30h y 01:00-01:30h. Las horas fueron seleccionadas en base a: 1) El ciclo de actividad del lenguado (Bayarri *et al.*, 2004b) con periodos de hasta el 70% de actividad en las últimas horas del día 2) las características del experimento y particularmente del grupo control que no fue visible en oscuridad y 3) de las características del lugar de trabajo: el horario de trabajo del personal técnico, de 8 a 16 h, y sus actividades podían interferir en el comportamiento de los peces, por lo que no fueron incluidas en el estudio.

**2)Análisis por detectores de movimiento:** La actividad de los peces fue cuantificada también por medio de sensores infrarrojos de movimiento SUNX-CX400 series. Compact photoelectric sensor (Panasonic Electric Works España S.A.). Estos sensores detectan el movimiento cuando un objeto interrumpe el rayo de luz que emiten (Vera *et al.*, 2006) con precisión hasta 35 cm. de distancia en agua. En cada tanque se instaló 1 sensor a 5 cm del fondo para evitar errores en caso de que un animal se quedara quieto delante del sensor, y un segundo sensor a 25 cm del fondo para captar la natación a media altura y diferenciarla de la natación de fondo. Se eliminaron periodos con posibles interferencias debido al trabajo zootécnico durante el periodo de 08:00 a 16:00h.

Tras el análisis de la actividad de los peces captada por los sensores, se llevó a cabo un análisis de actividad en paralelo observando los registros de video. Se marcó en la pantalla una línea de referencia imitando el sensor y se contabilizaron todos los movimientos efectuados por los peces a lo largo de la línea o cruzándola, sin tener en cuenta si el individuo que la cruzaba era el

mismo de la señal anterior o uno distinto. Se seleccionaron 10 minutos por hora de filmación, de forma aleatoria, pero registrando la misma hora en todos los tanques y en los mismos días en que se efectuaba el análisis del sensor de movimiento.

#### 2.2.4.- Evaluación de melatonina en sangre.

Se realizaron 4 extracciones de sangre (19 de marzo, 2, 16 y 30 de abril de 2007) al final del periodo de dos semanas de ensayo que incluye la semana de aclimatación y la semana de observaciones de comportamiento y actividad. En cada muestreo, la mitad de los animales fueron muestreados a media noche (01:00h) y la otra mitad a medio día (13:00h), obteniendo así el perfil de melatonina en su máximo y mínimo diarios.

Cada animal previamente fue sedado con fenoxietanol ( $0,2 \text{ ml l}^{-1}$ ) en un tanque de 30 l donde permanecieron tapados, para que durante la noche la luz roja, utilizada para poder trabajar afectase lo menos posible a los peces. Una vez sedados se extrajo una cantidad media de 0,6 ml de sangre de la aleta caudal usando jeringuillas heparinizadas ( $10 \mu\text{l}$  heparina / jeringuilla) de 1 ml.

La sangre obtenida se mantuvo en eppendorfs heparinizados ( $5\mu\text{l}$  heparina / eppendorf), y en agitación para mezclar bien la heparina y evitar la coagulación. Posteriormente se mantuvieron en hielo con el fin de evitar la degradación de la melatonina durante la obtención del resto de muestras.

Al terminar el muestreo las muestras de sangre se centrifugaron (Centrifuga JOAN, 3100) a 3000 G a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 15 minutos. Después de la centrifugación se extrajo el sobrenadante y las muestras de plasma fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis de melatonina. Al finalizar el muestreo se devolvieron los peces a otro tratamiento para comenzar la aclimatación, (Fig.: 2-1). Las muestras de plasma fueron analizadas en la Universidad de Murcia, donde se determinó el nivel de melatonina mediante radioinmunoanálisis, con un kit comercial (Melatonin Direct RIA, Biosource, Belgium) y un límite de detección de  $2 \text{ pg / ml}$  (Vera *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008a).

### 2.2.5.- Análisis estadístico

Todas las medias incluyen el error estándar y se presentan como  $\pm$  SE. Las variables dependientes fueron (1) el nivel de melatonina durante el día, (2) el nivel de melatonina durante la noche, (3) la media de la actividad locomotora por hora durante el día (07:00-19:00) y durante la noche (19:00-07:00) y (4) el número de repeticiones de cada comportamiento observado (apoyar la cabeza, separarse, persecuciones o competición y temblores) durante el día o la noche, y se compararon con las variables independientes de (1) tratamiento de iluminación nocturna, (2) la fecha de muestreo y (3) los diferentes tratamientos. Algunos datos de la melatonina y actividad locomotora no se distribuyeron normalmente. El nivel de melatonina fue comparado con un ANOVA de un factor y Kruskal-Wallis ANOVA. Se encontraron las mismas diferencias significativas en los dos tipos de análisis de varianza, pero los valores de P fueron ligeramente diferentes. La actividad locomotora se comparó con el test de ANOVA Kruskal-Wallis. La comparación entre los datos diurnos y nocturnos de melatonina se realizó utilizando el student T-test y el test no paramétrico de Mann-Witney. El nivel de significancia aplicado fue de  $P < 0.05$ .

El análisis de comportamiento se realizó contabilizando los movimientos efectuados durante media hora en 4 periodos del día. Los datos obtenidos fueron analizados mediante una ANOVA de dos vías, utilizando el test Holmsidak con un nivel de significación  $P < 0,05$  para identificar las diferencias encontradas.

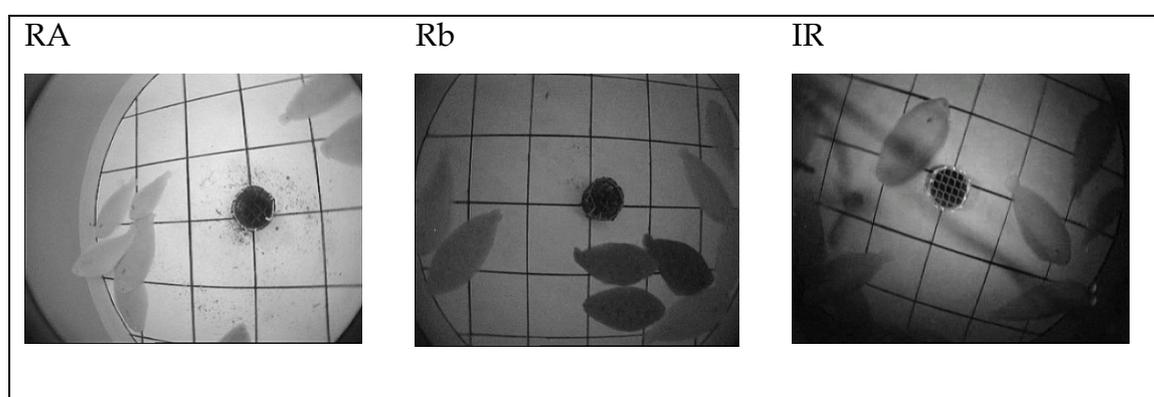
El análisis de la actividad se llevó a cabo mediante una descripción de los perfiles de actividad diaria según Bayarri *et al.*, (2004b).

La correlación entre la actividad medida por los sensores y la actividad medida mediante los videos fue examinada usando el método de correlación de Pearson. Se utilizó el programa de análisis Sigma Stat (Systat Software Inc., Germany) para todo el análisis estadístico de las muestras.

## 2.3. Resultados.

### 2.3.1.- Calidad visual obtenida

Los tres tratamientos de iluminación nocturna, **RA**, luz de alta intensidad de 50 lux, **Rb**, luz de baja intensidad de 5 lux e **IR** luz infrarrojo permitieron visualizar e identificar los peces a través del sistema de video-grabación (Fig.: 2-3), a excepción del grupo control (C) al no tener iluminación nocturna y estar en oscuridad total. Durante la noche, la visualización e identificación de los peces fue ordenada por dificultad (de menor a mayor) o por calidad visual (de mayor a menor) de la siguiente manera: RA (1) > Rb (1) > IR (2) > C (4). Según la notación antes descrita, el tratamiento RA se clasificó como 1: “claramente visible e identificable” ya que con este tipo de iluminación se obtuvo un nivel de iluminación elevado y no hubo ningún problema para visualizar los peces. El tratamiento Rb también se clasificó como 1: “claramente visible e identificable”, sin embargo estaba en el límite, aunque se pudo visualizar los peces sin dificultad en toda la columna de agua. El tratamiento IR se clasificó como 2: “visible” pero “no identificable” debido a la pérdida de visión en la



**Figura 2-3:** Calidad visual. Fotos de los tratamientos de luz nocturna. En la parte superior, la observación mediante las cámaras presentaba diferencias en la calidad. RA, Rb, IR representan fotos de los respectivos tratamientos, RA (luz roja, 50 lux, 1 fluorescente), Rb (luz roja, 5 lux, 1 fluorescente) y IR (leds infrarrojos, 2 focos). No está incluido el tratamiento C, debido a la ausencia de luz durante la Noche.

periferia del tanque así como la pérdida de visión por las características de las luces LED que no presentan dispersión de la luz. La pérdida de visibilidad comenzaba aproximadamente a la mitad del tanque siendo patente al llegar al fondo (especialmente en las áreas periféricas del tanque), sin poder identificar

adecuadamente a los individuos. El tratamiento C, en la noche fue clasificado como 4: “no visible, no identificable”.

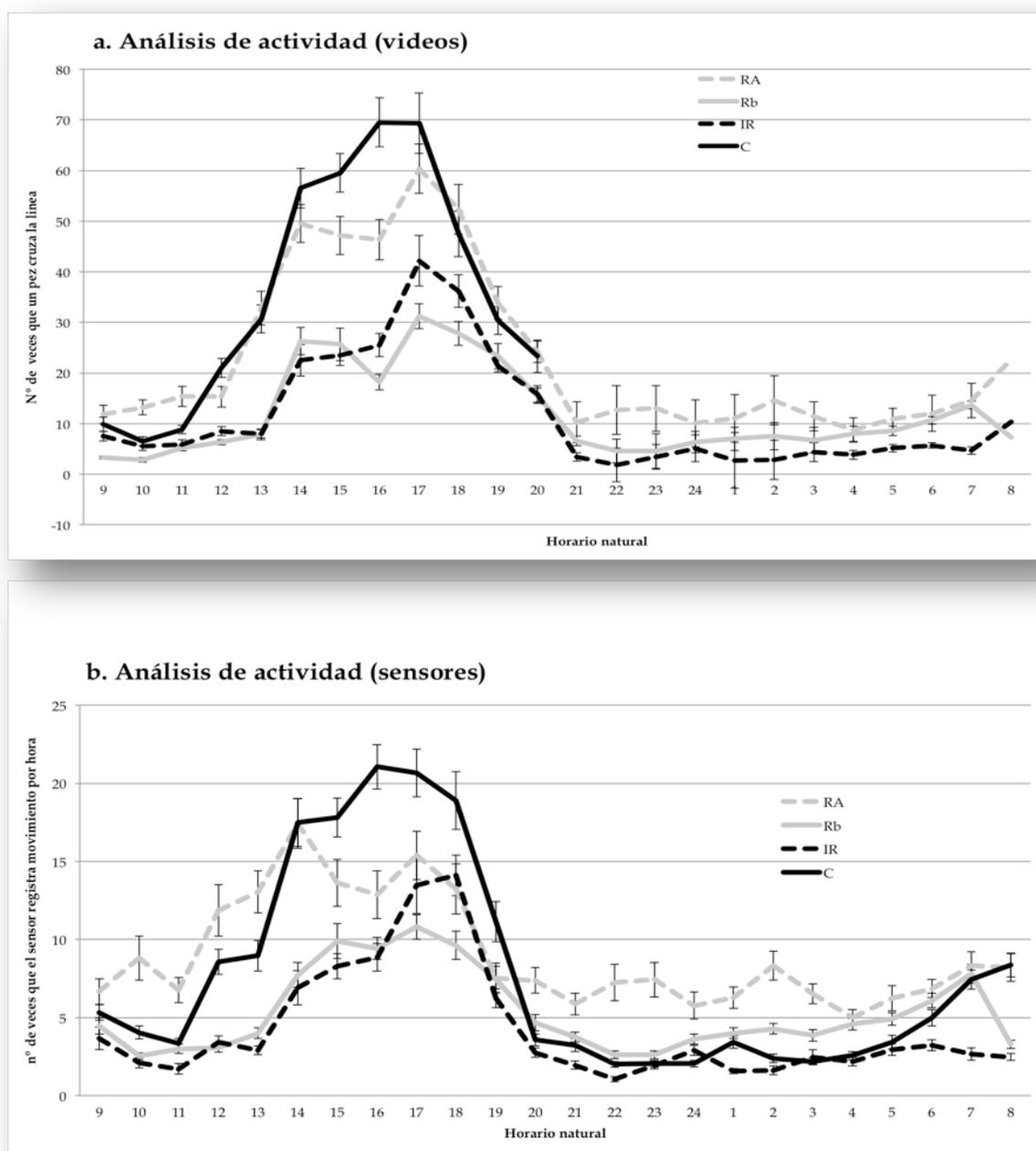
### 2.3.2.- Ciclos de actividad

El análisis de actividad se llevo a cabo primero teniendo en cuenta los resultados obtenidos con los sensores y a continuación mediante el estudio de las filmaciones de video. Ambos análisis dieron patrones de actividad similares ( $P < 0,05$ ), presentando un coeficiente de correlación de  $r = 0,94$ . Sin embargo, los sensores detectaron una actividad 2,4 veces menor que la obtenida con las filmaciones. El registro de movimientos obtenidos por el sensor situado a 25 cm del fondo del tanque fue bajo y desigual por lo que solo se muestran los resultados de los sensores situados a 5 cm del fondo del tanque.

En términos generales, la actividad diurna fue similar en todos los tanques, independientemente del tratamiento de luz nocturna aplicada. Se observaban dos picos de actividad: 1º) entre las 06:00 y las 08:00 de la mañana coincidiendo con la puesta en marcha del sistema de iluminación de luz diurna y con el inicio de la jornada laboral del personal técnico y 2º) entre las 13:00 y las 19:00h, previo a la hora de alimentación (15:00h) (Fig.: 2-4).

El pico de actividad de primera hora de la mañana solo se aprecia en los tratamientos Rb y C, que tuvieron una actividad entre los tratamientos RA e IR. Los peces de tratamiento RA exhibieron una actividad un poco más elevada y continua, sin pico marcado mientras que los peces del tratamiento IR mostraron una actividad menor sin presentar pico. El segundo incremento de actividad es mucho mayor que el primero siendo la actividad de los tratamientos Rb y C son similares. Por el contrario, entre las 20:00 a 06:00 de la mañana (periodo 2), la actividad registrada por los sensores es menor y bastante homogénea. (El tanque control en este periodo solo pudo analizarse mediante sensores). La actividad media durante la noche (19:00-07:00) fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) en el grupo RA ( $6,7 \pm 0,3$  movimientos por hora) en comparación con los grupos de IR ( $2,6 \pm 0,4$ ) y C ( $3,6 \pm 0,7$ ). La actividad nocturna de los peces del grupo Rb ( $4,4 \pm 0,4$ ) no fue significativamente diferente a la de los grupos RA y

C, pero fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) que la actividad en el grupo de IR. Durante el día (07:00-19:00) la actividad locomotora fue significativamente mayor en los grupos C ( $11,8 \pm 2,0$ ) y RA ( $11,3 \pm 1,0$ ) en comparación con el grupo de IR ( $5,9 \pm 1,3$ ), mientras que la actividad del grupo de Rb ( $6,3 \pm 0,9$ ) no fue significativamente diferente a la de los otros grupos.

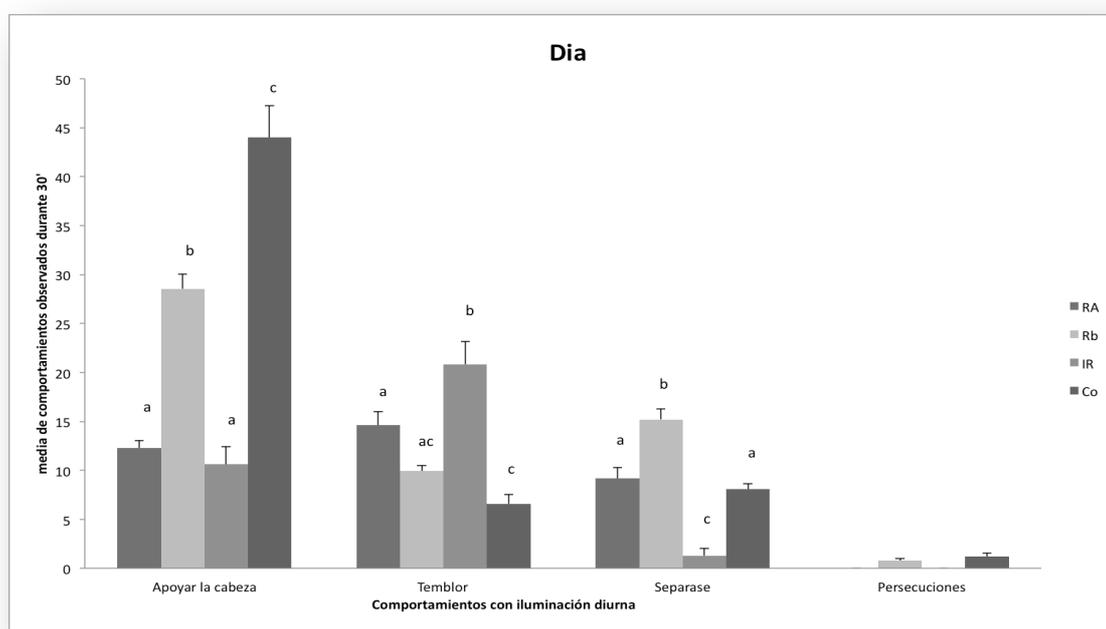


**Figura 2-4:** Comparativa, ciclo diario. Medida del perfil de actividad diaria en los 4 tratamientos, RA, Rb, IR, C de luz nocturna. Fotoperiodo del día fue luz blanca de 07:00-20:00 en los cuatro tratamientos. Las 24 horas fueron divididas en tres periodos: Periodo 1: de 11 de la mañana a 8 de la tarde. Periodo 2, de 8 de la tarde a 6 de la mañana. Periodo 3 de 6 de la mañana a 11 de la mañana. (a: análisis visual sobre los videos grabados, b: análisis mediante sensores infrarrojos de movimiento)

En los tratamientos con luz IR y luz control (sin luz) podemos observar unas variaciones más extremas con periodos de actividad mínima (2-3 movimientos por hora [registro de los sensores]) y periodos de actividad máxima, (15-23 movimientos por hora [registro de los sensores]).

### 2.3.3.- Análisis de comportamiento (Fig.: 2-5 y 2-6)

El comportamiento “Apoyar la cabeza” de los distintos grupos de peces, no presentó diferencias significativas durante la noche sin embargo durante el día aunque se registró el mismo perfil de máximos y mínimos sí se observaron pero con diferencias significativas en cuanto al número de veces registrado. Este comportamiento fue significativamente ( $P < 0.05$ ) más alto en los peces del grupo control (solo durante el día) seguido por el tratamiento Rb. Los tratamientos RA e IR presentaron niveles del comportamiento “Apoyar la cabeza” similares y significativamente ( $P < 0.05$ ) más bajos.



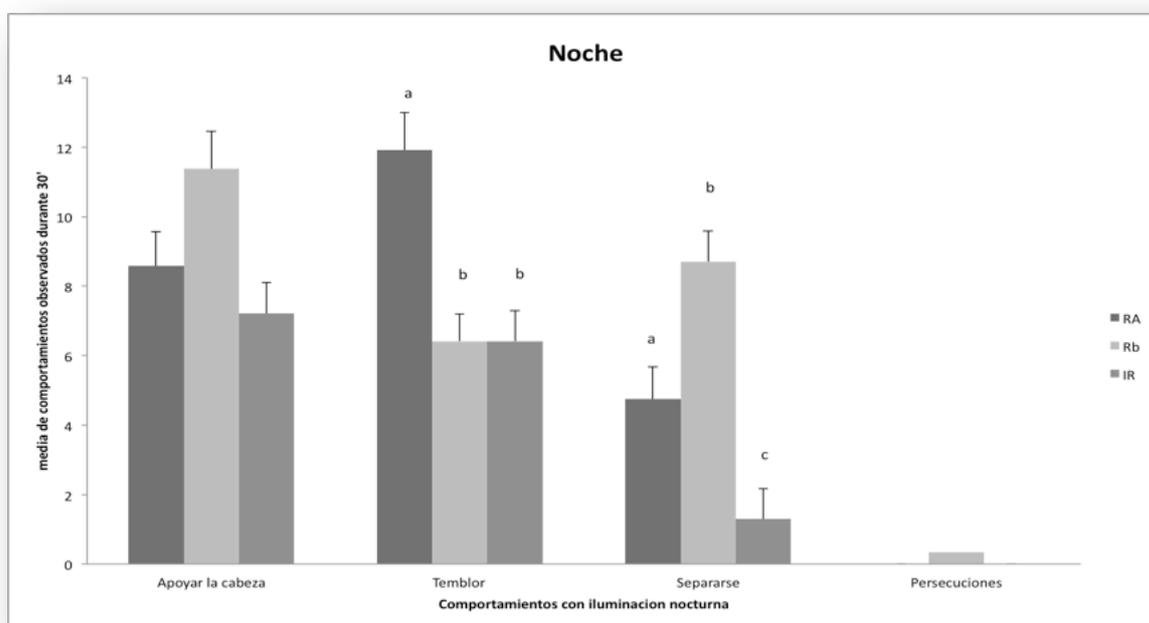
**Figura 2-5:** Comportamientos observados durante el día: Media de número de veces que se observó los comportamientos, apoyar la cabeza, temblor, separarse, persecuciones durante un periodo de 30 minutos durante el día (16:00-16:30h y 18:00-18:30h). Diferentes letras indican una diferencia significativa entre tratamientos de un comportamiento

Durante la noche, el comportamiento “Temblor” presentó niveles significativamente más altos en tratamiento RA comparado con los tratamientos Rb e IR que presentaron niveles similares. Durante el día, el comportamiento

“Temblor” de los peces presentó niveles significativamente más altos en el tratamiento IR comparado con los otros tratamientos mientras que los peces del tratamiento RA fue significativamente mayor que en los del grupo control. Los peces del tratamiento de Rb presentaron niveles similares, y sin diferencias significativas, a los observados en los tratamientos RA y C.

Durante la noche, el comportamiento “Separarse” presentó diferencias significativas entre los tratamientos Rb, RA e IR, mayor en los peces de Rb fue más alto, seguido por RA e IR. Durante el día, el comportamiento “Separarse” presentó el mismo patrón de la noche, con niveles más altos en el tratamiento Rb, seguido por RA y C (solo durante el día) que fueron similar mientras que IR presento los niveles más bajos.

Por último el comportamiento “persecuciones” apareció exclusivamente en los peces de los tratamientos Rb (día y noche) y C (solo observaciones del día).

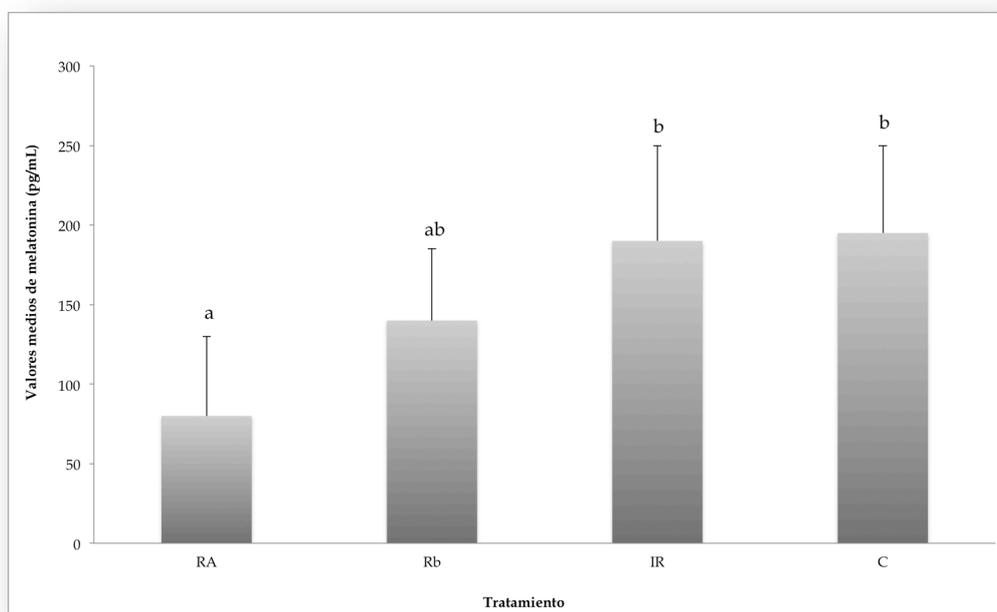


**Figura 2-6:** Comportamientos observados durante la noche. Media de número de veces que se observaron los comportamientos, apoyar la cabeza, temblor, separarse, persecuciones, durante un periodo de 30 minutos en la noche (22:00-22:30h y 01:00-01:30h). El tratamiento control no fue estudiado durante la noche por presentar oscuridad absoluta. Diferentes letras indican una diferencia significativa entre tratamientos de un comportamiento.

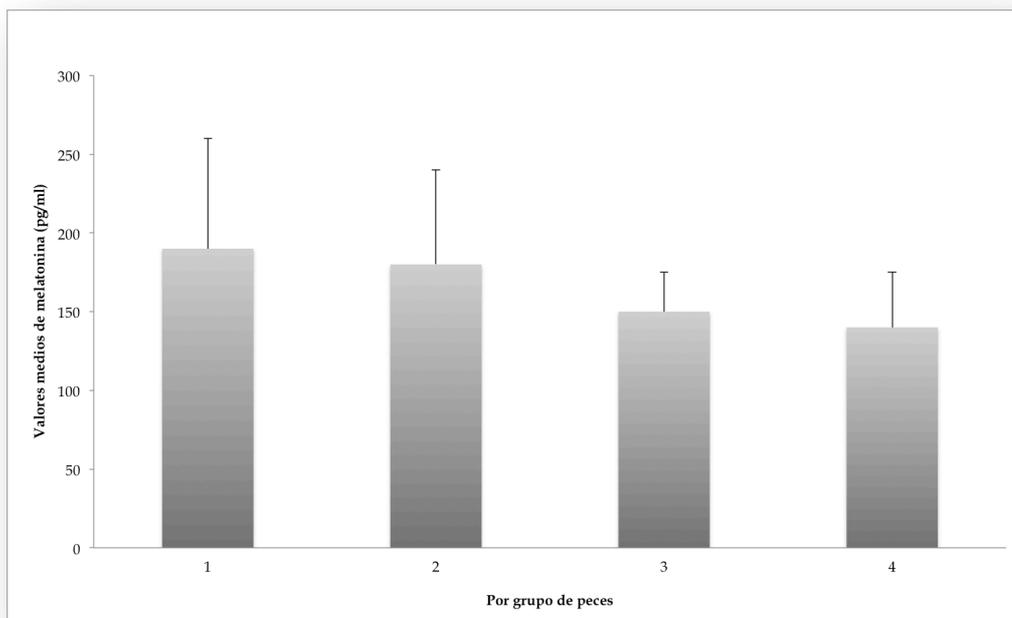
### 2.3.4.- Melatonina

Todos los tratamientos de luz nocturna presentaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los niveles promedio de melatonina obtenidos durante el día (muestras tomadas a las 13:00h) y durante la noche (muestras obtenidas a las 01:00h). No se observaron diferencias significativas en los niveles de melatonina entre las replicas del experimento ni entre los grupos de peces estudiados, durante el día o la noche. Tampoco hubo diferencias significativas durante el día entre los diferentes tratamientos, aunque el nivel de melatonina de los lenguados a media noche (24:00) se vio afectado significativamente ( $P < 0.05$ ) por el tratamiento de luz nocturna (Fig.: 2-7.a-d) siendo significativamente más bajo ( $P < 0.05$ ) en el tratamiento RA (50 lux) que en los grupos de IR y C (control). El tratamiento Rb (5 lux) no mostró diferencias significativas con los otros tres tratamientos (RA, IR y C).

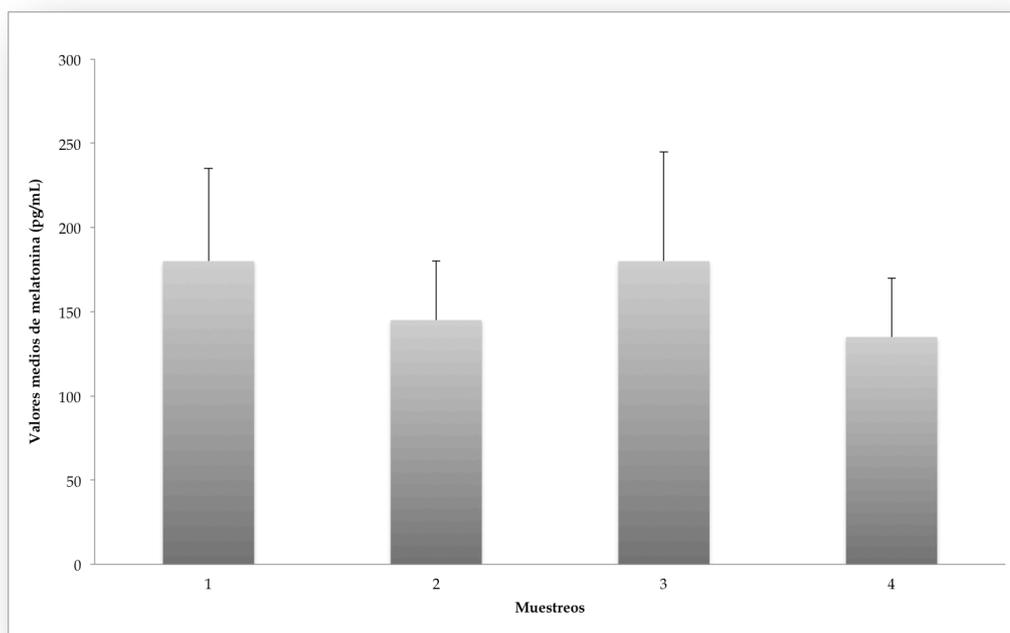
Se aprecia una clara separación entre los datos del día y de la noche en todos los tratamientos excepto en el tratamiento RA (Fig.: 2-7.d)



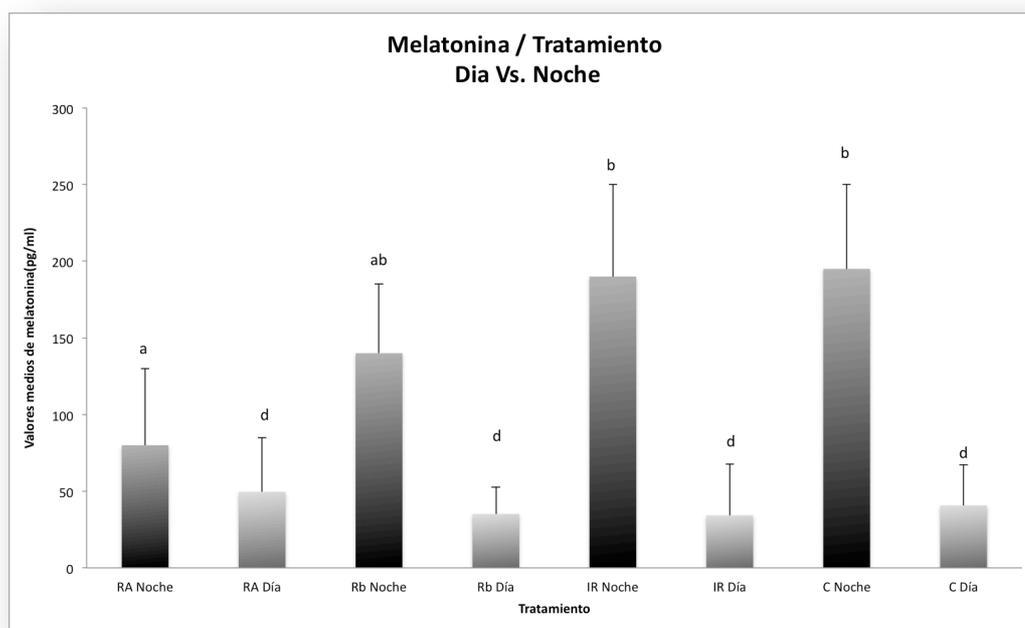
a



b



c



d

**Figura 2-7:** Melatonina: (a) valores medios de melatonina según el tratamiento aplicado de luz nocturna, RA, luz rojo de alta intensidad. Rb, luz roja de baja intensidad. IR luz infrarroja. C, control. (b) valores medios de melatonina según el grupo de peces estudiado. (c) valores medios de melatonina según la fecha en que fueron obtenidas. (d) valores medios de melatonina agrupando tanto el día como la noche / por tratamiento aplicado RA-D, luz roja de alta intensidad durante el día, RA-N, luz roja de alta intensidad durante la noche. Rb-D, luz roja de baja intensidad (día), Rb-N, luz roja de baja intensidad (Noche). IR-D, luz infrarroja (día), IR-N, luz infrarroja (noche). C-D Control (día), C-N Control (noche). Diferentes letras indican una diferencia significativa entre tratamientos de un comportamiento.

## 2.4. Discusión.

El lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) criado en cautividad presenta un ritmo de tipo circadiano en el que la actividad comienza en torno a las 13:00h (poco antes de la hora de alimentación) con un período de máxima actividad entre las 14:00 y las 18:00h, y con un descenso de actividad a partir de las 19:00 h, como se observa en los resultados obtenidos mediante filmaciones de video y sensores infrarrojos de actividad.

A fin de estudiar la actividad nocturna del lenguado, se han utilizado tres tipos e intensidades de luz. Con el tratamiento Rb, (luz roja de baja intensidad) se obtuvieron los resultados más adecuados para nuestros objetivos. Así, fue posible observar e identificar visualmente en las filmaciones a cada uno de los animales usados para el ensayo, su perfil de actividad y el tipo de comportamiento que no difería del tratamiento control. Además se midieron los niveles de melatonina en sangre, sin que estos presentaran diferencias significativas frente al tratamiento control.

Los tres tratamientos de iluminación nocturna empleados han permitido observar los animales y en dos de ellos identificarlos de forma continua a través del sistema de video grabación. En el tratamiento de luz roja de alta intensidad (50 Lux) no hubo ningún problema a la hora de observar los movimientos y reacciones, pudiendo incluso identificar visualmente caracteres externos de los animales para posteriores identificaciones. La luz roja de baja intensidad también permite distinguir individuos, movimientos y reacciones sin dificultad. La luz infrarroja permite una buena visibilidad de los peces en las zonas donde inciden los focos. Sin embargo, la radiación tipo Led no presenta dispersión por lo que cualquier objeto o individuo que se salga de la trayectoria de esta emisión quedará rápidamente oculto. Por ejemplo, si un individuo atraviesa el haz de luz se pierde visibilidad de todo el resto del tanque debido a esa falta de dispersión. La clara ventaja de la iluminación por fluorescentes a este nivel, viene dada por la propia forma de emisión, donde la dispersión de la luz aporta la percepción necesaria para evaluar todo el tanque. Durieux et al. (2010) en un estudio similar al nuestro estudiaron el comportamiento nocturno

de juveniles de lenguado común (*S. solea*) usando luces infrarrojas para iluminar el interior de los tanques, aunque en su caso la altura de agua era solo de 35cm. En nuestro caso, el requerimiento por parte de los reproductores hizo mas complicado el uso de este tipo de luces debido al número de lámparas necesario para iluminar toda la superficie.

Los análisis de actividad fueron llevados a cabo mediante sensores infrarrojos. Las características de estos sensores permiten el registro de actividad de los peces del tanque, pero las características del entorno pueden ser limitantes con la información registrada. La distancia de registro de los sensores varía con la turbidez del agua y aunque el sistema presentaba una gran transparencia es posible que existan diferencias en la cuantificación de un sensor en un tanque comparado con otro sensor en otro tanque. Aún así, los sensores permiten detectar tendencias. Se han observado picos de actividad en momentos concretos y gracias a los registros de video podemos observar que ocurría en el interior de los tanques en esos momentos. Así, mediante la observación de las filmaciones de video se pudo analizar la actividad de los peces en momentos concretos, obteniendo resultados similares a los proporcionados por los sensores, si no en cuanto a la cantidad de movimientos, si en el porcentaje relativo de éstos.

La información registrada en las filmaciones de video y mediante los sensores de movimiento indica que los ciclos diarios de actividad se mantuvieron en todos los tratamientos, presentando al menos dos picos uno a las 16:00h en el que se solapan dos eventos, la alimentación de los peces a las 15:00h y la desaparición de actividad humana en torno a los tanques y otro a las 8:00h coincidiendo con el encendido de la iluminación diurna (Fig.: 2-4). Hay diferencias entre los distintos tanques en cuanto a la cantidad de movimiento registrado por los sensores que, en algunos casos, puede atribuirse a las diferencias de sensibilidad provocada por las condiciones del agua. Se observan a su vez diferencias entre los datos en bruto registrados por los sensores, que no discriminan ni entre movimientos ni en el caso de un doble marcado (puede pertenecer a un mismo pez en un mismo movimiento) y los datos recopilados

en el análisis de actividad de los videos, en los que se obtienen resultados más fiables pero mucho más costosos de obtener.

En el tratamiento RA se observaron algunas diferencias frente a los otros tratamientos, aunque los picos de actividad se mantienen, los individuos en ese tratamiento presentaron algo más de actividad a lo largo de la noche, disminuyendo las diferencias entre los picos superior e inferior. Los tratamientos de Rb e IR presentaron un perfil muy similar al tratamiento control. Hay diferencias en cuanto a la cantidad de movimiento registrado por los sensores, que en algunos casos puede atribuirse a las diferencias de sensibilidad provocada por las condiciones del agua.

Una posible explicación al comportamiento observado en el tratamiento RA es que a ciertos niveles, la luz, (implicada en el establecimiento de los ciclos, aunque no es el único factor.) cuando es modificada provoca la modificación de los ciclos pero no se rompen. Por ejemplo, en condiciones de luz continua ha sido observado un cambio de 24h a 28 h en el ciclo circadiano de la lubina (*European seabass*) (Bayarri *et al.*, 2004a). Ya sea por factores exógenos o por factores endógenos, los ciclos permanecen (Sánchez Vázquez, 2010).

Además del análisis detallado de la actividad nocturna, los registros de video sirvieron para hacer el análisis de comportamientos de los peces. Los registros diurnos y nocturnos se estudiaron por separado, por un lado debido a la ausencia de datos del tanque control durante la noche (sin iluminación de ningún tipo) y por otro lado por su importancia para los análisis complementarios de melatonina. Los análisis de comportamiento y actividad deben ser considerados con precaución porque no fue posible separar el efecto tanque y el tratamiento de luz nocturna. Es posible que la perturbación recibida durante el día (8:00 - 16:00h) derivada de la jornada laboral, pudiera tener un efecto distinto en función del tanque y por lo tanto en el comportamiento. Sin embargo, todos los análisis fueron hechos fuera de periodo de trabajo para evitar el efecto de perturbación directa de los técnicos.

Los perfiles de comportamiento presentados por los grupos durante el día fueron complejos y no parecen tener relación con los tratamientos de luz

nocturna.

Así, durante el día cabe destacar los siguientes comportamientos:

1) "Apoyar la cabeza": con valores significativamente elevados en el tratamiento control, algo menores pero significativamente más altos en el tratamiento Rb, comparado con los valores perceptiblemente bajos en los tratamientos RA e IR.

2) Características compartidas en el comportamiento "persecuciones" (el otro comportamiento de interacción social) en el que se observaron valores similares entre los tratamientos Rb y C y no se produjo en los tratamientos RA e IR.

3) El comportamiento "Temblores", que aparece como respuesta al estrés o los sobresaltos, presentó valores significativamente más altos en el grupo IR mientras que en el grupo RA se produjo de forma significativamente mayor que en el grupo C y los valores en el tratamiento Rb fueron intermedios

4) Por último el comportamiento "Separarse", algo más ambiguo ya que aunque significa una respuesta de rechazo, se observa más como una respuesta a una posible interacción que como una reacción de estrés (a diferencia del temblor) es decir, valores muy bajos como en el tratamiento IR pueden venir asociados a un bajo nivel de interacciones sociales y valores altos como en el tratamiento Rb, pueden venir asociados a un elevado número de interacciones. Así, el comportamiento RA presenta similares valores del comportamiento "Separarse" que el tratamiento control pero este último presenta 4 veces más inicios o intentos de interacción que en el tratamiento RA.

Durante la noche observamos valores similares en el comportamiento "Apoyar la cabeza" entre los 3 tratamientos estudiados (salvo el Control que no es posible analizar) destacando una prevalencia en el tratamiento Rb en el que además es acompañado del comportamiento "Persecuciones" que no aparece en los otros dos.

El comportamiento temblor, aparece elevado en el tratamiento RA y muy similar en los tratamientos Rb e IR.

Sin embargo encontramos diferencias significativas en el comportamiento "separarse", más elevado en el tratamiento Rb. Si unimos el análisis de los cuatro comportamientos en el tratamiento Rb, podemos encontrar alguna

explicación a este fenómeno, ya que aunque el comportamiento “separarse”, aparece en mayor cantidad, también hay mas inicios de interacción “apoyar la cabeza” así como comportamiento “persecuciones”. Es decir, presentaron más rechazos de interacción pero como respuesta a más intentos. Interacciones iniciadas mediante “apoyar la cabeza” (como hemos dicho, es necesario un inicio de interacción para observar un comportamiento de rechazo), y menor cantidad de reacciones de sobresalto como son los temblores.

En resumen, durante la noche, el tratamiento RA presentó mas repeticiones del comportamiento “temblor” que los otros tratamientos, Rb, IR o C, lo que indicaba que los peces estaban aparentemente más estresados. Durante el día el tratamiento Rb presenta similitudes con el tratamiento control principalmente en lo que a comportamientos e interacciones sociales se refiere, mientras que entre los tratamientos IR y RA se aprecian similitudes en algunos aspectos, como un bajo nivel de inicio de interacciones (“apoyar la cabeza”), la ausencia del comportamiento “persecuciones” o un elevado número de “temblores”.

No se observaron diferencias significativas en los niveles de melatonina entre los grupos de peces o las fechas de muestreo. Por lo que para el análisis estadístico de los resultados se agruparon los datos obtenidos de melatonina por tratamiento sin detectar diferencias significativas durante el periodo diurno. Durante el periodo nocturno, se observaron diferencias significativas solo cuando se usaron fluorescentes. Así, el grupo RA presentó niveles de melatonina significativamente más altos que los tratamientos control sin luz nocturna e IR con luz infrarroja. Se observó, pues, un claro efecto de la máxima intensidad (tratamiento RA) de los fluorescentes sobre la amplitud de los valores de melatonina aunque no sobre su ritmo, de acuerdo con estudios previos llevados a cabo en otras especies como *Oncorhynchus mykiss* (Futter *et al.*, 2000) y *Salmo salar* (Porter *et al.*, 1999; Migaud *et al.*, 2007). Así los valores nocturnos de melatonina fueron mucho más bajos en los tratamientos IR y C y similares a los obtenidos en estudios realizados manteniendo lenguados en ciclos de luz continua (Oliveira *et al.*, 2007). El tratamiento Rb tuvo resultados intermedios de melatonina entre los encontrados en el tratamiento RA y los otros dos, sin mostrar diferencias significativas (Fig.: 2-7). Porter *et al.* (1999)

observaron una situación similar en el salmón al responder a la iluminación nocturna como si el periodo de iluminación correspondiera a días de 24 h, con una reducción de la maduración (6% de maduración comparado con el grupo control que presentó un 63% de maduración en el mismo periodo). Sin embargo, como ha sido observado en el presente estudio con lenguado senegalés (*S. senegalensis*), el salmón mantenía el ritmo circadiano de producción de melatonina, similar al control, aunque con valores menos reducidos durante la noche. Así, los valores obtenidos en el salmón (Porter *et al.*, 2001) y en el lenguado (presente estudio) indican que esta iluminación es a la vez detectada por los animales (produciéndose variaciones en la amplitud de los ritmos circadianos) como no detectada (no se produce supresión de los valores de melatonina).

En el lenguado diferentes longitudes de onda inhiben la producción de melatonina con exposiciones de luz puntuales (pulsos de luz blanca) de una hora de duración durante la noche (Bayarri *et al.*, 2002). Estos efectos lo producen longitudes de onda inferiores a 450 nm (violeta y ultravioleta) como en otras especies (*Dicentrarchus labrax* (Bayarri *et al.*, 2002), *Liza aurata* (Sánchez Hernández, 2008), *Salmo salar* (Migaud *et al.*, 2007) *Gadus morhua* (Kristoffersen *et al.*, 2006)) o bien iluminación blanca (como en *Oreochromis niloticus* (Volpato *et al.*, 2001) con todo el espectro. Longitudes de onda superiores a 700 nm, rojo profundo e infrarrojo no modifican la producción de melatonina (Oliveira *et al.*, 2007) en *Solea senegalensis*. Por esta razón, se seleccionó la luz roja como objeto de nuestro trabajo.

No se observa un efecto significativo del tratamiento Rb sobre la actividad, el comportamiento o la melatonina del animal mas allá de los cambios que puede provocar una noche de luna llena (Oliveira *et al.*, 2007). Es posible que exista una percepción de esta luz dentro de los valores razonables de variación. La actividad de los peces sigue los patrones observados en el grupo control y el tipo de comportamiento es básicamente social. No hay mayor porcentaje de respuestas negativas a la interacción. Sería interesante estudiar ciclos de actividad a largo plazo, circanuales y comprobar si son modificados.

## 2.5. Conclusiones.

Los resultados de este estudio indican la viabilidad del uso de la luz Rb en el estudio del comportamiento del lenguado senegalés sin que ello suponga una intrusión en su actividad normal. Una intensidad de 5 lux de luz roja profunda (>700nm) en la superficie del tanque, es suficiente para que la actividad de los peces quede registrada en el sistema de grabación con la suficiente claridad y calidad en el detalle y definición para poder realizar un análisis posterior de dicha actividad.

Aunque la iluminación más deseable sería la infrarroja debido a su nulo efecto sobre la melatonina, el tratamiento de luz roja de baja intensidad (Rb) no provocó ningún problema en los individuos ni a nivel fisiológico ni a nivel de comportamiento. Todo ello, además se une al coste de iluminación, así se necesitarían 4 focos infrarrojos para iluminar adecuadamente un tanque de 2m<sup>3</sup>, las luces infrarrojas cuestan 300 € la unidad lo que hace que su coste sea prohibitivo. Los fluorescentes tienen un coste inferior a 25 euros la unidad, necesitando uno solo para iluminar un tanque y en una intensidad mínima.

**Bibliografía:**

- Albert, O. T., Harbitz, A. & Hoines, A. S. (2003). Greenland Halibut Observed by Video in Front of Survey Trawl: Behaviour, Escapement, and Spatial Pattern. *Journal of Sea Research* **50**, 117-127.
- Alonso-Gómez, A. L., Valenciano, A. I., Alonso-Bedate, M. & Delgado, M. J. (1995). Differential Characteristics and Regulation of Arylamine and Arylalkylamine N-Acetyltransferases in the Frog Retina (*Rana perezi*). *Neurochemistry International* **26**, 223-231.
- Arnold, G. P. & Nuttall-Smith, P. B. N. (1974). Shadow Cinematography of Fish Larvae. *Marine Biology* **28**, 51-53.
- Batty, R. S. (1983). Observation of Fish Larvae in the Dark with Television and Infra-Red Illumination. *Marine Biology* **76**, 105-107.
- Bayarri, M. J., Garcia-Allegue, R., Lopez-Olmeda, J., Madrid, J. & Sanchez-Vazquez, F. (2004a). Circadian Melatonin Release in Vitro by European Sea Bass Pineal. *Fish Physiology and Biochemistry* **30**, 87-89.
- Bayarri, M. J., Madrid, J. A. & Sánchez-Vázquez, F. J. (2002). Influence of Light Intensity, Spectrum and Orientation on Sea Bass Plasma and Ocular Melatonin. *Journal of Pineal Research* **32**, 34-40.
- Bayarri, M. J., Muñoz-Cueto, J. A., López-Olmeda, J. F., Vera, L. M., Rol de Lama, M. A., Madrid, J. A. & Sánchez-Vázquez, F. J. (2004b). Daily Locomotor Activity and Melatonin Rhythms in Senegal Sole (*Solea senegalensis*). *Physiology & Behavior* **81**, 577-583.
- Bayarri, M. J., Rodriguez, L., Zanuy, S., Madrid, J. A., Sanchez-Vazquez, F. J., Kagawa, H., Okuzawa, K. & Carrillo, M. (2004c). Effect of Photoperiod Manipulation on the Daily Rhythms of Melatonin and Reproductive Hormones in Caged European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **136**, 72-81.
- Baynes, S. M., Howell, B. R., Beard, T. W. & Hallam, J. D. (1994). A Description of Spawning Behaviour of Captive Dover Sole, *Solea solea* (L.). *Netherlands Journal of Sea Research* **32(3/4)**, 271-275.
- Björnsson, B. T., Halldórsson, Ó., Haux, C., Norberg, B. & Brown, C. L. (1998). Photoperiod Control of Sexual Maturation of the Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): Plasma Thyroid Hormone and Calcium Levels. *Aquaculture* **166**, 117-140.
- Boeuf, G. & Le Bail, P.-Y. (1999). Does Light Have an Influence on Fish Growth? *Aquaculture* **177**, 129-152.
- Bromage, N. R., Porter, M. & Randall, C. (2001). The Environmental Regulation of Maturation in Farmed Finfish with Special Reference to the Role of Photoperiod and Melatonin. *Aquaculture* **197**, 63-98.
- Browman, H. I., Novales-Flamarique, I. & Hawryshyn, C. W. (1994). Ultraviolet Photoreception Contributes to Prey Search Behaviour in Two Species of Zooplanktivorous Fishes. *Journal . exp. Biol.* , **186**, 187- 198.

- Campbell, N. A., Reece, J. B. & Mitchell, L. G. (1999). *Biology*.
- Collin, J., Voisin, P., Falcón, J., Faure, J., Brisson, P. & Defaye, J. (1989). Pineal Transducers in the Course of Evolution: Molecular Organization, Rhythmic Metabolic Activity and Role. *Arch Histol Cytol* **52**, 441-449.
- Craig, W. (1918). Appetites and Aversions as Constituents of Instincts. *Biological Bulletin* **34**, 91-107.
- Denton, E. J. (1990). Light and Vision at Depths Greater Than 200 Meters. *Light and Life in the Sea*, 127-148.
- Duncan, N. J. & Bromage, N. (1998). The Effect of Different Periods of Constant Short Days on Smoltification in Juvenile Atlantic Salmon (*Salmo Salar*). *Aquaculture* **168**, 369-386.
- Duncan, N. J., Thrush, M. A., Elliott, J. A. K. & Bromage, N. R. (2002). Seawater Growth and Maturation of Atlantic Salmon (*Salmo Solar*) Transferred to Sea at Different Times During the Year. *Aquaculture* **213**, 293-309.
- Durieux, E. D. H., Le Duigou, M., Millot, S., Sasal, P. & Begout, M.-L. (2010). Sedentary Behaviour Establishment in O-Group Common Sole *Solea Solea*: A Laboratory Video-Tracking Study. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **90**, 1257-1262.
- Duston, J. & Saunders, R. L. (1992). Effect of 6-Month, 12-Month, and 18-Month Photoperiod Cycles on Smolting and Sexual-Maturation in Juvenile Atlantic Salmon (*Salmo Salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **49**, 2273-2280.
- Falcón, J., Besseau, L., Sauzet, S. & Boeuf, G. (2007). Melatonin Effects on the Hypothalamo-Pituitary Axis in Fish. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* **18 No.2**.
- Falcon, J., Migaud, H., Munoz-Cueto, J. A. & Carrillo, M. (2010). Current Knowledge on the Melatonin System in Teleost Fish. *General and Comparative Endocrinology* **165**, 469-482.
- Faleiro, F., Narciso, L. & Vicente, L. (2008). Seahorse Behaviour and Aquaculture: How to Improve Hippocampus Guttulatus Husbandry and Reproduction? *Aquaculture* **282**, 33-40.
- Futter, C., Roed, A., Porter, M., Randall, C. & Bromage, N. (2000). The Effects of Differential Light Intensities on the Diel Rhythm of Melatonin Release in Rainbow Trout. *Reproductive Physiology of Fish.*, 340.
- García-López, A., Pascual, E., Sarasquete, C. & Martínez-Rodríguez, G. (2006). Disruption of Gonadal Maturation in Cultured Senegalese Sole *Solea Senegalensis* Kaup by Continuous Light and/or Constant Temperature Regimes. *Aquaculture* **261**, 789-798.
- Goldman, B. D. (2001). Mammalian Photoperiodic System: Formal Properties and Neuroendocrine Mechanisms of Photoperiodic Time Measurement. *Journal of Biological Rhythms* **16**, 283-301.
- Iigo, M., Abe, T., Kambayashi, S., Oikawa, K., Masuda, T., Mizusawa, K., Kitamura, S., Azuma, T., Takagi, Y., Aida, K. & Yanagisawa, T. (2006). Lack of Circadian Regulation of in Vitro Melatonin Release from the Pineal Organ of Salmonid Teleosts. *General and Comparative Endocrinology* **154**, 91-97.

- Iigo, M., Hara, M., Ohtani-Kaneko, R., Hirata, K., Tabata, M. & Aida, K. (1997). Photic and Circadian Regulations of Melatonin Rhythms in Fishes. *Biological Signals* **6**, 225-232.
- Ingolfsson, O. A. & Jorgensen, T. (2006). Escapement of Gadoid Fish beneath a Commercial Bottom Trawl: Relevance to the Overall Trawl Selectivity. *fisheries research* **79**, 303-312.
- Jamieson, A. J., Godo, O. R., Bagley, P. M., Partridge, J. C. & Priede, I. G. (2006). Illumination of Trawl Gear by Mechanically Stimulated Bioluminescence. *fisheries research* **81**, 276-282.
- Kristoffersen, C., Karlsen, O., Hansen, T., Kristiansen, T., Fosseidengen, J. & Taranger, G. (2006). Sexual Maturation in Farmed Cod. *Fisken og Havet, Saernummer [Fisken Havet Saernummer]* **2**, 141-142.
- Marchesan, M., Spoto, M., Verginella, L. & Ferrero, E. A. (2005). Behavioural Effects of Artificial Light on Fish Species of Commercial Interest. *fisheries research* **73**, 171-185.
- Marín-Galvín, R. (2003). *Fisicoquímica Y Microbiología De Los Medios Acuáticos*. MADRID.
- Migaud, H., Cowan, M., Taylor, J. & Ferguson, H. W. (2007). The Effect of Spectral Composition and Light Intensity on Melatonin, Stress and Retinal Damage in Post-Smolt Atlantic Salmon, *Salmo Salar*. *Aquaculture* **270**, 390-404.
- Montgomery, J. & Pankhurst, N. W. (1997). Sensory Physiology. In *Deep-Sea Fishes* (Press, A., ed.), p. 378. San Diego, California: Academic Press.
- Moran, D., Smith, C. K., Gara, B. & Poortenaar, C. W. (2007). Reproductive Behaviour and Early Development in Yellowtail Kingfish (*Seriola Lalandi Valenciennes 1833*). *Aquaculture* **262**, 95-104.
- Oliveira, C., García, E. M., Lopez-Olmeda, J. F. & Sánchez-Vázquez, F. J. (2009). Daily and Circadian Melatonin Release in Vitro by the Pineal Organ of Two Nocturnal Teleost Species: Senegal Sole (*Solea Senegalensis*) and Tench (*Tinca Tinca*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* **153**, 6.
- Oliveira, C., Lopez-Olmeda, J. F., Delgado, M. J., Alonso-Gómez, A. L. & Sánchez-Vázquez, F. J. (2008a). Melatonin Binding Sites in Senegal Sole: Day/Night Changes in Density and Location in Different Regions of the Brain. *Chronobiology International* **25**, 645-652.
- Oliveira, C., Ortega, A., Lopez-Olmeda, J. F., Vera, L. M. & Sanchez-Vazquez, F. J. (2007). Influence of Constant Light and Darkness, Light Intensity, and Light Spectrum on Plasma Melatonin Rhythms in Senegal Sole. *Chronobiology International* **24**, 615-627.
- Oliveira, C., Vera, L. M., Lopez-Olmeda, J. F., Guzman, J. M., Mañanós, E., Ramos, J. & Sánchez-Vázquez, F. J. (2008b). Monthly Day/Night Changes and Seasonal Daily Rhythms of Sexual Steroids in Senegal Sole (*Solea Senegalensis*) under Natural Fluctuating or Controlled Environmental Conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology* **152 Part. A**, 8.
- Pitcher, T. J.; & Parrish, J. K. (1993). Functions of Shoaling Behaviour in Teleosts.
- Porter, M. J. R., Duncan, N., Handeland, S. O., Stefansson, S. O. & Bromage, N. R. (2001). Temperature, Light Intensity and Plasma Melatonin Levels in Juvenile Atlantic Salmon. *Journal of Fish Biology* **58**, 431-438.

- Porter, M. J. R., Duncan, N. J., Mitchell, D. & Bromage, N. R. (1999). The Use of Cage Lighting to Reduce Plasma Melatonin in Atlantic Salmon *Salmo Salar* / and Its Effects on the Inhibition of Grilising. *Aquaculture* **176**, 237-244.
- Queirolo, D., Montenegro, I., Gaete, E. & Plaza, G. (2010). Direct Observation of Chilean Hake (*Merluccius Gayi Gayi*) Behaviour in Response to Trawling in a South Central Chilean Fishery. *fisheries research* **102**, 327-329.
- Reiter, R. (1993). The Melatonin Rhythm: Both a Clock and a Calendar. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **49**, 654-664.
- Sánchez Hernández, S. (2008). Efecto Del Color De La Luz Artificial En *Liza Aurata* (Pisces: Mugilidae). *Anales Universitarios de Etología* **2**, 87-91.
- Sánchez Vázquez, F. J. (2010). Regulation of Appetite. *Aquaculture and Behaviour*, 1-12.
- Thrush, M. A., Duncan, N. J. & Bromage, N. R. (1994). The Use of Photoperiod in the Production of out-of-Season Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) Smolts. *Aquaculture* **121**, 29-44.
- Uz, T., M., A., R., A. & H., M. (2003). The Pineal Gland Is Critical for Circadian Periodic Expression in the Striatum and for Circadian Cocaine Sensitization in Mice. *Neuropsychopharmacology* **28 (12)**, 2117-2123.
- Vera, L. M., Lopez-Olmeda, J. F., Bayarri, M. J., Madrid, J. A. & Sanchez-Vazquez, F. J. (2005). Influence of Light Intensity on Plasma Melatonin and Locomotor Activity Rhythms in Tench. *Chronobiology International* **22**, 67-78.
- Vera, L. M., Madrid, J. A. & Sanchez-Vazquez, F. J. (2006). Locomotor, Feeding and Melatonin Daily Rhythms in Sharpshout Seabream (*Diplodus Puntazzo*). *Physiology & Behavior* **88**, 167-172.
- Volpato, G. L. & Barreto, R. E. (2001). Environmental Blue Light Prevents Stress in the Fish Nile Tilapia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **34**, 1041-1045.
- Weinberg, K. L. & Munro, P. T. (1999). The Effect of Artificial Light on Escapement beneath a Survey Trawl. *ICES Journal of Marine Science* **56**, 266-274.
- Wozniak, B. & Dera, J., eds. (2007). *Light Absorption in Seawater*. Springer.



## Capítulo 3

---

### **3. Estudio del comportamiento reproductivo del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) de origen salvaje y G1, mantenido en cautividad.**

#### **3.1. Introducción:**

##### 3.1.1. Etología y estudio del comportamiento

La etología o estudio del comportamiento animal ha sido poco desarrollado en muchas especies, sobre todo en peces. Tradicionalmente el comportamiento animal ha sido estudiado desde diferentes puntos de vista. Es complementaria a otras ramas de la ciencia; es decir, puesto que a la etología le importa la conducta tal como la emite un animal vivo en su contexto natural, no basta con describir las reacciones motoras o los cambios fisiológicos tal como aparecen sino también el contexto en el que ocurren y sobre todo la función biológica que cumplen. Los etólogos estudian el comportamiento y organizan su descripción en un etograma para entender los mecanismos y las causas que producen secuencias innatas repetidas de comportamiento y las motivaciones por las cuales los animales se comportan de la forma en que lo hacen.

Las primeras aproximaciones a un etograma las encontramos en observaciones de “Leroy, C.G.” (1723/1789), cuyos trabajos fueron recopilados por Thorpe, (1982) en su breve historia de la etología. En el siglo pasado Konrad Lorenz, en sus estudios de los instintos y los comportamientos innatos (Lorenz, 1950), y Nikolaas Tinbergen, con su “objetivos y métodos de la etología” (Tinbergen, 1963), considerados como los padres de la etología moderna, catalogaron el comportamiento de numerosos animales en su medio ambiente natural y desarrollaron los primeros etogramas. Un etograma es una lista completa de todas las conductas que un animal despliega en su entorno natural y que incluye tanto los comportamientos innatos como los adquiridos. Fantino y Logan (1979), mencionan que el etograma es una herramienta experimental que refleja ciertos aspectos específicos de la etología como disciplina. Lo definen

como el catálogo o la descripción detallada y completa del comportamiento de un organismo en su estado natural. Martin y Bateson (1993) lo definen como "un catálogo de descripciones de patrones de comportamientos discretos, típicos de las especie-objeto, que forman el repertorio comportamental básico de la especie". Los etogramas se han utilizado en diversos ámbitos, comenzando por el estudio básico del comportamiento de diferentes especies salvajes como pueden ser los pájaros; estudios evolutivos para comparar los cambios de comportamiento en especies próximas o en un ámbito más cercano a la actividad humana, en especies domesticadas como el cerdo, el caballo o el perro. En estas especies ha resultado ser de gran relevancia ya que pueden predecirse problemas de todo tipo, incluyendo infecciones o enfermedades, sin el sacrificio del animal, evitar comportamientos anormales (canibalismo, agresividad) que pondrían en peligro la producción o en el caso de las mascotas con una mayor cercanía al ser humano, evitar accidentes o contagios innecesarios.

El estudio del comportamiento de los peces presentaba una dificultad añadida por la complicación que supone para el ser humano observar el comportamiento de un animal en el medio acuático. Así, mientras las primeras observaciones del comportamiento concreto de animales terrestres datan de los siglos XVI-XVII, algunas de las primeras observaciones del comportamiento de peces datan de finales del siglo XIX. En la primera mitad del siglo XX comenzaron a realizarse ciertas descripciones del comportamiento de los peces, particularmente sobre el comportamiento gregario o schooling (Parr, 1931; Breder y Halpern, 1946; Breder y Rasquin, 1947; Morrow, 1948), diferencias de comportamiento con el dimorfismo sexual, diferencias de comportamiento con variaciones en la temperatura (Breder, 1937) y observaciones relacionadas con el uso de acuarios (Brind, 1931) en las que comienzan a ser descritos ciertos comportamientos reproductivos (Raney, 1947).

Muchos de los trabajos de estos primeros años se refieren a especies de agua dulce (Weisel, 1947; Aronson y Holztucker, 1949) principalmente debido a que son más fáciles de cultivar y observar. En torno a los años 50 comienza una

proliferación de estudios de comportamiento de peces, con el uso de acuarios y de nuevas especies como el espinoso (*Gasterosteus aculeatus* L.) (Tinbergen y Vaniersel, 1948) o el pez rojo (*Carassius auratus auratus*) utilizadas como especies modelo. Sus particulares características los convirtieron en animales de fácil manejo y obtención, siendo aprovechados en trabajos sobre comportamiento (Ingle, 1965) para el estudio de los peces en general.

### 3.1.2. El comportamiento reproductivo en peces planos

Las primeras descripciones del comportamiento reproductivo de un pez plano fueron realizadas por Butler (1895) en la que describe una aproximación sobre la reproducción del lenguado común (*S. solea*) y Breder (1922) que hace una descripción del comportamiento reproductivo de la solla roja (*Pseudopleuronectes americanus*). La descripción hecha por Butler (1985) que indica una liberación de huevos por parte de la hembra situada en el fondo del taque, fue posteriormente refutada por Horwood (1993) y finalmente por Baynes *et al.* (1994) con la descripción del cortejo de *S. Solea*, en él se describe como el macho se sitúa bajo la hembra, nadando juntos en sincronía hacia la superficie, con los poros genitales lo más juntos posible hacia la superficie. Otras descripciones del comportamiento reproductivo de distintas especies de peces planos, lenguado ocelado (*Bothus lunatus*) (Konstantinou y Shen, 1995), *Bothus ellipticus* (Konstantinou y Shen, 1995), lenguado de charco (*Bothus ocellatus*) (Konstantinou y Shen, 1995), *Tarphops oligolepis* (Manabe y Shinomiya, 2001), pedas (*Bothus podas*) (Carvalho *et al.*, 2003) y *Rhombosolea tapirina* (Pankhurst y Fitzgibbon, 2005) comparten en rasgos generales la necesidad de nadar en pareja (macho-hembra) juntos separándose del fondo, sincronizando movimientos y manteniendo los poros genitales muy juntos, optimizando así la mezcla de los gametos liberados por ambos sexos de forma similar a lo descrito por Baynes, *et al.*, (1994) para *S. solea*. Sin embargo las especies anteriormente citadas también presentan diferencias, por ejemplo en cuanto a la formación de la pareja para la puesta, ya que pueden incluir la formación de un de harén con un macho y varias hembras en su territorio, como

se da en el pedas (*Bothus podas*) (Carvalho et al., 2003) la existencia de machos territoriales y varias hembras asociadas, observado en el lenguado de charco (*Bothus ocellatus*), el lenguado ocelado (*Bothus lunatus*) y *Bothus ellipticus* (Konstantinou y Shen, 1995) o el apareamiento promiscuo en el que las hembras pueden permanecer en el territorio de uno u otro macho indistintamente y aparearse con el macho seleccionado observado en *Tarphops oligolepis* (Manabe y Shinomiya, 2001).

El lenguado senegalés (*S. senegalensis*) presenta una disfunción reproductiva en la generación G1, nacida y criada en cautividad, a diferencia del lenguado senegalés capturado en el medio marino y trasladado a condiciones de cautividad que sí presenta puestas con las características adecuadas en cuanto a calidad y cantidad para la industria acuícola (Dinis, 1986; Dinis et al., 1999; Ánguis y Cañavate, 2005; Howell et al., 2011). El lenguado senegalés de la primera generación (G1) presenta puestas infrecuentes de pobre calidad y sin eclosión. Ha habido contadas excepciones en cuanto a puestas de los peces G1, así se han descrito 2 casos en Santander y Cádiz, en los que se recogieron puestas espontáneas, incontroladas e inexplicadas de las que se obtuvieron segundas generaciones (G2) (com. pers., Dr. Pedro Cañavate, IFAPA, El Toruño, Cádiz y Dra. Olvido Chereguini, El Bocal, IEO Santander). En el IATS (Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, CSIC, Castellón) también se obtuvo una puesta de huevos de generación G2 en el transcurso de un experimento (Guzmán, et al., 2011) de inducción hormonal de lenguados G1. Las hembras fueron inducidas con un implante doble de GnRH $\alpha$  y a los machos con inyecciones de hCG, sin embargo, solo se obtuvo una puesta fecundada de un total de 60 puestas a lo largo del experimento. Es un resultado que no ha vuelto a suceder, ni se ha podido repetir hasta el momento (com. pers., Dr. Evaristo Mañanos, IATS-CSIC, Torre de la Sal, Castellón) por lo que los individuos G1 no pueden ser considerados como una fuente de huevos viables para la industria acuícola.

Esto tipo de disfunción reproductiva también se han citado en otros peces planos como el rodaballo (*Scophthalmus máximus*, L.) (Flüchter, 1972;

Devauchelle *et al.*, 1988). Estas disfunciones han sido superadas con diferentes técnicas, como por ejemplo en el rodaballo (tanto salvaje como en las sucesivas generaciones) en el que se modificó el fotoperiodo y la temperatura (Devauchelle *et al.*, 1988) para provocar la maduración, también practicando inducciones con hormonas exógenas (Flüchter, 1972) y mediante presión abdominal a fin de extraer manualmente los gametos. Sin embargo en el lenguado senegalés procedente de cultivo (G1) y mantenido en idénticas condiciones a las aplicadas en lenguados salvajes, (que sí presentan puestas fertilizadas) y tras modificaciones de temperatura y fotoperiodo, o tras las inducción hormonal aún persisten las dificultades y no se obtienen puestas. Parece que el lenguado senegalés (G1) presenta una disfunción reproductiva tipo 3, con componentes sociales (Capítulo 1) por lo que se estudio en el presente capítulo el comportamiento del lenguado senegalés en el contexto específico del comportamiento reproductivo y el cortejo. Se describió el comportamiento reproductivo, el cortejo y los comportamientos que lo forman así como los comportamientos más destacados relacionados con este. Se observó los comportamientos en diferentes grupos de lenguados, lenguados salvajes, lenguados G1 y mezclas de lenguados salvajes y de G1. De los diferentes grupos, se ha valorado el éxito en el cortejo en relación a la puesta y los comportamientos observados y descritos.

## 3.2. Material y métodos

### 3.2.1. Estabulación de peces y recogida de puestas

Para el estudio se utilizaron 5 grupos diferentes de peces dos de ellos con animales salvajes capturados por pescadores y mantenidos en las instalaciones del Instituto Español de Oceanografía (IEO, planta de cultivos “el Bocal”, Santander), durante los 5 años previos a su estudio. Ambos presentaban puestas espontáneas durante la época de reproducción. El tercer grupo estaba formado por animales G1. El cuarto y quinto grupo, fueron una mezcla de animales salvajes y animales G1. Los grupos estaban compuestos por:

1º: 29 peces (14 hembras y 15 machos) salvajes de 6 años de edad y con un peso medio de  $1,688 \pm 0,1\text{Kg}$  procedentes de Huelva y estabulados en el IEO de Santander en un tanque rectangular ( $2,5\text{m} \times 5,6 \text{ m} \times 1,4\text{m}$ ) de fibra de vidrio de  $14 \text{ m}^3$  de capacidad (biomasa total de  $48,94 \text{ Kg}$  o de  $3,5 \text{ Kg/m}^3$ ) con circuito abierto. El estudio se llevó a cabo del 7 al 23 de Mayo de 2008.

2º: 21 peces (10 hembras y 11 machos) salvajes de 8 años de edad y con un peso medio de  $1,541 \pm 0,1\text{Kg}$  procedentes de Huelva y estabulados en el IEO de Santander en un tanque rectangular ( $2,5\text{m} \times 5,6 \text{ m} \times 1,4\text{m}$ ) de fibra de vidrio de  $14 \text{ m}^3$  de capacidad, (biomasa total de  $32,36 \text{ kg}$  o de  $2,31 \text{ Kg.m}^{-3}$ ). Con circuito abierto y cuyo estudio se llevo a cabo del 1 al 17 de Abril del año 2009.

3º: 16 peces (8 hembras y 8 machos), animales G1 obtenidos y mantenidos en Santander durante 5 años y con un peso medio de  $1,415 \pm 0,07\text{Kg}$  (biomasa total de  $22,647 \text{ kg}$ ) con circuito abierto . El estudio se realizó del 18 de abril al 7 de mayo del 2009.

4º: Grupo mezcla 1, de hembras salvajes de los tanques de reproductores y machos G1 y G2. Las 3 hembras seleccionadas de 7 años de edad, provenían de tanques con puestas durante los años anteriores y fueron capturados en el Cantábrico. Los 2 machos G1 con 5 años de edad, fueron obtenidos y criados en las instalaciones de Santander, al igual que los 3 machos G2 de 4 años de edad. En total los 8 animales tenían con un peso medio de  $1,260 \pm 0,25\text{Kg}$  y una carga

total del tanque de 10,07 kg. El grupo fue formado a mediados de abril del año 2010

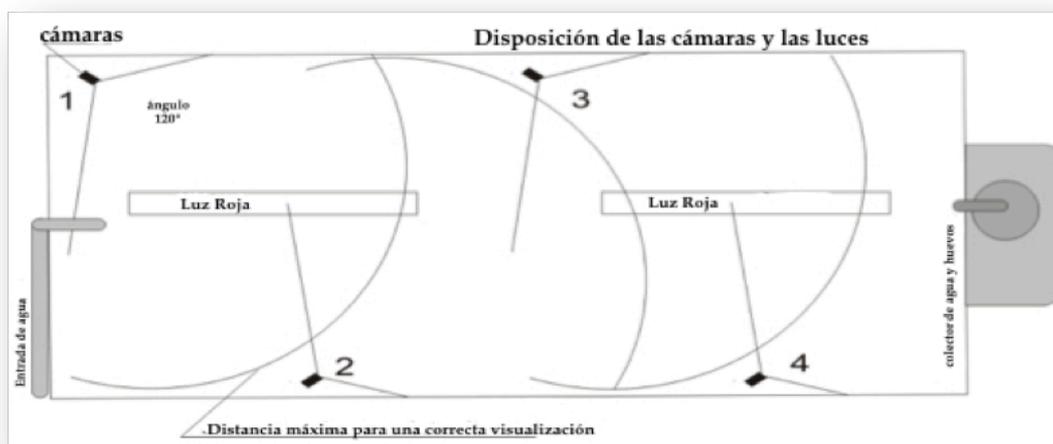
5º: Grupo mezcla 2, formado por 4 hembras G1, de 6 años de edad y 6 hembras G2 de 4 años de edad. Eran animales provenientes de puestas de Santander y criados en las instalaciones de la planta de cultivos “el Bocal”. Los 7 machos eran animales salvajes 3 procedentes del Cantábrico y 4 de Cádiz recolectados de los tanques de reproductores. El peso medio de los animales era de  $1,215 \pm 0,29$  Kg y la carga total del tanque fue de 20,64 kg. El grupo se formó a mediados de abril de 2010.

Los grupos 3, 4 y 5 (estos dos últimos fueron los grupos mezcla), fueron estabulados en tanques circulares troncocónicos de 7,5 m<sup>3</sup> con circuito abierto.

En el dispositivo de salida del agua se instaló un colector de huevos de superficie, por el que se filtraba toda el agua que es eliminada del tanque. Cada día a las 8 de la mañana el colector de huevos fue revisado para detectar la presencia de huevos, estos fueron recogidos y los siguientes datos registrados: volumen total de huevos, grado de desarrollo y porcentaje de huevos fecundados. La temperatura del sistema se varió siguiendo un ciclo semanal de tal manera que los lunes la temperatura del agua se programó en 16 °C, y los jueves se estabilizó en 18°C. El fotoperiodo fue de 16 horas de luz, (08:00 h hasta 00:00h) con una iluminación de la sala mediante fluorescentes de luz blanca, atenuada mediante rafia que cubriendo la superficie del tanque. Durante la noche, el tanque (cubierto por rafias) estaba iluminado con 2 fluorescentes de 58W, cubiertos con un filtro rojo supergel ROSCO que permite el paso de la radiación infrarroja y de rojo profundo >720nm pero impide el paso de las de menor longitud de onda. Los peces fueron alimentados a saciedad cinco días a la semana con mejillón y los dos días restantes con calamar troceado uno de los días mezclado con poliquetos.

### 3.2.2. Estudio del comportamiento

El estudio del comportamiento presentó tres fases de desarrollo, la grabación del comportamiento, el estudio y descripción de los datos obtenidos y la aplicación de estas descripciones en el estudio de los otros grupos. El estudio se

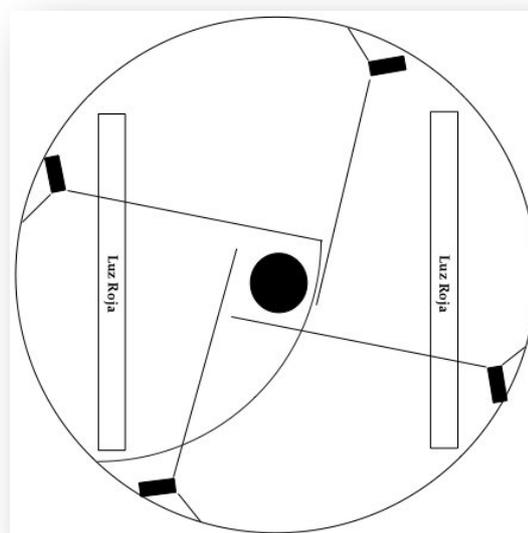


**Figura 3-1** Distribución luces y cámaras, tanque rectangular y tanque circular.

llevó a cabo entre los días 15 y 23 de mayo de 2008 durante 24 horas al día. Para grabar el comportamiento de los peces se colocaron 4 cámaras subacuáticas (F60B/NIR580-50G, Praesentis, S.L., Barcelona) en el tanque. Las cámaras se situaron cerca de la superficie y, enfocadas hacia el fondo. Se distribuyeron de forma seriada de tal manera que, comenzando por la entrada de agua:

*Cámara 1* se instaló en el extremo inicial de la pared izquierda del tanque. Debido a la orientación y a los grados de visión de la cámara se perdía el 4% del total de visión del tanque.

*Cámara 2* situada en la pared derecha del tanque a 1,5m del extremo inicial.



**Figura 3-2** Disposición de cámaras y luces en tanque troncocónico

*Cámara 3* situada en la pared izquierda del tanque a 3m del extremo inicial.

*Cámara 4* situada en la pared derecha del tanque a 4,5m del extremo inicial.

Con esta disposición de las cámaras se logró capturar aproximadamente el 96% de la totalidad del tanque. La información fue grabada y almacenada en una grabadora digital de cuatro entradas (UCDI DV41-50 Praesentis, S.L., Barcelona).

Se analizaron los videos del comportamiento de dos formas:

1) Análisis objetivo: para cuantificar la actividad de los peces.

2) Análisis descriptivo:

a) Una descripción subjetiva del comportamiento reproductivo.

b) Una descripción de los comportamientos observados divididos en acciones individuales y organizadas en un etograma para cuantificar las descripciones del comportamiento.

1) Para cuantificar la actividad de los peces se contó el número de veces que los peces pasaron a través de una línea dibujada en el campo de observación de cada cámara, a modo de sensores situados en la posición indicada, que no discriminarían si el movimiento es de un pez o de otro. En los grupos con puesta se analizó la actividad observando las cuatro cámaras durante los días en que se recogieron puestas en el tanque. Además se analizaron 5 días en los que no hubo puesta en estos grupos. En los tanques sin puesta se analizaron 5 días seleccionados aleatoriamente.

2) De varias visualizaciones se recogió información acerca de los diferentes comportamientos observados. Se dividieron los comportamientos en acciones y se organizaron las descripciones de cada acción en un etograma. Se anotó el sexo de los peces involucrados en cada acción cuando fue posible y la hora en que cada acción fue observada.

A partir de las visualizaciones, se realizó una descripción subjetiva del

comportamiento reproductivo durante el periodo anterior a cada puesta observada; definiendo actos y comportamientos específicos, así como su secuencia y valorando su importancia en ese flujo de comportamientos que concluye en la puesta.

El análisis cuantitativo del comportamiento de los diferentes grupos de peces se llevó a cabo registrando todos los comportamientos observados durante un periodo de media hora en el pico de máxima actividad (18:00 a 22:00 h). En los grupos sin un pico de actividad clara (grupo G1) se analizó el mismo periodo analizado en los salvajes durante noches con puesta. En total se analizaron 5 noches con puesta (es decir 5 periodos de media hora, uno por noche) y 5 noches sin puesta del grupo salvaje, todas las noches con liberación de huevos del grupo G1, y las 3 noches con puesta del grupo mezcla de machos salvajes con hembras G1.

Los datos recogidos por el observador se consideran completos cuando el aumento de registros no cambia la secuencia descrita, la proporción o el valor de cada parte. Se considera entonces que esta lista es un etograma, es decir, la descripción fragmentada y detallada de las conductas de la especie. "Etograma o Repertorio conductual: conjunto de todas las unidades de conducta posibles de un organismo en su entorno natural" (Peláez del Hierro y Veà Baró, 1997)

Los comportamientos fueron clasificados de forma genérica según el movimiento principal del comportamiento (ej. natación, temblor) y su función, para lo cual se distribuyeron inicialmente en comportamientos apetitivos (ej. comer, aparearse, natación acoplada) y comportamientos aversivos (ej. respuesta de evitación o miedo, ej. temblor) y una conducta o comportamiento neutro en el que la acción sirve en ambas categorías o forma parte de una compleja secuencia de acciones (Craig, 1918).

### Análisis Estadístico

Todas las medias se presentan con el error estándar ( $\pm$  SE). Los datos fueron analizados con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y se verificó que presentaban

una distribución normal. Se compararon perfiles de comportamientos de diferentes grupos de peces con el prueba de Chi cuadrado ( $P < 0.05$ ). El análisis de la actividad se llevó a cabo mediante una descripción de los perfiles de actividad diaria (Bayarri *et al.*, 2004). Se utilizó el programa de análisis Sigma Stat (Systat Software Inc., Germany) para el análisis estadístico

### 3.3. Resultados

#### 3.3.1. Puestas recogidas

A) Grupo de animales salvajes, 2008: de los colectores de huevos se recogieron un total de 6 puestas con un volumen medio de 307,85 ml de huevo no flotante (no viable) más huevo flotante (viable) y una fecundación media del 91,38%. Dos de los días presentaban huevos en muy diferente estadio, con diferencias entre los estadios del orden de 3 a 5 horas, lo cual indicó que hubo dos puestas por tanque durante la noche, previendo por tanto la observación de 8 cortejos.

B) Grupo de animales salvajes, 2009: de los colectores de huevos se recogieron un total de 4 puestas con un volumen medio de 187,85 ml y una fecundación media del 87%. Fueron observados 4 cortejos. A su vez, otros 3 días hubo recogida de huevos en los colectores, sin embargo, todo el volumen era de huevo no flotante y en la revisión de los videos no se observó la composición de ninguna pareja.

C) Grupo de animales G1, 2009: se recogieron 4 puestas con un volumen medio de 127,50 ml y un 19,61% de huevo flotante, la fecundación fue del 0%. En la revisión de los videos no se observó la formación de ninguna pareja.

D) Grupo de animales mezcla: Hembras Salvajes - Machos G1: Abril-Mayo 2010: No se recogieron puestas fertilizadas en ningún momento, desde su formación hasta Octubre del 2010, mucho después de terminar el periodo de observación. Durante el periodo de observación se recogió huevo flotante en dos ocasiones, fueron huevos no fecundados y en muy baja cantidad (50 ml entre las dos liberaciones). Se observaron 2 veces subidas a la superficie del agua por parte de hembras solitarias y aunque no pudo observarse la liberación de huevos, la mañana siguiente a este hecho se recogieron huevos sin fecundación 144 ml de los que el 42% pertenecía a la fracción no flotante.

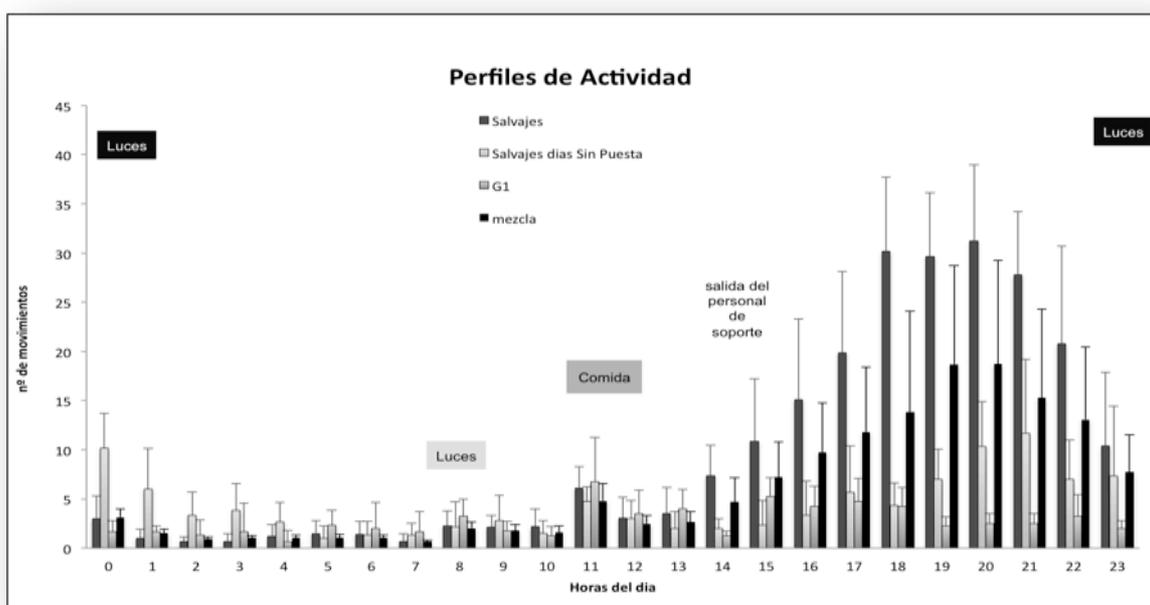
E) Grupo de animales mezcla: Hembras G1 - Machos Salvajes: Abril-Mayo 2010.

De los colectores de huevos se recogieron 3 puestas con un volumen medio de 38 ml y un 28,33% de huevo flotante, la fecundación fue del 47,01%. Se

observaron 2 cortejos, las condiciones de grabación no permitieron ver el tercero. A su vez, otros 3 días hubo recogida de huevos en los colectores, sin embargo, todo el volumen era de huevo no flotante y en la revisión de los videos no se observó la composición de ninguna pareja.

### 3.3.2. Diferencias de actividad de los grupos

La figura 3-1 muestra la actividad de los grupos de peces descritos anteriormente. Dicha actividad se desarrolló entre las 14:00 y 01:00 horas y se agrupó a lo largo de diferentes días y noches (incluyendo noches con y sin puesta) Hubo una clara asociación entre los niveles altos de actividad durante este periodo y la recogida de una puesta exitosa y fertilizada al día siguiente. Así, el grupo de peces salvajes presentó el pico más elevado de actividad ,



**Figura 3-3** Perfiles de actividad de 3 de los 5 grupos estudiados: Salvajes en días con puesta, Salvajes en días sin puesta, G1 y mezcla (grupo de machos salvajes y hembras G1 en días con puesta fertilizada). Se incluyen los eventos encendido (08:00) y apagado de luces (24.00) en el sistema, la hora de comida (11:00) y la hora de salida del personal de soporte.

seguido por el grupo mezcla de machos salvajes y hembras G1, registrado siempre en noches en las que se obtuvieron puestas exitosas (fertilizadas). En ambos casos ese pico de actividad se observó entre las 18:00 - 22:00 h y no se observó o fue de menor amplitud en los días sin comportamiento reproductivo, en el caso de peces salvajes en noches sin puesta, y el caso de lenguados G1

(Figura: 3-3), en noches sin puesta y en noches con liberaciones de huevos no fecundados (datos de G1 combinados en la Figura 3-15). Además de la actividad del periodo indicado anteriormente (4:00 a 01:00h) hubo un ligero aumento de actividad, en todos los grupos de peces, a las 11:00h coincidiendo con la distribución diaria de comida (Figura: 3-3).

### 3.3.3. Etograma del lenguado senegalés mantenido en cautividad

Todos los comportamientos observados fueron descritos y clasificados en el etograma adjunto en el Anexo 2: Etograma del lenguado senegalés, *S. senegalensis* (Kaup 1858).

Los comportamientos más relevantes implicados en el cortejo y la reproducción fueron organizados en un etograma reproductivo (Figuras en Anexo 2):

#### Etograma de la reproducción del lenguado senegalés

A. **Quieto (Q):** Ausencia de movimiento. El pez permanece estático en el fondo.

- Individual (Q1): El animal permanece quieto, estando solo o rodeado por otros animales pero sin interacción aparente. (Neutro)



- Con acciones sobre él (Q2): El animal permanece estático aunque otros animales actúen sobre él. El pez fuerza, de alguna manera, el estar quieto incluso frente a acciones directas como empujones con el morro por parte de otros peces. Este comportamiento supone que el pez tensa la musculatura periférica (dorsal y ventral) del lado izquierdo o ciego, convirtiéndose en una efectiva ventosa. (Aversivo)

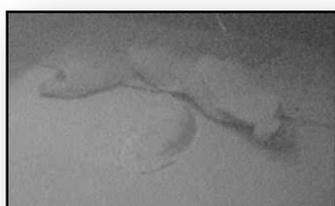
**Figura 3-4:** Animales quietos sin interacción aparente

B. **Natación (N):** Se pueden observar nataciones de fondo, nataciones del fondo a la columna de agua y de ahí nataciones a la superficie del agua. Los tipos de natación han sido clasificados según la interacción, la velocidad y el desplazamiento, el tiempo y la finalidad

- Individual (N1): El animal nada solo. (Neutro)
- Exploración (EX): El animal inspecciona una superficie o algún elemento cercano, como otro individuo del tanque. (Apetitivo)
- Acompañado por otros animales (N2): En la que el individuo que estamos estudiando lleva a cabo una natación y se pueden observar a otros individuos a su alrededor. Estos, también nadando, imitando o siguiendo su dirección y velocidad. Para este tipo de natación hemos de distinguir si el animal objeto de nuestro estudio:



**Figura 3-5:** 2 momentos en persecuciones. En ambos casos solo machos



I. Segue a (Fto): Es importante describir si el animal que estamos observando en este caso es parte del séquito que sigue a un animal que encabeza la natación. (Apetitivo)

II. Seguido por (Fby): La otra posibilidad es que sea el que encabeza el grupo. (Aversivo)

- Acoplados (N3): Tipo de Natación en la que un individuo (macho) se sitúa por debajo de otro individuo (hembra) levanta la

cabeza ligeramente hacia atrás situándose pegado y simétrico al otro individuo, nadando hacia la superficie. (Apetitivo)



**Figura 3-6** Pareja reproductora nadando acoplados hacia la superficie

- Descripciones de natación por velocidad y desplazamiento:

- I. Natación lenta o de recolocación: La velocidad es baja y requiere varios segundos para recorrer un metro (>10s), la distancia del desplazamiento suele ser de pocos centímetros cada vez que se lleva a cabo. Es más un cambio de posición que un desplazamiento real. (Neutro)
- II. Natación normal: Aproximadamente un metro cada 2-4 segundos. Suele implicar un cambio en la situación dentro del tanque que se prolonga durante varios metros. (Neutro)
- III. Natación rápida: (>1m/s). Habitualmente en respuesta a un estímulo externo. Suele comenzar con una cabriola o despegue brusco y suele durar lo que dura el estímulo (otro pez) o la reacción al estímulo (ruido, golpe). En ocasiones el animal termina en el mismo lugar del que partió si el estímulo ha desaparecido (normalmente Aversiva).

#### **De inicio de interacción**

- Apartar al otro (N4): Comportamiento que implica que un animal empuja activamente a otro, habitualmente con el morro aunque se han observado casos en los que lo hacen con la cola. (Aversivo)
  - Apartarse de otro (N5): Reacción a la aproximación de otro animal. Puede ser brusca (reacción rápida) o lenta. (Aversivo).
  - Acercarse a otro animal (N6): Comportamiento básico, compañía prácticamente a todos los demás comportamientos, es habitualmente el comienzo de las acciones o interacciones sociales. Pueden ser: nadar y acercarse a otro animal, acercarse y temblar sobre un animal, acercarse y apartar al otro, (Apetitivo).
- C. **Temblor (T1)**: Es una agitación brusca de todo el cuerpo, de forma lenta, son vibraciones en forma de onda por todo el cuerpo.
- Temblar encima de otro (T2): Puede ser considerado como una forma de "molestar" o estimular. (Aversivo)

- Temblores bajo o junto a otro (T3): Temblor cuando hay un pez junto o encima del que tiembla. (Aversivo)

#### D. Acciones entre individuos:

- **Cubrir a otro:**

I. Reposar la cabeza (R): Cuando uno apoya la cabeza sobre el otro en diferentes partes de su cuerpo. Puede pasar rápidamente a un *abrazo*, en diferentes situaciones. (Apetitivo)

1. Sobre el lomo. (R1)
2. Sobre la gónada. (R2)
3. Sobre la cola. (R3)

II. Cubrir con el cuerpo (RB): Cubrir la cabeza con el cuerpo

- **Cubierto por otro (Cby)**: Cuando a un animal que se encuentra quieto, se le acerca otro, se sitúa encima y comienza una serie de unidades de comportamiento como reposar la cabeza sobre el lomo, sobre la gónada o bien es completamente cubierto con el cuerpo. (Apetitivo)
- **Abrazo (E)**: Un pez abraza a otro por la cola, es, como situarse sobre la cola, pero un poco más elevado, como hasta la mitad del cuerpo y tensar el cuerpo para adoptar una forma convexa que sujete e impida los movimientos normales evitando así el desplazamiento (apetitivo como respuesta a un comportamiento aversivo: la hembra se marcha, intentando evitarle, y al haber machos alrededor su reacción es el abrazo).

<u>Grupo de comportamiento</u>	<u>Unidades de comportamiento</u>	<u>Con componentes específicos</u>	<u>Opciones</u>	
A. <u>Quieto (Q)</u>	<u>Individual: (Q1)</u>			0
	<u>Con acciones sobre él (Q2)</u>			-
B. <u>Natación (N)</u>	<u>Individual (N1)</u>			0
	<u>Exploración (EX)</u>			+
	<u>Acompañado por otros animales (N2)</u>		Sigue a (Fto)	-
			Seguido por (Fby)	-
		<u>Acoplados(N3)</u>		+
		<u>Apartar al otro (N4)</u>		-
C. <u>Temblor (T)</u>	<u>De inicio de interacción</u>	<u>Apartarse de otro (N5)</u>		-
		<u>Acercarse a otro animal (N6)</u>		+
	<u>Temblar (T1)</u>			-
	<u>Temblar encima de otro (T2)</u>			-
	<u>Temblores bajo o junto a otro (T3)</u>			-
D. <u>Acciones entre individuos:</u>			Sobre el Lomo. (R1)	+
	<u>Cubrir a otro:</u>	<u>Reposar la cabeza (R)</u>	Sobre la Gónada. (R2)	+
			Sobre la Cola (R3)	+
	<u>Abrazo (E)</u>	<u>Cubrir con el cuerpo (RB)</u>		-
	<u>Cubierto por otro (Cby)</u>			-

**Figura 3-7:** Tabla de observaciones del etograma: (+) apetitivo (-) aversivo. Comportamientos como las persecuciones, cubrir con el cuerpo, o quieto con acciones sobre él han sido considerados aversivos ya que pertenecen a un comportamiento competitivo o bien son una respuesta aversiva relacionada con la reproducción, pero de rechazo

3.3.4. Descripción del cortejo del lenguado salvaje mantenido en cautividad

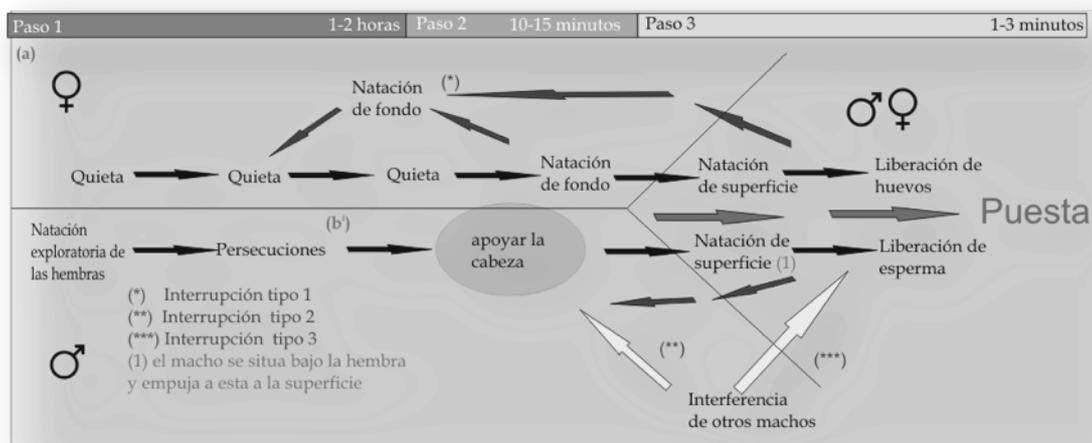


Figura 3-8: Esquema: Pasos 1 a 3 del cortejo del lenguado senegalés.

(\*) Interrupción tipo 1: es el rechazo de la hembra, la ruptura de la pareja por cuestiones externas como puede ser encontrar la pared del tanque durante la natación, lo que provoca una vuelta al paso previo del cortejo.

(\*\*) Interrupción tipo 2: en la que varios machos centran su atención en la misma hembra, impidiendo o dificultando el desarrollo del cortejo.

(\*\*\*) Interrupción del cortejo tipo 3: por sus características, en la que el macho principal está dedicando sus esfuerzos y atenciones al cortejo, no puede evitar la interrupción del mismo; se vuelve al paso 1 o 2.

El comportamiento reproductivo se ha dividido en tres pasos clasificados de 1 a 3, partiendo de un paso 0 inicial o basal, en el que aun no se aprecia intencionalidad reproductiva (1), hasta finalizar en la freza exitosa (3).

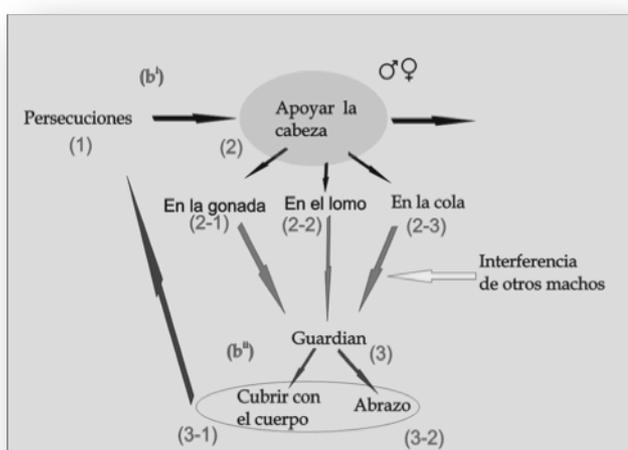


Figura 3-9 Detalle del comportamiento de apoyar la cabeza

**Paso 0)** Existen interacciones entre machos y hembras, que se dan como contactos puntuales casi durante todas las horas.

**a.** Los contactos son exploratorios como el comportamiento de “apoyar la cabeza” en las diferentes partes del

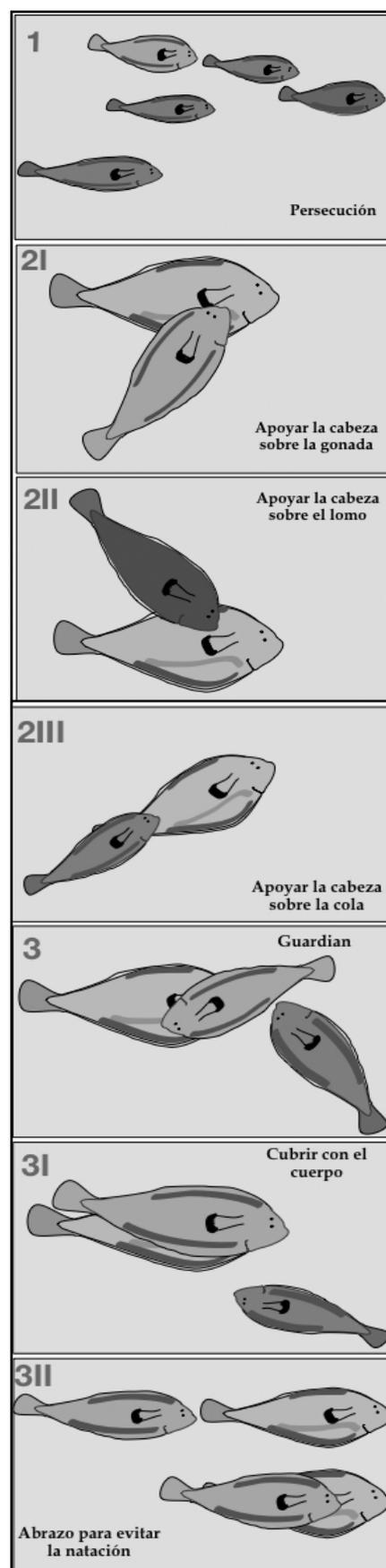
cuerpo. No son específicos de machos sobre hembras, sino que también se dan de machos sobre machos; aunque estos últimos son breves.

b. En el tanque la actividad general es normal, se aprecian nataciones a velocidad normal. En general se aprecia un número elevado de individuos que permanecen “quietos” incluso cuando son objeto de estas acciones exploratorias.

c. Hay una correspondencia con el momento del día. El paso 0, dentro del día en el que va a haber un cortejo, se extiende desde las 8:00 h (la hora de referencia la tomamos teniendo en cuenta cuando se ilumina el tanque.) hasta las 12:00-13:00 h.

Las interacciones no indican que una hembra y un macho han formado una pareja, o que el macho este persiguiendo o protegiendo una hembra. Es decir, no indican que un pez o grupo de peces hayan centrado la atención en otro pez o grupo de peces.

**Paso 1)** En el tanque la actividad ha aumentado enormemente. Sin embargo las hembras permanecen en general quietas, son más propensas a recolocaciones que a nataciones prolongadas. Parece que las interacciones entre los peces indican que un pez o grupo de peces ha centrado su atención en otro pez o grupo de peces. Los machos se vuelven más insistentes en los contactos con las hembras (*aproximaciones*), con el objetivo de provocar la



**Figura 3-10** Esquema de comportamientos: Persecuciones, apoyar la cabeza, guardián, cubrir con el cuerpo, abrazo.

reacción de las hembras.

a. Se observan los mismos contactos puntuales, exploratorios, pero ahora sí, más enfocados de machos a hembras; que permanecen en situación de estar “quietas”. Sin embargo ahora sí podemos apreciar en éstas, otros comportamientos como temblores, escapes de poca duración e incluso mantenerse quietas, en el que la hembra se ancla al fondo del tanque para evitar ser desplazada por el /los machos (\*Figura 3-3). En estos casos la situación vuelve al paso 0 .

b. Un aspecto característico del paso 1, es que muchas veces machos externos a esta pareja puntual persiguen a la pareja en el momento en que comienzan a nadar. “**Persecución**” (1) que a modo de competición es continuada incluso aunque la hembra desista y repose en el suelo de nuevo. El macho continúa, y el resto de machos le persiguen a él, alejándole de la hembra, se ha observado esta persecución de hasta 15 minutos a lo largo del tanque. Finalmente el macho inicial se para y la persecución se detiene. Los machos sin embargo continúan participando en nataciones competitivas entre ellos o persecuciones, en los que un animal se sitúa a la cabeza y el resto le sigue. Se observan persecuciones de hasta 7 animales. Posteriormente el macho vuelve a buscar las interacciones con la hembra en las que se había fijado minutos antes y vuelve a comenzar. Este tipo de persecuciones e interacciones entre machos solo han sido observadas en el contexto de la freza, son mucho más abundantes que el cortejo en sí mismo y es probable que puedan ser utilizados de forma predictiva, para decidir en qué tanque vamos a tener puesta e incluso cuales son los animales implicados en esta.

c. La otra posibilidad es que sea permitido, lo que en muchos casos significa que no hay signos externos de rechazo y el macho se sitúa encima o sobre la hembra. Se observa una serie de comportamientos asociados a esta situación que se puede dividir en dos tipos,

i. En el tipo 1 el macho repite insistentemente el comportamiento de apoyar la cabeza cambiando repetidamente entre las diferentes posibilidades, gónada (2I), lomo (2II), cola (2III). Parece que el macho “molesta” a la hembra, llegando a

temblar encima de ella o incluso golpearla ligeramente con la cabeza, para provocar que despegue del fondo y nadar a la superficie para la puesta.

ii. En el tipo 2 se producen encuentros entre los machos, sobre la hembra, se apartan unos a otros, se empujan con el morro o se golpean con la cola mientras cubren a la hembra con el cuerpo (guardián (3): el macho protege a la hembra de otros machos, cubre a la hembra (3I) o se posiciona entre la hembra y otros machos para proteger la hembra de los avances o la atención de otros machos así como conseguir que ésta no se dirija o fije su



atención en otros machos llegando incluso a impedir su avance realizando una acción como de “abrazo” (3II) (\*\* figura 3-8). Esta interacción se repite tanto en el paso 1 como en el paso 2, en los momentos en que hay interferencias de otros machos.

**Figura 3-11:** Comportamiento de Guardián frente a otro macho.

**Paso 2)** Cuando se consigue el desplazamiento de la hembra, al menos, el macho que ha provocado la respuesta persigue a la hembra. Cuando la hembra ha aceptado al macho (*interacción permitida*), la hembra comienza a nadar más separada del suelo (*natación hacia la superficie*), el macho se introduce bajo la hembra y comienza a elevarse, subiendo con la hembra hasta la superficie y controlando su avance con la cabeza (pasos del cortejo, paso 3).

Se han registrado subidas a la superficie del macho con la hembra en las que otros machos perseguidores seguían detrás, y estos han interferido e incluso impedido la freza (puesta fallida) interponiéndose entre el macho y la hembra en un momento en el que el macho no puede actuar como guardián o dispersarlos debido a que está inmerso en el cortejo (\*\*\*) (figura 3-8) y las interacciones regresan a paso 1. También se han observado ocasiones en las que el macho ha aprovechado la natación de una hembra para intentar provocar una puesta, la hembra rápidamente cambia de rumbo rompiendo la pareja.

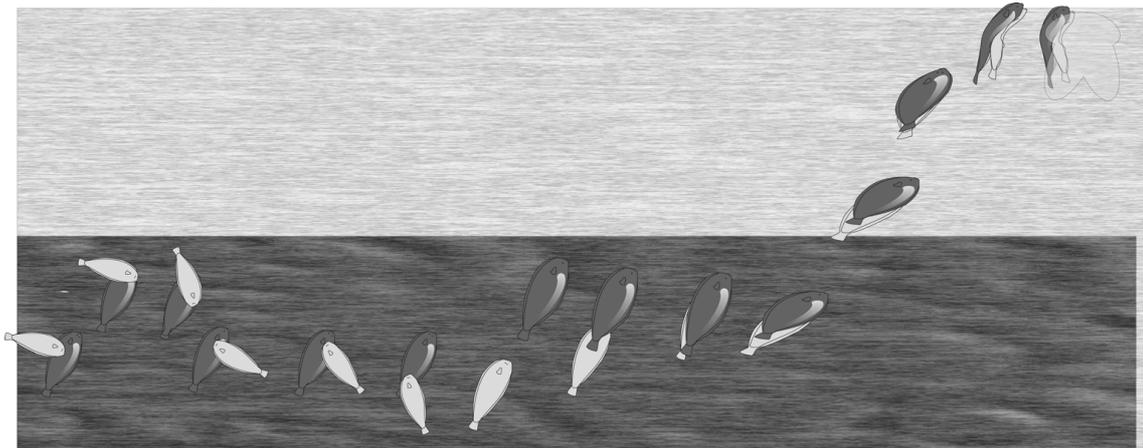
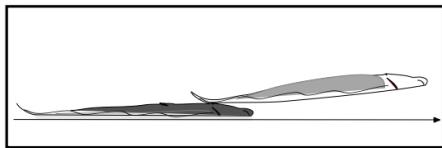


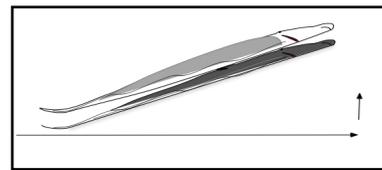
Figura 3-12: El cortejo del lenguado senegalés

**Paso 3)** La hembra y el macho llegan juntos a la superficie y tras unos segundos en esta situación, la hembra y el macho comienzan a liberar los gametos (freza) el paso 3 fue observado en 8+4 puestas recogidas, sin variaciones. La puesta ha sido dividida en: 5 tiempos.

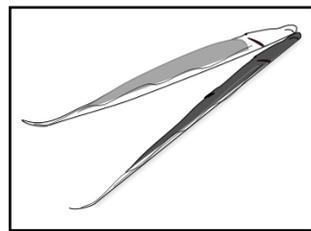
a: t1)



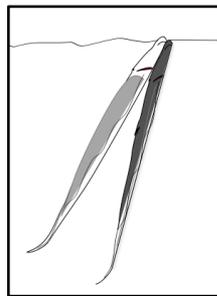
b: t2)



c:t3)



d:t4)



e:t5)

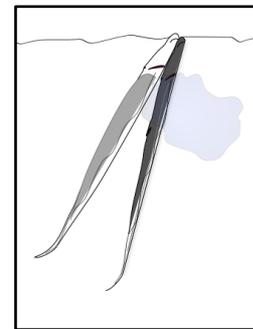


Figura 3-13: Secuencia de la puesta: a-e

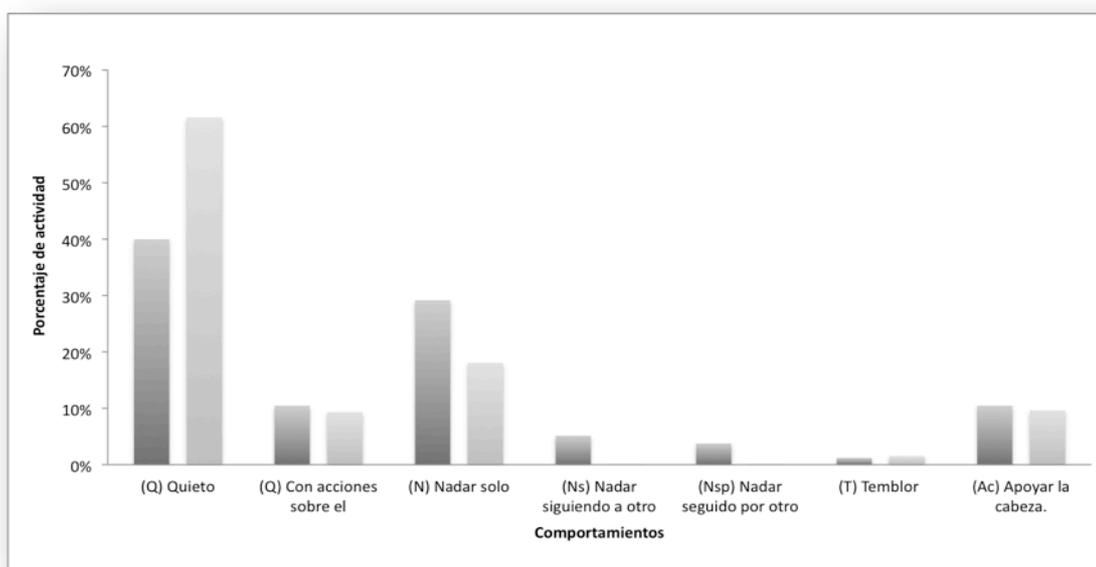
- t1) El macho consigue el despegue de la hembra del fondo y rápidamente se sitúa debajo de esta.
- t2) El macho, por debajo de la hembra se coloca en paralelo a esta por debajo, comenzando una natación que provoca la elevación de la pareja.
- t3) El macho y la hembra, nadan despegándose del fondo en dirección a la superficie y nadando en sincronía, con los poros genitales enfrentados muy cercanos.

- t4) Llegan a la superficie impulsados por los esfuerzos del macho, hasta que sacan la boca del agua. Aquí se produce una natación de entre 10-15 s por la superficie.
- t5) Comienza la puesta de huevos y esperma (5-10 s), tras al cual la pareja se rompe tomando direcciones distintas.

Sin embargo también se han observado casos en los que la hembra sube directamente (seguida por el macho o no) y suelta los huevos cuando está preparada. Este hecho ha sido observado en 2 de las 4 ocasiones en las que hubo puesta no fecundada en el tanque G1.

### **A) Diferencias de comportamiento salvajes en noches con puesta vs noches sin puesta**

La cantidad de actividad en el tanque de animales salvajes es mucho menor en días y noches sin puesta (Figura 3-14). El aumento de actividad en las noches con puesta estuvo claramente asociado al aumento en comportamientos reproductivos, particularmente persecuciones (nadar siguiendo otro, nadar

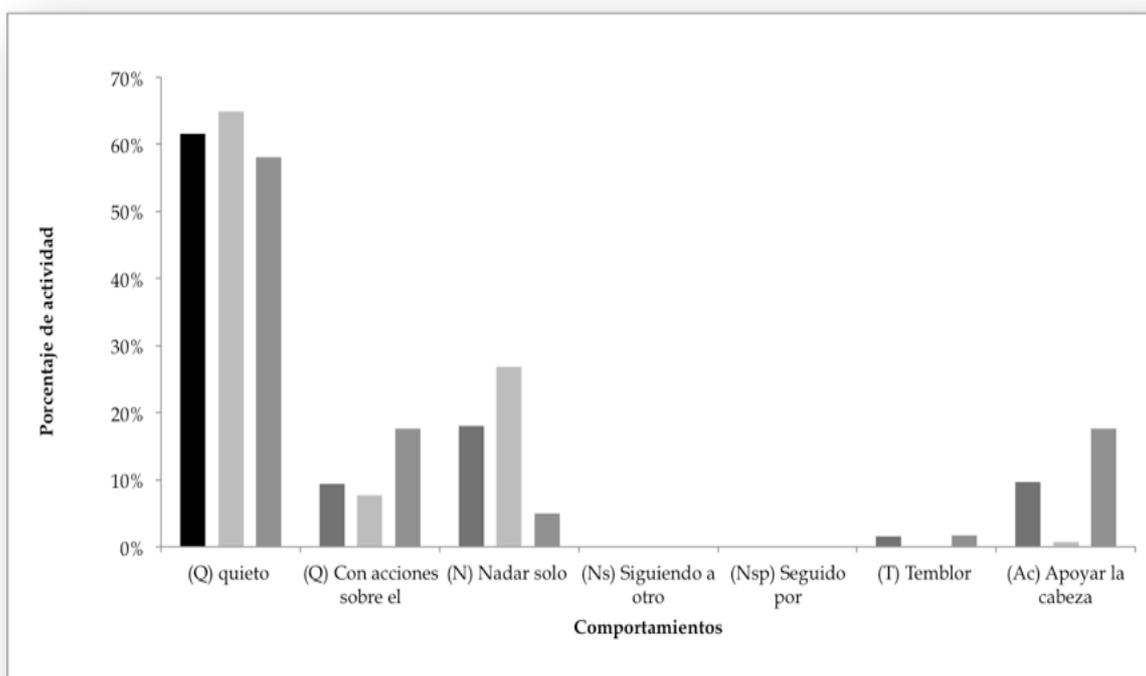


**Figura 3-14** (■) Salvajes en noches con liberación de huevos. (□) Salvajes en noches sin puesta. El perfil de comportamientos fue significativamente diferente en noches con puesta, comparados a las noches sin puesta:  $X_i^2$  ( $P < 0,001$ ).

seguido por otro) del paso 1 del proceso de cortejo (Figura 3-7, Figura 3-8). Los perfiles de comportamiento, incluyendo el estacionario (quieto), con acciones

sobre el, nadar siguiendo a otro, nadar seguido por otro y apoyar la cabeza, fueron significativamente diferentes ( $P < 0,01$ ) entre las noches con y sin puesta. En las noches sin puesta, se aprecian más comportamientos individuales (quieto) y menos comportamientos sociales (con acciones sobre el, nadar siguiendo a otro, nadar seguido por otro, apoyar la cabeza). En las noches con puesta, hubo más comportamientos de natación como nadar solo, nadar siguiendo a otro y nadar seguido por otro. Los comportamientos persecuciones, nadar siguiendo a otro y nadar seguido por otro solo se aprecian los días en los que hubo puestas o intentos fallidos de cortejo.

### **B) Comparación de comportamiento salvajes vs G1**



**Figura 3-15:** (■) Salvajes en noches sin puesta (■); G1 en noches sin puesta (■); G1 en noches con liberación de huevos. No se observaron diferencias en el perfil de comportamiento entre G1 en noches con liberación de huevos y salvajes en noches sin puesta:  $X^2$  ( $P=0.1$ ). Sin embargo hubo diferencias significativas en el comportamiento entre peces G1 en noches in puesta comparado a noches con puesta:  $X^2$  ( $P < 0.05$ ).

La actividad y los comportamientos del grupo G1 fueron similares a las observadas en los peces salvajes en noches sin puesta (Figura 3-15). La actividad registrada en los animales G1 es mucho menor que la registrada en animales salvajes en noches con puesta, pero muy similar a la actividad de los animales salvajes en noches sin puesta (Figura 3-14 y 3-15). La disminución de la actividad y la ausencia de comportamientos reproductivos (nadar siguiendo a y

nadar seguido por) están claramente asociados en ambos grupos. No se observaron diferencias en el perfil de comportamiento entre G1 en noches con liberación de huevos y salvajes en noches sin puesta ( $X_i^2$ ,  $P=0.1$ ). Sin embargo sí hubo diferencias significativas en el comportamiento entre peces G1 en noches sin liberación de huevos comparado con noches en las que si hubo liberación ( $X_i^2$ ,  $P<0.05$ ). En animales G1 en días en los que no hubo liberación de huevos disminuyen los comportamientos sociales aun más que en el caso de peces salvajes sin puesta, llegando a desaparecer comportamientos como apoyar la cabeza. También se observa la desaparición del comportamiento temblor probablemente asociado a la desaparición de interacciones entre los animales (Figura 3-15). No se observaron comportamientos asociados a la competición, siguiendo a otro y seguido por otro. En los peces G1 en días con liberación de huevos hay comportamientos sociales como apoyar la cabeza o respuestas como temblores disminuyendo la natación en solitario, con absoluta ausencia de comportamientos competitivos.

### **C) Comparación de comportamiento salvajes vs mezcla**

Dado que del grupo mezcla formado con hembras salvajes y machos G1 no se obtuvo ninguna puesta ni comportamientos asociados a ésta, las observaciones se centraron en el grupo de machos salvajes y hembras G1 en las que sí se pudieron identificar claramente 2 de 3 posibles cortejos deducidos al recoger 3 puestas. Los comportamientos registrados fueron muy similares a los observados en peces salvajes en noches con puesta (Figura 3-14 y 3-15). La actividad registrada en el grupo mezcla aunque fue menor a la registrada en animales salvajes en noches con puesta presenta un perfil similar, con un pico de actividad desde las 18:00 a las 22:00 h (Figura 3-3 y 3.2). No se ha considerado oportuno la inclusión de los datos estadísticos debido a la baja N obtenida. Sin embargo, en los dos cortejos filmados han podido observarse los 3 pasos del cortejo, incluyendo las persecuciones asociadas a la competición (siguiendo a otro y seguido por otro). Se registraron comportamientos sociales como apoyar la cabeza en las 3 variantes o respuestas como temblores (Figura 3-16)

	Paso 0	Paso 1: (a)		Paso 1: (b)					Paso 2	Paso 3
		primero s contacto s	persecu ciones	reposar la cabeza			guardián		Pareja sube a la superficie	puesta
				gónada	cola	lomo	cubrir con el cuerpo	abrazo		
Salvajes / 2008	8/8	8/8	6/8	5/8	7/8	6/8	3/8	1/8	8/8	8/8
Salvajes / 2009	4/4	4/4	4/4	2/4	4/4	2/4	1/4	0/4	4/4	4/4
G1 / 2009	SI	SI							NO	NO
Mezcla H salvajes y M G1	SI	SI	no hubo cortejo, estos comportamientos se suceden sin relación aparente ni secuencia definida y en menor número de veces						NO	NO
Mezcla M salvajes y H G1	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	1/2	1/2	0/2	2/2	2/2

**Figura 3-16** Repeticiones observadas de los diferentes comportamientos en el contexto del cortejo, por los cortejos observados

En general (Figura 3-16) se observó una total ausencia de comportamientos relacionados con el paso 1 del cortejo en los animales G1 y el grupo mezcla de machos G1 y hembras salvajes tanto en días con liberación de huevos como en días sin ninguna liberación. Solo se detectan los comportamientos del paso 1 y del paso 0 en animales salvajes durante los días en los que no hubo puesta o intentos de puesta.

En individuos salvajes y en los grupos mezcla de machos salvajes y hembras G1 se observaron claramente toda la gama de comportamientos asociados al cortejo (pasos 1 a 3) durante los días y noches en las que hubo puesta.

### 3.4. Discusión

En el presente trabajo se ha filmado y descrito por primera vez el comportamiento reproductivo del lenguado senegalés salvaje mantenido en cautividad, para lo que se han estudiado un total de 14 cortejos completos y 5 grupos de peces diferentes. También por primera vez se ha descrito la ausencia de comportamiento reproductivo en los lenguados criados en cautividad (G1). Ha sido descrita la liberación de huevos por parte de las hembras maduras de G1 fuera del contexto del cortejo en grupos de procedencia uniforme (G1) y la participación de hembras de la misma procedencia (G1) en cortejos exitosos cuando son mezcladas con machos salvajes, demostrando que la disfunción reproductiva del lenguado senegalés criado en cautividad (G1) se concentra exclusivamente en los machos.

De los 14 cortejos se obtuvo una media de 165,23 ml de huevos por puesta, con un 65% de huevo flotante y una fecundación media del 68,29%. El porcentaje de huevo flotante y fecundación es mucho menor en el grupo mezcla, que se formó únicamente 2 meses antes de iniciar el experimento. Tras la manipulación inicial y la formación del grupo las puestas mejoraron en calidad y cantidad.

De la observación de los 8 primeros cortejos de reproductores salvajes, se pasó a describir los diferentes comportamientos. De estas observaciones podemos concluir que al menos en condiciones de cautividad, el lenguado senegalés presenta un aumento de actividad en la segunda mitad de las horas de luz y se prolonga durante varias horas en la noche. Este aumento de actividad general es mucho más apreciable en los tanques con individuos exclusivamente de origen salvaje y en el grupo mezcla de machos salvajes y hembras G1 durante los días en los que realizan el cortejo y la puesta. En los grupos de salvajes en días sin puesta, en el grupo de G1 (en días con y en días sin suelta de huevos) así como en el grupo mezcla de hembras salvajes y machos G1, este aumento de actividad comienza más cerca del final del día y se prolonga más durante la noche que en los salvajes con puesta, aunque en estos casos el aumento de actividad general es significativamente menor. Al igual que otros peces planos

(Gibson, 2005), el lenguado es un animal en general sedentario con enormes capacidades de camuflaje en el medio natural. En natación, las velocidades registradas son similares a las de la solla roja (1m en 4 s) en natación normal (Stoner *et al.*, 1999).

Inicialmente existen contactos puntuales entre machos y hembras durante casi todas las horas de actividad. Algunos de estos comportamientos son comunes a todos los peces planos, como la baja actividad (Gibson, 2005), aunque los machos presentan hasta 5 veces más actividad que las hembras (observación personal).

A partir de media tarde comienzan a producirse comportamientos competitivos como las persecuciones (en las que se ha observado la participación de hasta 7 machos) de forma similar a lo descrito para la solla roja (Stoner *et al.*, 1999). Lo hemos dividido en 2, diferenciando entre el perseguido y los perseguidores. Este comportamiento, ha sido observado con claridad en 11 de los 14 cortejos observados. En la solla roja es considerado parte del cortejo y de hecho en muchos casos es la hembra la que lo comienza (Stoner *et al.*, 1999). Sin embargo en el lenguado parece no ser necesaria la participación de la hembra, aunque a veces ocurre y en esos casos es ella la que lidera la persecución durante unos metros para después abandonar, son principalmente los machos los que participan en las persecuciones. Hay una serie de comportamientos como cubrir con el cuerpo, ser cubierto por el otro y un comportamiento de guardián que se podrían considerar comportamientos aversivos entre machos y entran dentro de la categoría de competición entre machos por una misma hembra, al igual que las persecuciones. El abrazo, sin embargo entra dentro de la categoría de comportamientos apetitivos y se produce como intento de evitar que la hembra se separe. Sin embargo todos estos comportamientos de aislar o proteger a la hembra suceden bajo la presencia de otros machos.

El macho que parece liderar las persecuciones, el perseguido cuando éstas se detienen repite insistentemente el comportamiento de apoyar la cabeza, parece “molestar” a la hembra para provocar el inicio de la natación. Hecho que

aprovecha para situarse debajo de la hembra e iniciar el ascenso que culmina en la puesta al llegar a la superficie del agua.

Este comportamiento por parte del macho provocando la natación de la hembra fue una diferencia entre las dos especies de lenguado estudiadas. En el lenguado común el animal se introduce entre el fondo y la hembra antes de impulsarse a la superficie y realizar la puesta (Baynes *et al.*, 1994). Sin embargo en el presente estudio se ha observado que el macho de lenguado senegalés ha de conseguir que la hembra comience a nadar para poder acceder al lado ciego de esta. Aunque este comportamiento puede estar motivado o favorecido por las condiciones de la cría en cautividad y la ausencia de sustrato suelto en el fondo del tanque los dos estudios de lenguado común y lenguado senegalés fueron hechos en tanques sin sustrato. La falta de sustrato puede afectar el comportamiento de los peces, por ejemplo con los temblores ya que la ausencia de arena impide algunos de los cometidos de este comportamiento como son la ocultación o la protección frente al movimiento del agua y las corrientes (Gibson, 2005).

Un comportamiento o respuesta de aceptación al cortejo por parte de la hembra de lenguado senegalés es la natación permitiendo al macho situarse debajo y comenzar a nadar hacia la superficie, es la única respuesta favorable observada, y a su vez es un requisito imprescindible, y parece estar siempre provocada por la insistencia del macho. A diferencia de lo descrito para el kobe (*Crossorhombus kobensis*) (Moyer *et al.*, 1985), en el que la hembra realiza un cabeceo, lo que ha sido considerado como señal para el macho para comenzar la puesta, la hembra lleva a cabo un movimiento de elevación y bajada repetida de la cabeza tras la cual el macho se acerca y comienzan el cortejo. En el lenguado sin embargo todas las puestas observadas fueron provocadas en primera instancia por los machos así como también los intentos infructuosos.

Los peces planos presentan diferencias a la hora de efectuar la puesta en la posición del macho que puede ser bajo la hembra durante la liberación de los gametos como en el caso del lenguado senegalés (presente estudio), lenguado común (Baynes *et al.*, 1994), el rodaballo (Flüchter, 1972), la solla (*Pleuronectes*

*Platessa*) (Foster, 1953) y la solla roja (Stoner *et al.*, 1999); o superior como en el rêmol de roca (Künne, 1930) y el kobe (Moyer *et al.*, 1985). Una vez posicionado debajo de la hembra durante el proceso de la puesta, parece que el macho de *S. senegalensis*, comienza a elevar a la hembra hacia la superficie, al igual que la solla (*Pleuronectes Platessa*) (Foster, 1953) o diferente a el rêmol de roca (*Zeugopterus punctatus*) (Künne, 1930) o al kobe (Moyer *et al.*, 1985) en los que los machos permanecen sobre la hembra durante todo el proceso de la puesta.

La mayoría de los peces planos estudiados realizaron la liberación de los gametos con los poros genitales muy juntos (Gibson, 2005), como en el *lenguado ocelado* (*Bothus lunatus*) (Konstantinou y Shen, 1995), *Bothus ellipticus* (Konstantinou y Shen, 1995), *lenguado de charco* (*Bothus ocellatus*) (Konstantinou y Shen, 1995), *Tarphops oligolepis* (Manabe y Shinomiya, 2001), y de *Rhombosolea tapirina* (Pankhurst y Fitzgibbon, 2005). Otras especies presentan características peculiares como (1) en el pedas (*Bothus podas*) (Carvalho *et al.*, 2003) en el que la pareja sube de forma sincrónica a la superficie pero inicialmente se produce la liberación del esperma y posteriormente de los huevos, cuando el macho ya ha descendido al sustrato, o (2) la participación de varios machos en la puesta como en la solla roja (Stoner *et al.*, 1999) que en el *lenguado* tiene como consecuencia la ruptura de la pareja y el fallo de la puesta. A pesar de estas diferencias puntuales, de forma general el cortejo en pareja observado en del *lenguado* senegalés fue similar a otras especies de peces planos. Además, en el presente estudio se observó la asociación del comportamiento de formación de la pareja y la liberación de huevos que como las persecuciones forman una parte predictiva y posiblemente esencial del éxito reproductivo.

Además de la comparación con otras especies la observación de los comportamientos de los grupos de salvajes, G1 y mezcla, nos permite realizar algunas comparaciones entre ellos para entender la disfunción reproductiva observada. El paso 0 y los primeros contactos son realizados por todos los grupos sin presentar diferencias. Sin embargo, los grupos de G1 y el grupo mezcla con machos G1 y hembras salvajes presentan unos primeros contactos

más desorganizados. No parece haber una preferencia clara por las hembras, se producen contactos puntuales por parte de los machos con otros animales, no exclusivamente con hembras. Los contactos son breves y no parece haber respuesta a ellos. No se producen persecuciones de ningún tipo que es un aspecto del paso 1 que lo diferencia frente al paso 0. Además, la interacción de apoyar la cabeza, en cualquiera de sus variaciones, es breve y sin respuesta por parte del individuo situado debajo (sea macho o hembra), no hay incitaciones por parte del macho ni empujes ni intentos de que el animal situado en la posición inferior comience a nadar. Las únicas respuestas observadas por parte del animal inferior parecen ser de breves recolocaciones o huidas pero sin el acompañamiento del animal situado encima. En los grupos G1 y mezcla de machos G1 con hembras salvajes, no se han observado tampoco comportamientos de guardián, ni frente a machos (al no haber elección preferente por una hembra concreta, los contactos para empezar no implican a más de dos animales), ni sujetando o cubriendo la cabeza de la hembra. No hay inicio del comportamiento de cortejo y no hay tampoco conclusión de éste en los grupos G1 y mezcla con machos G1.

Sin embargo, estos comportamientos sí se producen, en el orden previsto y anteriormente descrito, en el grupo mezcla de machos salvajes y hembras G1. En este grupo solo fue posible observar estos comportamientos 2 veces, pero lo achacamos al breve tiempo (2-3 meses). Informaciones sobre el seguimiento de este grupo a lo largo del año siguiente al estudio, en el que las puestas fueron más numerosas y de mejor calidad, nos confirman dicha apreciación. (Comunicación personal Ignacio Martin, IEO, Santander)

Los resultados descritos en este capítulo nos permiten por primera vez describir el problema reproductivo del lenguado, confirmando que:

El problema reproductivo del lenguado senegalés es la ausencia total de comportamiento reproductivo y cortejo con la consiguiente ausencia de huevos fecundados con una total ausencia de la mayoría de los comportamientos (particularmente de las persecuciones del paso 1 del cortejo y de los pasos 2 y 3).

Hay que remarcar el éxito reproductivo de los animales salvajes (macho y hembra) así como del grupo mezcla formado por machos salvajes y hembras G1, frente al fracaso de los grupos G1 (macho y hembra) y el grupo mezcla formado por hembras salvajes y machos G1.

El problema de disfunción de comportamiento reproductivo se centra en los machos G1.

### 3.5. Conclusiones

En *S. senegalensis* las puestas las realizan solamente los dos individuos implicados (macho y hembra).

Un requisito imprescindible para la emisión de huevos por parte de la hembra, es que el macho mantenga y controle la dirección de la natación durante cierto tiempo (unos segundos) en la superficie del agua. Hay diversas interacciones complejas entre machos de las que cabe destacar las persecuciones y la actitud de guardián, ambas descritas en el etograma, con un gran valor predictivo y que solo se realizan en días o noches en los que hay puesta o al menos intentos fallidos de cortejo. Su valor para predecir el día de la puesta (persecuciones entre machos) y saber cual es la pareja reproductora del momento (actitud de guardián ) es muy importante tanto para las empresas de producción como para los centros de investigación.

Estas acciones específicas de la puesta exitosa han sido observadas exclusivamente en grupos de animales con machos salvajes, siendo de menor importancia el origen de las hembras reproductoras, por lo que la ausencia de comportamiento reproductivo en los animales G1 se puede y debe enfocar en los machos.

La disfunción reproductiva del lenguado senegalés se confirma como disfunción tipo 3 de componentes sociales. Los machos G1 son al menos parte del problema mientras que no lo son las hembras G1.

### 3.6. Bibliografía

- Ánguis, V. y Cañavate, J. P. (2005). Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture* **243**, 133-145.
- Aronson, L. R. y Holztucker, A. M. (1949). Reproductive behavior in the african mouthbreeding fish, *Tilapia-macrocephala* (Bleeker). *Anatomical Record* **105**, 551-551.
- Bayarri, M. J., Muñoz-Cueto, J. A., López-Olmeda, J. F., Vera, L. M., Rol de Lama, M. A., Madrid, J. A. y Sánchez-Vázquez, F. J. (2004). Daily locomotor activity and melatonin rhythms in Senegal Sole (*Solea senegalensis*). *Physiology & Behavior* **81**, 577-583.
- Baynes, S. M., Howell, B. R., Beard, T. W. y Hallam, J. D. (1994). A description of spawning behaviour of captive Dover sole, *Solea solea* (L.). *Netherlands Journal of Sea Research* **32**, 271-275.
- Breder, C. (1922). Description of the spawning habits of *Pseudopleuronectes americanus* in captivity. *American Society of Ichthyologists and Herpetologists (ASIH)*, 3-4.
- Breder, C. M. y Halpern, F. (1946). Innate and acquired behavior affecting the agregation of fishes. *Physiological Zoology* **19**, 154-190.
- Breder, C. M., Jr.; (1937). The perennial flying fish controversy. *Science (New York, N.Y.)* **86**, 420-422.
- Breder, C. M. y Rasquin, P. (1947). Evidence for the lack of a growth principle in the optic cyst of Mexican cave fish. *Zoologica; scientific contributions of the New York Zoological Society* **32**, 29-33.
- Brind, W. L. (1931). Monographs on various species of fish, and on the management of aquaria. pp. 4081-4083. New York.
- Butler, G. W. (1895). Report on the spawning of the common sole (*Solea vulgaris*) in the aquarium of the Marine Biological Association's Laboratory at Plymouth, during April and May, 1895. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **4**, 3-9.
- Carvalho, N., Alfonso, P. y Santos, R. S. A. (2003). The harem mating system and mate choice in the wide-eyed flounder, *Bothus podas*. *Environmental Biology of Fishes* **66**, 249-258.
- Craig, W. (1918). Appetites and Aversions as Constituents of Instincts. *Biological Bulletin* **34**, 91-107.
- Devauchelle, N., Alexandre, J. C., Lecorre, N. y Letty, Y. (1988). Spawning of turbot (*Scophthalmus-maximus*) in captivity. *Aquaculture* **69**, 159-184.
- Dinis, M. T. (1986). Quatre Soleidae de l'Estuaire du Tage. Reproduction et Croissance. Essai d'Élevage de *Solea senegalensis* Kaup 1858Thèse d'État ès-Sciences Naturelles. *Université de Bretagne Occidentale, France*.
- Dinis, M. T., Ribeiro, L., Soares, F. y Sarasquete, C. (1999). A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture* **176**, 27-38.
- Flüchter, J. (1972). Inducing of spawning in the turbot (*Rhombus maximus* L.) by injection of hypophyseal suspensions. *Aquaculture* **1**, 285-287.

- Forster, G. R. (1953). The spawning behaviour of plaice. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **32**, 319-319.
- Gibson, R. N. (2005). *Flatfishes: biology and exploitation*.
- Horwood, J. (1993). The bristol channel sole (*Solea solea* (L) - A fisheries case-study. *Advances in Marine Biology, Vol 29* **29**, 215-367.
- Howell, B. R., Prickett, R., Canavate, J. P., Mañanós, E., Dinis, M. T., Conceicao, L. y Valente, L. (2011). The cultivation of soles. *Reprort of the 5th Workshop. EAS Spec. Publ.* **36**, 3.
- Ingle, D. J. (1965). Behavioral-effects of forebrain lesions in goldfish. *American Psychologist* **20**, 556-557.
- Konstantinou, H. y Shen, D. C. (1995). The social and reproductive behavior of the eyed flounder, *Bothus ocellatus*, with notes on the spawning of *Bothus lunatus* and *Bothus ellipticus*. *Environmental Biology of Fishes* **44**, 311-324.
- Künne, C. (1930). Aquarienbeobachtungen am Zwergbutt, *Zeugopterus punctatus*. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie* **24**, 134-139.
- Lorenz, K. Z. (1950). The comparative method in studying innate behaviour patterns. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **4**, 221-268.
- Manabe, H. y Shinomiya, A. (2001). Two spawning seasons and mating system of the bastard halibut, *Tarphops oligolepis*. *Ichthyological Research* **48**, 421-424.
- Morrow, J. E., Jr.: (1948). Schooling behavior in fishes. *The Quarterly review of biology* **23**, 27-38.
- Moyer, J. T., Yogo, Y., Zaiser, M. J. y Tsukahara; (1985). Spawning behavior and social organization of the flounder *Crossorhombus kobensis* (Bothidae) at Miyake-jima, Japan. *Jap. J. Ichthyol* **32**, 363-367.
- Pankhurst, N. W. y Fitzgibbon, Q. P. (2005). Characteristics of spawning behaviour in cultured greenback flounder *Rhombosolea tapirina*. *Aquaculture* **253**, 279-289.
- Parr, A. E. (1931). Sex dimorphism and schooling behavior among fishes. *American Naturalist* **65**, 173-180.
- Peláez del Hierro, F. y Veà Baró, J., eds. (1997). *Etología, Bases biológicas de la conducta animal y humana*. Madrid.
- Raney, E. C. (1947). Subspecies and breeding behavior of the cyprinid fish *notropis-procne* (Cope). *Copeia*, 103-109.
- Stoner, A. W., Bejda, A. J., Manderson, J. P., Phelan, B. A., Stehlik, L. L. y Pessutti, J. P. (1999). Behavior of winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, during the reproductive season: laboratory and field observations on spawning, feeding, and locomotion. *Fishery Bulletin* **97**, 999-1016.
- Tinbergen, N. (1963). On aims and methods of Ethology (Reprinted from *Zeitschrift fur Tierpsychologie*, vol 20, pg 410, 1963). *Animal Biology* **55**, 297-321.
- Tinbergen, N. y Vaniersel, J. J. A. (1948). Displacement reactions in the 3-spined stickleback. *Behaviour* **1**, 56-63.

Weisel, G. F. (1947). Breeding behavior and early development of the mudsucker, a gobiid fish of california. *Copeia*, 77-85.



## Capítulo 4

---

## 4. Comportamiento reproductivo del lenguado senegalés inducido hormonalmente.

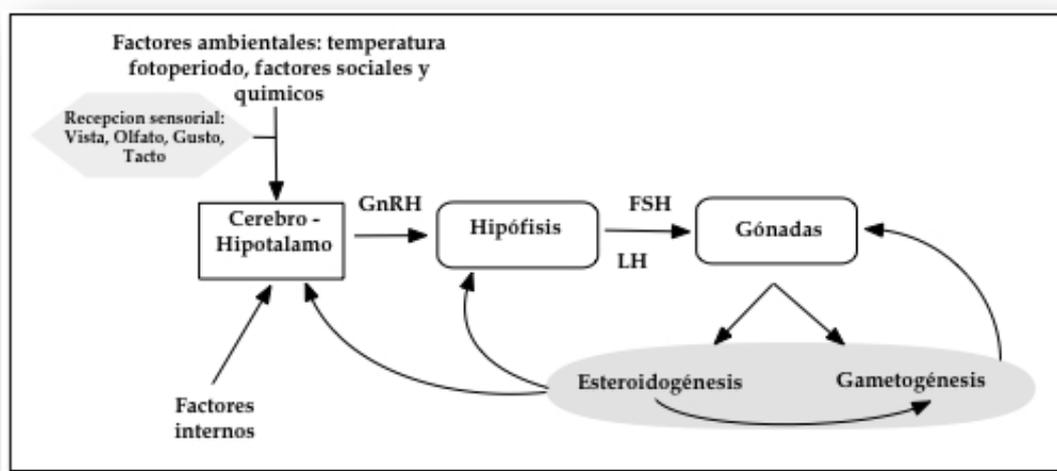
### 4.1. Introducción

El lenguado senegalés presenta una disfunción reproductiva de tipo 3 (Zohar y Mylonas, 2001; Capítulo 1) identificada como una disfunción del comportamiento reproductivo (capítulo 3). Estas disfunciones parecen producirse cuando el pez no encuentra las condiciones sociales adecuadas para que se produzca por un lado el estímulo reproductivo y por otro la correcta realización de la puesta. Una técnica utilizada para provocar la puesta incluyendo todos los aspectos relacionados con la ovulación, espermiación, cortejo o comportamiento reproductivo y así la obtención de huevos de buena calidad, es la inducción hormonal.

#### Inducción hormonal

La inducción hormonal es una técnica utilizada desde los años 70 (Zohar y Mylonas, 2001) para provocar puestas y, en algunos casos, eliminar disfunciones reproductivas derivadas del mantenimiento en cautividad. En la mayoría de los casos, la maduración de los oocitos, la ovulación y el desove pueden ser estimulados mediante el tratamiento hormonal con gonadotropinas o agonistas de la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRHa), ya sea en forma de inyecciones o de implantes de liberación sostenida (Zohar y Mylonas., 2001; Mylonas *et al.*, 2008; Mylonas *et al.*, 2010). Por ejemplo la administración de implantes de GnRHa induce la ovulación múltiple en el *Paralichthys lethostigma* (Berlinsky *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1998), *Paralichthys dentatus* (Berlinsky *et al.*, 1997) y en la limanda (*Pleuronectes ferrugineus*) (Larsson *et al.*, 1997). En el rodaballo (*Scophthalmus máximus*), el tratamiento con implantes de GnRHa no solo induce la ovulación sino que reduce el período entre ovulaciones (Mugnier *et al.*, 2000). Agulleiro *et al.* (2006) y Guzmán *et al.* (2009)

en distintos experimentos usando implantes o inyecciones de GnRHa fueron capaces de obtener desoves de *S. senegalensis*, aunque en todos los casos los huevos no presentaron signos de haber sido fecundados. Así, la inducción a la puesta con GnRHa es una práctica ya utilizada con el lenguado, cuyos efectos fisiológicos han sido convenientemente descritos. Estos mismos autores (Agulleiro et al, 2006, 2007; Guzmán et al., 2011b) llevaron a cabo la inducción de machos G1 de lenguado senegalés bien con hCG ( $1000 \text{ IU} \cdot \text{Kg}^{-1}$ ), implantes de GnRHa ( $40 \mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ ) inyecciones de GnRHa ( $25 \mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ ) e implantes de GnRHa ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ ) obteniendo mejoras significativas en la producción de esperma pero no en la fertilización de las puestas. Solo se ha citado un caso, no reproducido en ninguna otra ocasión, (Guzmán et al., 2001b) en el que se



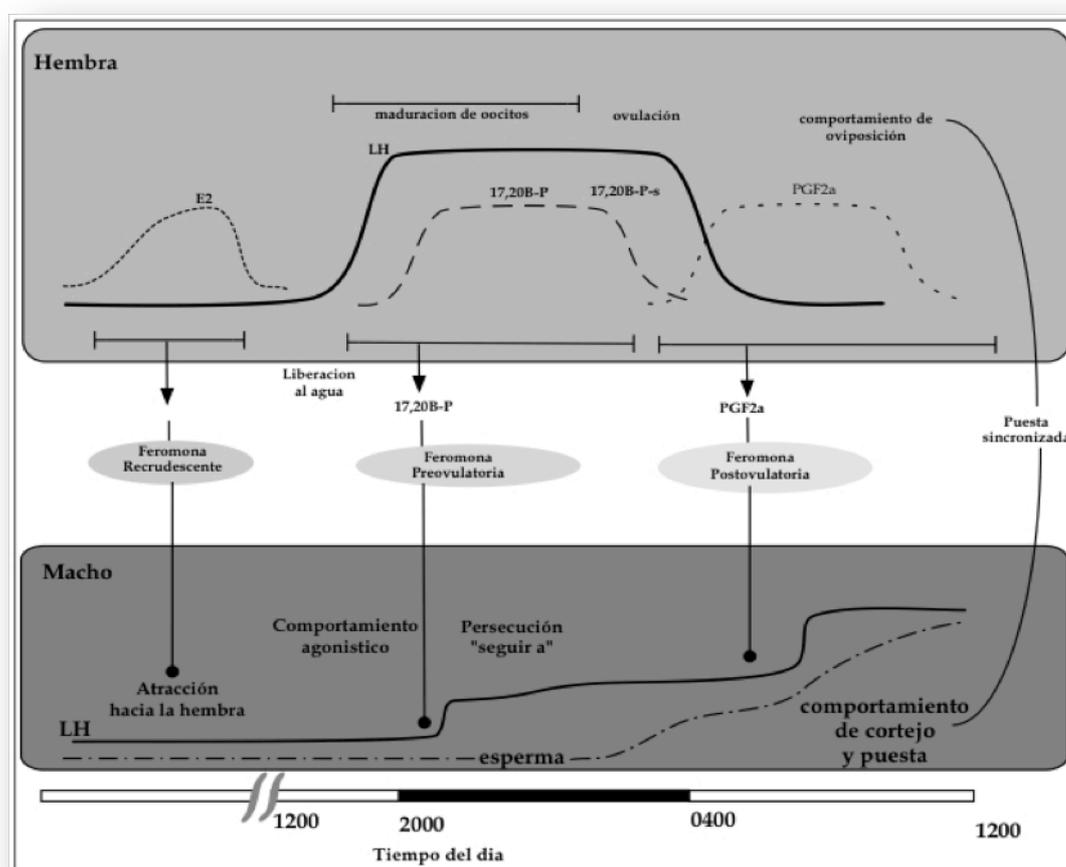
**Figura 4-1:** El eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. La GnRH es estimulada por diversos factores, provocando la liberación de diversas hormonas que estimulan la síntesis de esteroides sexuales. (Adaptado de Muñoz-Cueto & González Martínez, 2005)

obtuvo una puesta (G2) fertilizada tras la inducción de hembras G1 con doble implante de GnRHa y de machos con hCG. También han sido descritos los efectos de la GnRHa para la obtención manual de gametos, mediante masaje abdominal, para la fecundación artificial tanto en forma de implantes ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ ) como de inyecciones ( $25 \mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ ) (Rasines et al., 2011). Actualmente es una técnica en desarrollo en empresas y centros de investigación.

La inducción hormonal tiene múltiples y muy diferentes objetivos, desde 1) provocar cambios fisiológicos en los reproductores (maduración gonadal) hasta 2) la regulación y sincronización de las puestas.

La inducción con GnRHa produce la liberación de una serie de Gonadotropinas endógenas, la FSH (hormona estimulante del folículo) y la LH (hormona luteinizante), que regulan la gametogénesis, la esteroidogénesis gonadal y la ovulación y la espermiación (Swanson, 1991). De la acción de la LH dependen los procesos de ovulación y secreción de esteroides gonadales, especialmente progesterona en el ovario y andrógenos en el testículo.

La sincronización de varios individuos para la realización de la puesta parece estar asociada a la liberación al medio de distintas sustancias que son recibidas/percibidas por otros individuos de su misma especie, las feromonas.



**Figura 4-2:** En hembras postvitelogénicas, señales externas inducen la liberación de la hormona luteinizante. La maduración induce la liberación del esteroide 17,20βP (4-pregnen-17,20β-diol-3-ona). Aparece la AD (Androstenediona), que provoca comportamientos agonísticos entre machos. Los machos incrementan la LH y comienzan a seguir - perseguir individuos de su misma especie. Los machos expuestos a esta liberación de feromonas, incrementan la calidad y cantidad de esperma en los espermiductos previamente a la ovulación. Los huevos en el oviducto inducen la síntesis de prostaglandina F2 (PGF2α) la cual actúa sobre el cerebro de la hembra influyendo en su comportamiento sexual y estimulando su liberación junto con su metabolito la 15K-PGF2α como una feromona post-ovulatoria estimulando al macho y sus relaciones y comportamiento de cortejo y puesta. (Adaptado y traducido de: © Stacey & Sorensen, 2003).

Las feromonas son utilizadas por los peces como señales de alarma, como medio para formar agregaciones/cardúmenes de individuos de la misma especie (aprendizaje de dominancias y/o relaciones basadas en individuos de características similares) y para fines reproductivos (Sorensen *et al.*, 2004).

Stacey y Sorensen (2004) describieron en el pez rojo (*Carassius auratus*) los diferentes ciclos hormonales durante el desarrollo gonadal, la maduración y la liberación final de los gametos (Figura 4-2). A lo largo del ciclo de maduración oocitaria y durante la liberación de los oocitos las hembras señalizan el estado del ciclo en que se encuentran mediante la emisión de diferentes sustancias (sales biliares, moléculas esteroideas y prostaglandinas) como parte de los distintos productos de excreción (Vélez *et al.*, 2009; Hubbard, 2012). En estos ciclos hormonales endógenos del pez rojo, se produce la liberación de feromonas de actuación exógena en conespecíficos como la 17,20 $\beta$ -P, o la prostaglandina PGF2 $\alpha$  (Sorensen y Stacey, 2004). Así, como se observa en la Figura 4-2, en el pez rojo, la maduración de los oocitos viene acompañada de la liberación al medio de la 17,20 $\beta$ P (4-pregnen-17,20 $\beta$ -diol-3-ona) (MIS) que provoca un comportamiento agonístico característico de la especie provocando el inicio de las persecuciones entre machos (comportamiento similar al desplegado por el lenguado senegalés.) para posteriormente, cuando la hembra esta preparada para la liberación de los huevos maduros, excretar PGF2 $\alpha$  (prostaglandina F2 $\alpha$ ) que, a su vez, induce el comportamiento de cortejo y puesta en el pez rojo (Sorensen y Stacey, 2004).

Las Prostaglandinas (Sorensen *et al.*, 1984; Sorensen, et al., 1988; Fujita *et al.*, 1991; Sorensen, 1992; Scott *et al.*, 1994; Sorensen y Stacey, 2004) son un conjunto de sustancias, pertenecientes al grupo de los ácidos grasos de 20 carbonos (eicosanoides) que constituyen una familia de mediadores celulares. Se sintetizan a partir del ácido Araquidónico (20:4n-6) por acción de diferentes oxigenasas y peroxidasas, siendo su papel como feromonas en teleósteos ampliamente estudiado y confirmado (Sorensen, et al., 1988). Presentan 3 funciones esenciales en la reproducción de peces teleósteos: (1) Juegan un papel paracrino estimulante en el ovario y/o en la modulación de la ruptura folicular,

(2) estimulan el cerebro y provocan la conducta sexual femenina (niveles circulantes de prostaglandina F) y (3) estimulan la conducta sexual masculina cuando se liberan al agua actuando como feromonas (la prostaglandina F) (Sorensen, et al., 1988). Aunque su rol sólo ha sido caracterizado en el pez rojo, los trabajos publicados indican que son los metabolitos de la prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  (como la 13,14-Dihydro-15-keto-PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) los que pueden actuar como feromonas en otros peces (Sorensen, et al., 1988; Sorensen y Stacey, 2004).

Durante los años 2007 a 2009 se llevaron a cabo una serie de experimentos de inducción a la puesta con un objetivo principal: describir el comportamiento del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) G1 tras la aplicación de tratamientos de inducción hormonal con GnRH $\alpha$ , HCG y PGF<sub>2</sub>  $\alpha$ . Se utilizó el etograma desarrollado en el capítulo 3 para cuantificar el comportamiento reproductivo inducido e intentar dilucidar hasta que momento de este comportamiento llega el lenguado G1 tras la aplicación de diferentes hormonas y feromonas. Los productos químicos utilizados se seleccionaron en función del efecto que provocan en la inducción a la puesta. La GnRH $\alpha$ , usada eficazmente para la inducción a la puesta, actúa directamente sobre la hipófisis estimulando la síntesis y secreción de gonadotrofinas endógenas (FSH y LH) estimulando la cascada hormonal del eje hipófisis - gónada. El HCG induce la puesta actuando directamente sobre la gónada con resultados comprobados en el caso de lenguados G1 (Guzmán et al., 2011b). Por otro lado la PGF<sub>2</sub> $\alpha$  estimula el comportamiento reproductivo en el pez rojo (*Carassius auratus*) (Stacey, 2003).

## 4.2. Material y métodos

### 4.2.1. Sistemas de cultivo y zootecnia común a los 3 experimentos

Para todos los experimentos el fotoperiodo fue diurno simulando el natural mediante el uso de fluorescentes blancos de 58 W y una intensidad de 150 lux. La temperatura del agua se ajustó al ciclo natural de temperatura en el momento de la realización de cada experimento, por lo que se detalla en cada uno de ellos. Para la iluminación nocturna se utilizaron luces fluorescentes de 58 w cubiertas con un filtro rojo supergel ROSCO, que permite el paso de radiaciones infrarrojas y de rojo profundo >720 nm pero impide el paso de las de menor longitud de onda, (Figura 2-1) y ajustado para proporcionar una iluminación mínima (5 lux en la superficie del agua) necesaria para visualizar los peces en los registros de video (Capítulo 2). Se instaló una cámara F60B/NIR580-50G subacuática en cada tanque, conectada a una grabadora modelo DVR-0804HB de 8 pistas (capítulo 2).

Los peces se alimentaron 3 días a la semana con pienso (0,5% del peso corporal) de dos tipos 2 días Vitalis Repto 8mm, y 1 día Elite 7mm (Skretting, España), 1 día de descanso y 3 días de alimento fresco (0,7% del peso corporal). El alimento fresco consistía en un día mejillón (*Mytilus edulis*), otro calamar (*Loligo gahi*) y otro poliquetos (*Nereis virens*). Los peces reproductores se seleccionaron al azar se evitándose la presencia de hermanos y medio hermanos dentro del mismo grupo, mediante un análisis de paternidades (anexo 4).

### 4.2.2 Análisis y colección de datos común a los tres experimentos

#### 4.2.2.a Análisis de madurez

- a) La madurez de las hembras se evaluó mediante un índice gonadal visual (Anguis y Cañavate, 2005) llevado a cabo por 2 investigadores de forma independiente. Este índice (G) externo de madurez fue evaluado tomando como valor mínimo (1) el que presentan las hembras con el menor desarrollo gonadal, equivalente al mes de enero tras la

reabsorción gonadal, y como valor máximo (4) el de las hembras que muestran el máximo desarrollo gonadal, generalmente en primavera. En ocasiones, en este último estadio, el simple acto de situar el pez fuera del agua sobre una superficie plana conlleva una liberación casi espontánea de los huevos ejerciendo una mínima presión sobre el abdomen de la hembra.

- b) La madurez y la funcionalidad espermática de los machos se evaluó una vez anestesiando el pez en un baño de 2-Fenoxietanol (SCHARLAB, S.L) (2 ml por 10 l). El esperma se obtuvo por masaje y presión abdominal desde el testículo hacia el poro genital del macho, una vez eliminada la orina secando bien el poro con papel absorbente. El esperma se recogió con una jeringa de 1 ml introduciéndose posteriormente en eppendorfs de 1,5 ml situados en una gradilla con hielo. El porcentaje de esperma móvil y tiempo de duración del movimiento en el momento de la extracción se evaluó el primer y último día de cada experimento. Con las muestras de esperma se tomaron muestras de 1  $\mu$ l en un portaobjetos junto con 19  $\mu$ l de agua de mar mezclándose en un frotis para activar el esperma, una vez activado se cuantificó bajo el microscopio (40 X) la duración de la movilidad cronometrando el tiempo desde el momento de la activación hasta que el 100% de los espermatozoides quedan inmóviles (Dra. O. Chereguini (IEO Santander, Cantabria)).

#### 4.2.2.b. Recogida y análisis de la puesta.

En caso de producirse una puesta, ésta era recogida en unos colectores (malla de 500  $\mu$ m) situados bajo el rebosadero superior de los tanques. Todos los días se inspeccionaban los colectores (8:00 h) y en caso de puesta se registraron el volumen total de huevos recogidos, el porcentaje de fecundación, el grado de desarrollo del embrión y la hora de puesta. Además, parte de los huevos se utilizaron para evaluar su desarrollo en placas Nunc de 96 pocillos (Shields et al., 1997), usando un huevo por pocillo e incubando a temperatura constante durante 24 -48 h.

#### 4.2.2.c Análisis de comportamiento y actividad

Las filmaciones de video se registraron diariamente en el periodo comprendido entre las 13:00 y las 20:00 horas, eliminando las horas de trabajo del personal técnico. Las cámaras, situadas en posición cenital, grababan tanto durante el fotoperiodo diurno como en el nocturno.

1. Visualización y estudio de los videos grabados en cada tanque.
  - a. En un primer visionado se buscaron indicios de cortejo, puesta, o comportamientos relacionados.

En posteriores visualizaciones:

- b. Variación del índice de actividad entre hembras y machos y entre tratamientos. Para ello se visualizaron 6 grupos de filmaciones de 30 minutos por tanque, elegidos al azar durante todo el experimento.
- c. Actividad media diurna del lenguado en cautividad, para ello se estudió cada 2 minutos toda la actividad registrada en los tanques.
- d. Análisis de los videos aplicando el etograma reproductivo (Capítulo 3) analizando los periodos de máxima actividad en el tanque.

#### 4.2.3. Experimentos de inducción hormonal.

##### 4.2.3.1. Inducción con GnRH $\alpha$

###### *4.2.3.1.a Diseño experimental*

El experimento se llevó a cabo en 2 tanques de 10 m<sup>3</sup> de fibra de vidrio con un toldo aislante superior, una renovación de 250 l/h, temperatura constante de 18  $\pm$ 1°C fotoperiodo natural (14 hL:10 hO) con iluminación desde las 07:10 a las 21:10h.

Se utilizaron 20 reproductores de lenguado (G1) cultivados a partir de huevos procedentes del IFAPA El Toruño, (Puerto de Santa María, Cádiz) en dos tanques de 10 m<sup>3</sup>. Los animales fueron distribuidos al azar (10 animales, 5 hembras y 5 machos) en cada tanque. El peso medio de los animales fue de

1623,2 g. Considerando como requisito no incluir hermanos o medio-hermanos en los grupos experimentales. Previamente al comienzo del experimento, se evaluó la madurez de los machos y de las hembras mediante el índice gonadal visual descrito anteriormente (Anguis y Cañavate, 2005). Al finalizar el experimento se evaluó de nuevo la madurez de los machos y hembras.

Diariamente se revisaron, recogieron y registraron los datos de las puestas. Se instaló un equipo de detección de movimiento, formado por 2 sensores GP2D05 y un receptor GP2Y0A2YK, SHARP, modificados para soportar el agua y la presión.

#### ***4.2.3.1.b Metodología de inducción hormonal (Protocolo de inducción en Anexo protocolos)***

Inducción hormonal de la puesta

El día 0 del experimento los animales fueron inducidos con una inyección de GnRHa (5 µg /kg, diluido en suero salino) intramuscular a las 12 de la mañana. Repitiéndose la inyección cada 3 días durante los 14 días de duración del experimento.

#### **4.2.3.2 Inducción con GnRHa - hCG**

##### ***4.2.3.2.a. Diseño experimental***

El experimento se llevó a cabo en 6 tanques de 2 m<sup>3</sup> de fibra de vidrio, con un toldo aislante superior, renovación del agua de 250 l/h, temperatura constante de 14°C ±1°C y fotoperiodo natural con 11 horas de luz de 07:30 a 18:30 h.

Se utilizaron 30 lenguados procedentes del IFAPA El Toruño (Puerto de Santa María, Cádiz), escogidos al azar evitando la presencia de hermanos y medio hermanos (Anexo 4). Se utilizaron 12 hembras con un peso medio de 1305,75 ± 273,5 g y una longitud media de 43,1±6,6 cm y 18 machos con un peso medio de 966,5 ± 179 g. y una longitud media de 38,5 ± 2,9 cm distribuidos en 6 tanques con 5 animales (2 hembras y 3 machos) en cada tanque. La biomasa aproximada de cada tanque fue de 2,5 kg /m<sup>3</sup>. El día 1 del experimento y el día

14, se revisó la madurez de los machos y las hembras. Diariamente se revisaron recogieron y registraron los datos de las puestas.

#### *4.2.3.2.b. Metodología de inducción hormonal específica del experimento.*

Las hembras de todos los grupos fueron implantadas intramuscularmente con GnRHa (implantes enviados desde el Hellenic Center For Marine Research), (50 µg/Kg en dos formatos, 50 µg para individuos de peso aproximado a 1 kg y 75 µg para individuos próximos a 1,5 kg), a los machos del grupo control (escogido al azar) no se les suministró ninguna hormona, mientras que los machos del grupo 1 fueron implantados con GnRHa (dosis igual que las hembras), y los machos del grupo 2 recibieron una inyección de hCG (tres dosis, una por semana: 1000 IU/Kg), comenzando en este caso, una semana antes de la realización del experimento.

#### 4.2.3.3. Inducción con GnRHa -PG.

##### *4.2.3.3.a. Diseño experimental*

Los experimentos se llevaron a cabo en 6 tanques de 2 m<sup>3</sup>, de fibra de vidrio, con un toldo aislante superior con una renovación de 250 l/h y una temperatura constante de 18 ±1°C. El fotoperiodo correspondía al natural de principios de junio con 12 horas de luz, de 07:10 a 19:10 h. Se utilizaron 30 reproductores de lenguado (generación G1) cultivados a partir de huevos procedentes del IFAPA El Toruño, (Puerto de Santa María, Cádiz), distribuidos en 6 tanques, circulares, de fibra de vidrio (diámetro de 1.7 m) con capacidad de 2 m<sup>3</sup>. El peso medio de los animales fue de 1413,33 ± 307,49 g con una carga media en los tanques de 7066,66 g ± 693,4 g/m<sup>3</sup>. Considerando como requisito no incluir hermanos o medio-hermanos en los grupos experimentales, los reproductores fueron escogidos al azar y distribuidos 5 animales (2 hembras y 3 machos) en cada uno de los 6 tanques. Previamente al comienzo del experimento y el último día de este, se evaluó la madurez de los machos mediante extracción y observación del espermatozoide y la madurez de las hembras mediante el índice gonadal visual (Anguis y Cañavate, 2005). En la salida de cada tanque se instaló un colector de

huevos de superficie, que se revisaba diariamente a fin de recoger y registrarlos datos de las puestas.

#### ***4.2.3.3.b. Metodología de inducción hormonal (Protocolo de inducción (Anexo 3))***

Los tanques se dividieron en 2 grupos, un grupo control que constaba de 2 tanques (10 animales, 4 hembras y 6 machos) y un grupo experimental inducido hormonalmente, con 4 tanques (20 animales, 8 hembras y 12 machos). El día 0 del experimento, los animales del grupo experimental fueron inducidos con una inyección intramuscular GnRHa con una dosis de 5 µg/kg, mientras que a los del grupo control se les inyectó una dosis igual de suero salino. El tratamiento se repitió cada 3 días. Cuando comenzaron las puestas superiores a 15 ml de volumen total de huevo, comenzaron las inyecciones de PGF2α (Sigma Aldrich Química S.A. ) que se mantuvieron durante los 10 días del experimento. Para la inyección con PGF2α, se utilizaron dosis de 1000 IU/Kg cada 2 días.

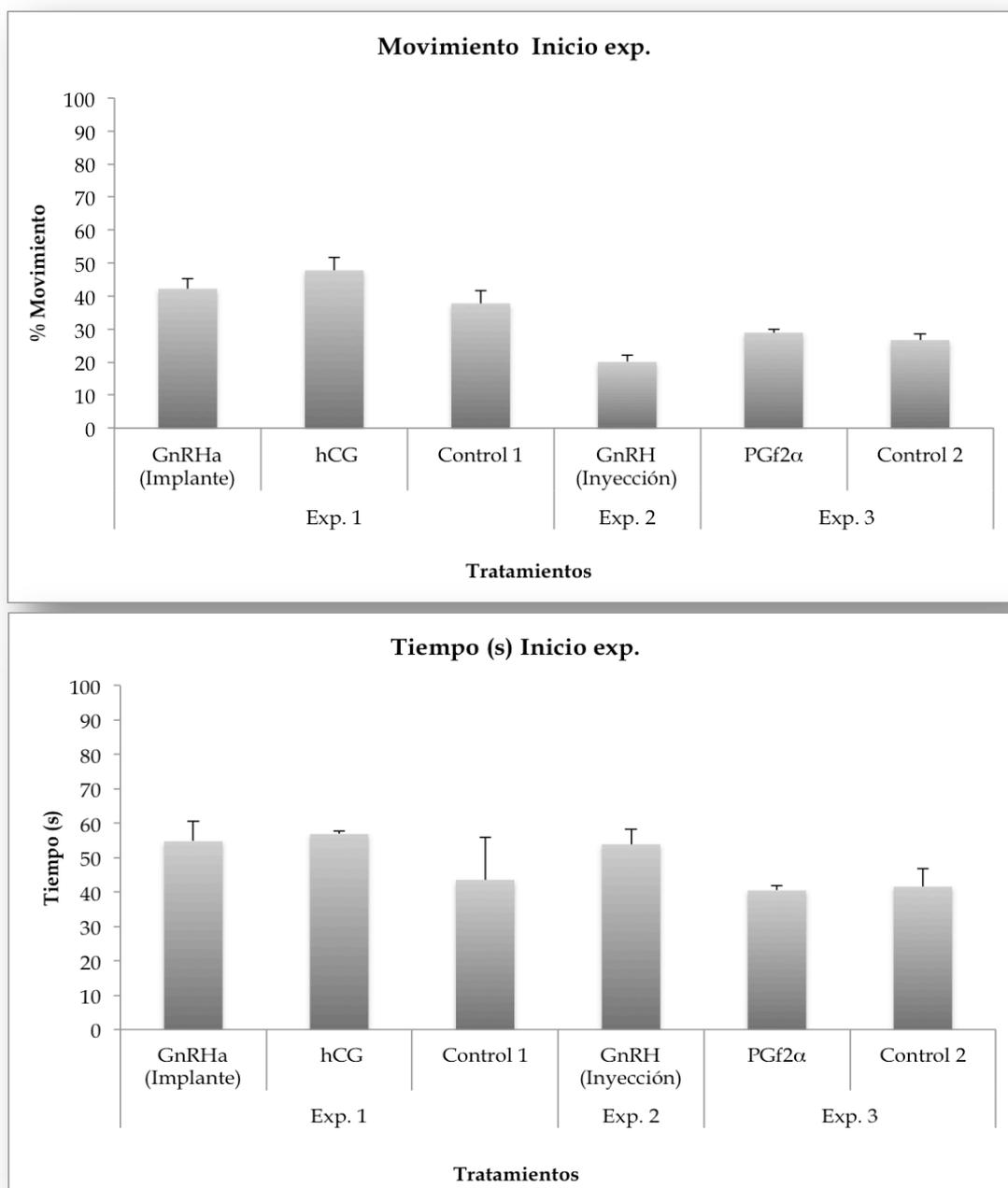
#### **4.2.4. Análisis estadístico aplicado**

Todas las medias se presentan con el error estándar ( $\pm$  SE). Los datos fueron analizados con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y se verificó que presentaban una distribución normal. Los resultados obtenidos de madurez de las hembras (31 individuos), de producción de esperma (40 individuos) y puestas obtenidas (50) fueron analizados mediante ANOVA de un factor entre los diferentes tratamientos aplicados. El análisis de los comportamientos se realizó analizando cada acción descrita entre tratamientos mediante ANOVA de un factor y para identificar diferencias entre tratamientos se aplicó una comparación múltiple utilizando el test de Tukey.

Los datos fueron analizados mediante los programas Spss , IBM, Polar Engineering and consulting) y Sigma Stat 3.1 (Systat Software Inc., Germany).

### 4.3. Resultados

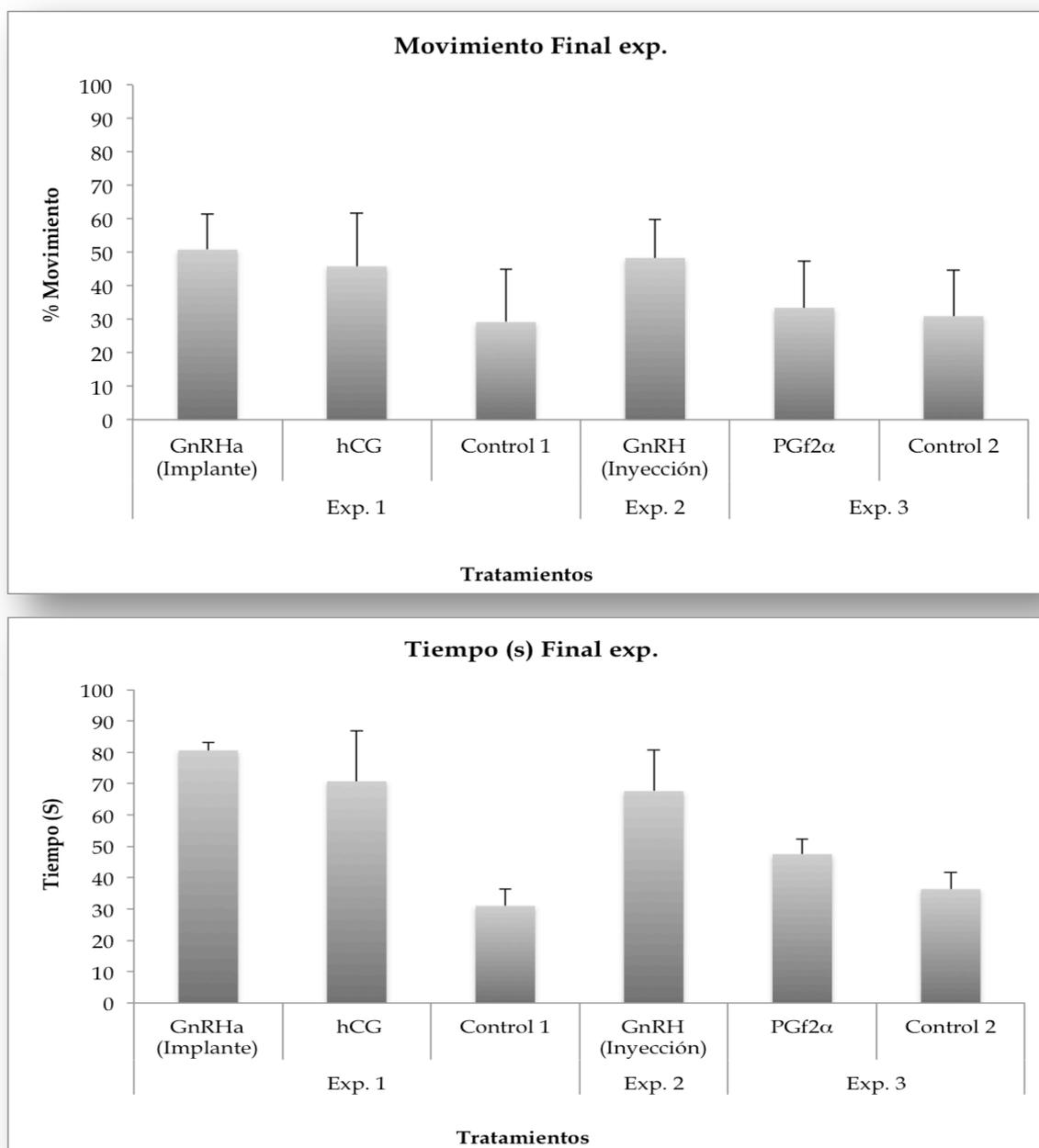
Al principio de los tres experimentos todos los animales presentaron estados avanzados de madurez. La funcionalidad del esperma (% movimiento



**Figura 4-3:** Tiempo medio de movimiento y % de movilidad del esperma extraído de los machos utilizados en los experimentos. No presentaban diferencias significativas entre los diferentes tratamientos al comenzar el experimento ( $P=0,127$ ).

espermático y tiempo de duración del esperma activo) no mostró ninguna diferencia significativa entre los distintos tratamientos hormonales (Figuras 4-3) ( $P=0,127$ ). Sin embargo si se observaron diferencias significativas en el

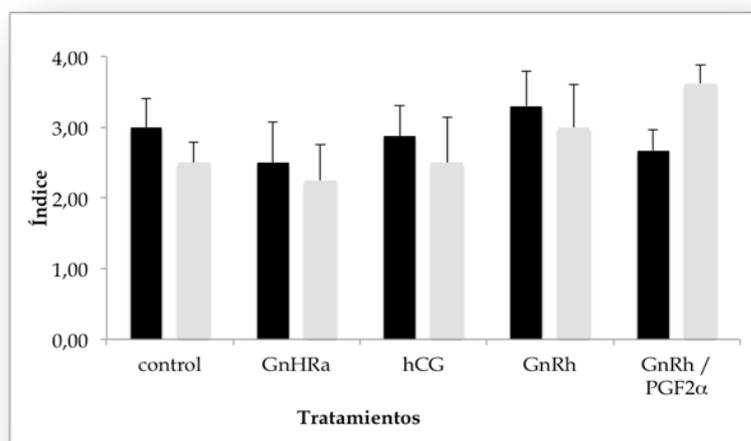
movimiento de los espermatozoides ( $P < 0.05$ ) al finalizar las inducciones al término del experimento (Figura 4-4). El tratamiento control 1 presentó



**Figura 4-4:** Porcentaje de movilidad y tiempo medio de movimiento del esperma extraído de los machos utilizados en los experimentos. Presentaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el tiempo de actividad entre los tratamientos control y el resto de tratamientos, así como entre el tratamiento con PGF2 con las inyecciones de GnRHa en el tiempo de actividad de los espermatozoides.

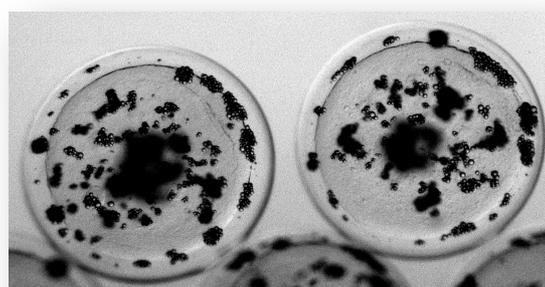
diferencias significativas frente a los tratamientos de GnRHa (implante) y hCG con valores en torno a un 30% más bajos en cuanto a movimiento y más del 50% más bajos en cuanto al tiempo en que los espermatozoides permanecían activos. El control 2 presentó valores menores que el tratamiento GnRHa aplicado en

inyecciones seriadas, y valores menores que el tratamiento con  $\text{PGF2}\alpha$  en



**Figura 4-5** Variación del índice G de las hembras entre el primer día y el día 14 del experimento. (■) Día 1 tras la inducción, (■) Día 14.

de las hembras excepto en el control 2, que presentaba una media ligeramente inferior en relación a las hembras utilizadas para los tratamientos GnRH $\alpha$  (inyectado) y GnRH $\alpha$ / $\text{PGF2}\alpha$  (Figura 4-5). Aun así la madurez de todas era visible el día de inicio de los experimentos, presentando un valor del índice gonadal (Anguis y Cañavate, 2005) en torno a 3. Al finalizar los experimentos se observó una clara diferencia entre los animales inducidos con GnRH $\alpha$ / $\text{PGF2}\alpha$  y el resto de tratamientos y experimentos ya que, a pesar de las liberaciones de huevos, el índice aumentó hasta cerca del 4 en todos los casos, produciéndose incluso un exceso de hinchazón en las gónadas, a excepción de los controles que permanecieron en torno a un índice G 3-2,5.



**Figura 4-6** huevos de lenguado observados a la lupa. Fotografía de Ignacio Carazo

#### 4.3.1. Análisis de las puestas

##### 4.3.1.a. Inducción GnRH $\alpha$

El primer día del experimento, previamente a la inyección con GnRH $\alpha$ , se revisó la madurez de las hembras (IG-visual). De las 10 hembras utilizadas para la

cuanto al tiempo de activación, no presentó diferencias con este tratamiento en cuanto al % de movimiento de los espermatozoides.

No hubo diferencias significativas en el grado de maduración

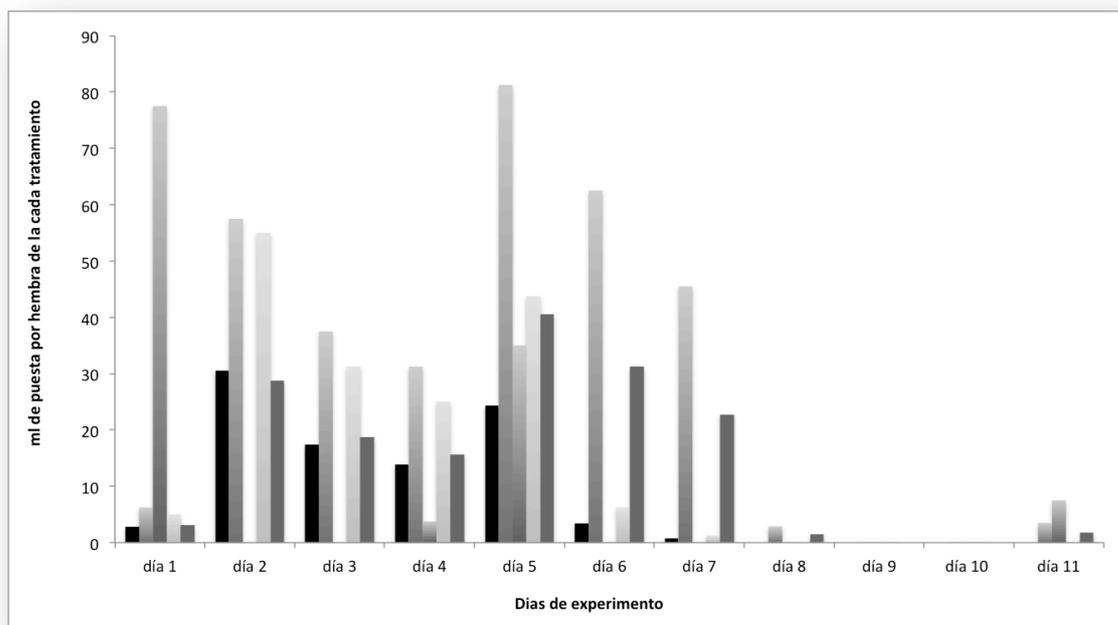
realización del experimento, 6 presentaron un índice G de 4, 3 presentaron un índice 3 en el que la gónada presenta flaccidez al tacto, mientras que la última mostró un índice 1-2. Al finalizar el experimento la hembra con un índice 1-2 había reabsorbido completamente la gónada, el resto de las hembras permaneció con un índice de 3,5 cercano al 4. Se recogieron un total de 5 puestas, con un total de 670 ml de huevos que, no estaban fecundados, aunque el 55 % eran flotantes. Los huevos flotantes fueron incubados para confirmar, mediante incubación en placas de 96 pocillos, que no estaban fecundados dado que a las 48 horas todos estaban muertos (Figura 4-6).

#### 4.3.1.b. Inducción GnRH<sub>a</sub> - hCG

Todas las hembras presentaron un índice G de 3 al inicio del experimento, y similar al final, aunque con mayor variación. Se recogieron 39 puestas en 10 días con un volumen medio de huevos por tratamiento de 39,36 ml para el hCG y 72,92 ml para el tratamiento de GnRH<sub>a</sub>. El grupo control produjo una media de 37,22 ml por puesta. El 81,24 % pertenecían a la fracción no flotante. La fecundación se comprobó mediante incubación en placas de 96 pocillos ya las 48 horas todos los huevos incubados estaban muertos.

#### 4.3.1.c. Inducción GnRH<sub>a</sub> -PG

Aunque 2 hembras presentaron inicialmente un índice G de 3 y el resto un índice G de 4 al finalizar el experimento todas las hembras utilizadas presentaron un índice 4. Se obtuvieron 6 puestas de más de 20 ml, en 3 de los 4 tanques del tratamiento con PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , mientras que los tanques control no produjeron ninguna puesta. El volumen total de huevos recogidos de los tanques tratamiento, fue de 310 ml de los que 192 ml correspondieron a la fracción no flotante. Tras la observación e incubación durante 24 h de la fracción flotante se concluyó que no estaban fecundados y el 100% de los huevos murió al cabo de 48 h. Uno de los tanques experimentales nunca presentó puestas por lo que no fue inducido con prostaglandinas.



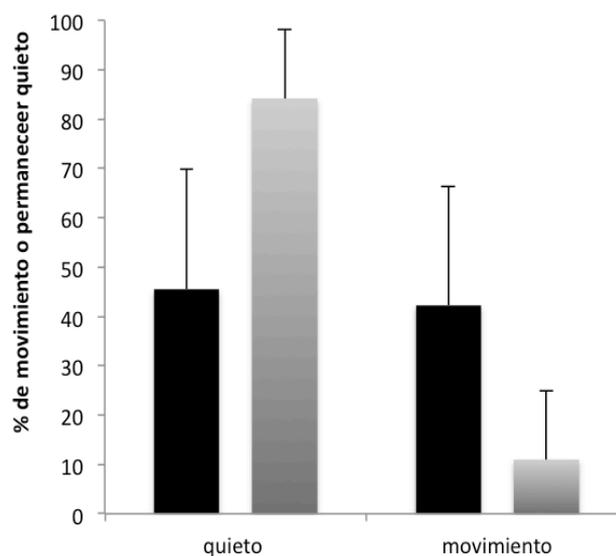
**Figura 4-7** Volumen (V) de puestas de hembras inducidas, media del V por hembra en cada tratamiento. (■) controles 1 y 2 combinados, (■) hCG, (■) inyección de GnRH, (■) implante de GnRH, (■) PGF2 $\alpha$ .

### 4.3.2. Análisis de actividad y comportamientos reproductivos asociados con la puesta.

#### 1) Cuantificación de la actividad de los peces

Tras el estudio de la actividad media, analizando las filmaciones cada 2 minutos, se detectó una bajada de la actividad tras la manipulación aunque los perfiles de actividad general se mantuvieron similares, con picos de actividad tras la alimentación y una actividad máxima entre las 16:00 h y las 02:00 h.

Hubo diferencias en la actividad entre los sexos



**Figura 4-8** Diferencias de actividad entre machos y hembras. (■) macho, (■) hembra. Relación de actividad observada visualizando 6 grupos de 30 minutos en cada tanque. Las mediciones se realizaron en el tratamiento control.

presentando los machos un mayor porcentaje de actividad (hasta un 45%) en el tiempo analizado, que las hembras (de un 15 a un 30%) (Figura 4-8), sin embargo la actividad en los tanques tratamiento en general fue baja en todos los casos, y solo los tanques control presentaron una mayor actividad (Figura 4-9).

## *2) Cortejo*

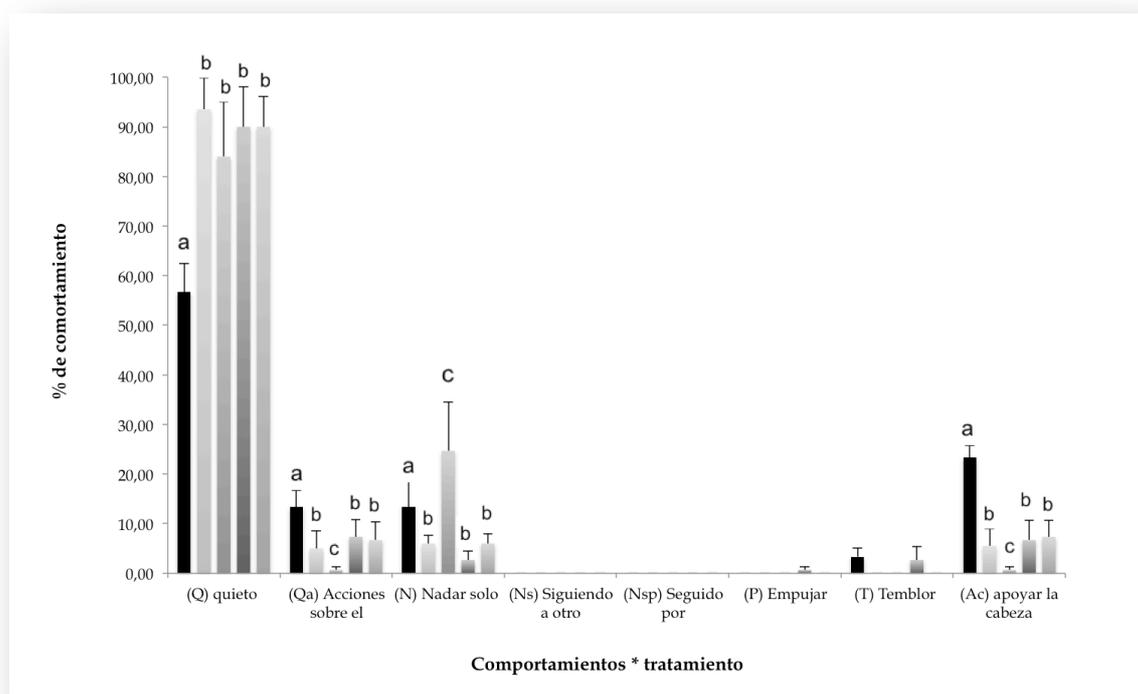
En el visionado rápido de los videos de todos los grupos de los 3 experimentos no hubo indicios de cortejo o puesta. Tras la visualización detallada de las filmaciones de video buscando comportamientos asociados a la reproducción (formación de pareja, macho “molestando” a la hembra y protegiendo la hembra de otros machos, persecuciones entre machos y machos/hembra, natación de la hembra y el macho juntos hacia el superficie) se observó la total ausencia de todos esos comportamientos durante los experimentos. No se observó ninguna subida en pareja ni los comportamientos que forman parte de las persecuciones: “seguir a” y “seguido por” (Figura 4-9). Sin embargo sí se distinguieron subidas momentáneas a la superficie por parte de hembras solitarias, especialmente en los tanques de 10 m<sup>3</sup> del experimento de inducción solo con GnRH.

## *3) Comportamientos desplegados tras la inducción.*

El grupo control presentó diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ), en comparación con los grupos inducidos, en todos los comportamientos desplegados, lo que se puede considerar como mayor actividad general (Figura 4-9). Así los peces del grupo control presentaron mayor cantidad de actividades sociales (apoyar la cabeza) con sus respuestas relacionadas (permanecer quieto, con acciones sobre el o temblor como reacción aversiva a estos contactos). Se observan también diferencias entre el grupo de peces inducido con hCG y los demás tratamientos, especialmente en los comportamientos que tienen un carácter más social, con valores significativamente más bajos ( $P < 0,001$ ) que el resto de los grupos, mientras que en el comportamiento “nadar solo” los

valores obtenidos para el grupo inducido con hCG son significativamente mas altos ( $P < 0,05$ ) (Figura 4-9).

Los comportamientos observados en los grupos inducidos con GnRHa no presentaron diferencias significativas entre las diferentes aplicaciones: inyección e implante y el tratamiento con  $PGF2\alpha$ .



**Figura 4-9** Porcentaje de peces manifestando los distintos tipos de comportamiento asociados a la reproducción (■)Control, (▨)GnRHa implante, (■)hCG, (■)PGF2α, (■)GnRHa inyección. No se presentan los datos del control 2 debido a que no presentó ninguna puesta ni liberación de huevos.

#### 4.4. Discusión

Todos los tratamientos hormonales utilizados en esta serie de experimentos dieron lugar a desoves similares a los descritos tanto para el lenguado senegalés (Agulleiro et al., 2006; Guzmán et al., 2011a) y otros peces planos, *Paralichthys lethostigma* (Berlinsky et al., 1996; Watanabe et al., 1998), *Paralichthys dentatus* (Berlinsky et al., 1997), limanda (*Pleuronectes ferrugineus*) (Larsson et al., 1997) o rodaballo (*Scophthalmus máximus*) (Mugnier et al., 2000), sin embargo en ninguno de los tratamientos experimentales de este estudio se observaron comportamientos de cortejo y los huevos obtenidos no estaban fecundados.

La inducción hormonal tuvo un claro efecto en los machos provocando un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) tanto en la movilidad como en el tiempo de actividad del esperma, ya observado tanto en el lenguado (Guzmán et al, 2011b) como en otras especies (Zohar y Mylonas, 2001)

No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos en cuanto al índice gonadal de las hembras al inicio de los experimento excepto en el grupo control. Cabe destacar que una de las hembras que mostraba un IG bajo (1-2) al finalizar el experimento había reabsorbido la gónada quedándose en un IG=1. Hubo diferencias significativas en las hembras inducidas con prostaglandina y los demás tratamientos, diferencias que pueden explicarse por la aplicación de la  $PGF2\alpha$  en combinación con el GnRH $\alpha$ , lo que provocó un aumento del volumen de la gónada debido a la hidratación de los oocitos.

La actividad de los peces de los distintos tratamientos, independientemente del tipo de hormona aplicado, fue significativamente menor ( $P < 0.05$ ) que la observada en el grupo control. Todos los peces, y en todos los tratamientos empleados, mostraron un elevado grado del comportamiento “quieto” sin mostrar ningún tipo de interacción con el resto de los individuos del tanque.

Para el estudio de comportamiento en los distintos tratamientos se seleccionaron los comportamientos más relevantes en cuanto a cortejo y relaciones entre individuos obtenidos a partir del etograma del lenguado (capítulo 3). Se consideraron los siguientes comportamientos: “permanecer quieto” ya que aporta información sobre el grado de actividad de los peces, “nadar solo” que apunta a la actividad individual sin interacciones entre individuos, “apoyar la cabeza” como inicio de una interacción entre individuos, “permanecer quieto con acciones sobre el” y “temblor” usados como respuesta a los intentos de interacción y “seguir a” y “seguido por” que forman parte de los preámbulos del cortejo.

El comportamiento “permanecer quieto” presentó valores muy elevados, llegando a observarse menos de un 7% de actividad en los peces inducidos bien con GnRH aplicado en implante e inyección o con la combinación GnRH<sub>a</sub> y PGF<sub>2</sub>. Se registró algo más de actividad (15%- 30%) en los peces tratados con hCG, aunque sin diferencias significativas con el resto de los tratamientos hormonales. Solo se observaron diferencias significativas cuando se comparan los comportamientos de los grupos tratados con el grupo control que mostró siempre un 35% - 45% del tiempo de actividad en el tanque. “Quieto con acciones sobre el” mostró diferencias entre el tratamiento control y los demás tratamientos debido a que hubo mas interacciones exploratorias entre individuos, acompañado por un aumento en la respuesta hacia esta interacción bien “permaneciendo quieto” o “temblando” a modo de rechazo. No se observó natación a media altura como respuesta favorable a la interacción. El tratamiento con HCG presentó índices muy bajos de interacciones entre varios individuos y la actividad registrada en los tanques fue casi de forma exclusiva “nadar solo”. No se produjeron, en ningún caso, comportamientos relacionados con actividades competitivas entre machos, (siguiendo a y seguido por).

#### 4.5. Conclusiones

La inducción con hormonas GnRH $\alpha$ , tanto en implante como en inyección, HCG o PGF2 $\alpha$  permiten a las hembras alcanzar un elevado grado de maduración observable mediante el índice externo de madurez, obteniéndose puestas liberadas de forma natural en los tanques, sin embargo la disfunción reproductiva permanece ya que las puestas obtenidas no fueron viables. En el caso de los machos la inducción hormonal también tuvo un efecto positivo sobre la movilidad espermática y la duración de la misma. Sin embargo la actividad general de los individuos inducidos hormonalmente fue en todos los caso muy baja, sin que pudiera observarse una inducción del comportamiento reproductivo, ni en las hembras, ni en los machos que las acompañan, por lo que no queda claro el papel de estas hormonas en el comportamiento reproductivo y la comunicación conespecífica o en el reconocimiento de los individuos.

## Bibliografía

- Agulleiro, M. J., Anguis, V., Cañavate, P., Martínez-Rodríguez, G., Mylonas, C. C. & CERDA, J. (2006). *Induction of Spawning of Captive-Reared Senegal Sole (Solea Senegalensis) Using Different Administration Methods for Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist*. Amsterdam, PAYS-BAS: Elsevier.
- Agulleiro, M. J., Cerdà, J., Duncan, N., Mylonas, C. & Scott, A. P. (2007). *Treatment of GnRHa-Implanted Senegalese Sole (Solea Senegalensis) with 11-Ketoandrostenedione Stimulates Spermatogenesis and Increases Sperm Motility*.
- Anguis, V. & Canavate, J. P. (2005). *Spawning of Captive Senegal Sole (Solea Senegalensis) under a Naturally Fluctuating Temperature Regime*. *Aquaculture* **243**, 133-145.
- Berlinsky, D. L., King V, W., Smith, T. I. J., Hamilton, R. D., Holloway, J. & Sullivan, C. V. (1996). *Induced Ovation of Southern Flounder Paralichthys Lethostigma Using Gonadotropin Releasing Hormone Analogue Implants*. *Journal of the World Aquaculture Society* **27**, 143-152.
- Berlinsky, D. L., William, K. V., Hodson, R. G. & Sullivan, C. V. (1997). *Hormone Induced Spawning of Summer Flounder Paralichthys Dentatus*. *Journal of the World Aquaculture Society* **28**, 79-86.
- Cabrera E., Robles, V. & Herráez, P., 2008. *Methods in reproductive aquaculture*, CRC, 81-85.
- Cross, I., Guzmán, J. M., Kight, K., Klenke, U., Mañanós, E. L., Ortiz-Delgado, J. B., Rebordinos, L., Riaza, A., Rubio, M., Sánchez-Ramos, I. & Sarasquete, C. (2009). *Comparative Gene Expression of Gonadotropins (Fsh and Lh) and Peptide Levels of Gonadotropin-Releasing Hormones (GnRHs) in the Pituitary of Wild and Cultured Senegalese Sole (Solea Senegalensis) Broodstocks*. *Comparative Biochemistry and Physiology - A - Molecular and Integrative Physiology* **153**, 266-277.
- Devauchelle, N., Alexandre, J. C., Lecorre, N. & Letty, Y. (1988). *Spawning of Turbot (Scophthalmus-Maximus) in Captivity*. *Aquaculture* **69**, 159-184.
- Flüchter, J. (1972). *Inducing of Spawning in the Turbot (Rhombus Maximus L.) by Injection of Hypophyseal Suspensions*. *Aquaculture* **1**, 285-287.
- Fujita, I., Sorensen, P. W., Stacey, N. E. & Hara, T. J. (1991). *The Olfactory System, Not the Terminal Nerve, Functions as the Primary Chemosensory Pathway Mediating Responses to Sex Pheromones in Male Goldfish*. Basel, SUISSE: Karger.
- Guzmán, J. M., Bayarri, M. J., Ramos, J., Zohar, Y., Sarasquete, C. y Mananos, E. L. (2009). *Follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression during larval development in Senegalese sole (Solea senegalensis)*. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* **154**, 37-43.
- Guzmán, J. M., Cal, R., García-López, á., Chereguini, O., Kight, K., Olmedo, M., Sarasquete, C., Mylonas, C. C., Peleteiro, J. B., Zohar, Y. & Mañanós, E. L. (2011a). *Effects of in Vivo Treatment with the Dopamine Antagonist Pimozide and Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist (GnRHa) on the Reproductive Axis of Senegalese Sole (Solea*

- Senegalensis). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology***158**, 235-245.
- Guzmán, J. M., Ramos, J., Mylonas, C. C. & Mañanós, E. L. (2011b). Comparative Effects of Human Chorionic Gonadotropin (hCG) and Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist (GnRHa) Treatments on the Stimulation of Male Senegalese Sole (*Solea Senegalensis*) Reproduction. *Aquaculture***316**, 121-128.
- Hubbard, P. C. (2012). Pheromones in Marine Fish and Their Culture. (Book, U. C., ed.).
- Larsson, D. G. J., Mylonas, C. C., Zohar, Y. & Crim, L. W. (1997). *Gonadotropin-Releasing Hormone Analogue (GnRH-a) Induces Multiple Ovulations of High-Quality Eggs in a Cold-Water, Batch-Spawning Teleost, the Yellowtail Flounder (*Pleuronectes Ferrugineus*)*. Ottawa, ON, Canada: National Research Council of Canada.
- Mechaly, A. S., Viñas, J. & Piferrer, F. (2012). Sex-Specific Changes in the Expression of Kisspeptin, Kisspeptin Receptor, Gonadotropins and Gonadotropin Receptors in the Senegalese Sole (*Solea Senegalensis*) During a Full Reproductive Cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology***162**, 364-371.
- Mugnier, C., Guennoc, M., Lebegue, E., Fostier, A. & Breton, B. (2000). Induction and Synchronisation of Spawning in Cultivated Turbot (*Scophthalmus Maximus L.*) Broodstock by Implantation of a Sustained-Release GnRH-a Pellet. *Aquaculture***181**, 241-255.
- Muñoz-Cueto y González Martínez, (2005) Sistemas GnRH en Peces Perciformes. Universidad de Cádiz. Capítulo 1, 33
- Mylonas, C. C., Fostier, A. & Zanuy, S. (2010). Broodstock Management and Hormonal Manipulations of Fish Reproduction. *General and Comparative Endocrinology***165**, 516-534.
- Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 10, 463-491.
- Mylonas, C. C., Zohar, Y. (2008). Controlling Reproduction in Aquaculture. In: Burnell, G., Allan, G. (Eds.). *New Technologies in Aquaculture: Improving Production Efficiency, Quality and Environmental Management***Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK**, 001-038.
- Pfaff, D. (2005). Hormone-Driven Mechanisms in the Central Nervous System Facilitate the Analysis of Mammalian Behaviours. *Journal of Endocrinology***184**, 447-453.
- Rasines, I., Gómez, M., Martín, I., Rodríguez, C., Mañanós, E. & Chereguini, O. (2011). Artificial Fertilization of Senegalese Sole (*Solea Senegalensis*): Hormone Therapy Administration Methods, Timing of Ovulation and Viability of Eggs Retained in the Ovarian Cavity. *Aquaculture***326-329**, 129-135.
- Scott, A. P. & Sorensen, P. W. (1994). Time Course of Release of Pheromonally Active Gonadal Steroids and Their Conjugates by Ovulatory Goldfish. *General and Comparative Endocrinology***96**, 309-323.

- Sorensen, P. W. (1992). Hormonally Derived Sex Pheromones in Goldfish: A Model for Understanding the Evolution of Sex Pheromone Systems in Fish. *The Biological Bulletin* **183**, 173-177.
- Sorensen, P. W., Hara, T.J., Stacey, N.E., Goetz, F.W. (1988). F Prostaglandins Function as Potent Olfactory Stimulants That Comprise the Postovulatory Female Sex Pheromone in Goldfish. *Biology of Reproduction* **39**, 1039-1050.
- Sorensen, P. W. & Stacey, N. E. (2004). Brief Review of Fish Pheromones and Discussion of Their Possible Uses in the Control of Non-Indigenous Teleost Fishes. In *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, pp. 399-417: Taylor & Francis.
- Sorensen, P. W. & Winn, H. E. (1984). The Induction of Maturation and Ovulation in American Eels, *Anguilla Rostrata* (Lesueur), and the Relevance of Chemical and Visual Cues to Male Spawning Behaviour. *Journal of Fish Biology* **25**, 261-268.
- Stacey, N. & Sorensen, P. (2006). Reproductive Pheromones. *Fish Physiology* **24**, 359-412.
- Stacey, N., Sorensen, P., Donald, W. P., Arthur, P. A., Susan, E. F., Anne, M. E. & Robert, T. R. (2002). Hormonal Pheromones in Fish. In *Hormones, Brain and Behavior*, pp. 375-434. San Diego: Academic Press.
- Steffen S. Madsen, Skovbølling, S., Nielsen, C. & Korsgaard, B. (2004). 17-Estradiol and 4-Nonylphenol Delay Smolt Development and Downstream Migration in Atlantic Salmon, *Salmo Salar*. *aquatic toxicology* **68**, 11.
- Swanson, P., Bernard, M., Nozaki, M., Suzuki, K., Kawauchi, H., y Dickhoff, W.W., 1989. Gonadotropins I and II in juvenile coho salmon. *Fish Physiol. Biochem.*, 7: 169-176
- Vélez, Z., Hubbard, P., Welham, K., Hardege, J., Barata, E. & Canário, A. (2009). Identification, Release and Olfactory Detection of Bile Salts in the Intestinal Fluid of the Senegalese Sole (<I>Solea Senegalensis</I>). *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **195**, 691-698.
- Watanabe, W. O., Ellis, E. P., Ellis, S. C. & Feeley, M. W. (1998). Progress in Controlled Maturation and Spawning of Summer Flounder *Paralichthys Dentatus* Broodstock. pp. 393-404: Blackwell Publishing Ltd.
- Zohar, Y. & Mylonas, C. C. (2001). Endocrine Manipulations of Spawning in Cultured Fish: From Hormones to Genes. *Aquaculture* **197**, 99-136.
- Zohar, Y. I. O. a. L. R., Eilat (Israel). National Center for Mariculture) (1988). Gonadotropin Releasing Hormone in Spawning Induction in Teleosts: Basic and Applied Considerations. *Reproduction in fish. Basic and applied aspects in endocrinology and genetics, Tel-Aviv (Israel), 10-12 Nov 1986. Colloques de l'INRA. INRA, Paris (France)* **44**.



## Capítulo 5

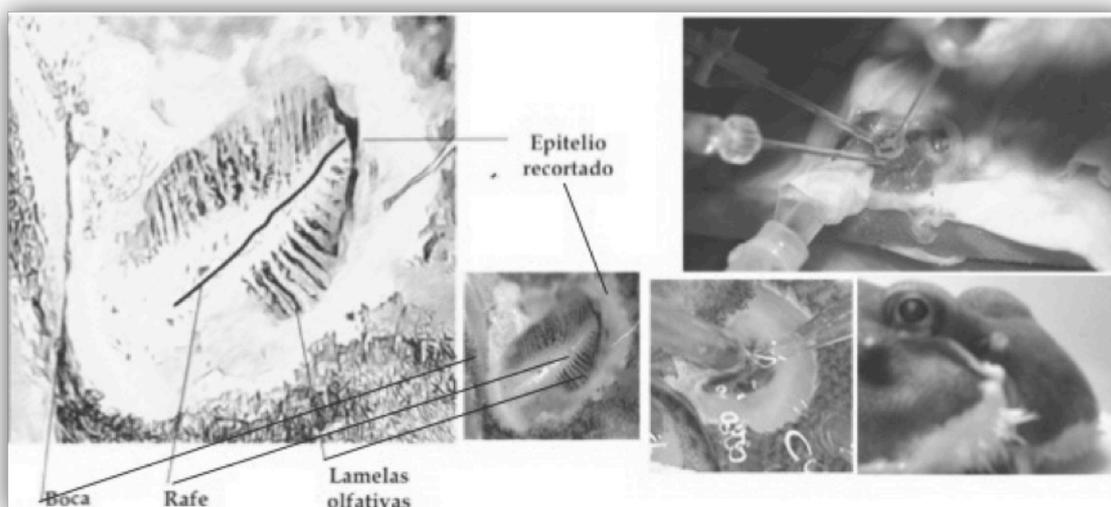
---

## 5. Percepción química conespecífica en el Lengado senegalés (*Solea senegalensis*, Kaup)

### 5.1. Introducción

Kittredge et al. (1971) fue el primero en sugerir que los organismos acuáticos usan hormonas y sus metabolitos como feromonas sexuales y Døving (1976) sugirió que esa misma posibilidad fuese aplicada concretamente a los peces teleósteos. La definición más actual, define las feromonas como “un “olor” o mezcla de sustancias olorosas, liberadas por un individuo (emisor) que provocan en individuos de la misma especie (receptores) adaptaciones concretas y respuestas típicas de cada especie. La expresión de estas reacciones “no requiere una experiencia previa o aprendizaje” (Sorensen y Stacey, 1999) y su detección por parte del individuo receptor se produce a través de los sentidos del olfato y del gusto

Se han propuesto una gran variedad de productos químicos para funcionar como feromonas en peces, tetrodotoxina (Matsumura, 1995), aminoácidos específicos (Kawabata 1993), purinas (Pfeiffer et al 1985.), ácidos biliares (Selset y Døving, 1980, Polkinghorne et al., 2001), esteroides gonadales, (Sorensen et al., 1990) prostaglandinas F. (Sorensen et al. 1988). Ha sido demostrada la percepción de diferentes compuestos, incluyendo: esteroides, (Scott et al., 2007), catecolaminas (Hubbard et al., 2003a), ácidos biliares (Li et al., 2002; Vélez et al., 2009), prostaglandinas (Sorensen et al., 2004) y feromonas (Sorensen et al., 1998; Sorensen et al., 2004; Stacey et al., 2006). Para la medición de esta percepción en peces, fundamentalmente de agua dulce que presenta mayor respuesta que los de agua salada (Huertas et al., 2007; Hubbard et al., 2011) se ha usado desde hace más de 30 años el electroolfatograma (EOG) (Sorensen, 1988; Hara, 1994; Scott et al., 1994; Stacey et al., 1995; Scott et al., 2002).



**Figura 5-1:** Roseta olfativa al descubierto en el lenguado para mediciones con el EOG (I. Carazo, 2010).

De esta variedad de químicos propuestos como feromonas únicamente para los esteroides gonadales, prostaglandinas y ácidos biliares ha sido descrita su liberación a partir de un organismo conspecífico (organismo emisor), su detección o percepción olfativa de otro organismo conspecífico (organismo receptor) y la estimulación de una respuesta biológica en el organismo receptor (Sorensen y Stacey, 2004). Lo que ha sido comprobado mediante el EOG en numerosas especies: cypriniformes, siluriformes, characiformes, salmoniformes y perciformes, presentando una notable especificidad a estos compuestos. (Stacey y Cardwell 1995; Stacey y Sorensen 2002). Muchos esteroides sexuales, prostaglandinas y sus metabolitos son detectados con gran sensibilidad y especificidad por algunas especies de peces como carpas salmónidos y gobios (Stacey et al., 2002; Stacey y Sorensen, 2006) y ejercen un efecto clave en el comportamiento reproductivo y en la fisiología de estos taxones. La percepción química para la comunicación ha sido demostrada en varias especies como el pez rojo (*Carassius auratus*) (Stacey et al, 2003) o la anguila (*Anguilla anguilla*) (Huertas et al, 2007). Por esta dinámica de acción (emisión de unos compuestos al medio por un emisor) y reacción (captación de los compuestos, por un receptor, que implican una respuesta a corto o medio plazo de éste) se considera que existe una comunicación química conespecífica bien a corto (modificación del comportamiento inmediato) o medio plazo (cambios hormonales y fisiológicos, a medio plazo), para los peces teleósteos (pez rojo, pércidos, gobios, anguilas) especialmente en la reproducción (Stacey et al., 2002;

Huertas et al., 2007). Los ácidos biliares, las hormonas esteroideas y las prostaglandinas ocupan un lugar prevalente en este tipo de señales, ya que se ha demostrado su importancia en distintas especies de teleósteos. En el pez rojo las prostaglandinas (Sorensen, 1987), en la anguila y el lenguado a los ácidos biliares (Huertas et al., 2007, Vélez et al., 2007), en la lamprea a los ácidos biliares y hormonas esteroideas (Li et al., 2002). En el lenguado ha sido demostrada la percepción a los ácidos biliares (Vélez et al., 2007)

Varios trabajos han estudiado feromonas esteroideas en peces, como Colombo et al. (1982) al trabajar en la biosíntesis de esteroideas en el ovario de la carpa, Van den Hurk et al. (1987) y Van den Hurk y Lambert (1983) que describieron la función como feromonas de esteroideas glucurónidos ováricos sobre el macho de pez cebra y en el pez gato (*Clarias gariepinus*) (Lambert et al., 1986) o en otros teleósteos (Stacey et al., 1987). Ciertos compuestos esteroideos provocan respuesta en el sistema olfativo de *Haplochromis burtoni* como muestran las mediciones mediante el EOG llevadas a cabo por Robinson, et al. (2008). Se comprobó que estos peces no respondían, sin embargo, a esteroideos libres, lo que es similar al bagre (*Clarias gariepinus*) (Resink et al., 1989) pero contrasta con el pez rojo (*Carassius auratus*) el cual si responde a esteroideos libres (Sorensen, et al., 1990) Sorensen et al., (1990) describieron la sensibilidad del pez rojo al  $17\alpha,20\beta$ -dihidroxy-4-pregnen-3-one, así como a otras 20 moléculas esteroideas.

Las prostaglandinas han sido identificadas como feromonas en algunos teleósteos (Sorensen et al., 1988; Moore & Waring, 1996) Sorensen et al. (1988) describieron la sensibilidad a las prostaglandinas F. del pez rojo que detecta la  $PGF2\alpha$  y sus metabolitos como el 15K-  $PGF2\alpha$  a concentraciones de  $10^{-10}$  M en el agua pero los cíclidos y otros perciformes presentan una pequeña y corta o bien ninguna respuesta olfativa a prostaglandinas (Kitamura et al., 1994; Stacey et al., 1995; Murphy et al., 2003). Kitamura, et al., (1994) estudió la respuesta de 11 especies de teleósteos a prostaglandinas F ( $PGF2\alpha$  y sus metabolitos 15-keto- $PGF2\alpha$ , o, 13,14-Dihydro-15-keto- $PGF2\alpha$ ). Las 5 especies de cypriniformes estudiadas presentaron distintas respuestas en el EOG a estas moléculas a

concentraciones de  $10^{(-7)}$  M. Por el contrario las seis especies de no cypriniformes presentaron respuestas bajas a las prostaglandinas a  $10^{(-7)}$  M., e incluso resultaban anósmicos a concentraciones de  $10^{(-8)}$  M

Los ácidos biliares parecen funcionar en muchos peces teleósteos como feromonas atractantes, Polkinghorne et al (2001) demostró la detección de 2 ácidos biliares únicos conoespecíficos por larvas de lamprea (*Petromyzon marinus*) que es liberado en un rango de 16 - 5 ng/h por cada animal y detectado en agua a 0,5-1,5 picomolar. A su vez han sido estudiados en animales adultos de la trucha ártica (*Salvelinus alpinus*) (Selset y Døving, 1980), la trucha lacustre (*Salvelinus namaycush*) (Zhang et al., 2001) Carpas (Sorensen y Caprio, 1998) o la Lamprea (*Petromyzon marinus*) la cual utiliza una variedad de ácidos biliares como agregante o como feromonas sexuales ( Li, et al., 1995; Li, et al., 2002; Sorensen, et al., 2003; Siefkes, et al., 2003)

En un pez plano marino como el lenguado, adaptado a condiciones de baja o nula iluminación (Bayarri et al., 2004) la percepción química conspecífica probablemente tiene una importancia similar o mas alta comparado a otras especies cuyos hábitos de vida, no limitados por condiciones de baja iluminación, les permiten una percepción del ambiente mediante la visión. Una posible vía de estudio para entender el problema reproductivo en el lenguado senegalés es llevar a cabo modificaciones en los ritmos hormonales de la G1 para estudiar posibles diferencias de comportamiento con los animales salvajes que sí practican el cortejo y se reproducen. Vélez et al., (2005) han estudiado la diferente sensibilidad que presenta el lenguado senegalés en ambas narinas, la de la cara oculta con una sensibilidad mayor a compuestos relacionados con la comida y el substrato ola de la cara superior con más sensibilidad a compuestos relacionados con el agua y con otros individuos de la misma especie. Esta percepción llevada a cabo por las neuronas receptoras que conforman la roseta olfativa, conlleva una cascada de reacciones internas a nivel neuronal cuantificables mediante el electroolfatograma. Tras la de la señal, el animal puede tener una respuesta a corto o medio plazo. A corto plazo mediante una modificación del comportamiento, realizando cambios en la

actividad que el animal estaba llevando a cabo en su intensidad(Stacey, 2003) o estimulando un acercamiento o un alejamiento al lugar de emisión de la señal (dependiendo del tipo de señal, por ejemplo señales de peligro)(Brown, et al, 2006). A medio plazo, se pueden llegar a producir alteraciones hormonales en el animal que capta la presencia de estos compuestos.

El presente estudio tiene como objetivo valorar los productos que son excretados y en que grado intervienen en la percepción química entre individuos de la misma especie. Se han seleccionado las prostaglandinas, moléculas cuyo mecanismo y función es conocido en organismos terrestres, como posibles vías de comunicación química en el lenguado senegalés ya que han resultado ser no solo importantes señales de la maduración sexual sino que además en estudios con animales acuáticos han mostrado nuevas e importantes características en la comunicación entre individuos (Sorensen *et al.*, 1984; Fujita *et al.*, 1991; Sorensen, 1992; Scott *et al.*, 1994; Sorensen *et al.*, 1998; Sorensen *et al.*, 2004; Sorensen *et al.*, 2005), lo que nos ha llevado a investigarlas como posibles vías de comunicación química en el lenguado senegalés.

Posteriormente se ha realizado un experimento para valorar posibles efectos de algunos de estos compuestos sobre el comportamiento (modificación del comportamiento inmediato por percepciones químicas). El estudio se realizó en Trømso en convenio con el Norwegian Institute of Food, Fisheries and Aquaculture Research(Nofima, Noruega). Debido a impedimentos legales, se llevó a cabo con una especie autóctona, el salvelino(*Salvelinus alpinus*), con el objetivo secundario de valorar su viabilidad y posteriormente importar la metodología a las instalaciones del IRTA, para su uso en el lenguado.

En resumen, los objetivos desarrollados en este capítulo fueron: determinar la percepción de diferentes fluidos que probablemente contienen feromonas para la comunicación conespecífica mediante el uso del Electroolfatograma (EOG) en el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Determinar el efecto de algunas de estas moléculas y fluidos en el comportamiento de la trucha ártica (*Salvelinus alpinus*).

## 5.2. Material y Métodos

### 5.2.1. Muestras

Se tomaron muestras, muestras de agua de los tanques y de los organismos, muestras de mucus, heces y orina (N=159 muestras). También se realizaron muestreos de agua de una secuenciación de la posible liberación al agua del tanque de posibles productos derivados de la inducción hormonal por parte de hembras tratadas.

#### 5.2.1.1. Animales de muestreo

Para llevar a cabo el estudio, se muestrearon 5 grupos de peces, tomando muestras de agua, mucus, orina y heces.

- Tres grupos mantenidos en las instalaciones del IRTA-San Carles de la Rápita (Tarragona).
  - Dos grupos de lenguados G1 seleccionados como posibles reproductores que han sido caracterizados genéticamente y sin parentesco entre machos y hembras. Eran animales G1, provenientes de un stock de Santander con una edad de 5 años, sexualmente maduros con un peso de  $1710,5 \pm 670,73$  g para las hembras y  $1314,66 \pm 497,13$  g para los machos. Los peces fueron mantenidos en un tanque de  $10 \text{ m}^3$  con una temperatura variable según las diferentes épocas del año.
  - Un tercer grupo de animales salvajes capturados en el Delta del Ebro en noviembre del 2007, de pequeño tamaño (peso medio de  $434,25 \pm 96,375$  g) a los que se les practicaron diferentes pruebas de madurez (extracción de esperma a los machos y oocitos a las hembras, resultando infructuosos ambos intentos) así como la caracterización de los niveles de vitelogenina para su posterior determinación del sexo. Estos animales fueron considerados como grupo de inmaduros en el estudio.

Los peces fueron alimentados seis días de la semana, 3 días se suministró pienso en raciones de 0,5% del peso corporal total (dos días: vitalis repro 8mm, y un día: elite 7mm, ambos de Skretting) y tres días de alimento fresco, un día mejillón (*Mytilus edulis*), otro calamar (*Loligo gahi* capturado en Falkland island) y otro poliquetos (*Nereis virens* obtenido en Topsy Baits, Zeeland, Holland), en raciones del 0,7% del peso corporal total. La temperatura fue de 16°C y la iluminación de 7:30 h a 18:00 h.

- Dos grupos mantenidos en las instalaciones del IEO Santander (planta de cultivos el Bocal) en condiciones de estabulación similares excepto en el tipo de tanque. Uno de los grupos formado por animales de origen salvaje de 7 años de edad con puestas espontaneas y regulares obtenidas en los últimos 3 años y mantenidos en un tanque de 14 m<sup>3</sup>. El otro grupo formado por animales G2 de 3 años de edad, obtenidos a partir de una de las pocas puestas espontáneas e inexplicadas que existían en los centros de investigación en el momento del muestreo y mantenidos en tanques de 0,8 m<sup>3</sup>. Este grupo ha sido caracterizado genéticamente para localizar los reproductores, aunque nunca habían participado en ninguna puesta. En Santander, la iluminación era entre las 08:00h y las 22:00 h y la temperatura del agua era de 14°C para ambos grupos en la época de toma de muestras.

#### **5.2.1.2. Toma de muestras**

De todos los grupos se seleccionaron animales al azar para la toma de muestras. Los muestreos se realizaron con peces alimentados el día anterior (para permitir el llenado del intestino y poder recoger muestras de heces). Los peces se extraían del agua sin anestésiar, se depositaban sobre una mesa cubriéndoles los ojos, se retiró el mucus con un portaobjetos (por raspado ligero de la superficie corporal del animal) y una jeringuilla, depositándolo en un tubo de cristal con tapón y refrigerándolo en una bandeja con hielo. Tras la recogida del mucus se anestésiaron (MS-222, 45 mg/l) durante 3 minutos, se midió el índice de madurez gonadal externa de las hembras (índice de madurez gonadal visual

descrito por Anguis y Cañavate (2005)) y se tomaron muestras de orina recogidas con jeringuilla presionando ligeramente el abdomen y las heces mediante una cánula acompañado por una segunda presión abdominal y una ligera succión, conservando todas las muestras obtenidas en hielo. Se tomaron además muestras de agua del tanque. Antes de depositar los peces en el tanque original, se tomaron los datos del chip de identificación de cada uno de los individuos, para una posterior identificación de las muestras.

MUESTRAS	MUESTRAS DE ORINA Y HECES DE LOS ANIMALES			
	Origen de los individuos a muestrear	muestras de orina	muestras de heces	replicas
stock salvajes (Santander)	Macho sexualmente maduro	1*	1	2
	Hembra sexualmente madura	1*	1	2
stock G2 (Santander)	macho con madurez desconocida	1*	1	2
	Hembra con madurez desconocida	1*	1	2
Stock G1 (IRTA) Tanque 1	Macho sexualmente maduro	1*	1	2
	Hembra sexualmente madura	1*	1	2
Stock G1 (IRTA) Tanque 2	Macho sexualmente maduro	1*	1	2
	Hembra sexualmente madura	1*	1	2
Stock inmaduros (IRTA)	Macho sexualmente Inmaduros	1*	1	2
	Hembra sexualmente inmadura	1*	1	2
muestras totales obtenidas		20*	20	40

**Figura 5-2** muestras de orina y heces recolectadas . \* de las muestras de orina se obtuvieron 4 muestras, por un lado 3 muestras filtradas (eluido de C18, eluido de C2 y filtrado de C2) posteriormente, la orina total, y el eluido de C18 fueron fraccionados y disueltos a 1/1000, 1/10000, 1/100000 y 1/1000000, de igual forma fueron diluidas las heces.

Se centrifugaron las muestras de mucus para eliminar el sobrenadante antes de congelarlas con el resto de muestras a -21°C hasta su procesamiento y medición mediante el electroolfatograma (EOG).

### Muestra de agua:

Se tomaron muestras de los tanques de mantenimiento de los animales, a la salida del tanque y a la entrada del tanque. Estas, presentan un procesado particular: una vez recogidas (1 l por muestra) se concentran primero haciendo

pasar el agua a través de un cartucho sep-pack (Waters) que fracciona la muestra en función del peso molecular [C-18: 18 carbonos, C-2: 2 carbonos].

Luego a través de sílica consolidada con hidrofobicidad fuerte, utilizada para soluciones acuosas a fin de fijar los analitos por adsorción (incluso los que presentan hidrofobicidad débil) y presenta un comportamiento similar a la CLAR inversa (Waters, WAT023501) que retiene esteroides y lipófilos polares. El resto del agua es descartada. Tras la extracción, se recuperan los productos retenidos mediante la aplicación de 5 ml de metanol, el extracto se guarda en

MUESTRAS	MUESTRA DE AGUA DEL TANQUE DE MANTENIMIENTO		MUESTRAS DE AGUA Y MUCO DE LOS ANIMALES			
	muestra de agua control. Entrada	Muestra de agua control. Salida	Origen de los individuos a muestrear	numero de muestras de agua obtenidas	muestras de Muco	replicas
stock salvajes (Santander)	1	1	Macho maduro	1	1	2
			Hembra madura	1	1	2
stock G2 (Santander)	1	1	Macho con madurez desconocida	1	1	2
			Hembra con madurez desconocida	1	1	2
Stock G1 (IRTA) Tanque 1	1	1	Macho maduro	1	1	2
			Hembra madura	1	1	2
Stock G1 (IRTA) Tanque 2	1	1	Macho maduro	1	1	2
			Hembra madura	1	1	2
Stock inmaduros (IRTA)	1	1	Macho Inmaduros	1	1	2
			Hembra inmadura	1	1	2
muestras totales obtenidas	5	5		20	20	50

Figura 5-3 muestras de agua y mucus recolectadas

tubos vidrio congelados a  $-20^{\circ}$ , al igual que el resto de muestras, hasta su utilización.

**Muestras de animales inducidos hormonalmente:** Cuatro hembras estabuladas en el IRTA, con un desarrollo gonadal de 2-3, se usaron para hacer una inducción hormonal, dos de ellas fueron inducidas con PGF2 $\alpha$  (Prostaglandina

-80	-40	-20	-10	0	10	20	40	80	160	320	640
-----	-----	-----	-----	---	----	----	----	----	-----	-----	-----

**Figura 5-4** Secuenciación de productos excretados tras la inducción. Tiempos de toma de muestra

F2 $\alpha$ ) (Sigma-Aldrich Chemical Co, Spain) y las otras dos con 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (17,20P) (Sigma-Aldrich Chemical Co, Spain), recogiendo los productos de excreción en el agua desde 80 min. antes de la inducción hormonal hasta 640 min. tras la inducción (Figura 5-4).

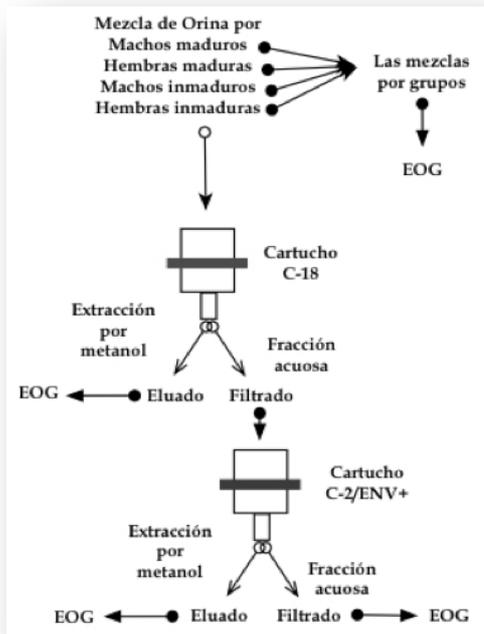
ORIGEN	TRATAMIENTO	CADA ANIMAL
G1 ( hembra madura IRTA) 1 animal	PGF2 $\alpha$ (Inducción)	(1 control de agua + 11 muestras / animal)
G1 ( hembra madura IRTA) 1 animal	PGF2 $\alpha$ (inducción)	11 muestras / animal
G1 ( hembra madura IRTA) 1 animal	control	(1 control de agua + 11 muestras / animal)
G1 ( hembra madura IRTA) 1 animal	17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -P (inducción)	11 muestras / animal
G1 ( hembra madura IRTA) 1 animal	17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -P (inducción)	(1 control de agua + 11 muestras X animal)
G1 ( hembra madura IRTA) 1 animal	control	11 muestras / animal
		<b>nº Total de muestras 69</b>

**Figura 5-5** muestras recolectadas para la secuenciación de animales inducidos

### 5.2.2 Electro Olfatograma (EOG):

A fin de efectuar el electroolfatograma (EOG) las muestras anteriormente descritas siguen el proceso siguiente:

- Evaporación del metanol
- Dilución en agua control (dilución 1-1 sustituyendo el metanol tras su evaporación)
- Resuspensión de la muestra que habitualmente esta concentrada en el fondo.



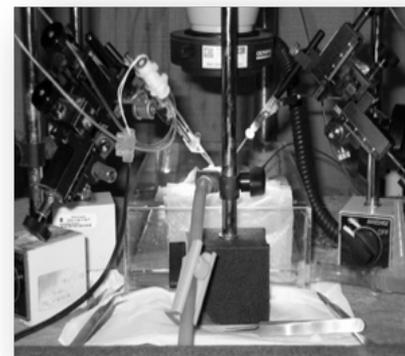
**Figura 5-6** Diagrama del fraccionamiento de las muestras de orina. Filtración por peso molecular. Adaptado de Huertas et al, 2007.

MS222 (ácido 3-aminobenzoico éster etílico. Sigma-Aldrich Chemical Co.), donde permanecía durante media hora. Tras esta primera sedación, el animal fue inyectado con 0,2 ml de trietyoduro de galamina (3 mg/kg/1 ml solución salina 0,9%), bloqueante muscular que impide las contracciones musculares involuntarias. El animal era situado en el soporte del Electroolfatograma donde era rápidamente intubado para evitar la muerte por falta de oxígeno. El agua para la respiración eran 10 l de agua marina previamente filtrada, con 1 g de MS222, (la mitad de la concentración inicial) para de este modo evitar que el pez despertara en medio del experimento.

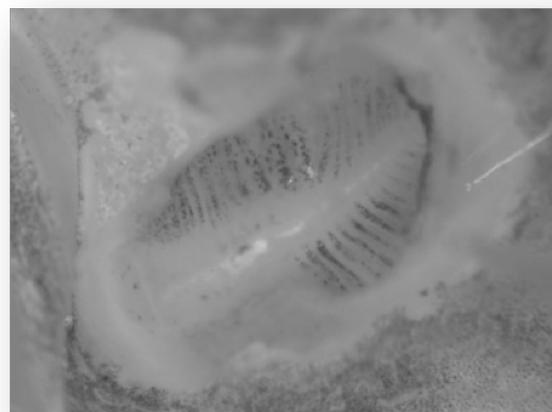
Metodología de grabación del EOG. (Hubbard et al., 2002)

#### *Preparación de los individuos para su medición mediante el EOG*

Los animales utilizados en el estudio, son 15 lenguados de pequeño tamaño, y 1 año de edad, con un peso medio de  $82,43 \pm 17,91$  g, aportados por el CCMAR, en Gambelas (Portugal). Cada animal fue trasladado desde los tanques de mantenimiento, en 5 l de agua con 1 g de



**Figura 5-7** Soporte y logística del EOG



**Figura 5-8** Lamelas olfativas tras retirar el epitelio de la narina

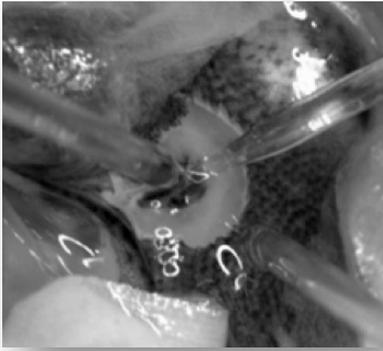


Figura 5-9 Situación electrodos EOG

Posteriormente, con un bisturí y en una lupa, se le retiraba el epitelio superficial de la narina, dejando expuesto el epitelio olfativo donde se situaban los electrodos de medición, así como el tubo inyector de muestra.

Se utilizaron aproximadamente 100 muestras por cada animal agrupándolas por muestreo para facilitar la coherencia de los resultados

obtenidos. los resultados se registraron con el programa AxoScope y posteriormente en Excel donde fueron tratados para su posterior análisis estadístico.

### 5.2.3 Análisis Estadístico:

Se estudiaron un total de 159 muestras sin fraccionar y 60 muestras

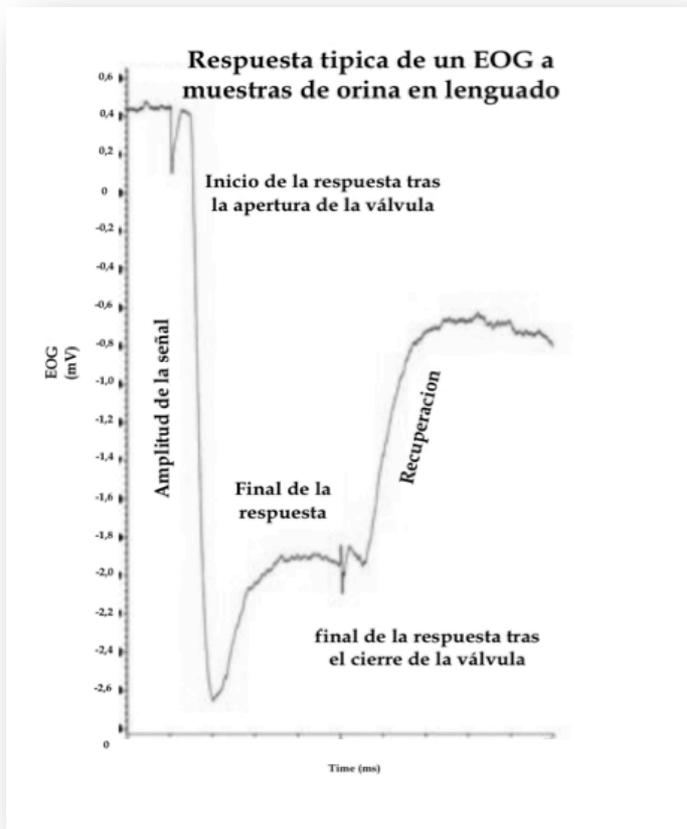


Figura 5-10 Gráfica de respuesta a una muestra. Perfil típico de respuesta en lenguado senegalés. Se distingue un primer pico de respuesta a la apertura de la válvula de inyección de muestra. A continuación la respuesta a la muestra, y finalmente la respuesta al cierre programado de la válvula. Posteriormente la pendiente de recuperación.

(correspondientes a los tipos: heces, orina y eluido 1 de orina) que fueron diluidas ( a 1.000, 10.000, 100.000, 1.000.000) para su estudio obteniendo un total de 399 muestras más los controles, que se inyectaron en la narina superior de los 15 individuos de estudio. Los resultados en este experimento los marca la amplitud de la señal registrada por el electroolfatograma. La

señal es un reflejo eléctrico de la excitación que provoca la muestra al contacto con los receptores olfativos de las lamelas de la nariz, provocando una sinapsis que captan los electrodos (captan la despolarización de los receptores y su posterior repolarización) y es registrada por el electroolfatograma y recogida por el ordenador.

Los datos obtenidos en el EOG de las diluciones de la muestra (heces y orina) se transformaron logarítmicamente para un posterior análisis de regresión. La comparación dos a dos de las líneas de regresión, pendiente e intersección se realizó mediante la t de Student.

Los datos fueron analizados mediante los programas Spss Statistics 17.0 (SPSSInc, IBM, Polar Engineering and consulting) y Sigma Stat 3.1 (Systat Software Inc., Germany).

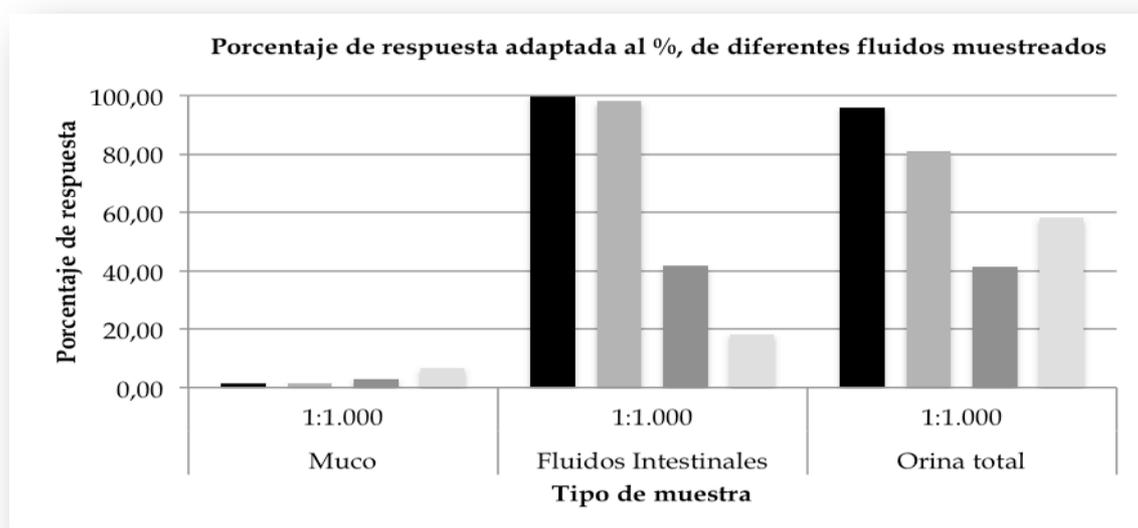
### 5.3. Resultados

#### 5.3.1 Muestras de agua:

En ninguno de los casos, los productos extraídos del (1) agua de los tanques generales de los peces, (2) agua de los tanques individuales, (3) agua de tanques con animales a los que se había inducido, tanto con  $\text{PGF2}\alpha$  como con  $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona ( $17,20\text{P}$ ), se registró un efecto en el EOG. Todas las muestras de agua analizadas tuvieron el mismo rango de efectos que el agua control, con valores comprendidos entre 0,05 y 0,1 mV. Solo hubo 2 casos en los que se observó una señal de reconocimiento por parte de los individuos pero el efecto no fue significativo y sin confirmación posterior en cuanto a diferencias entre las muestras de agua recogidas en los tanques de animales maduros o inmaduros, machos o hembras ni diferencias en el agua de los animales inducidos, entre un momento u otro de la inducción.

#### 5.3.2 Muestras de mucus:

El análisis de los extractos de mucus, al igual que el agua, nono indujo ningún cambio en la lectura del EOG (Figura 5-11), la detección fue de tan baja

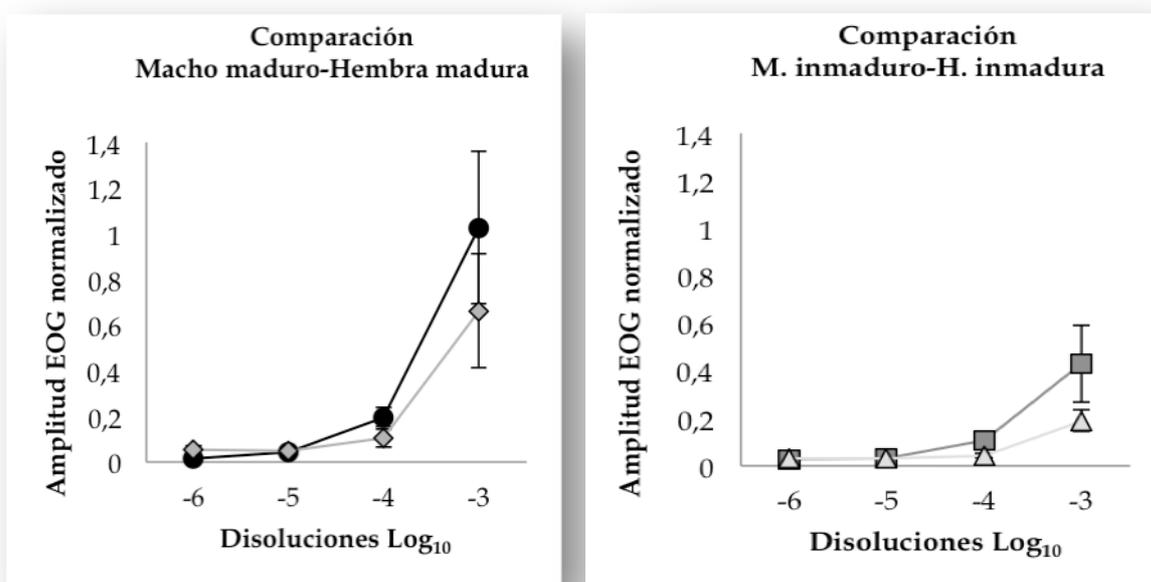


**Figura 5-11** Comparativa entre los 3 fluidos estudiados. Nótese que la concentración es 1/1000. Con lo que los valores en diluciones mayores, pierden totalmente significación. Se ha adaptado el máximo de respuesta al 100% para comparar las muestras. (■) macho maduro, (▣) hembra madura, (■) macho inmaduro, (▣) hembra inmadura.

intensidad que fue imposible realizar comparaciones. Las amplitudes de la respuesta del EOG de las muestras de mucus, fueron en todos los casos menores a un 10 % de la amplitud registrada si se medía orina o heces.

### 5.3.3 Respuesta olfativa a diferentes disoluciones de heces.

En el caso del análisis de heces de distintos individuos, macho maduro, hembra madura, macho inmaduro y hembra inmadura sí se produjo una respuesta en el EOG, muy relacionada con el nivel de dilución de la muestra (Figura. 5.12). Casi todas las rectas de regresión comparando el  $\log_{10}$  de la amplitud de la señal con el  $\log_{10}$  de la dilución de las muestras de heces presentaron una  $R^2$  superior a 0,913 excepto la recta de regresión de las hembras inmaduras que presentó una  $R^2$  del 0,771. Se detectaron diferencias significativas ( $P=0,05$ ) entre macho maduro-hembra madura y macho inmaduro-hembra inmadura tanto en la pendiente de la recta como en el ajuste, observándose una mayor respuesta cuando se usaban heces de machos que de hembras en ambas comparaciones (Figura 5-12). Además hubo diferencias significativas en la pareja hembra madura - hembra inmadura, así como en la pendiente entre la pareja macho



**Figura 5-12: Respuesta por madurez:** Gráfico semilogarítmico. Muestras de heces de macho maduro (●) Hembra madura (◆) macho inmaduro (■) hembra inmadura (Δ). Respuesta por madurez a muestras de heces a diferentes diluciones.

maduro - macho inmaduro obteniendo mayor respuesta para los maduros que para los inmaduros ( $P<0,05$ ), aunque sin diferencias significativas en el ajuste de la recta macho maduro-macho inmaduro (Figura 5-13).

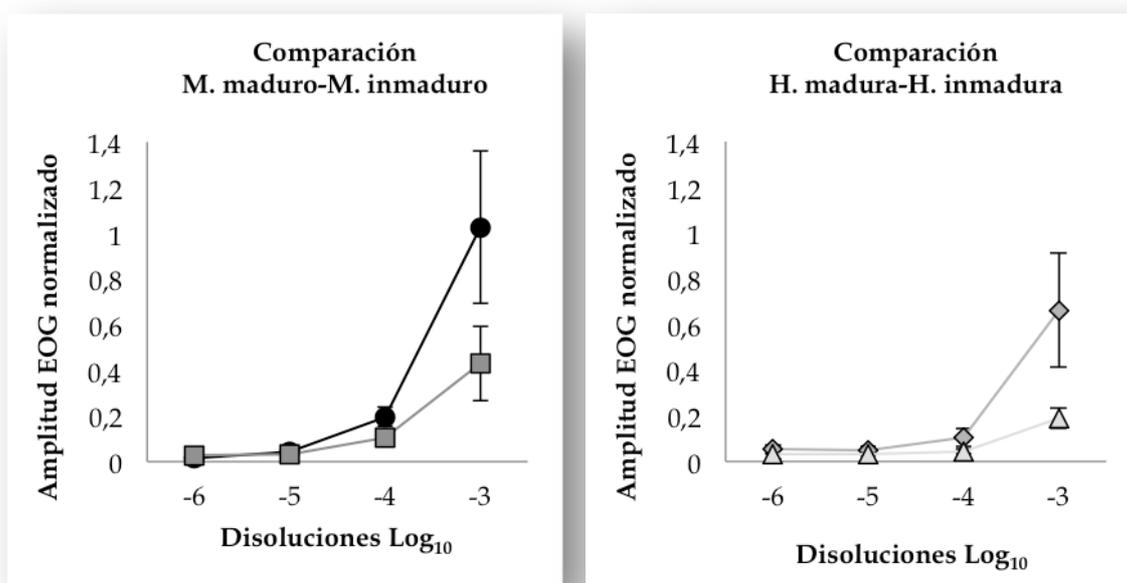


Figura 5-13 Respuesta por sexo: Gráfico semilogarítmico. Macho maduro (●) Hembra madura (◆) macho inmaduro (■) hembra inmadura (Δ). Respuesta por madurez a muestras de heces a diferentes diluciones.

### 5.3.4 Respuesta olfativa a la orina

- a. Respuesta a la exposición a muestras en bruto de orina usando diferentes diluciones. Hubo respuesta en el EOG a las diferentes diluciones de las muestras obtenidas de machos maduros, hembras maduras, machos

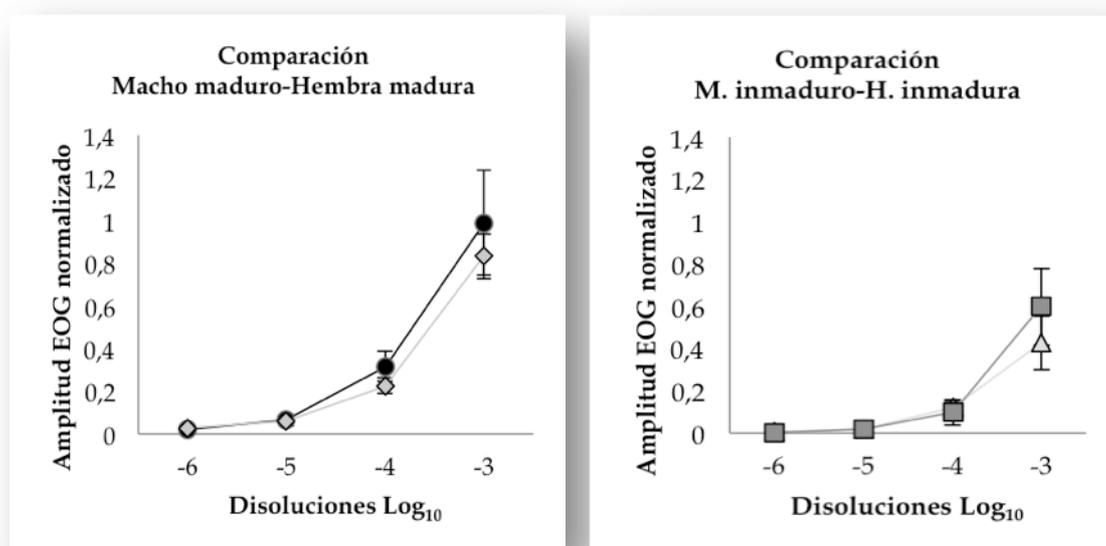
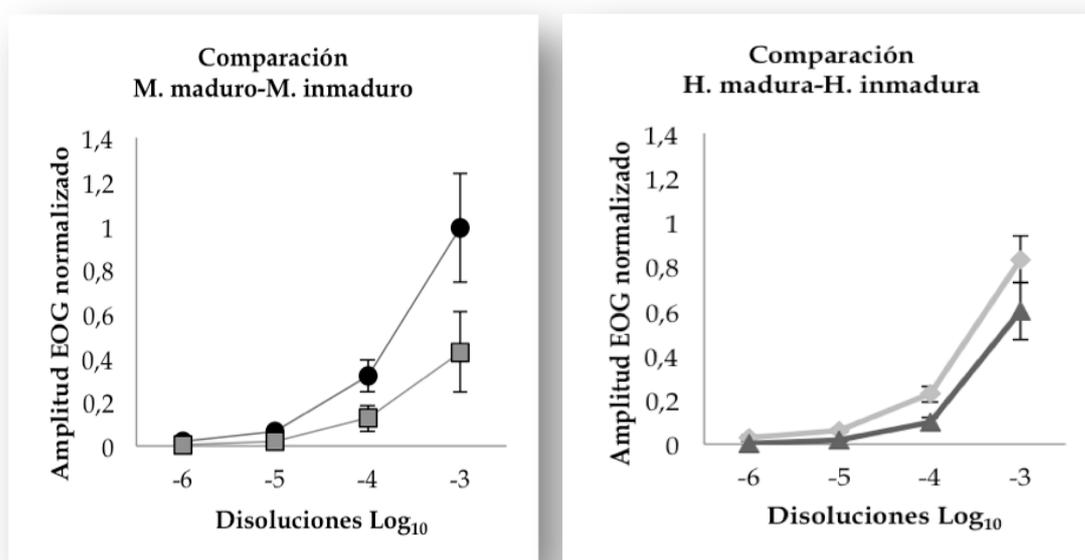


Figura 5-14 Respuesta por sexo: Gráfico semilogarítmico, macho maduro (●) hembra madura (◆) macho inmaduro (■) hembra inmadura (Δ) respuesta por sexo a muestras de orina a diferentes diluciones.

inmaduros y hembras inmaduras (Figuras 5-14 y 5-15).

La respuesta del EOG mostró una relación con el grado de dilución de la muestra (Figura. 5-14 y 5-15). Todas las rectas de regresión presentaron una  $R^2$  superior al 0,989. Hubo diferencias significativas en todas las comparaciones dos a dos (t-student;  $P < 0,05$ ). La respuesta del EOG a la orina de macho maduro fue mayor que a la de hembra madura y, a su vez, el macho inmaduro produjo mayor respuesta que la hembra inmadura (Figura 5-14). La discriminación en cuanto a la madurez de los peces, los individuos maduros produjeron significativamente mayor respuesta del EOG que los individuos inmaduros en



**Figura 5-15** Respuesta por madurez Gráfico semilogarítmico. Muestras de orina de: macho maduro (●) hembra madura (◆) macho inmaduro (■) hembra inmadura (▲) Respuesta por madurez a muestras de orina a diferentes diluciones.

ambos casos (Figura 5-15).

- b. Respuesta a orina tratada por fraccionamiento en fase sólida (C18) (Figura 5-6).

Al igual que en el caso de las muestras de orina sin tratar, todas las muestras de orina eluidas produjeron una respuesta en el EOG dependiente de la dilución aplicada (Figura. 5-16). Todas las rectas de regresión presentaron una  $R^2$  superior al 0,893. Hubo diferencias significativas (t-student;  $P < 0,05$ ) en la comparación por madurez (Figura 5-16). La respuesta a la orina de los machos

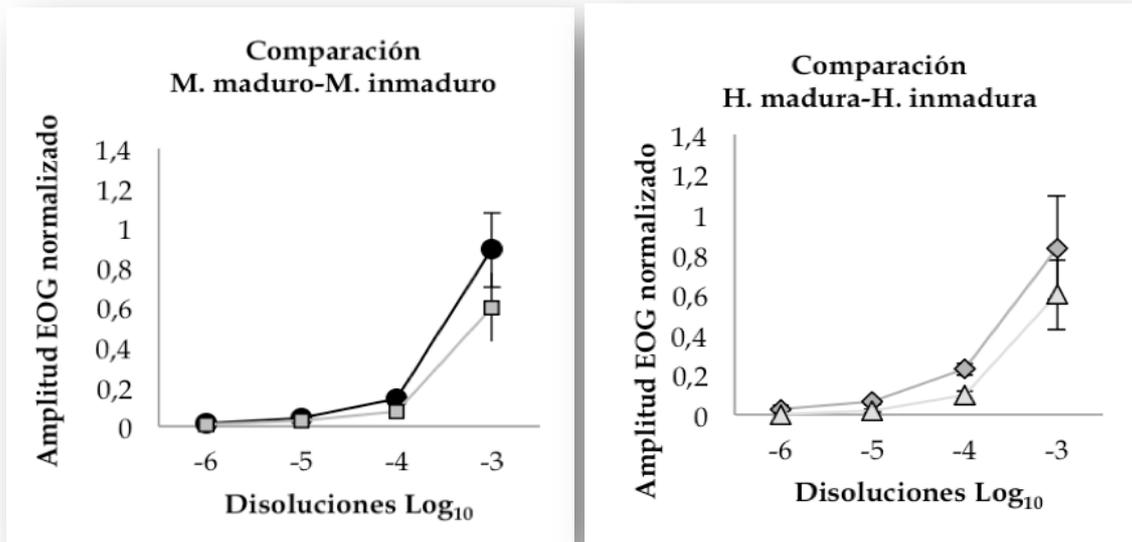


Figura 5-16 Respuesta por madurez Grafico semilogaritmico. macho maduro (●) hembra madura (◆) macho inmaduro (■) hembra inmadura (△) Fracción eluada a diferentes diluciones de respuesta por madurez a muestras de orina de la fracción eluada tras su paso por el cartucho C18 (ver figura 5-6)

maduros fue significativamente mas alta ( $P < 0.05$ ) que los machos inmaduros y

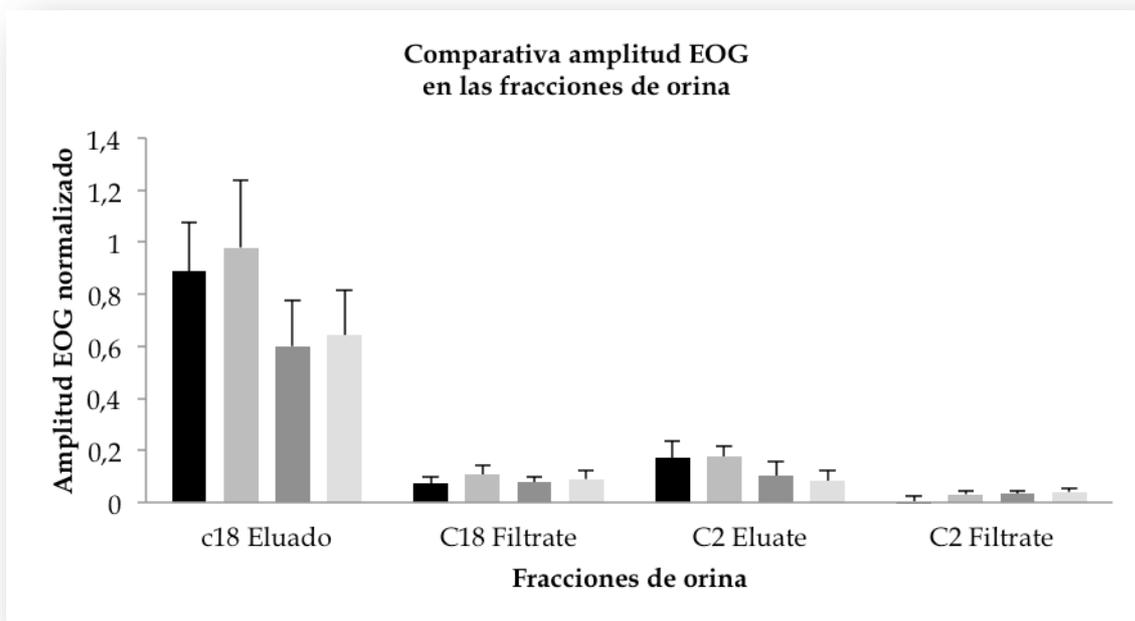


Figura 5-17 Media +S.E. de las amplitudes registradas en lenguados inmaduros ( $n=10$ ) en respuesta a la extracción fraccionada en fase sólida de orina de machos y hembras conespecíficos a diferentes estados de maduración, expresados como media de la respuesta a orina no tratada y a la misma dilución (1:1000) Obsérvese que la mayoría de la actividad es retenida por el cartucho de C-18 (C 18 eluado). (■) macho maduro, (◆) hembra madura (■) macho inmaduro, (△) hembra inmadura

la respuesta a la orina de las hembras maduras fue significativamente mas alto ( $P < 0.05$ ) que las hembras inmaduros. Sin embargo, no hubo diferencias en la comparación por sexo.

En la orina fraccionada podemos observar 6 veces más percepción a la fracción eluída (Figura 5-17) que a las fracciones del filtrado. Sin embargo, es posible que parte de la respuesta diferencial se encuentre en la fracción filtrada del C18, concretamente en la fracción eluída del C2. La baja señal provocada por el agua así como la baja señal de animales inducidos nos llevan a descartar esta parte del estudio.

#### **5.4. Percepción química conespecífica en la trucha ártica, Arctic Charr (*Salvelinus alpinus*). Uso de tecnologías accesorias en el estudio del comportamiento animal.**

##### 5.4.1. Meta y justificación del experimento en relación a la tesis.

Se ha comprobado que la exposición puntual a moléculas consideradas como feromonas en la comunicación conespecífica en peces (Sorensen *et al.*, 2004) como la prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) y su análogo D-coprostenol, modifica el comportamiento de los peces (Stacey, 2003) mediante cambios en la actividad nadadora.

En el presente trabajo fueron valorados diferentes parámetros como la velocidad de la natación, movimiento relativo al punto de inyección de la señal, movimiento total, así como diferentes parámetros del ángulo de los cambios de dirección en la natación (parámetros definidos por el programa EthoVision)(Noldus, Information technology (Netherlands) Nieuwe Kanaal 5 6709 PA P.O. Box 268 Wageningen). Se examinó la influencia sobre el comportamiento de *Salvelinus alpinus* de sustancias (las moléculas de PGF2 $\alpha$  y el análogo D-coprostenol), relacionadas con la comunicación conespecífica. Stacey *et al.* (2003) describió efectos en el comportamiento según la maduración y el género y propuso que la PGF2 $\alpha$  fue reconocida por los machos como una señal del estado de maduración de las hembras (Figura 2; capítulo 4), los machos responderían con el comienzo de una serie de comportamientos relacionados con la aproximación a las hembras y el comienzo del cortejo (Stacey, *et al.*, 2003). El estudio del comportamiento es posible con filmaciones y análisis de imagen con programas informáticos. En el presente estudio se utilizó el programa EthoVision, para analizar el comportamiento del *Salvelinus alpinus* expuesto a diferentes sustancias. Con el programa EthoVision se registraron datos como velocidad de la natación, movimiento relativo al punto de inyección de la señal, movimiento total, así como diferentes parámetros del ángulo de los cambios de dirección en la natación. El objetivo del experimento fue determinar el efecto de diferentes moléculas y sustancias (D-coprostenol, PGF2 $\alpha$  y fluidos

ováricos de hembras maduras) en el comportamiento de peces machos (maduros e inmaduros) y hembras inmaduras aislados en un tanque.

#### 5.4.2. Estabulación de peces

Para este estudio se han utilizado ejemplares juveniles y adultos del stock de Hammerfest y Svalbard (Nofima, Noruega). Se utilizaron individuos del stock de Hammerfest para los experimentos de comportamiento. Solo se utilizaron las hembras maduras del stock de Svalbard para la extracción de líquido de las gónadas.

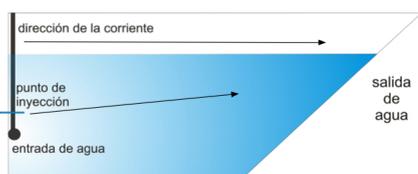
Los peces se distribuyeron en dos grupos, de 1 y 2 años de edad, estabulados en las instalaciones de NOFIMA Marine (Ringvassøya, Tromsø, Noruega) en dos tanques circulares de 4 m<sup>3</sup> en circuito abierto (renovación de 5 l/min), fotoperiodo de 9h de luz : 15h de oscuridad y temperatura 5±1°C. Los animales de entre 100 y 600 g fueron capturados al azar y alimentados con pienso

comercial en raciones diarias del 5% de la biomasa del tanque

Protocolo experimental:

*Tratamientos aplicados:*

Todos los tratamientos elegidos y descritos a continuación se aplicaron directamente en el agua, sin que los peces pudieran percibir la presencia del investigador. El protocolo de aplicación fue previamente aprobado por los investigadores.

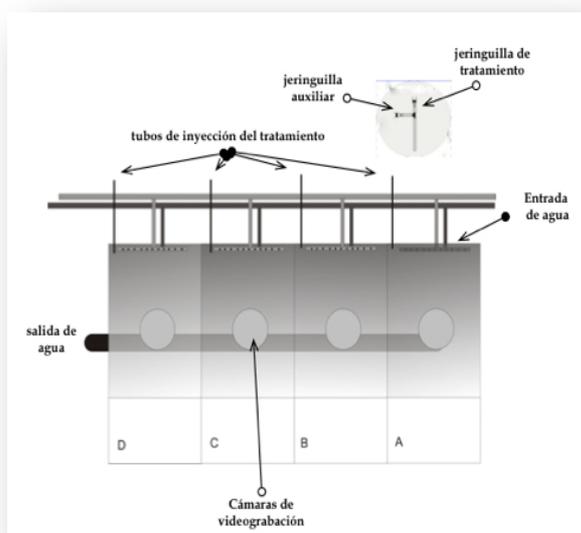


**Figura 5-18** Sistema para grabación y experimentación.

Los tratamientos fueron:

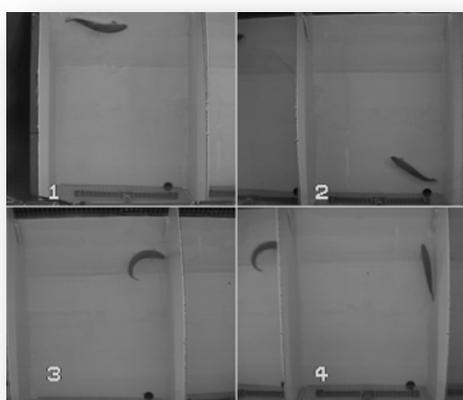
- Control de agua( agua del sistema )
- D-coprostenol (0,035 mg x ensayo, diluido en 10 ml de agua del sistema)
- PGF2 $\alpha$ (0,034 mg x ensayo, diluido en 10 ml de agua del sistema)

- Background control (agua extraída de tanque con presencia de animales inmaduros (comprobado previamente).
- Fluidos provenientes de hembras maduras (se extrajó 1 ml de fluido ovárico de cada una de las 6 hembras, y se mezcló en un pool. Se diluyó 0,2 ml de fluido ovárico en 10 ml de agua del sistema para cada aplicación).



**Figura 5-19** Esquema del sistema de grabación y el sistema de inyección de muestras.

registraba un compartimento con un solo pez. Los campos de grabación, delimitados por el programa de análisis de datos de ordenador, presentaban el



**Figura 5-20** Instantánea de la grabación del comportamiento de 4 individuos simultáneamente

### 5.4.3. Estudio de comportamiento mediante EthoVision.

El estudio del comportamiento se llevó a cabo entre los días 10 a 30 de octubre de 2009. Para registrar el comportamiento de los peces se colocaron 4 cámaras en la parte superior del tanque a un metro de la superficie y enfocadas hacia el fondo. Cada una de las cámaras

registraba un compartimento con un solo pez. Los campos de grabación,

delimitados por el programa de análisis de datos de ordenador, presentaban el mismo espacio en cada una de las replicas, presentando cada una un volumen medio de 226 l / tanque ( $\pm 6$  l). Los compartimentos (figura 5-18) presentaban la inyección de agua en un lado del tanque y la salida en el lado opuesto generándose un flujo de agua con una corriente descrita en la figura. Se realizó un breve estudio para observar el desplazamiento de la

sustancia inyectada en el agua, para lo cual se tintó con colorante el contenido

de una jeringuilla. Se observó que la zona junto al punto de inyección, debido a la entrada de agua, rápidamente quedaba libre de la sustancia teñida, observándose que el color o sustancia inyectada se concentró en la mitad final del tanque hasta la salida, al final de tanque y su eliminación por renovación del agua. Actualmente la sustancia inyectada se concentró en el área mas alejada al punto de inyección. Incluso con la dispersión propia de la disolución de los compuestos inyectados, el área cercano al punto de inyección quedaba rápidamente libre de cualquier sustancia debido a la entrada continua de agua en el sistema.

El programa usado para el análisis del comportamiento es EthoVision (Noldus).

Los parámetros analizados son :

- Velocidad de desplazamiento: Comprobar si la percepción de las sustancias diluidas en el agua tiene algún efecto en la velocidad de desplazamiento de los peces.
- Movimiento, distancia total: Comparación entre sexos o entre tratamientos de la actividad general de los individuos.
- Distancia al punto de emisión de la señal química, para comprobar si hay una reacción de aproximación o rechazo al punto de emisión de la señal. El programa mide la proximidad de la natación al punto seleccionado, que en este caso es el punto de aplicación del tratamiento en el agua.
- Diseño experimental

Se utilizaron 32 por tratamiento aplicado. Los peces fueron distribuidos en 8 grupos de 4 animales (el sistema de análisis de imagen admitía el análisis simultaneo de 4 individuos) para el registro videográficos del comportamiento. Se estableció también un grupo de 30 juveniles mantenidos en un tanque aparte del que se extrajeron las muestras del control 2 (Background control) y otro grupo de 6 hembras . para la obtención y mezcla de fluidos gonadales.

### 5.4.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de componentes principales a fin de establecer posibles relaciones entre los diferentes resultados. Los parámetros obtenidos se analizaron mediante ANOVA de dos vías, seguido del Test de Tukey para las comparaciones dos a dos.

Parámetros analizados: las variables independientes fueron el sexo (macho maduro, macho inmaduro y hembra inmadura) y el tratamiento (control, control de agua de tanques, D-coprostenol, PGF $2\alpha$  y fluidos ováricos de hembras maduras). Los parámetros dependientes fueron la velocidad de natación, el acercamiento al punto de emisión de la señal o el movimiento total.

#### 5.4.4. Resultados

##### **Variables analizadas en EthoVision:**

###### *Velocidad de desplazamiento*

La velocidad de desplazamiento presentó diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) entre los 3 grupos (macho maduro, macho inmaduro y hembra inmadura) para todos los tratamientos excepto el control de agua de los tanques con animales ( $P=0,176$ ), siendo (1) el macho maduro el que presentaba más velocidad en el control y al detectar fluidos ováricos y (2) el macho inmaduro el que más velocidad presentaba frente al tratamiento con  $PGF2\alpha$  (3) los machos (inmaduros y maduros) presentaban mas velocidad que la hembra inmadura frente al D-coprostenol (Fig.:5-21 ).

###### *Distancia al punto de aplicación del tratamiento*

La distancia al punto de aplicación de las distintas sustancias ensayadas presentó diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) para los sexos en todos los tratamientos excepto el tratamiento control ( $P=0,901$ ). Cuando se aplicaba agua del sistema (control) los individuos inmaduros se acercaban mas al punto de inyección, mientras que en el tratamiento con D-coprostenol los machos se alejaban más de dicho punto, llegando las hembras a estar mas cerca del punto de referencia que en el control. Este comportamiento de “acercamiento” lo llevaron a cabo tanto en este tratamiento como en el tratamiento de  $PGF2\alpha$  o con los fluidos ováricos, mientras los machos presentaban mayor alejamiento al punto (Fig.:5-21). En los fluidos ováricos, las hembras inmaduras repiten el comportamiento y los machos maduros también. Los machos inmaduros tuvieron un comportamiento similar al control.

###### *Distancia de natación total:*

Presentó diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) para los sexos estudiados, en todos los tratamientos excepto el tratamiento control de agua de los tanques. En general, los machos maduros recorrían más distancia (unos 200 cm más por minuto) en el tratamiento control (Figura 5-22). En el tratamiento D-coprostenol presento una cierta diferencia entre los machos inmaduros y los otros dos,

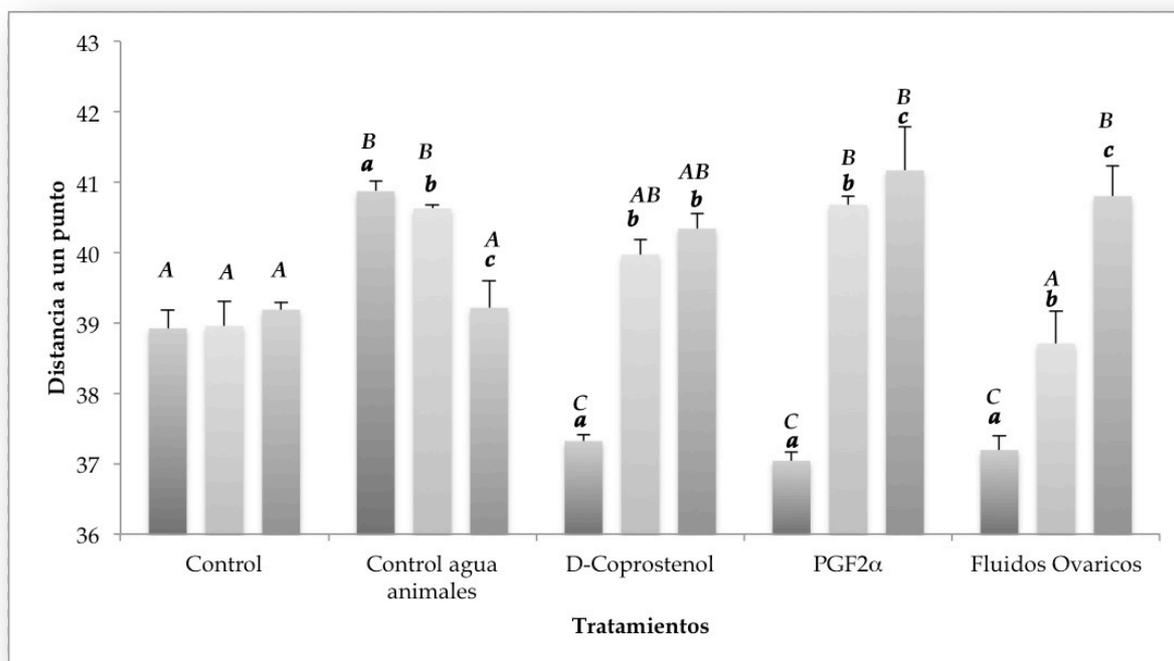
machos maduros y hembras inmaduras, que presentaban valores similares. El tratamiento PGF2 $\alpha$  diferenció a los tres grupos, observándose mayor distancia recorrida por los machos inmaduros y una disminución de la distancia recorrida por los machos maduros comparado a las hembras inmaduras. El tratamiento con fluidos ováricos presentó diferencias entre los tres grupos siendo los machos maduros los que mayor distancia recorrían seguido por los inmaduros y por ultimo por las hembras inmaduras, sin embargo estos dos, hembras inmaduras, y machos inmaduros, no presentaron diferencias al compararlo con sus controles.

#### Efecto de los tratamientos por sexos / estado de madurez:

**Machos maduros:** presentaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) para la “distancia al punto de aplicación” entre los tratamientos control y los tratamientos D-coprostenol, PGF2 $\alpha$  y fluido ovárico siendo más lejana la natación al punto de inyección. En los tratamientos PGF2 $\alpha$  y fluido ovárico. en el caso de la “natación total” se observaron diferencias significativas entre el tratamiento control con los tratamientos control de agua de tanques, D-coprostenol, y PGF2 $\alpha$ , los dos presentaron menor movimiento que el grupo control, control de agua de los tanques y para el tratamiento con fluido ovárico,. Finalmente, para la variable “velocidad de natación” no se observaron diferencias entre los tratamientos control y fluido ovárico. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los tratamientos control de agua de los tanques con el D-coprostenol y PGF2 $\alpha$ , que fueron significativamente menores que los tratamientos control y fluido ovárico

**Machos inmaduros:** presentaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) para la “distancia al punto de inyección” entre el tratamiento control con los tratamientos control de agua de los tanques, PGF2 $\alpha$  y D-coprostenol, sin embargo no presentaron diferencias con el tratamiento de fluido ovárico. Para la “natación total”, se observan diferencias entre el tratamiento control con los tratamientos control de agua de tanques, D-coprostenol y PGF2  $\alpha$  y fluido ovárico sin embargo no se observaron diferencias en este parámetro entre los tratamientos control de agua de los tanques, D-coprostenol, y PGF2 $\alpha$ , no hubo

diferencias entre el control y el tratamiento de fluido ovárico. En la variable “velocidad de natación” no se observaron diferencias entre los tratamientos control y fluido ovárico, los cuales presentaron la velocidad mas baja. La

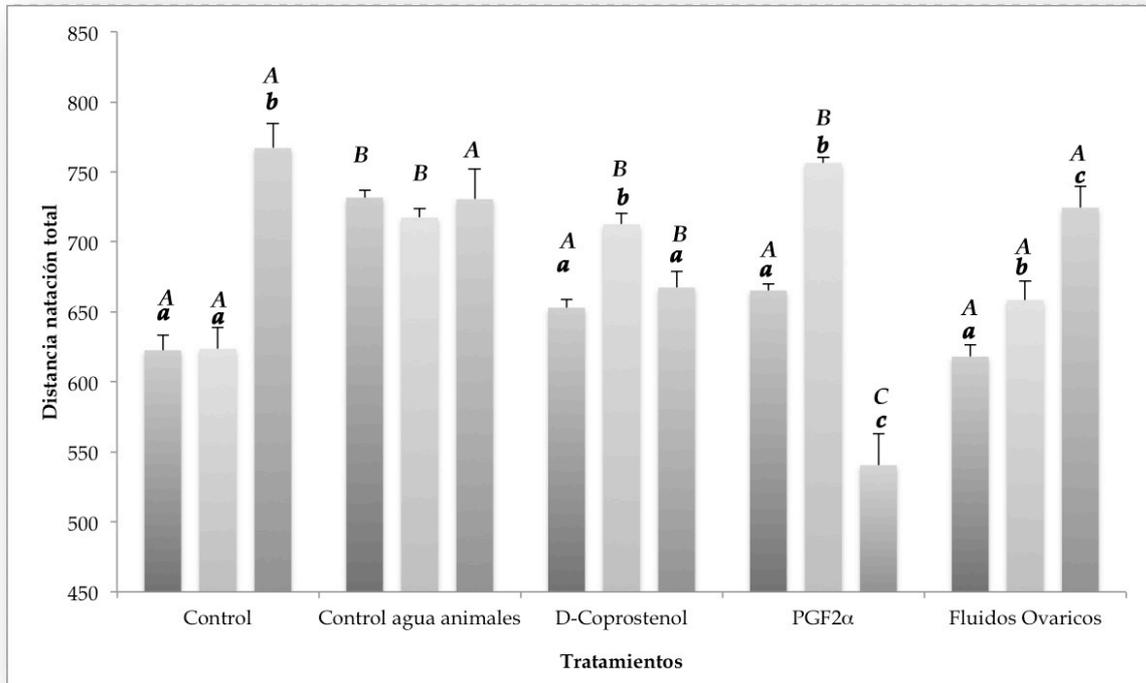


**Figura 5-21** distancia al punto de inyección del tratamiento. (■) hembra inmadura, (▒) macho inmaduro, (□) macho maduro. Las letras minúsculas corresponden a diferencias significativas en los análisis, por cada tratamiento. Las letras mayúsculas corresponden a diferencias significativas en los análisis por cada sexo.

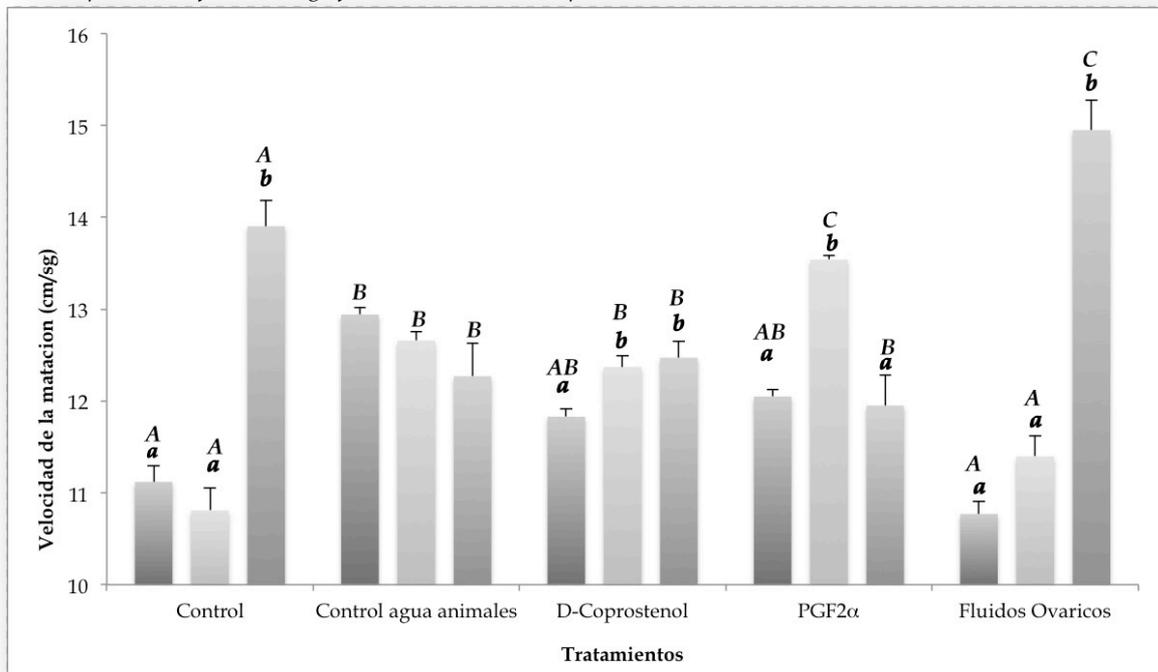
velocidad fue significativamente mas alta en los tratamientos control de aguay D-coprostenol, que presentaron valores similares. El tratamiento PGF2α presentó la mayor velocidad de natación de los grupos.

**Hembras inmaduras:** presentaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) para la “distancia al punto de inyección” comparado al control, el grupo control agua animales presentó significativamente ( $P < 0,05$ ) mas distancia y los grupos D-coprostenol, PGF2α y fluido ovárico significativamente ( $P < 0,05$ ) menos distancia. No hubo diferencias entre los grupos D-coprostenol, PGF2α y fluido ovárico. Para la “distancia natación total”, no hubo diferencias entre los grupos control, D-coprostenol, PGF2α y fluido ovárico. El grupo control agua animales presento significativamente ( $P < 0,05$ ) mas distancia de natación comparado a los otros grupos. En la variable “velocidad de natación” El grupo control agua animales presento significativamente ( $P < 0,05$ ) mas velocidad de la natación comparado a los grupos control y fluidos ováricos. Los grupos D-coprostenol y

PGF2 $\alpha$  fueron entre los dos extremos (control agua animales y fluidos ováricos) sin diferencias con los otros grupos.



**Figura 5-22** distancia natación total. (■) hembra inmadura, (▒) macho inmaduro, (■) macho maduro. Las letras minúsculas corresponden a diferencias significativas en los análisis, por cada tratamiento. Las letras mayúsculas corresponden a diferencias significativas en los análisis por cada sexo.



**Figura 5-23** velocidades de natación en cm/s: (■) hembra inmadura, (▒) macho inmaduro, (■) macho maduro. Las letras minúsculas corresponden a diferencias significativas en los análisis, por cada tratamiento. Las letras mayúsculas corresponden a diferencias significativas en los análisis por cada sexo

### 5.5. Discusión

Los resultados de este estudio muestran claramente que la orina y el fluido intestinal de su misma especie son potentes aromas conespecíficos para el lenguado senegalés. Tanto la cantidad como la calidad de algunos de estos aromas presentes en la orina y fluido intestinal dependen del sexo y el estado de maduración sexual del emisor. Esto podría indicar que la orina y las heces pueden ser la vía de liberación de los productos involucrados en la comunicación química conespecífica y por lo tanto en la percepción y reconocimiento entre individuos de la misma especie al igual que ocurre en otros teleósteos como el pez rojo (Stacey *et al*, 2003) o la anguila (Huertas *et al*, 2007). Sin embargo no podemos descartar que la sensibilidad olfativa a estos aromas pueda ser diferente en función del sexo y el estado de maduración del receptor ya que en nuestro estudio hemos utilizado individuos juveniles de 80 g y un año de edad.

El uso de agua de los tanques y del mucus como sustancias “emisoras” o que contiene sustancias “emisoras” no dio resultados de reconocimiento por parte de los lenguados, sin embargo sería necesario completar el estudio evaluando la cantidad, consistencia y capacidad de cohesión o dilución del mucus liberado durante todo el día así como su composición ya que podría tratarse de una vía de liberación débil y sostenida de feromonas a su entorno como ocurre en la anguila (Huertas *et al.*, 2007).

Las muestras de orina se fraccionaron primero con un cartucho Sep-Pack C-18 produciendo dos submuestras, el eluído y el filtrado. El filtrado fue posteriormente fraccionado de nuevo mediante un cartucho C-2, obteniendo otras 2 fracciones: el eluído 2 y el filtrado 2. La mayor actividad olfativa de la orina de lenguado estaba contenida en el eluído obtenido tras el fraccionamiento por C-18 (primer eluído obtenido) mientras que las fracciones en las que se esperaba mayor cantidad de aminoácidos (primer y segundo filtrado obtenidos en el fraccionamiento) tuvieron una actividad significativamente más baja. Sin embargo, y en consonancia con los datos obtenidos, parte de esa percepción diferenciada en cuanto al sexo, puede

encontrarse en la fracción filtrada del C18, ya sea en el C2 eluído (con mayor amplitud) o en el filtrado, lo que explicaría la falta de respuesta en cuanto al sexo encontrada en la fracción eluada del C18, frente a la clara distinción sexual en la misma muestra sin fraccionar. La naturaleza exacta de los aromas contenidos en esta fracción es desconocida. Sin embargo a partir de estudios realizados con otras especies de peces (Stacey y Sorensen, 2002), es posible que los esteroides sexuales y prostaglandinas, o los metabolitos implicados en su síntesis, sean retenidos por los cartuchos C-18.

No se conocen aun las posibles funciones reproductivas de los aromas contenidos en la orina y heces del lenguado. En otros peces como el pez rojo sí se sabe que liberan prostaglandinas (Stacey *et al.*, 2003) dentro del contexto de la maduración sexual (Sorensen *et al.*, 1988) sin embargo el pez rojo es un pez de agua dulce con mayor capacidad de liberación de orina que los peces marinos. Este es el primer estudio en demostrar el efecto que tienen estos dos fluidos (orina y fluidos intestinales liberados en las heces) para el reconocimiento entre individuos de su misma especie y para que el receptor discrimine el estado de maduración o el sexo del emisor en el lenguado senegalés.

Es muy probable, aunque no se ha analizado en este estudio, que los aromas contenidos en las heces puedan ser ácidos biliares (Vélez *et al.*, 2009; Hubbard, 2012) que serían retenidos en el eluído del C18, ya que muchas especies han demostrado una alta sensibilidad olfativa a estos ácidos (Hara, 1994; Li *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Siefkes *et al.*, 2004) incluyendo el lenguado senegalés (Vélez *et al.*, 2007). Habría que realizar más estudios sobre la liberación real de ácidos biliares en las heces así como su importancia relativa en el contenido total de heces y sobre la capacidad de liberación de estos fluidos intestinales por parte del pez, requisito *sine qua non* para poder considerar estos fluidos como parte de la comunicación conespecífica. También habría que estudiar la liberación voluntaria de orina ya que los peces de agua salada presentan menor formación de orina que los peces de agua dulce (Hubbard *et al.*, 2011). Es probable que el fluido intestinal sea una ruta más importante de liberación de feromonas en los peces marinos que en los peces de agua dulce

(Hubbard *et al.*, 2003b). Los ácidos biliares son sólo producidos por los vertebrados en la digestión del alimento y su comunicación química en los peces puede haber surgido poco después o simultáneamente a dicho papel en la digestión, como señalan Huertas *et al.*, (2007).

La percepción de las moléculas presentes en la orina y las heces pueden ser importantes para el desarrollo o realización del comportamiento reproductivo del lenguado tal como ha sido propuesto en el capítulo 4 o como ha sido descrito para el pez rojo (Stacey ,2003), la anguila (Huertas *et al.*, 2007) y la lamprea (Li *et al.*, 2002). El olfato de los peces es estimulado, y puede medirse mediante el EOG, por múltiples sustancias: ácidos biliares, esteroides gonadales, aminoácidos, prostaglandinas (Laberge *et al.*, 2001). De estas sustancias, que juegan diversos papeles en el comportamiento, hay que señalar que a excepción de los ácidos biliares que son al menos una parte de la señal producida por las heces, no hay ningún estudio acerca del resto de los compuestos secretados por las heces que puedan influir en esa señal. Los aminoácidos son detectados con una alta especificidad pero tienen roles muy variados tanto en la alimentación, como en la reproducción, o como señales de alarma. Los esteroides gonadales y las prostaglandinas están presentes en la orina y su especificidad en la señalización de la madurez del individuo o en su papel como feromonas ha sido demostrada en salmón (Moore, 1994) en el misgurno de Asia (Kitamura *et al.*, 1994), pez rojo (Sorensen *et al.*, 1994) y en la trucha ártica (Sveinson *et al.*, 1995). De hecho no se conoce otra función para las prostaglandinas liberadas al agua que no esté relacionada con la reproducción (Laberge *et al.*, 2001), por esta razón fueron seleccionadas en el experimento con trucha ártica.

En el experimento con trucha ártica aunque no se pudieron determinar comportamientos específicos de reconocimiento sí se observaron diferencias en la velocidad de natación y en la atracción / repulsión hacia el punto de emisión de la señal, tanto en el control de agua de cultivo, los tratamientos con prostaglandinas o el tratamiento con fluidos ováricos, lo que valida la

metodología utilizada, siendo necesario definir nuevos parámetros de medida del software utilizado o bien la especie más adecuada a ese tipo de mediciones.

En general se puede observar que los machos maduros fueron más activos y los tratamientos de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y fluido ovárico tuvieron el efecto de aumentar la actividad. A su vez provocaron una natación a mayor distancia del punto de aplicación o su natación en la zona en que se concentró la  $\text{PGF}_2$  y fluido ovárico. Los tratamientos control agua animales y D-coprostenol disminuyeron la actividad de los machos maduros. El efecto del control agua de los tanques con animales y fluidos ováricos fue el opuesto en animales inmaduros. El tratamiento de control agua de los tanques tuvo el efecto de aumentar la actividad con una distancia mas lejano del punto de aplicación (i.e. en la zona de concentración) y el tratamiento de fluido ovárico no tuvo efecto. El efecto de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y D-coprostenol en animales inmaduros fue diferente en los diferentes sexos, generalmente no hubo efecto sobre las hembras inmaduras mientras que en los machos inmaduros se aumento la actividad y distancia al punto de aplicación del tratamiento (i.e. en la zona de concentración).

El estudio realizado con la trucha ártica nos permitió alcanzar los objetivos previstos ya que pudimos determinar una clara percepción de la prostaglandina  $\text{PGF}_{2\alpha}$  por parte de los machos y las hembras, siendo sus efectos algo diferentes a su análogo comercial (D-coprostenol) sin embargo no pudo determinarse si en el agua de los tanques con animales o en los fluidos ováricos están actuando también las prostaglandinas, o si los efectos producidos por el agua de los tanques y los fluidos ováricos correspondían a otro tipo de señal como podían ser los esteroides gonadales o simplemente aminoácidos presentes en los fluidos disueltos en el agua de los tanques.

## 5.6. Conclusiones

Los resultados del presente estudio demuestran que el fluido intestinal y la orina contienen potentes sustancias odorantes/aromas conespecíficos del lenguado senegalés dependiendo tanto la calidad como la cantidad de éstas sustancias, del sexo, del estado de maduración sexual del emisor. Es necesario realizar estudios sobre la diferente percepción de estos aromas en función del sexo y estado de madurez del receptor. Tanto la orina como las heces son una posible vía de emisión de potenciales feromonas sexuales en el lenguado. La naturaleza y actuación de estas precisa más investigación.

Por otro lado tanto los fluidos gonadales, así como las dos prostaglandinas utilizadas en el experimento realizado con trucha ártica dieron lugar a modificaciones en el comportamiento de los peces, aunque debido al método de estudio no pudieron comprobarse comportamientos específicos de cortejo, lo que sería una vía muy interesante de estudio a aplicar en el lenguado.

**Bibliografía:**

- Bayarri, M. J., Muñoz-Cueto, J. A., López-Olmeda, J. F., Vera, L. M., Rol de Lama, M. A., Madrid, J. A. & Sánchez-Vázquez, F. J. (2004). Daily Locomotor Activity and Melatonin Rhythms in Senegal Sole (*Solea Senegalensis*). *Physiology & Behavior* **81**, 577-583.
- Brown, E.G., Chivers, D.P. (2006) Learning about danger, Chemical alarms. Fish cognition and behaviour., 49-69. Blackwell publishing
- Colombo L, Belvedere PC, Marconato A, Bentivenga F, 1982. Pheromones in teleost fish. In: Richter CJJ, Goos TJT (eds.), Proceedings of the Second International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. The Netherlands: Pudoc, pp. 84-94
- Døving (1976) Evolutionary trends in olfaction. en: Benz G (ed), structure-activity relationship in chemoreception. London: IRL Press, pp. 149-159.
- Fujita, I., Sorensen, P. W., Stacey, N. E. & Hara, T. J. (1991). *The Olfactory System, Not the Terminal Nerve, Functions as the Primary Chemosensory Pathway Mediating Responses to Sex Pheromones in Male Goldfish*. Basel, SUISSE: Karger.
- Hara, T. J. (1994). The Diversity of Chemical Stimulation in Fish Olfaction and Gustation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **4**, 1-35.
- Hubbard, P., Barata, E., Ozório, R., Valente, L. & Canário, A. (2011). Olfactory Sensitivity to Amino Acids in the Blackspot Sea Bream (&Lt;I&Gt;Pagellus Bogaraveo&Lt;/I&Gt;): A Comparison between Olfactory Receptor Recording Techniques in Seawater. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **197**, 839-849.
- Hubbard, P. C. (2012). Pheromones in Marine Fish and Their Culture. In *Unpublished Chapter Book*.
- Hubbard, P. C., Barata, E. N. & Canário, A. V. M. (2003a). Olfactory Sensitivity to Catecholamines and Their Metabolites in the Goldfish. *Chemical Senses* **28**, 207-218.
- Hubbard, P. C., Barata, E. N. & Canario, A. V. M. (2002). Possible Disruption of Pheromonal Communication by Humic Acid in the Goldfish, *Carassius Auratus*. *Aquatic Toxicology* **60**, 169-183.
- Hubbard, P. C., Barata, E. N. & Canário, A. V. M. (2003b). Olfactory Sensitivity of the Gilthead Seabream (&Lt;I&Gt;Sparus Auratus&Lt;/I&Gt; L) to Conspecific Body Fluids. *Journal of Chemical Ecology* **29**, 2481-2498.
- Huertas, M., Hubbard, P. C., Canario, A. V. M. & Cerda, J. (2007). Olfactory Sensitivity to Conspecific Bile Fluid and Skin Mucus in the European Eel *Anguilla Anguilla* (L.). *Journal of Fish Biology* **70**, 1907-1920.
- Kitamura, S., Ogata, H., Takashima, F. (1994), Activities of F-type prostaglandins as releaser sex pheromones in cobitid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, **107**, 1, January, 161-169.
- Kitamura, S., Ogata, H. & Takashima, F. (1994). Respuesta olfativa de varias especies de

- teleósteos a F-prostaglandinas. *Comparativa Bioquímica y Fisiología A* 107, 463-467.
- Kittredge JS, Terry M, Takahashi R, 1971, Sex pheromone activity of the molting hormone crustecdysone on male crabs (*Pachygrapsus crassipes*, *Cancer antennarius* and *C. anthony*). *Fish Bull* 69: 337-43
- Laberge, F., Hara, T.S. (2001) Neurobiology of fish olfaction: a review. *Brain Research Reviews*, **36**,1, 46-59,
- Lambert JGD, van den Hurk R, Schoonen WGEJ, Resink JW, van Oordt PGWJ, 1986. Gonadal steroidogenesis and the possible role of steroid glucuronides as sex pheromones in two species of teleosts. *Fish Physiol Biochem* 2:101-07
- Li, W., Alexander P. Scott, Michael J. Siefkes, Honggao Yan, Qin Liu, Sang-Seon Yun & Gage, D. A. (2002). Bile Acid Secreted by Male Sea Lamprey That Acts as a Sex Pheromone. *Science (New York, N.Y.)* **296** 138-141.
- Li, W. & Sorensen, P. W. (1997). Highly Independent Olfactory Receptor Sites for Naturally Occurring BileAcids in the Sea Lamprey, *Petromyzon Marinus*. *J Comp Physiol A* **180**, 429-438.
- Matsumura, K., Tetrodotxin as a pheromone, *Nature*. Vol. 378, no. 6557, pp. 563-564. 1995.
- Moore, A. & Waring, C. P. (1996). Electrophysiological and endocrinological evidenc that F-series prostaglandins function as priming pheromones in mature male Atlantic salmon parr. *Journal of Experimental Biology* 199,2307-2316.
- Murphy, C.A., Stacey, N., and Corkum, L.D. 2001. Putativesteroidal pheromones in the round goby, *Neogobiusmelanostomus*: olfactory and behavioral responses. *J. Chem.Ecol.* **27**: 443-47
- Pfeiffer, W., Riegelbauer, G., Meier, G. & Scheibler, B. (1985). *Effect of hypoxanthine-3-N-oxide and hypoxanthine-1-N-oxide on central nervous excitation of the black tetra, *Gymnocorymbus ternetzi* (Characidae, Ostariophysi, Pisces) indicated by dorsal light response. *Journal of Chemical Ecology* **11**, 507-523.*
- Polkinghorne, C. A.; Olson, J. M.; Gallaher, D. G.; Sorensen, P. W. 2001: Larval sea lamprey release two unique bile acids to the water at a rate sufficient to produce detectable riverine pheromonal plumes. *Fish Physiology and Biochemistry* **24**: 15-30.
- Resink, J.W., Schoonen, W.G.E.J., Albers, P.C.H., Filé, D.M., Notenboom, C.D., Van Den Hurk, R., Van Oordt, P.G.W.J, The chemical nature of sex attracting pheromones from the seminal vesicle of the African catfish, *Clarias gariepinus*, *Aquaculture*, Volume 83, Issues 1-2, 1 December 1989, Pages 137-151
- Robinson, T.C., Sorensen P.W., Bayer J.M., Seelye J.G. (2009) Olfactory Sensitivity of Pacific Lampreys to Lamprey Bile Acids. *Transactions of the American Fisheries Societ* Vol. 138, Iss. 1,
- Robison, R., Fernald, R.D., Stacey, N.E., 1998. The olfactory system of a cichlid fish responds to steroidal compounds. *Journal of Fish Biology*, 53(1), pp.226-229.

- Scott, A. P. & Ellis, T. (2007). Measurement of Fish Steroids in Water—a Review. *General and Comparative Endocrinology* **153**, 392-400.
- Scott, A. P. & Sorensen, P. W. (1994). Time Course of Release of Pheromonally Active Gonadal Steroids and Their Conjugates by Ovulatory Goldfish. *General and Comparative Endocrinology* **96**, 309-323.
- Scott, J. W. & Scott-Johnson, P. E. (2002). The Electroolfactogram: A Review of Its History and Uses. *Microscopy Research and Technique* **58**, 152-160.
- Siefkes, M.J., Zielinski, B., Scott, A.P. 2003b. Male sea lampreys, *Petromyzon marinus* L., excrete a sex pheromone from gill epithelia. *Biol. Reprod.* 69: 125-132
- Selset and Døving, 1980 R. Selset, K.B. Døving Behavior of mature anadromous charr (*Salmo alpinus* (L.)) towards odorants produced by smolts of their own population *Acta Physiol. Scand.*, 108 (1980), pp. 113-122
- Siefkes, M. J. & Li, W. (2004). Electrophysiological Evidence for Detection and Discrimination of Pheromonal Bile Acids by the Olfactory Epithelium of Female Sea Lampreys (*Petromyzon Marinus*). *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **190**, 193-199.
- Sorensen, P. W. (1992). Hormonally Derived Sex Pheromones in Goldfish: A Model for Understanding the Evolution of Sex Pheromone Systems in Fish. *The Biological Bulletin* **183**, 173-177.
- Sorensen, P. W., Chamberlain, K.J., Stacey, N.E., Hara, T.J. (1987). Differing Roles of Prostaglandin F2a and Its Metabolites in Goldfish Reproductive Behavior. In *Reproductive Physiology of Fish* (Idler, D. R., Crim, L.W., Walsh, J.M., ed.), p. 164. Newfoundland, (Canadá).
- Sorensen, P. W., Christensen, T. A. & Stacey, N. E. (1998). Discrimination of Pheromonal Cues in Fish: Emerging Parallels with Insects. *Current Opinion in Neurobiology* **8**, 458-467.
- Sorensen, P. W., and CAPRIO, J. 1998. Chemoreception in fish, pp. 375 - 406, in R. E. Evans (ed.). *The Physiology of Fishes*. 2nd edn. CRC, Florida.
- Sorensen, P. W., Hara, T.J., Stacey, N.E., Goetz, F.W. (1988). F Prostaglandins Function as Potent Olfactory Stimulants That Comprise the Postovulatory Female Sex Pheromone in Goldfish. *Biology of Reproduction* **39**, 1039-1050.
- Sorensen, P. W., Pinillos, M. & Scott, A. P. (2005). Sexually Mature Male Goldfish Release Large Quantities of Androstenedione into the Water Where It Functions as a Pheromone. *General and Comparative Endocrinology* **140**, 164-175.
- Sorensen, P. W. & Stacey, N. E. (2004). Brief Review of Fish Pheromones and Discussion of Their Possible Uses in the Control of Non-Indigenous Teleost Fishes. In *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, pp. 399-417: Taylor & Francis.
- Sorensen, P. W. & Winn, H. E. (1984). The Induction of Maturation and Ovulation in American Eels, *Anguilla Rostrata* (Lesueur), and the Relevance of Chemical and Visual Cues to Male Spawning Behaviour. *Journal of Fish Biology* **25**, 261-268.

- Sorensen, Peter W., Hara, Toshiaki J., Stacey, Norman E., Dulka, Joseph G, 1990. *Extreme olfactory specificity of male goldfish to the preovulatory steroidal pheromone 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*. **166**,3.373-383
- Stacey NE, Sorensen PW, Dulka JG, Van Der Kraak GJ, Hara Ti, 1987. Teleost sex pheromones: recent studies on identity and function. In: Idler DR, Crim LW, Walsh JM (eds.), *Proceedings of the Third International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. St. Johns, Newfoundland: Memorial University Press, pp. 150-54
- Stacey, N. (2003). Hormones, Pheromones and Reproductive Behavior. *Fish Physiology and Biochemistry***28**, 229-235.
- Stacey, N. & Sorensen, P. (2006). Reproductive Pheromones. *Fish Physiology* **24**, 359-412.
- Stacey, N., Sorensen, P., Donald, W. P., Arthur, P. A., Susan, E. F., Anne, M. E. & Robert, T. R. (2002). Hormonal Pheromones in Fish. In *Hormones, Brain and Behavior*, pp. 375-434. San Diego: Academic Press.
- Stacey, N. E. & Cardwell, J. R. (1995). Hormones as Sex Pheromones in Fish: Widespread Distribution among Freshwater Species. In *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, University of Texas at Austin, Austin, Texas, 2-8 July, 1995* (F. W. G. & Thomas, P., eds.), pp. 244-248. Austin.
- Sveinsson, T, Hara, T., Mature males of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* release F-type prostaglandins to attract conspecific mature females and stimulate their spawning behaviour. *Environmental Biology of Fishes*. **42**, 3. 253-266. Springer Netherlands
- Van den Hurk R, Schoonen WGEJ, van Zoelen GA, Lambert JGD, 1987. Biosynthesis of steroid glucuronides in the testis of the zebrafish *Brachydanio rerio*, and their pheromonal function as ovulation inducers. *Gen Comp Endocrinol* **68**:179-88)
- Van den Hurk R, Lambert JGD, 1983. Ovarian steroid glucuronides function as sex pheromones for male zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Can J Zoology* **61**:2381-87
- Vélez, Z., Hubbard, P., Welham, K., Hardege, J., Barata, E. & Canário, A. (2009). Identification, Release and Olfactory Detection of Bile Salts in the Intestinal Fluid of the Senegalese Sole (&Lt;I&Gt;Solea Senegalensis&Lt;/I&Gt;). *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **195**, 691-698.
- Vélez, Z., Hubbard, P. C., Barata, E. N. & Canario, A. V. M. (2005). Evidence for Functional Asymmetry in the Olfactory System of the Senegalese Sole (*Solea Senegalensis*). *Physiological and Biochemical Zoology* **78**, 756-765.
- Zhang, C., Brown, S. & Hara, T. (2001). Biochemical and Physiological Evidence That Bile Acids Produced and Released by Lake Char (Small *Salvelinus namaycush*/Small) Function as Chemical Signals. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* **171**, 161-171.



## Capítulo 6

---

## 6. Discusión general de la tesis.

### Disfunción reproductiva del lenguado

El lenguado senegalés capturado en el medio marino y trasladado a condiciones de cautividad presenta puestas con características adecuadas de calidad y cantidad (Dinis *et al.*, 1999; Ánguis y Cañavate, 2005; Howell *et al.*, 2011). Sin embargo la primera generación nacida y criada en cautividad (G1) no presenta puestas lo que supone una disfunción reproductiva, siendo una situación generalizada tanto en los diferentes centros de investigación como en las empresas de producción (Dinis *et al.*, 1999; Howell *et al.*, 2011). Se conocen 3 tipos de disfunciones reproductivas en hembras de peces y una en machos (Zohar y Mylonas, 2001). En el lenguado senegalés no se puede hablar de una disfunción tipo 1 (Zohar, 1988; Zohar y Mylonas, 2001) descrita en hembras que manifiestan problemas de maduración durante la vitelogénesis. Esta disfunción se observa en la anguila (*Anguilla* sp) mantenida en cautividad, o en el múgil (*Múgil cephalus*, L., 1758) mantenido en agua salada (Valdebenito *et al.*, 2011). Tampoco parece ser del tipo 2 descrita como una falta de maduración de los oocitos postvitelogénicos convirtiéndose en atrésicos (Zanuy y Carrillo, 1987; Mylonas *et al.*, 2010). En el lenguado no se han observado fallos en la maduración final de los oocitos ni en la ovulación o la puesta. Sin embargo suelen utilizarse inducciones con GnRH para estimular y controlar la FOM cuando los óvulos son extraídos manualmente consiguiendo buenas calidades, en cuanto a cantidad y viabilidad (Rasines, *et al.*, 2011). Las hembras de lenguado senegalés G1, presentan oocitos maduros en buen estado y en la época de maduración normal. Son oocitos viables que se extraen sin dificultad por presión abdominal. En algunos casos los machos pueden presentar problemas de disminución de la cantidad de esperma, o en la calidad de éste (Zohar y Mylonas, 2001). Sin embargo los machos de lenguado senegalés, aunque presentan cantidades bajas de esperma (Cabrita, *et al.*, 2006),

liberan espermatozoides en suficiente cantidad y con buena movilidad que permite la fecundación in vitro de los huevos extraídos por presión abdominal (Rasines, *et al.*, 2011). El lenguado senegalés no presenta ninguna de las disfunciones anteriormente descritas ya que a finales de febrero ya es visible la formación de la gónada femenina, con una característica hinchazón abdominal y a finales de marzo la hidratación oocitaria hace muy visible la gónada.

El tercer tipo de disfunción en las hembras es la ausencia de desove al final del ciclo reproductivo, los oocitos maduran normalmente y se produce la ovulación en respuesta a estímulos fisiológicos y ambientales (Zohar y Mylonas, 2001), pero los óvulos no son liberados durante el proceso de puesta (Duncan *et al.*, en prensa). La causa no parece ser ambiental, a diferencia de la carpa (Duncan, en prensa) que necesita de un sustrato adecuado para poder llevar a cabo la puesta. En algunas especies, la modificación de los parámetros ambientales, luz, o temperatura, son suficientes para producir la señal necesaria para el comienzo del cortejo. En el lenguado senegalés salvaje, una variación cíclica de la temperatura es suficiente a principios de primavera para provocar la puesta en cautividad, sin embargo esto no es suficiente para el lenguado senegalés G1. Los lenguados salvajes mantenidos en las mismas condiciones que los G1 no presentan esta disfunción (Ánguis y Cañavate, 2005; capítulo 3) y tampoco las hembras G1 mezcladas con machos salvajes (capítulo 3). Como consecuencia de esta disfunción los oocitos sufren atresia (Guzmán *et al.*, 2009) y son reabsorbidos o liberados fuera del contexto de la puesta lo que, se ha observado en este estudio en varias ocasiones (capítulo 3 y 4). El tipo 3 de disfunción reproductiva se ha resuelto en algunos casos con la inclusión de un sustrato adecuado (carpa, véase más arriba) lo que en el lenguado supone una mejora en las condiciones de vida, pero sin cambios en cuanto a la reproducción (observación personal) o con la obtención manual de los gametos por presión abdominal o “stripping” (Mañanos, *et al.*, 2009; Rasines, *et al.*, 2011) al igual que se realiza para salmónidos y otros peces planos cultivados de forma industrial como el rodaballo y el halibut

(Mañanos *et al.*, 2009; Duncan *et al.*, en prensa). Es una solución solo parcial, ya que no se resuelve el problema ni ofrece información sobre la causa de la disfunción.

### **Comportamiento reproductivo**

El trabajo desarrollado en esta tesis se ha centrado en estudiar el comportamiento y la fisiología de la comunicación química en el lenguado senegalés como herramientas para entender esta disfunción reproductiva de tipo 3 que parece tener un alto componente social. En una primera aproximación se estudió el comportamiento de esta especie, con actividad crepuscular y nocturna, (Bayarri *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2009), que habita zonas que no reciben mucha luz y que ha demostrado ser muy sensible a la iluminación de baja intensidad (Oliveira *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2010). Al igual que otros animales de fondo presentan una mayor sensibilidad al tipo de radiación que llega a su hábitat y menos a longitudes de onda que no atraviesan los primeros metros de agua (Montgomery y Pankhurst, 1997).

Se han estudiado tres tratamientos de luz nocturna a fin de seleccionar aquel que permitiera filmar el comportamiento del lenguado senegalés en los tanques de cultivo. El tratamiento de luz roja de baja intensidad, < 5 lux en la superficie del agua, tuvo resultados adecuados para nuestros objetivos ya que fue posible observar e identificar los animales en grabaciones de video, y estudiar el perfil de actividad y el tipo de comportamiento, que no difería del tratamiento control. Los niveles de melatonina en sangre no presentaron tampoco diferencias significativas frente al tratamiento control lo que coincide con las observaciones de Oliveira *et al.*,(2007). Una vez seleccionado el tipo de iluminación nocturna comenzaron los estudios de comportamiento del lenguado.

Así, gracias a los resultados obtenidos en este trabajo (capítulo 3), se ha

observado y descrito por primera vez el comportamiento reproductivo del lenguado senegalés salvaje mantenido en cautividad, se ha descrito la ausencia de comportamiento reproductivo en los lenguados criados en cautividad (G1), ha sido descrita la liberación de huevos por parte de las hembras maduras de G1 fuera del contexto del cortejo en grupos de procedencia uniforme (G1) y la participación, sin embargo, de hembras de la misma procedencia (G1), en cortejos exitosos cuando son mezcladas con machos salvajes demostrando que la disfunción reproductiva del lenguado senegalés criado en cautividad (G1) se concentra en los machos.

En el lenguado senegalés la actividad dentro del tanque de cultivo aumenta por la tarde, incrementando la frecuencia de ciertos comportamientos durante la época de reproducción. Así, apoyar la cabeza unos sobre otros es una forma de contacto social habitual en peces planos (Gibson, 1997), probablemente una forma de reconocimiento conespecífico, para lo que el lenguado además utiliza el olfato. Presenta diferencias perceptivas en ambas narinas, la narina inferior percibe olores relacionados con la comida o con otros animales de su especie (Vélez *et al.*, 2005) mientras que la superior percibe el ambiente. Estos contactos se producen en todos los periodos del día aunque lo que cambia es su frecuencia. Tras estos contactos exploratorios, grupos de machos centran su atención en las hembras, no parece haber un condicionante de dominancia o territorialidad al contrario que en el pedas o el lenguado ocelado (Carvalho *et al.*, 2003)) en los que la territorialidad impide a otros machos el acceso a la hembras. Esta falta de territorialidad puede ser provocada por las condiciones del cultivo intensivo, aunque no se conocen datos sobre territorialidad o dominancia en *S. senegalensis* en el medio salvaje.

En cierto momento, estas exploraciones de varios machos desemboca en juegos o persecuciones, a veces iniciados por las hembras como en la solla roja (Stoner *et al.*, 1999), pero no exclusivamente ya que a veces es iniciado por los machos. La

hembra, cuando participa, se detiene a los pocos segundos y los machos continúan la persecución. Estas persecuciones continúan a lo largo de la tarde y el principio de la noche. A lo largo de la tarde, en medio de estas persecuciones y contactos sociales, un lenguado macho comienza a ser más insistente con una hembra concreta. Cuando se acercan otros machos reproduce comportamientos de protección de la hembra frente a otros machos o de disuasión de la hembra para que no se fije en otros machos (comportamiento de guardián). En cierto momento la hembra comienza a nadar permitiendo al macho situarse debajo de ella y comenzar a nadar sincrónicamente hacia la superficie. Solo participan el macho y la hembra, la intrusión de otros machos o el encuentro con materiales del sistema de cultivo como tuberías o tubos de aireación, provoca la ruptura de la pareja. Así, en la puesta solo participan dos individuos, al contrario que en la solla roja (Stoner *et al.*, 1999) en el que participan varios machos o varias hembras. En lenguado no se ha observado la participación de otras hembras o machos en ningún punto del cortejo.

La observación de los G1 nos indica que, si bien los machos realizan los contactos puntuales previos como “apoyar la cabeza”, no pasan al siguiente nivel, no centran su atención en las hembras ovuladas, no realizan persecuciones ni tampoco cortejo opuesta. Usando grupos mezcla de individuos G1 y salvajes se pudo constatar que los machos salvajes realizaron todos los pasos anteriormente descritos cuando estaban con hembras G1 mientras que los machos G1 mezclados con hembras salvajes no los realizaban por lo que tras la evaluación de los resultados obtenidos en esta tesis, se llega a la conclusión de que el problema radica en los machos G1.

Como ya se ha comentado, la disfunción de los lenguados G1 no es del tipo 1 ni del tipo 2 descritos por Zohar (2001), es una disfunción de tipo 3, no relacionada con componentes ambientales ya que individuos salvajes estabulados en las mismas condiciones que los G1 sí se reproducen. La razón de esta alteración del

comportamiento no se conoce. Las hembras parecen estar en el punto correcto de maduración sobre todo si observamos el grupo mezcla (machos salvajes-hembras G1) que presentó puestas fertilizadas, o las puestas espontaneas de hembras fuera del contexto del cortejo (Cañavate *et al.*, 2005; capítulo 3). Sin embargo los machos G1 no realizan los comportamientos, ni siquiera el paso 1 del cortejo, en el que la actividad de los machos aumenta y sus contactos de reconocimiento de las hembras se vuelven mas insistentes.

### **Inducción del comportamiento**

En este proceso, que podemos definir como un proceso de emisión – recepción de información a través de señales químicas, tenemos dos componentes. La emisión (1) de algún tipo de señal química (feromonas sexuales) por parte de las hembras, que permite a los machos reconocerla y detectar su estado de madurez y la recepción (2) por parte de los machos de esas moléculas y el efecto que estas tienen en su comportamiento.

Para estudiar e incrementar la emisión de estas señales químicas se indujeron lenguados G1 con diferentes hormonas que actúan bien en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (GnRH desencadena la liberación de gonadotropinas hipofisarias) bien con feromonas (PGF2) para provocar la puesta o al menos el cortejo o los pasos previos a éste. Se aplicaron diferentes tratamientos con hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Zohar *et al.*, 2001; Mylonas *et al.*, 2008; Mylonas *et al.*, 2010 Rasines *et al.*, 2011), gonadotropina coriónica humana (HCG) (Guzmán *et al.*, 2011), así como un tratamiento mezcla en el que primero se aplicó una dosis baja (5 µg/Kg) de GnRH y tras la primera liberación de huevos, inyecciones de PGF2  $\alpha$ . Se produjeron desoves similares a los descritos tanto para esta especie (Agulleiro *et al.*, 2006; Guzmán *et al.*, 2011a) como para otros peces planos, *Paralichthys lethostigma* (Berlinsky *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*,

1998). *Paralichthys dentatus* (Berlinsky *et al.*, 1997), limanda (*Pleuronectes ferrugineus*) (Larsson *et al.*, 1997) o rodaballo (*Scophthalmus máximus*) (Mugnier *et al.*, 2000). Sin embargo en ninguno de los tratamientos experimentales de este estudio se observaron comportamientos de cortejo y los huevos obtenidos no estaban fecundados. Al evaluar los diferentes comportamientos desplegados por los lenguados G1 tras la inducción, se observó que los comportamientos más relevantes en cuanto a cortejo y relaciones entre individuos, obtenidos a partir del etograma del lenguado (capítulo 3) no se producían. Se observó una disminución significativa de la actividad en los peces inducidos frente al grupo control ( $P < 0,05$ ), representada por el aumento del comportamiento “quieto” sin interacciones entre individuos en los diferentes tratamientos.

El comportamiento “quieto con acciones sobre el” mostró diferencias entre el tratamiento control y los demás tratamientos debido a que hubo más interacciones exploratorias entre individuos. El tratamiento con HCG presentó índices muy bajos de acciones entre varios individuos y la actividad registrada en los tanques fue casi de forma exclusiva, “nadar solo”. No se produjeron comportamientos relacionados con actividades competitivas entre machos, (siguiendo a y seguido por). Las diferentes inducciones aunque provocaron cambios fisiológicos y modificación en la puesta no produjeron modificaciones en el comportamiento reproductivo, de hecho la actividad general de los peces se redujo en todos los casos estudiados.

Dado que la inducción hormonal no modificó el comportamiento reproductivo tal vez sería interesante probar otras concentraciones de hormona o incluso otras hormonas y repetir el experimento. Por esta razón el último capítulo de la tesis se centra en el estudio de la inducción del comportamiento y la percepción química conespecífica.

Para el estudio de la recepción de esas señales químicas conespecíficas se utilizaron la orina y los fluidos intestinales dado que se ha comprobado que

poseen potentes aromas conoespecíficos para el lenguado senegalés. Algunos de los compuestos presentes en estas sustancias, sales biliares, hormonas esteroides y feromonas provocan una respuesta neuronal cuantificable mediante electroolfatograma. Este intercambio de información química permite al lenguado senegalés distinguir entre individuos macho o hembra e incluso su estado de maduración. Tanto la orina como las heces son percibidas con claridad y en ambas se pueden observar diferencias. Se llevó a cabo un fraccionamiento de la orina mediante bases sólidas C-18 que retienen lípidos, esteroides y compuestos polares, revelando así la mayor potencia olfativa en esta fracción. Esta recepción de señales a diferentes compuestos puede provocar cambios en el comportamiento reproductivo de los peces como se ha observado en la trucha ártica al variar su velocidad o cantidad de movimiento o al registrar un acercamiento o alejamiento del punto de inyección del compuesto (D-coprostenol,  $\text{PGF2}\alpha$ , Fluido ovárico o agua de un tanque de cultivo) en el agua.

En definitiva, parece claro que la disfunción tipo 3 del lenguado tiene un componente social muy marcado, en el que la comunicación entre individuos puede ser el punto determinante para descubrir su disfunción. Serían necesarios más estudios de comportamiento sobre dominancias y establecimiento de jerarquías así como sobre las diferencias entre machos salvajes y machos G1 en cuanto a recepción de señales hormonales relacionadas con la reproducción.

## Bibliografía

- Agulleiro, M. J., Anguis, V., Cañavate, P., Martínez-Rodríguez, G., Mylonas, C. C. y CERDA, J. (2006). *Induction of spawning of captive-reared Senegal sole (Solea senegalensis) using different administration methods for gonadotropin-releasing hormone agonist*. Amsterdam, PAYS-BAS: Elsevier.
- Ánguis, V. y Cañavate, J. P. (2005). Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture* **243**, 133-145.
- Bayarri, M. J., Muñoz-Cueto, J. A., López-Olmeda, J. F., Vera, L. M., de Lama, M. A. R., Madrid, J. A. y Sánchez-Vázquez, F. J. (2004). Daily locomotor activity and melatonin rhythms in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Physiology & Behavior* **81**, 577-583.
- Carvalho, N., Alfonso, P. y Santos, R. S. (2003). The Harem Mating System and Mate Choice in the Wide-Eyed Flounder, &lt;i>Bothus podas&lt;/i>. *Environmental Biology of Fishes* **66**, 249-258.
- Dinis, M. T., Ribeiro, L., Soares, F. y Sarasquete, C. (1999). A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture* **176**, 27-38.
- Duncan, N. J., Sonesson, A. K. y Chavanne, H. (en prensa). Principles of finfish broodstock management in aquaculture: control of reproduction and genetic improvement. In *Advances in aquaculture hatchery technology* (Allan, G. B., ed.). Cambridge (U.K.): Woodhead Publishing Limited.
- García-López, A., Anguis, V., Couto, E., Canario, A. V. M., Cañavate, J. P., Sarasquete, C. y Martínez-Rodríguez, G. (2005). Non-invasive assessment of reproductive status and cycle of sex steroid levels in a captive wild broodstock of Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup). *Aquaculture*.
- Gibson, R. N. (1997). Behaviour and the distribution of flatfishes. *Journal of Sea Research* **37**, 241-256.
- Guzmán, J. M., Ramos, J., Mylonas, C. C. y Mañanós, E. L. (2009). Spawning performance and plasma levels of GnRHa and sex steroids in cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*) treated with different GnRHa-delivery systems. *Aquaculture* **291**, 200-209.
- Guzmán, J. M., Ramos, J., Mylonas, C. C. y Mañanós, E. L. (2011). Comparative effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) treatments on the stimulation of male Senegalese sole (*Solea senegalensis*) reproduction. *Aquaculture* **316**, 121-128.
- Howell, B. R., Prickett, R., Cañavate, J. P., Mañanós, E., Dinis, M. T., Conceicao, L. y Valente, L. (2011). The cultivation of soles. *Report of the 5th Workshop. EAS Spec. Publ.* **36**, 3.

- Montgomery, J. y Pankhurst, N. W. (1997). Sensory Physiology. In *Deep-Sea Fishes* (Press, A., ed.), p. 378. San Diego, California: Academic Press.
- Mylonas, C. C., Fostier, A. y Zanuy, S. (2010). Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology* **165**, 516-534.
- Oliveira, C., Duncan, N. J., Pousao-Ferreira, P., Mananos, E. y Sanchez-Vazquez, F. J. (2010). Influence of the lunar cycle on plasma melatonin, vitellogenin and sex steroids rhythms in Senegal sole, *Solea senegalensis*. *Aquaculture* **306**, 343-347.
- Oliveira, C., Garcia, E. M., Fernando Lopez-Olmeda, J. y Javier Sanchez-Vazquez, F. (2009). Daily and circadian melatonin release in vitro by the pineal organ of two nocturnal teleost species: Senegal sole (*Solea senegalensis*) and tench (*Tinca tinca*). *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* **153**, 297-302.
- Oliveira, C., Ortega, A., Lopez-Olmeda, J. F., Vera, L. M. y Sanchez-Vazquez, F. J. (2007). Influence of constant light and darkness, light intensity, and light spectrum on plasma melatonin rhythms in senegal sole. *Chronobiology International* **24**, 615-627.
- Stoner, A. W., Bejda, A. J., Manderson, J. P., Phelan, B. A., Stehlik, L. L. y Pessutti, J. P. (1999). Behavior of winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, during the reproductive season: laboratory and field observations on spawning, feeding, and locomotion. *Fishery Bulletin* **97**, 999-1016.
- Valdebenito, I., Paiva, L. y Berland, M. (2011). Atresia folicular en peces teleósteos: una revisión. Follicular atresia in teleost fish: a review. *Arch Med vet.* **43**, 11-25.
- Vélez, Z., Hubbard, P. C., Barata, E. N. y Canario, A. V. M. (2005). Evidence for functional asymmetry in the olfactory system of the Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Physiological and Biochemical Zoology* **78**, 756-765.
- Zanuy, S. y Carrillo, M. (1987). La reproducción de los peces teleósteos y su aplicación en acuicultura. *Reproducción en acuicultura*. CAICYT. Madrid, J. Labarta U (eds). 1-131.
- Zohar, Y. y Mylonas, C. C. (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* **197**, 99-136.
- Zohar, Y. I. O. a. L. R., Eilat (Israel). National Center for Mariculture) (1988). Gonadotropin releasing hormone in spawning induction in Teleosts: basic and applied considerations. *Reproduction in fish. Basic and applied aspects in endocrinology and genetics, Tel-Aviv (Israel), 10-12 Nov 1986. Colloques de l'INRA. INRA, Paris (France)* **44**.



## Capítulo 7

---

## 7. Conclusiones

Como conclusiones finales y siguiendo el esquema desarrollado en esta tesis:

En los estudios de iluminación:

- Los resultados de los estudios nos indican la viabilidad del uso de la luz Rb (roja de baja intensidad) en el estudio del comportamiento, sin que ello suponga una intrusión en la actividad normal de estos animales.

Su viabilidad como sistema de iluminación nocturna para los estudios de comportamiento quedó reforzada por las puestas así como las grabaciones del cortejo, realizadas bajo esa iluminación en las instalaciones del IEO en Santander, (planta de cultivos “El Bocal”) en las que se pudo comprobar que no afectó a su normal desarrollo.

Sobre la puesta:

- Se concluyó que un requisito imprescindible para la suelta de huevos por parte de la hembra, es el mantenimiento en la superficie de la hembra por parte del macho.
- En general en *S. senegalensis*, nos encontramos que las puestas las realizan solamente los dos individuos implicados (macho y hembra), sin participación de otros animales en el cortejo.
- Existen muchas interacciones complejas entre machos de las que cabe destacar las persecuciones y la actitud de guardián, ambas descritas en el etograma
- Estos comportamientos (persecuciones y guardián) tienen un gran valor predictivo ya que solo se realizan en días o noches en los que hay puesta o al menos intentos fallidos de cortejo. Su valor predictivo, las primeras acerca del día de la puesta, y la segunda acerca de la pareja reproductora del momento es muy importante tanto para empresas de producción como para centros de investigación.

### Sobre la disfunción reproductiva que afecta a esta especie en cautividad

- Estas acciones específicas de la puesta exitosa han sido observadas exclusivamente en grupos de animales con machos salvajes, siendo de menor importancia el origen de las hembras reproductoras, por lo que la ausencia de comportamiento reproductivo en los animales G1 se puede enfocar en los machos.
- Los resultados descritos en este capítulo nos permiten por primera vez describir el problema reproductivo del lenguado G1, confirmando que es la ausencia total de comportamiento reproductivo y cortejo, con la consiguiente ausencia de huevos fecundados.
- La disfunción reproductiva asociada a estos animales es claramente la disfunción tipo 3 y específicamente una disfunción en el comportamiento reproductivo, ya que los procesos de maduración de ambos géneros, machos y hembras, llegan hasta el final de su desarrollo normal. Los machos G1 son el problema, mientras que las hembras G1 no lo son.
- Hay que remarcar el éxito reproductivo de los animales salvajes (macho y hembra) así como del grupo mezcla formado por machos salvajes y hembras G1 frente al fracaso de los grupos G1 (macho y hembra) y el grupo mezcla formado por hembras salvajes y machos G1. El problema parece centrado en el momento de realizar los comportamientos necesarios para sincronizar la liberación de gametos por parte de ambos. El desarrollo de estos comportamientos que son iniciados, como se ha descrito en este estudio por parte de los machos implicados, es el punto clave de esta disfunción.

### Sobre la inducción

- Bajo las condiciones del presente estudio, la inducción con hormonas no resuelve la disfunción y tampoco parece aumentar la cantidad de señales

producidas por las hembras hacia los machos. No se percibe cambio de comportamiento en los machos tras la inducción de las hembras.

#### Acerca de la comunicación química

- Este estudio ha demostrado que el fluido intestinal y la orina contienen potentes sustancias odorantes/aromas con específicas del lenguado senegalés y que la calidad y cantidad de estas sustancias odoríferas dependerá tanto del sexo como del estado de maduración sexual del emisor. Tanto la orina como las heces son por lo tanto la vía potencial de feromonas sexuales del lenguado. Que son y como actúan estas sustancias requiere mayor investigación.
- Los compuestos, D-coprostenol, PGF<sub>2</sub>α, fluido ovárico o agua de un tanque de cultivo, introducidos en la agua de un tanque con una trucha ártica (*Salvelinus alpinus*) aislada, provocaron cambios significativos ( $P < 0.05$ ) en su comportamiento, velocidad o cantidad de movimiento o al registrar un acercamiento o alejamiento del punto de inyección.

Finalmente, consideramos que la continuación de las investigaciones, comenzando por las relaciones de dominancia, la formación de territorios (algo difícil en instalaciones habituales de acuicultura) y un mayor análisis de la comunicación, podrían ser las vías adecuadas para comprender el problema reproductivo del lenguado y solucionarlo.



## Capítulo 8 translations

---

## REPRODUCTIVE BEHAVIOUR AND PHYSIOLOGY OF SENEGALESE SOLE, (*SOLEA SENEGALENSIS*) BROODSTOCK IN CAPTIVITY

### 1. Brief Introduction

Aquaculture is currently an industry of great importance compared to the current situation of demand and the state of our seas and oceans. On the one hand, many species are overexploited, and, secondly, the degree of pollution of the sea is becoming increasingly high. Thus, according to the FAO, aquaculture provides 38% of the current production of marine products, including fish, molluscs and crustaceans, except plant products. This percentage, compared to the 1970 data in which aquaculture accounted for 3.9% of the total world production, or in 2003, when the fish aquaculture production alone was 23.4 million tons (FIGIS-FAO, 2004) and represented 31% of world production, show its increasing importance. This increase in aquaculture production has been achieved by advances in knowledge of the biology of cultured organisms and the development of technology for cultivation.

### The sole in aquaculture

Currently, the sole production represented approximately 915 tons (485 t of Senegalese sole and 450t of common sole) in 2011 (FAO) with a production cost of around 8-9€, and a market price ranging from 13 € (Howell et al., 2011) to 21 € at Christmas time (data obtained in market). Presently, the Senegalese sole is grown on farms in the Portuguese Atlantic coast, the Canary Islands, the northwest of Spain and France, and on some growing points in the Spanish Mediterranean coast. At the same time, in the past years it has represented a minor culture in several estuaries on the wetlands of Andalusia in extensive cultivation (Andalucía, 2010).

For years, many studies have been conducted on the biology of these species, aimed at developing its intensive cultivation. Although many efforts have been devoted to cultivating the Senegalese sole for the last 35 years, several problems limit its widespread culture, making it a culture only partially accepted by

aquaculture companies. Some of these problems are: the development of appropriate diets, adequate recirculation and growing systems, diseases (mainly Tenacibaculosis (*Tenacibaculum* spp) and vibriosis (*Vibrio* SSP) (Howell et al., 2011) but also, pasteurellosis (*Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*) lymphocystis virus (*Lymphocystivirus*) and Viral haemorrhagic septicaemia (rhabdovirus VHSV)), and the controlled reproduction of the first generation born in captivity (G1), which is the object of the work in this thesis.

### **Reproductive disorders**

Some fish species have different reproductive disorders when they are introduced as culture species. In females: In some species, including flatfish, females show problems during the final oocyte maturation (FOM) and, therefore, during ovulation or spawning (Zohar, 1988; Zohar et al., 2001). This dysfunction (reproductive dysfunction, type 1) consists of the failure of the vitellogenesis, seen for example in the eel (*Anguilla* spp) kept in captivity, or in groups of mullet (*Mugil cephalus* L., 1758) kept in seawater (Valdebenito et al., 2011). In others (reproductive dysfunction, type 2) postvitellogenic oocytes do not complete final oocyte maturation ultimately, becoming atresic (Zanuy et al. 1987; Mylonas et al., 2010). The third type of dysfunction is the absence of spawning at the end of the reproductive cycle. In this type, the oocytes have matured normally, and ovulation has occurred in response to physiological and environmental stimuli (Zohar et al., 2001), but the eggs are not released during the laying process. The cause is usually environmental (e.g. absence of spawning substrate, in case of salmon or carp, or lack of space), or else, they do not receive adequate social stimulation. As a result, the eggs are usually reabsorbed or released outside the spawning context. The lack of space or social stimulation appears to be the cause of this dysfunction in flatfish (Duncan et al., in press). Males may experience other causes, such as problems of decreased sperm quantity and quality (Zohar et al., 2001).

These dysfunctions appear to be caused when the fish do not experience the right conditions, diet or environmental, in order to produce the correct stimulus for hormone release. In the case of the turbot, this dysfunction was overcome

after induction of carp pituitary extracts (Flüchter, 1972). Subsequently, there were described a series of changes in temperature and photoperiod which were also sufficient to avoid dysfunctions in captivity (Devauchelle et al., 1988).

The third type of reproductive dysfunction has been resolved in some cases with the addition of a suitable spawning substrate (carp), or by obtaining gametes manually. However, in Senegalese sole (*S. senegalensis*), the addition of substrate was not enough. Although the manual extraction of gametes allows obtaining fertilized eggs, it does not resolve the dysfunction of the G1 Senegalese sole.

The purpose of this thesis is to examine the behaviour and the physiology of the chemical communication in Senegalese sole as a method for understanding the social components of their reproductive dysfunction.

### **Research in the field of behavior and reproductive physiology of the Senegalese sole.**

Ethology is the study of the conduct of a living animal in its natural context. It is complementary to other branches of science: is not enough to describe the motor reactions or physiological changes as they appear, but also the context in which they occur and, above all, their true biological function.

The ethogram is an experimental tool that reflects specific aspects of ethology as a discipline. Martin and Bateson (1993) define it as "a catalogue of descriptions of discrete behaviour patterns typical of the subject species, which form the basic behavioural repertoire of the species." It has been little used for the study of fish behaviour since it is especially difficult to observe fish in the aquatic environment. The first descriptions of the reproductive behavior of a flat fish were made by (Butler, 1895) on the reproduction of common sole (*S. solea*) and (Breder, 1922) on winter plaice (*Pseudopleuronectes americanus*).

The present study, aimed to study the behaviour of a nocturnal species, the Senegalese sole (*S. senegalensis*), which is an animal of mainly crepuscular and nocturnal activity (Bayarri et al., 2004a; Oliveira et al., 2009). Senegalese sole live

in areas exposed to little light, and have been shown to be sensitive to low intensity lighting (Oliveira et al., 2007, Oliveira et al., 2010). Like other seabed animals, they show higher sensitivity to radiation reaching their habitat and less to wavelengths that do not pass through the first few meters of water (Montgomery et al., 1997).

Light plays a fundamental role in the biological rhythms of fish (Bromage et al., 2001). In the aquatic environment, the light varies with depth. Thus, the short wavelengths >400nm have a great penetration into water, being able to reach 800m-1000m on clear ocean waters (Denton, 1990). Instead, longer wavelengths (> 600 nm, corresponding to the red fraction and infrared) are rapidly lost in the first few meters of water (4-8 m) due to absorption (Marin Galvin, 2003; Wozniak et al., 2007). Artificial lights are regularly used in both animal research and animal production for human consumption. The manipulation of light/photoperiod allows to control the circadian or circannual biological rhythms that control growth (Boeuf et al., 1999b, Duncan et al., 2002), maturation (Porter et al., 1999; Bromage et al., 2001) and processes related to smoltification (Duston et al., 1992, Duncan et al., 1998) and reproduction has been controlled to give out-off-season spawning (Bromage et al., 2001). In flatfish, for example, the off season egg-laying has been induced in halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) (Björnsson et al., 1998). Furthermore, reproduction was suppressed in order to avoid losses in growth due to unwanted maturation during the fattening phase (Bromage et al., 2001).

There is a clear relationship between day-night cycles and the activity and behaviour of an organism (Goldman, 2001; Bayarri et al., 2004b; Vera et al., 2005; Falcón et al., 2007). The Senegalese sole is no exception to this, and it is affected by changes in illumination.

The description of the courtship of *Solea solea* (Baynes et al., 1994) along with other flatfish descriptions indicates that sole share many of the general features of courtship behaviours. There are some differences in partner selection for *Tarphops oligolepis* (Manabe et al., 2001), or in the harem system with one male territorial and several females in a territory for the flounder (*Bothus podas*)

(Carvalho et al., 2003); the social behaviour with territorial males and several females associated for the eyed flounder (*B. ocellatus*), the plate fish (*B. lunatus*) and *B. ellipticus* (Konstantinou et al., 1995), Gibson (Gibson, 1997, 2005), in his reviews, provides a basic framework for studying the general behaviour of these animals.

### **Overview of pheromones and hormones in fish**

In vertebrates, the reproductive hormones have two critical functions: the timing of sexual maturation and the control of sexual interactions between individuals of the same species (Pfaff, 2005). The hormones act on the brain to induce synchrony between reproductive behaviour and maturation of gametes of an individual. Thus, hormones act on effectors to generate behaviours and other signals that induce reproductive synchrony between individuals of the same species.

However, hormones contribute to a third group of actions: after being released into the environment and can act as sex pheromones. Many sex steroids, prostaglandins and their metabolites are detected with high sensitivity and specificity by certain species of fish, such as salmon, carp and gudgeon (Stacey et al., 2002, Stacey et al., 2006) and have a key effect in the reproductive behaviour and in the physiology of these fish. One possible approach to understand the problem is to make changes in the hormonal rhythms of the G1, in order to study the behavioural differences compared with wild animals that spawn successfully.

Pheromones: "substances excreted by an individual and received by a second individual, which causes a specific reaction, for example a defined behaviour or development process." (Karlsson et al., 1959). The current definition defines pheromones as "a smell" or "mixture of odorous substances, released by an individual (emitter), that evoke in individuals of the same species (receptors), specific adaptations and responses typical of each species. The expression of these reactions requires no prior experience or learning." (Sorensen et al., 1999)

Pheromones differ from the hormones by the fact that they are not stored, but automatically synthesized and released, and their life span is short. Although sex pheromones have been known by their functions in fish reproduction, the evidence of them being steroids and prostaglandins is comparatively recent. The detection of these sex hormones takes place in the taste and smell organs.

In vertebrates, the smell and taste sensory organs represent the largest organs for the detection and identification of chemical stimuli from the environment. The olfactory organ in fish has considerable diversity, possibly reflecting the enormous variety of ecological habitats and all the different evolutionary paths taken. The chemical information is transmitted directly to the central nervous system.

The hormonal induction is a technique used to induce spawning often to eliminate the characteristic dysfunction type 2 of species kept in captivity. In most cases, oocyte maturation, ovulation and spawning may be stimulated by treatment with gonadotropin hormone or gonadotropin releasing hormone agonist (GnRH<sub>a</sub>), either as injections or sustained-release implants (Zohar et al., 2001; Mylonas et al., 2008; Mylonas et al., 2010). In *Solea senegalensis*, the use of a GnRH<sub>a</sub> implant or multiple injections of GnRH<sub>a</sub> showed that both treatments caused spawning, but without fertilization (Agulleiro et al., 2006, Guzman et al., 2011a).

In Senegalese sole, the induction with GnRH<sub>a</sub> and hCG has been tested (Agulleiro et al. 2006 Agulleiro et al., 2007, Cross et al., 2009; Guzman et al., 2009; Guzman et al., 2011b; Rasines et al., 2011; Mechaly et al., 2012) and the action on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis is well known in other species. This is a widespread process in companies and research centres.

Norman Stacey and Peter Sorensen described the different hormonal cycles during gonadal development, gonad maturation, and the final release of gametes in goldfish (*Carassius auratus auratus*, L., 1758.). Throughout the cycle of oocyte maturation and release into the medium, the state of the cycle is signalled by the female fish with the release of different substances to the

medium like bile salts (Hara, 1994, Zhang et al., 2001, Li et al., 2002; Huertas et al., 2007), steroid molecules (Arbuckle et al., 2005; Barata et al., 2008) and prostaglandins (Velez et al., 2009, Hubbard, 2012), as part of various fluids excreted (urine, mucus, faeces).

In a marine flatfish such as the sole, which, as mentioned above, is adapted to low-light or no-light conditions, the importance of the chemical perception of the environment should be noted, and is based mainly, but not exclusively, on the sense of smell. Some of the molecules that fish are able to distinguish are steroids, prostaglandins, hormones and pheromones and other compounds that have not yet been investigated (Sorensen et al., 2004).

In Senegalese sole, the different sensitivity that occurs in both nostrils has been investigated, noting that the nostril on the hidden side has a greater sensitivity to food-related compounds and the substrate, while the nostril on the upper side shows more sensitivity to compounds related with water and with the perception of other individuals of the same species (Velez et al., 2005). This conspecific perception is measurable by an electroolfatogram. Following this signal reception, a short or medium term response may occur: on a short term, a behaviour modification, or on a medium term, hormonal changes can occur in the recipient animal. Due to the dynamics of this action (the release of a compound to the medium by a transmitter) and reaction (uptake of the compounds by a receiver, which involve a short or medium term response from it) these facts are considered to be related to a conscious chemical communication (immediate behavior modification) / unconscious (medium and long term hormonal and physiological changes) and conspecific.

Some of the substances (issued / received) are bile salts (Hara, 1994, Zhang et al., 2001, Li et al., 2002; Huertas et al., 2007), natural steroid hormones (Arbuckle et al., 2005; Barata et al., 2008) and prostaglandins (Sorensen, 1987, Sorensen et al., 1993; Stacey et al., 2002, Sorensen et al., 2004; Stacey et al., 2006 Appelt et al., 2007). Prostaglandins have proven to be not only important as signalling sexual maturation, but also in aquatic animal studies show significant new features in communication between individuals.

The objective of this thesis is the description of the reproductive behaviour of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) kept in captivity, both from the wild and bred in captivity from hatching (G1), and also their social communication at physiological level in order to explain the G1 reproductive dysfunction, which is one of the principal limitations to the culture, of this species.

## 2. General objectives

The general objective of this thesis was to study the reproductive behaviour of Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858), and to investigate the role of pheromones and olfaction in conspecific communication to determine and find solutions to the reproductive dysfunction of Senegalese sole hatched and reared in captivity (G1). Principally, studies were centred on the courtship of Senegalese sole (wild and G1), the effect on behaviour of hormones and pheromones and the influence of body fluids such as urine and faeces in the recognition of conspecifics.

Specific issues of this thesis were:

- Firstly, How can the behaviour of Senegalese sole be studied?, How can nocturnal behaviour be studied? and How can culture systems be adapted for these studies?
- What is the reproductive behaviour of Senegalese sole? How many fish are involved? What are the essential aspects and critical points for reproduction?
- What are the differences in reproductive behaviour between animals from the wild and animals bred in captivity? What is the failure or who fails? Is it a structural component or social component?
- Is the dysfunction based in sexual aspects or maturation? How can the dysfunction be viewed? Is the dysfunction based in a failure to exchange information / communicate? Is there such an exchange of information / communication? What kind of aspects cause the exchange of information / communication? How can we increase the exchange of information / communication? What is the mechanism to perceive the information emitted / communication?

The specific objectives for the experiments were:

- Study on the nocturnal illumination that can be used for future studies of behaviour of the Senegalese sole,

To determine a lighting system that does not affect the nocturnal behaviour and physiology of Senegalese sole for later use in the study of the nocturnal behaviour of Senegalese sole.

- Study of the reproductive behaviour of Senegalese sole. Development of a reproductive ethogram.

To description the courtship of wild Senegalese sole that spawn successfully in captivity and the behaviour of captive-bred sole, that exhibit the reproductive dysfunction to give poor quality spawns. To identify and describe in an ethogram the behaviours that form and particularly are most important in the courtship.

- Senegalese sole hormonal induction to induce reproductive behaviour

To describe the behaviour of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) of captive-bred generation (G1) that were induced to spawn with the application several hormonal induction treatments. To use the ethogram developed in chapter 3 to quantify the behaviour and to describe to what point in the courtship is reached by G1 Senegalese sole after the application of the hormones and pheromones.

- Perception of conspecific of chemical substances in Senegalese sole. With a short experiment on the arctic char

Determine the perception of different fluids that may contain pheromones used of conspecific communicate using Electroolfatograma (EOG) in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). To determine the effect of some of these molecules and fluids on the behaviour of arctic char (*Salvelinus alpinus*).

### 3. Final Discussion

#### Reproductive dysfunction of Senegalese sole

The Senegalese sole caught in the marine environment and transferred to captive conditions spawned with adequate characteristics of quality and quantity (Dinis et al., 1999; Anguis and Cañavate, 2005, Howell et al., 2011). However, the first generation born and raised in captivity (G1) does not spawn adequately presenting a reproductive dysfunction. This is a common situation both in different research centres and commercial production centres (Dinis et al., 1999, Howell et al., 2011). Three types of reproductive dysfunction have been described (Zohar and Mylonas, 2001). Dysfunction type 1, which does not appear to be the dysfunction in Senegalese sole, was described as when females did not enter or only reached early stages of vitellogenesis (Zohar, 1988; Zohar and Mylonas, 2001). This dysfunction was observed in the eel (*Anguilla* sp) kept in captivity, or mullet (*Mugil cephalus* L., 1758) maintained in seawater (Valdebenito et al., 2011). Dysfunction type 2, which also does not appear to be the dysfunction in Senegalese sole, was described as a lack of final oocyte maturation, post-vitellogenesis becoming atresic (Zanuy and Carrillo, 1987; Mylonas et al., 2010). In Senegalese sole failures have not been observed in the final oocyte maturation or ovulation. However, GnRH $\alpha$  inductions have been used to stimulate and control the FOM and ovulation to obtain eggs that were extracted manually and that had good quality and viability (Rasines, et al., 2011). Therefore, Senegalese sole G1 females, present mature oocytes in good condition at the time of normal maturation. The oocytes were viable and were removed without difficulty by abdominal pressure. The dysfunction that may be presented in males was described as a decrease in quantity and quality of sperm (Zohar and Mylonas, 2001). However, Senegalese sole males, despite of having low quantity of sperm (Cabrita, et al., 2006), present sperm of sufficient quality for the in-vitro fertilization of eggs extracted by abdominal pressure (Rasines, et al., 2011). The Senegalese sole has none of the above described dysfunctions, in late February the developing ovary can be observed and in late March the ovary is very visible due to oocyte hydration.

The third type of dysfunction in females is the absence of spawning at the end of the reproductive cycle, usually oocyte maturation and ovulation occurs in response to physiological and environmental stimuli (Zohar and Mylonas, 2001), but the eggs are not released to complete the spawning process (Duncan et al., in press). The dysfunction in Senegalese sole does not appear to be caused by the environment, unlike carp (Duncan, in press) that needs a suitable substrate to complete spawning. In some species, changing environmental parameters, light, or temperature, are sufficient to produce the necessary signal for the start of the courtship. In wild Senegalese sole, a cyclical variation in temperature in early spring was sufficient to provoke natural spontaneous spawning in captivity, however, the same conditions did not provoke spawning in G1 Senegalese sole. The wild Senegalese sole kept in the same conditions as the G1 did not present a reproductive dysfunction (Anguis and Cañavate, 2005, chapter 3) and neither did G1 females mixed with wild males (Chapter 3). As a result of this dysfunction oocytes underwent atresia (Guzman et al., 2009) and were reabsorbed or released only by the female outside of the spawning context as has been observed in various occasions in the present study. The 3rd type of reproductive dysfunction has been resolved in some cases with the addition of a suitable substrate (carp, see above). The addition of substrate in the captive environment of Senegalese sole appeared to improve welfare, but no change was observed in terms of reproduction (personal observation). The 3rd type of reproductive dysfunction has also been resolved by obtaining gametes manually by abdominal pressure or "stripping" (Mañanos, et al, 2009; Rasines, et al., 2011) as is practiced for salmonids and other cultured flatfish industrially such as turbot and halibut (Mañanos et al., 2009, Duncan et al., in press) and including Senegalese sole (Rasines, et al., 2011). However, stripping is only a partial solution because it does not solve the problem or provide information about the cause of the dysfunction.

### **Reproductive behaviour**

The work in this thesis has focused on studying the behaviour and physiology of chemical communication in Senegalese sole as tools for understanding this

3<sup>rd</sup> type of reproductive dysfunction that appears to have a high social component. In a first approach, the behaviour of this species was studied. The Senegalese sole has been described to have crepuscular and nocturnal activity (Bayarri et al., 2004, Oliveira et al., 2009), living in areas that do not receive much light and has been shown to be very sensitive to low intensity illumination (Oliveira et al.; 2007 Oliveira et al., 2010). Similar to other animals that inhabit the sea bed and present more sensitivity to the type of radiation reaching this bottom habitat and less to wavelengths that do not penetrate the first few meters of water (Montgomery and Pankhurst, 1997).

Three treatments of nocturnal illumination were studied with the aim to develop a system that permitted the non-intrusive filming of Senegalese sole nocturnal behaviour in the culture tanks. The low-intensity red light treatment of, <5 lux at the water surface, proved appropriate for our purposes since it was possible to observe and identify the animals in video recordings, and study the profile of the type of activity and behaviour, which was not different from the control treatment. Melatonin levels in blood also showed no significant differences compared to the control treatment which is consistent with the observations of Oliveira et al., (2007). Once a non-invasive nocturnal illumination system had been selected and validated the studies on the nocturnal behaviour of Senegalese sole were initiated.

The present study, observed and described for the first time the reproductive behaviour of wild Senegal sole held in captivity and described the absence of reproductive behaviour in captive-bred sole (G1) (Chapter 3). The mature G1 females were observed to release eggs outside of the context of courtship in groups of fish of only G1 origin. However, females from the same G1 origin were successful in courtship when mixed with wild males, which demonstrated that the reproductive dysfunction of Senegalese sole bred in captivity (G1) was centred in G1 males.

During the breeding season, Senegalese sole increased activity in the afternoon by increasing the frequency of certain behaviours in the culture tanks. Behaviours such as rest the head on one another, which is a common form of

social contact in flatfish (Gibson, 1997) and possibly a form of conspecific recognition, for which the sole also use the olfactory system. The Senegalese sole has perceptual differences between nostrils, the lower nostril perceives odours associated with food or with other animals of the same species (Velez et al., 2005) while the upper perceives the environment. These social (rest the head) contacts occur in all periods of the day, but with changes in frequency. Following these exploratory contacts, males focus attention on females, but there does not appear to be a determining dominance or territoriality unlike the pedas or ocellatus flounder (Carvalho et al., 2003) in which territorial males prevent other males access to females. This apparent lack of territoriality may be caused by intensive farming conditions, although there are no data on territoriality or dominance in *Solea senegalensis* in the wild.

At some point, in these explorations by several males lead to games or persecutions, sometimes initiated by females as in the winter flounder (Stoner et al., 1999), but not exclusively as sometimes persecutions were initiated by males. The female, when participating, stopped after a few seconds and the males continued without female participation. These persecutions continued throughout the afternoon and early evening. Throughout the afternoon, in the midst of these persecutions and social contacts, a particular male became more insistent with a particular female to form a couple. When other males approached this couple, the male of the couple was observed to protect the female from the other male(s) by taking a position between the female and approaching male or covering the female (behaviour guardian). At some point in the behaviour between the couple the female swam from the bottom and permitted that the male swam under her and the couple swam towards the surface in synchrony. Only the male and the female were involved and the intrusion of other males or encounters with materials of the system such as pipes or air hoses caused the couple to break-up. Therefore, only two individuals were involved in gamete liberation in Senegalese sole, unlike in the winter flounder (Stoner et al., 1999) that spawn in groups of several males and several females. Senegalese sole were only observed to spawn in a couple and

the participation of other males or females was not observed at any point of the gamete liberation.

The observations of G1 groups indicated that G1 males did not perform the behaviour "rest the head," and did not pass to the next step of the courtship sequence "persecutions" did not centre attention in ovulated females and did not perform the courtship swim to liberate gametes. Using groups of mixed G1 and wild origin demonstrated that wild males performed all the courtship steps with G1 females while G1 males did not perform the steps of courtship, thus indicating that the problem of G1 reproductive dysfunction lies with G1 males.

As already mentioned, the G1 Senegalese sole dysfunction appears not to be of type 1 or type 2 described by Zohar and Mylonas (2001), but appears to be a type 3 dysfunction unrelated to environmental components as wild individuals housed in the same conditions as the G1 reproduce successfully. The reason for this behaviour dysfunction is not known. Females appear to be at the right point of maturity especially considering the mix group (wild males with G1 females) that spawned successfully and the liberation of ova outside of the context of the courtship by G1 females held with G1 males (Cañavate et al., 2005, Chapter 3). However, G1 males did not even perform behaviours in the first step of courtship, in which the activity of the males increase and contact or recognition of ovulated females became more insistent.

### **Induction of behaviour**

There are two components in the process of chemical communication, which can be defined as a process emission - receiving information through chemical signals. The emission (1) of some kind of chemical signal (pheromone) by females, which allows males to recognize and detect the state of maturity and reception (2) by the males of these molecules and the effect the chemical reception has on the males behaviour.

To study and increase possible emissions of chemical signals G1 Senegalese sole were induced with different hormones (Gonadotropins (HCG), GnRH (triggers

the release of pituitary gonadotropins) or pheromone (PGF2 $\alpha$ ) that act on the hypothalamic-pituitary-gonadal to induce spawning including courtship behaviour. Different treatments were applied with gonadotropin-releasing hormone (GnRH $\alpha$ ) (Zohar et al., 2001; Mylonas et al., 2008; Mylonas et al., 2010 Rasines et al., 2011), human chorionic gonadotropin (HCG) (Guzman et al., 2011) and a treatment in which the first GnRH $\alpha$  was applied on a low dose (5 mg / Kg) and after the first GnRH $\alpha$  induced release of eggs, PGF2 $\alpha$  injections were applied. Spawning was produced similar to those described for this species (Agulleiro et al.; 2006 Guzman et al. 2011a) and as described for other flatfish, *Paralichthys lethostigma* (Berlinsky et al., 1996, Watanabe et al., 1998). *Paralichthys dentatus* (Berlinsky et al., 1997), yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) (Larsson et al., 1997) and turbot (*Scophthalmus máximus*) (Mugnier et al., 2000). However, none of the experimental treatments were observed to induce courtship behaviours and fertilized eggs were not obtained. An in-depth analysis using the ethogram to dissect and quantify the individual behaviours of G1 Senegalese sole induced with different hormones revealed that the behaviours most relevant in terms of courtship and relationships between individuals, obtained from Senegalese sole ethogram (Chapter 3) did not occur. There was a significant decrease in activity of fish induced with the hormones compared to the control group ( $P < 0.05$ ), represented by increased in behaviours such as "still" with no interactions between individuals.

The behaviour "stay with actions on the" exhibited differences between the control treatment and the other treatments because the control presented more exploratory interactions between individuals. HCG treatment showed very low rates of actions between individuals and the activity recorded in the tanks was almost exclusively, "swim alone." There were no activities related to competitive or persecution behaviour between males, (follow and followed by). The different hormonal inductions despite of inducing physiological changes that resulted in increased liberation of ova did not produce changes in reproductive behaviour, in fact the overall fish activity was reduced in all cases studied.

Despite that hormonal induction did not alter or induce reproductive behaviour it may still be interesting to test other levels of hormones or other hormones and repeat these types of experiments, especially if previously chemical communication was studied to identify the bases of the chemical communication. For this reason the last chapter of the thesis focused on the study of the induction of chemical behaviour and perception conspecific.

Urine and intestinal fluids were used to study the reception of conspecific chemical signals and were found to possess potent scents for conspecific Senegalese sole communication. Some of the compounds present in these substances, bile salts, steroid hormones and pheromones elicit a neuronal response measurable by electroolfatogram. This communication allowed the Senegalese sole to chemically distinguish between male or female individuals and even state of maturation, immature and mature. Both urine and faeces were perceived both clearly and significant differences were found. Urine was fractionated using a C-18 solid bases filter, which retained lipids, steroids and polar compounds and the filtered fraction gave a significantly higher olfactory response. This reception of signals of different chemical compounds could induce changes in the reproductive behaviour of the fish as seen in the arctic char that varied swimming speed, movement or distance from the point at which the substance was injected into the water of the tank.

In short, the type 3 dysfunction observed in G1 Senegalese sole had a strong social and behavioural component and the Senegalese sole have conspecific communication, which may be the key for discovering the cause of the G1 dysfunction. Further studies are needed on dominance behaviour, the establishing of hierarchies and on the differences between wild and G1 males in relation to receiving hormonal signals related to reproduction.

#### 4. Conclusions

As final conclusions and following the scheme developed in this thesis:

From the nocturnal lighting studies:

- Low intensity red (5 lux, group Rb) provided nocturnal illumination that did not affect the normal behaviour or activity of the animals.

Its viability as a nocturnal illumination system for behavioural studies, was reinforced by the spawning and the recordings of courtship, conducted under the nocturnal illumination system in the IEO facilities in Santander, (Culture unit "El Bocal") that demonstrated that the system did not affect normal behaviour.

About the courtship of Senegalese sole:

- A prerequisite for the release and fertilisation of eggs from the female, is the maintenance on the surface of the female by the male.
- *Solea senegalensis*, spawned only in pairs (male and female) and no other animals were involved in gamete release in the courtship.
- There are many complex interactions between males, which include persecutions or competition and guardian type behaviour, both described in the ethogram
- These male behaviours (persecutions or competition and guardian) have predictive value and were only observed on days or nights with spawns or at least failed attempts at courtship. These behaviours can predict, firstly the day of spawning and secondly the spawning pair, which may be important for commercial companies and research centres.

About the reproductive dysfunction that affects Senegalese sole in captivity:

- The specific actions or behaviours observed with successful spawning were exclusive to groups of animals with wild males and the origin of the females was less important. Therefore, the absence of reproductive behaviour in G1 animals can be attributed to the G1 males.
- For the first time, it was described that the reproductive problem observed in Senegalese sole was the total absence of courtship and reproductive behaviour, with the consequent that all eggs were not fertilized.
- The reproductive dysfunction associated with these animals was clearly the dysfunction type 3 and specifically a dysfunction in reproductive behaviour considering that both sexes complete or partially complete maturation with normal development. The G1 males were associated with the dysfunction and G1 females were not associated.
- It must be highlighted the reproductive success in groups of wild fish and the mixed group of wild males with G1 females compared to the failure in G1 fish and the mixed group of G1 males and wild females. The problem appeared to be centred in the initiation of the behaviours that synchronise the gamete release. The sequence of behaviours was initiated by the males with the persecutions, as described in the present study and this may be the key to the dysfunction.

#### About the hormone induction therapies

- Under the described experimental conditions, hormone induction did not solve the dysfunction and also did not appear to increase the amount of signals produced by the male towards the female. No change in behaviour of the males towards the females was perceived.

#### About chemical communication in the Senegalese sole

- The intestinal fluid and urine contain potent conspecific odorants for the Senegalese sole and the quality and quantity of response to these odorants enabled the differentiation between sex and maturation status of the emitter of the substances. Both urine and faeces were, therefore, a potential pheromone

pathway in Senegalese sole. Further investigation is required to determine what chemicals act as pheromones and the actions of these chemicals.

- The substances, D-coprostenol, PGF2alpha, ovarian fluids or water from a culture tank introduced in the water of a tank with an isolated arctic charr (*Salvelinus alpinus*) provoked significant ( $P < 0.05$ ) changes in the fish behaviour, swimming velocity, amount of movement or distance from the point at which the substance was introduced to the tank.

Finally, further research into dominance relationships between fish, the formation of territories (which would be complicated in normal aquaculture facilities) and chemical communication, might be the appropriate way to understand and solve the reproductive problems of G1 Senegalese sole.



## **Bibliografía general**

---

## Referencias Bibliográficas.

### A

- Agulleiro, M. J., Anguis, V., Cañavate, P., Martínez-Rodríguez, G., Mylonas, C. C. y CERDA, J. (2006). Induction of spawning of captive-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*) using different administration methods for gonadotropin-releasing hormone agonist. Amsterdam, PAYS-BAS: Elsevier.
- Agulleiro, M. J., Cerdà, J., Duncan, N., Mylonas, C. & Scott, A. P. (2007). Treatment of GnRHα-Implanted Senegalese Sole (*Solea Senegalensis*) with 11-Ketoandrostenedione Stimulates Spermatogenesis and Increases Sperm Motility.
- Albert, O. T., Harbitz, A. & Hoines, A. S. (2003). Greenland Halibut Observed by Video in Front of Survey Trawl: Behaviour, Escapement, and Spatial Pattern. *Journal of Sea Research* 50, 117-127.
- Alonso-Gómez, A. L., Valenciano, A. I., Alonso-Bedate, M. & Delgado, M. J. (1995). Differential Characteristics and Regulation of Arylamine and Arylalkylamine N-Acetyltransferases in the Frog Retina (*Rana Perezii*). *Neurochemistry International* 26, 223-231.
- Andalucía, J. d. (2010). <http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/areas-tematicas/pesca-y-acuicultura/acuicultura/el-sector-acuicola-en-andalucia/los-sistemas-de-cultivo.html>. In Sector acuícola de Andalucía.
- Anguis, V. & Canavate, J. P. (2005). Spawning of Captive Senegal Sole (*Solea Senegalensis*) under a Naturally Fluctuating Temperature Regime. *Aquaculture* 243, 133-145.
- Appelt, C. W. y Sorensen, P. W. (2007). Female goldfish signal spawning readiness by altering when and where they release a urinary pheromone. *ANIMAL BEHAVIOUR* 74, 1329-1338.
- Arbuckle, W. J., Bång, A. J., Corkum, L. D., Zielinski, B. S., Li, W., Yun, S.-S., Bachynski, S. y Scott, A. P. (2005). In vitro biosynthesis of novel 5 $\beta$ -reduced steroids by the testis of the round goby, *Neogobius melanostomus*. *General and Comparative Endocrinology* 140, 1-13.
- Arias, A. y Moyano, P. D. (1990). Estados juveniles de la ictiofauna en los caños de las salinas de la bahía de Cádiz. Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía.
- Arnold, G. P. & Nuttall-Smith, P. B. N. (1974). Shadow Cinematography of Fish Larvae. *Marine Biology* 28, 51-53.
- Aronson, L. R. y Holztucker, A. M. (1949). Reproductive behavior in the african mouthbreeding fish, *Tilapia-macrocephala* (Bleeker). *Anatomical Record* 105, 551-551.

## B

- Barata, E., Fine, J., Hubbard, P., Almeida, O., Frade, P., Sorensen, P. y Canário, A. (2008). A Sterol-Like Odorant in the Urine of Mozambique Tilapia Males Likely Signals Social Dominance to Females. *Journal of Chemical Ecology* 34, 438-449.
- Batty, R. S. (1983). Observation of Fish Larvae in the Dark with Television and Infra-Red Illumination. *Marine Biology* 76, 105-107.
- Bauchot, M. L. y Pras, A. (1980). *Guide des poissons marins d'Europe*. France.
- Bayarri, M. J., Garcia-Allegue, R., Lopez-Olmeda, J., Madrid, J. & Sanchez-Vazquez, F. (2004a). Circadian Melatonin Release in Vitro by European Sea Bass Pineal. *Fish Physiology and Biochemistry* 30, 87-89.
- Bayarri, M. J., Madrid, J. A. & Sánchez-Vázquez, F. J. (2002). Influence of Light Intensity, Spectrum and Orientation on Sea Bass Plasma and Ocular Melatonin. *Journal of Pineal Research* 32, 34-40.
- Bayarri, M. J., Muñoz-Cueto, J. A., López-Olmeda, J. F., Vera, L. M., Rol de Lama, M. A., Madrid, J. A. y Sánchez-Vázquez, F. J. (2004a). Daily locomotor activity and melatonin rhythms in Senegal Sole (*Solea senegalensis*). *Physiology & Behavior* 81, 577-583.
- Bayarri, M. J., Rodriguez, L., Zanuy, S., Madrid, J. A., Sanchez-Vazquez, F. J., Kagawa, H., Okuzawa, K. y Carrillo, M. (2004b). Effect of photoperiod manipulation on the daily rhythms of melatonin and reproductive hormones in caged European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 136, 72-81.
- Baynes, S. M., Howell, B. R., Beard, T. W. & Hallam, J. D. (1994). A Description of Spawning Behaviour of Captive Dover Sole, *Solea Solea* (L.). *Netherlands Journal of Sea Research* 32(3/4), 271-275.
- Ben-Tuvia, A. (1990). a taxonomic reappraisal of the Atlanto-Mediterranean soles *Solea solea*, *S. senegalensis* and *S. lascaris*. *Journal of Fish Biology* 36, 947-960.
- Berlinsky, D. L., King V, W., Smith, T. I. J., Hamilton, R. D., Holloway, J. & Sullivan, C. V. (1996). Induced Ovulation of Southern Flounder *Paralichthys lethostigma* Using Gonadotropin Releasing Hormone Analogue Implants. *Journal of the World Aquaculture Society* 27, 143-152.
- Berlinsky, D. L., William, K. V., Hodson, R. G. & Sullivan, C. V. (1997). Hormone Induced Spawning of Summer Flounder *Paralichthys dentatus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 28, 79-86.
- Björnsson, B. T., Halldórsson, Ó., Haux, C., Norberg, B. & Brown, C. L. (1998). Photoperiod Control of Sexual Maturation of the Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): Plasma Thyroid Hormone and Calcium Levels. *Aquaculture* 166, 117-140.
- Boeuf, G. y Le Bail, P.-Y. (1999a). Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture* 177, 129-152.

- Breder, C. (1922). Description of the spawning habits of *Pseudopleuronectes americanus* in captivity. American Society of Ichthyologists and Herpetologists (ASIH), 3-4.
- Breder, C. M. y Halpern, F. (1946). Innate and acquired behavior affecting the aggregation of fishes. *Physiological Zoology* 19, 154-190.
- Breder, C. M. y Rasquin, P. (1947). Evidence for the lack of a growth principle in the optic cyst of Mexican cave fish. *Zoologica; scientific contributions of the New York Zoological Society* 32, 29-33.
- Breder, C. M., Jr.; (1937). The perennial flying fish controversy. *Science (New York, N.Y.)* 86, 420-422.
- Brind, W. L. (1931). Monographs on various species of fish, and on the management of aquaria. pp. 4081-4083. New York.
- Bromage, N. R., Porter, M. & Randall, C. (2001). The Environmental Regulation of Maturation in Farmed Finfish with Special Reference to the Role of Photoperiod and Melatonin. *Aquaculture* 197, 63-98.
- Browman, H. I., Novales-Flamarique, I. & Hawryshyn, C. W. (1994). Ultraviolet Photoreception Contributes to Prey Search Behaviour in Two Species of Zooplanktivorous Fishes. *Journal . exp. Biol. ,* 186, 187- 198.
- Brown, E.G., Chivers, D.P. (2006) Learning about danger, Chemical alarms. *Fish cognition and behaviour.*, 49-69. Blackwell publishing
- Butler, G. W. (1895). Report on the spawning of the common sole (*Solea vulgaris*) in the aquarium of the Marine Biological Association's Laboratory at Plymouth, during April and May, 1895. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 4, 3-9.

## C

- Cabrera E., Robles, V. & Herráez, P., 2008. Methods in reproductive aquaculture, CRC, 81-85.
- Campbell, N. A., Reece, J. B. & Mitchell, L. G. (1999). *Biology*.
- Cañavate, J. P. y Fernández-Díaz, C. (1999). Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture* 174, 255-263.
- Carvalho, N., Alfonso, P. y Santos, R. S. A. (2003). The harem mating system and mate choice in the wide-eyed flounder, *Bothus podas*. *Environmental Biology of Fishes* 66, 249-258.
- Carvalho, N., Alfonso, P. y Santos, R. S. A. (2003). The harem mating system and mate choice in the wide-eyed flounder, *Bothus podas*. *Environmental Biology of Fishes* 66, 249-258.
- Collin, J., Voisin, P., Falcón, J., Faure, J., Brisson, P. & Defaye, J. (1989). Pineal Transducers in the Course of Evolution: Molecular Organization, Rhythmic Metabolic Activity and Role. *Arch Histol Cytol* 52, 441-449.
- Colombo L, Belvedere PC, Marconato A, Bentivenga F, 1982. Pheromones in teleost fish. In: Richter CJJ, Goos TJJ (eds.), *Proceedings of the Second International Symposium on the*

- Reproductive Physiology of Fish. The Netherlands: Pudoc, pp. 84-94
- Conceição, L. E. C., Ribeiro, L., Engrola, S., Aragao, C., Morais, S., Lacuisse, M., Soares, F. y Dinis, M. T. (2007). Nutritional physiology during development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 268, 64-81.
- Craig, W. (1918). Appetites and Aversions as Constituents of Instincts. *Biological Bulletin* 34, 91-107.
- Cross, I., Guzmán, J. M., Kight, K., Klenke, U., Mañanós, E. L., Ortiz-Delgado, J. B., Rebordinos, L., Riaza, A., Rubio, M., Sánchez-Ramos, I. y Sarasquete, C. (2009). Comparative gene expression of gonadotropins (FSH and LH) and peptide levels of gonadotropin-releasing hormones (GnRHs) in the pituitary of wild and cultured Senegalese sole (*Solea senegalensis*) broodstocks. *Comparative Biochemistry and Physiology - A - Molecular and Integrative Physiology* 153, 266-277.
- D**
- de Actas (12-16 de mayo, 2003. Cádiz, España): 343-345. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía. Sevilla, España.
- Denton, E. J. (1990). LIGHT AND VISION AT DEPTHS GREATER THAN 200 METERS. *Light and Life in the Sea*, 127-148.
- Devauchelle, N., Alexandre, J. C., Lecorre, N. & Letty, Y. (1988). Spawning of Turbot (*Scophthalmus-Maximus*) in Captivity. *Aquaculture* 69, 159-184.
- Dinis, M. T. (1986). Quatre Soleidae de l'Estuaire du Tage. Reproduction et Croissance. Essai d'Élevage de *Solea senegalensis* Kaup 1858Thèse d'État ès-Sciences Naturelles. Université de Bretagne Occidentale, France.
- Dinis, M. T., Ribeiro, L., Soares, F. y Sarasquete, C. (1999). A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture* 176, 27-38.
- Døving (1976) Evolutionary trends in olfaction. en: Benz G (ed), structure-activity relationship in chemoreception. London: IRL Press, pp. 149-159.
- Duncan, N. J. & Bromage, N. (1998). The Effect of Different Periods of Constant Short Days on Smoltification in Juvenile Atlantic Salmon (*Salmo Salar*). *Aquaculture* 168, 369-386.
- Duncan, N. J., Sonesson, A. K. y Chavanne, H. (in press). Principles of finfish broodstock management in aquaculture: control of reproduction and genetic improvement. In *Advances in aquaculture hatchery technology* (Allan, G. B., ed.). Cambridge (U.K.): Woodhead Publishing Limited.
- Duncan, N. J., Thrush, M. A., Elliott, J. A. K. & Bromage, N. R. (2002). Seawater Growth and Maturation of Atlantic Salmon (*Salmo Solar*) Transferred to Sea at Different Times During the Year. *Aquaculture* 213, 293-309.
- Duncan, N., Estévez, A., Porta, J., Carazo, I., Norambuena, F., Aguilera, C., Gairin, I. y Bucci, F. (2012). Reproductive development, GnRHa-induced spawning and egg quality of wild

meagre (*Argyrosomus regius*) acclimatised to captivity. *Fish physiology and Biochemistry* 38, 1273-1286.

Durieux, E. D. H., Le Duigou, M., Millot, S., Sasal, P. & Begout, M.-L. (2010). Sedentary Behaviour Establishment in O-Group Common Sole *Solea Solea*: A Laboratory Video-Tracking Study. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 90, 1257-1262.

Duston, J. & Saunders, R. L. (1992). Effect of 6-Month, 12-Month, and 18-Month Photoperiod Cycles on Smolting and Sexual-Maturation in Juvenile Atlantic Salmon (*Salmo Salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49, 2273-2280.

## F

Falcón, J., Besseau, L., Sauzet, S. & Boeuf, G. (2007). Melatonin Effects on the Hypothalamo-Pituitary Axis in Fish. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 18 No.2.

Falcon, J., Migaud, H., Munoz-Cueto, J. A. & Carrillo, M. (2010). Current Knowledge on the Melatonin System in Teleost Fish. *General and Comparative Endocrinology* 165, 469-482.

Faleiro, F., Narciso, L. & Vicente, L. (2008). Seahorse Behaviour and Aquaculture: How to Improve *Hippocampus Guttulatus* Husbandry and Reproduction? *Aquaculture* 282, 33-40.

Fernández-Díaz, C., Yýfera, M., Cañavate, J. P., Moyano, F. J., Alarcón, F. J. y Díaz, M. (2001). Growth and physiological changes during metamorphosis of Senegal sole reared in the laboratory. *Journal of Fish Biology* 58, 1086-1097.

Flüchter, J. (1972). Inducing of spawning in the turbot (*Rhombus maximus* L.) by injection of hypophyseal suspensions. *Aquaculture* 1, 285-287.

Forster, G. R. (1953). The spawning behaviour of plaice. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 32, 319-319.

Friedman, M. (2008). The evolutionary origin of flatfish asymmetry. *Nature* 454, 209-212

Fujita, I., Sorensen, P. W., Stacey, N. E. & Hara, T. J. (1991). The Olfactory System, Not the Terminal Nerve, Functions as the Primary Chemosensory Pathway Mediating Responses to Sex Pheromones in Male Goldfish. Basel, SUISSE: Karger.

Futter, C., Roed, A., Porter, M., Randall, C. & Bromage, N. (2000). The Effects of Differential Light Intensities on the Diel Rhythm of Melatonin Release in Rainbow Trout. *Reproductive Physiology of Fish.*, 340.

## G

García-López, A., Martínez-Rodríguez, G. y Sarasquete, C. (2005). Male reproductive system in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup): Anatomy, histology and histochemistry. *Histology and histopathology* 20.

- García-López, A., Pascual, E., Sarasquete, C. & Martínez-Rodríguez, G. (2006). Disruption of Gonadal Maturation in Cultured Senegalese Sole *Solea Senegalensis* Kaup by Continuous Light and/or Constant Temperature Regimes. *Aquaculture* 261, 789-798.
- Gibson, R. N. (1997). Behaviour and the distribution of flatfishes. *Journal of Sea Research* 37, 241-256.
- Gibson, R. N. (2005). Flatfishes: biology and exploitation.
- Goldman, B. D. (2001). Mammalian photoperiodic system: Formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *Journal of Biological Rhythms* 16, 283-301.
- Guzmán, J. M., Bayarri, M. J., Ramos, J., Zohar, Y., Sarasquete, C. y Mananos, E. L. (2009). Follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression during larval development in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* 154, 37-43.
- Guzmán, J. M., Cal, R., García-López, á., Chereguini, O., Kight, K., Olmedo, M., Sarasquete, C., Mylonas, C. C., Peleteiro, J. B., Zohar, Y. y Mañanós, E. L. (2011a). Effects of in vivo treatment with the dopamine antagonist pimozide and gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH<sub>a</sub>) on the reproductive axis of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 158, 235-245.
- Guzmán, J. M., Ramos, J., Mylonas, C. C. & Mañanós, E. L. (2011b). Comparative Effects of Human Chorionic Gonadotropin (hCG) and Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist (GnRH<sub>a</sub>) Treatments on the Stimulation of Male Senegalese Sole (*Solea Senegalensis*) Reproduction. *Aquaculture* 316, 121-128.

## H

- Hara, T. J. (1994). The diversity of chemical stimulation in fish olfaction and gustation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4, 1-35.
- Horwood, J. (1993). The bristol channel sole (*Solea solea* (L) - A fisheries case-study. *Advances in Marine Biology*, Vol 29 29, 215-367.
- Howell, B. R., Prickett, R., Canavate, J. P., Mañanós, E., Dinis, M. T., Conceicao, L. y Valente, L. (2011). The cultivation of soles. Reprort of the 5th Workshop. *EAS Spec. Publ.* 36, 3.
- Hubbard, P. C. (2012). Pheromones in marine fish and their culture. In *Unpublished Chapter Book*.
- Hubbard, P. C. (2012). Pheromones in Marine Fish and Their Culture. (Book, U. C., ed.).
- Hubbard, P. C. (2012). Pheromones in Marine Fish and Their Culture. In *Unpublished Chapter Book*.
- Hubbard, P. C., Barata, E. N. & Canãrio, A. V. M. (2003a). Olfactory Sensitivity to Catecholamines and Their Metabolites in the Goldfish. *Chemical Senses* 28, 207-218.

- Hubbard, P. C., Barata, E. N. & Canario, A. V. M. (2002). Possible Disruption of Pheromonal Communication by Humic Acid in the Goldfish, *Carassius Auratus*. *Aquatic Toxicology* **60**, 169-183.
- Hubbard, P. C., Barata, E. N. & Canário, A. V. M. (2003b). Olfactory Sensitivity of the Gilthead Seabream (<I>Sparus Auratus</I> L) to Conspecific Body Fluids. *Journal of Chemical Ecology* **29**, 2481-2498.
- Hubbard, P., Barata, E., Ozório, R., Valente, L. & Canário, A. (2011). Olfactory Sensitivity to Amino Acids in the Blackspot Sea Bream (<I>Pagellus Bogaraveo</I>): A Comparison between Olfactory Receptor Recording Techniques in Seawater. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **197**, 839-849.
- Huertas, M., Hubbard, P. C., Canario, A. V. M. y Cerda, J. (2007). Olfactory sensitivity to conspecific bile fluid and skin mucus in the European eel *Anguilla anguilla* (L.). *Journal of Fish Biology* **70**, 1907-1920.

## I

- Iigo, M., Abe, T., Kambayashi, S., Oikawa, K., Masuda, T., Mizusawa, K., Kitamura, S., Azuma, T., Takagi, Y., Aida, K. & Yanagisawa, T. (2006). Lack of Circadian Regulation of in Vitro Melatonin Release from the Pineal Organ of Salmonid Teleosts. *General and Comparative Endocrinology* **154**, 91-97.
- Iigo, M., Hara, M., Ohtani-Kaneko, R., Hirata, K., Tabata, M. & Aida, K. (1997). Photic and Circadian Regulations of Melatonin Rhythms in Fishes. *Biological Signals* **6**, 225-232.
- Ingle, D. J. (1965). BEHAVIORAL-EFFECTS OF FOREBRAIN LESIONS IN GOLDFISH. *American Psychologist* **20**, 556-557.
- Ingolfsson, O. A. & Jorgensen, T. (2006). Escapement of Gadoid Fish beneath a Commercial Bottom Trawl: Relevance to the Overall Trawl Selectivity. *fisheries research* **79**, 303-312.

## J

- Jamieson, A. J., Godo, O. R., Bagley, P. M., Partridge, J. C. & Priede, I. G. (2006). Illumination of Trawl Gear by Mechanically Stimulated Bioluminescence. *fisheries research* **81**, 276-282.

## K

- Karlson, P. y Luscher, M. (1959). /`Pheromones/': a New Term for a Class of Biologically Active Substances. *Nature* **183**, 55-56.
- Kitamura, S., Ogata, H. & Takashima, F. (1994). Respuesta olfativa de varias especies de teleósteos a F-prostaglandinas. *Comparativa Bioquímica y Fisiología A* **107**, 463-467.
- Kitamura, S., Ogata, H., Takashima, F. (1994), Activities of F-type prostaglandins as releaser sex pheromones in cobitide loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, *Comparative Biochemistry*

and *Physiology Part A: Physiology*, **107**,1, January, 161-169.

- Kittredge JS, Terry M, Takahashi R, 1971, Sex pheromone activity of the molting hormone crustecdysone on male crabs (*Pachygrapsus crassipes*, *Cancer antennarius* and *C. anthony*). *Fish Bull* 69: 337-43
- Konstantinou, H. y Shen, D. C. (1995). The social and reproductive behavior of the eyed flounder, *Bothus ocellatus*, with notes on the spawning of *Bothus lunatus* and *Bothus ellipticus*. *Environmental Biology of Fishes* 44, 311-324.
- Kristoffersen, C., Karlsen, O., Hansen, T., Kristiansen, T., Fosseidengen, J. & Taranger, G. (2006). Sexual Maturation in Farmed Cod. *Fisken og Havet, Saernummer [Fisken Havet Saernummer]* 2, 141-142.
- Künne, C. (1930). Aquarienbeobachtungen am Zwergbutt, *Zeugopterus punctatus*. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie* 24, 134-139.

## L

- Laberge, F., Hara, T.S. (2001) Neurobiology of fish olfaction: a review. *Brain Research Reviews*, **36**,1, 46-59,
- Lagardère, F., Decamps, P. y Quero, J.-C. (1979). Découverte les long des costes de la Charente-Maritime d'une population de *Solea senegalensis* Kaup, 1858 (Soleidae, Pleuronectiformes). *Ann. Soc. Sci. Nat. Charente-Maritime* 6, 563-572.
- Lambert JGD, van den Hurk R, Schoonen WGEJ, Resink JW, van Oordt PGWJ, 1986. Gonadal steroidogenesis and the possible role of steroid glucuronides as sex pheromones in two species of teleosts. *Fish Physiol Biochem* 2:101-07
- Larsson, D. G. J., Mylonas, C. C., Zohar, Y. & Crim, L. W. (1997). Gonadotropin-Releasing Hormone Analogue (GnRH-a) Induces Multiple Ovulations of High-Quality Eggs in a Cold-Water, Batch-Spawning Teleost, the Yellowtail Flounder (*Pleuronectes ferrugineus*). Ottawa, ON, Canada: National Research Council of Canada.
- Li, W. & Sorensen, P. W. (1997). Highly Independent Olfactory Receptor Sites for Naturally Occurring BileAcids in the Sea Lamprey, *Petromyzon Marinus*. *J Comp Physiol A***180**, 429-438.
- Li, W., Alexander P. Scott, Michael J. Siefkes, Honggao Yan, Qin Liu, Sang-Seon Yun y Gage, D. A. (2002). Bile Acid Secreted by Male Sea Lamprey That Acts as a Sex Pheromone. *Science* (New York, N.Y.) 296 138-141.
- Lorenz, K. Z. (1950). The comparative method in studying innate behaviour patterns. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 4, 221-268.

## M

- Manabe, H. y Shinomiya, A. (2001). Two spawning seasons and mating system of the bastard halibut, *Tarphops oligolepis*. *Ichthyological Research* 48, 421-424.

- Mañanós, E., N.J., D., Mylonas, C., Cabrita, E., Robles, V. y Harraez, P., eds. (2009). Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. Baca Raton, USA: Press Taylor and Francis Group.
- Marchesan, M., Spoto, M., Verginella, L. & Ferrero, E. A. (2005). Behavioural Effects of Artificial Light on Fish Species of Commercial Interest. *fisheries research* 73, 171-185.
- Marín-Galvín, R. (2003). *Fisicoquímica y microbiología de los medios acuáticos*. Madrid.
- Matsumura, K., Tetrodotxin as a pheromone, *Nature*. Vol. 378, no. 6557, pp. 563-564. 1995.
- Mechaly, A. S., Viñas, J. & Piferrer, F. (2012). Sex-Specific Changes in the Expression of Kisspeptin, Kisspeptin Receptor, Gonadotropins and Gonadotropin Receptors in the Senegalese Sole (*Solea Senegalensis*) During a Full Reproductive Cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 162, 364-371.
- Migaud, H., Cowan, M., Taylor, J. & Ferguson, H. W. (2007). The Effect of Spectral Composition and Light Intensity on Melatonin, Stress and Retinal Damage in Post-Smolt Atlantic Salmon, *Salmo Salar*. *Aquaculture* 270, 390-404.
- Montgomery, J. y Pankhurst, N. W. (1997). Sensory Physiology. In *Deep-Sea Fishes* (Press, A., ed.), p. 378. San Diego, California: Academic Press.
- Moore, A. & Waring, C. P. (1996). Electrophysiological and endocrinological evidenc that F-series prostaglandins function as priming pheromones in mature male Atlantic salmon parr. *Journal of Experimental Biology* 199,2307-2316.
- Moran, D., Smith, C. K., Gara, B. & Poortenaar, C. W. (2007). Reproductive Behaviour and Early Development in Yellowtail Kingfish (*Seriola Lalandi Valenciennes 1833*). *Aquaculture* 262, 95-104.
- Morrow, J. E., Jr.; (1948). Schooling behavior in fishes. *The Quarterly review of biology* 23, 27-38.
- Moyer, J. T., Yogo, Y., Zaiser, M. J. y Tsukahara; (1985). Spawning behavior and social organization of the flounder *Crossorhombus kobensis* (Bothidae) at Miyake-jima, Japan. *Jap. J. Ichthyol* 32, 363-367.
- Mugnier, C., Guennoc, M., Lebegue, E., Fostier, A. & Breton, B. (2000). Induction and Synchronisation of Spawning in Cultivated Turbot (*Scophthalmus Maximus L.*) Broodstock by Implantation of a Sustained-Release GnRH-a Pellet. *Aquaculture* 181, 241-255.
- Muñoz-Cueto y González Martínez, (2005) *Sistemas GnRH en Peces Perciformes*. Universidad de Cádiz. Capítulo 1, 33
- Murphy, C.A., Stacey, N., and Corkum, L.D. 2001. Putative steroidal pheromones in the round goby, *Neogobius melanostomus*: olfactory and behavioral responses. *J. Chem.Ecol.*27: 443-47
- Mylonas, C. C. y Zohar, Y. (2008). Controlling reproduction in aquaculture. In: Burnell, G., Allan, G. (Eds.). *New Technologies in Aquaculture: Improving Production Efficiency*,

Quality and Environmental Management Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK, 001-038.

Mylonas, C. C., Fostier, A. y Zanuy, S. (2010). Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology* 165, 516-534.

Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 10, 463-491.

## O

Oliveira, C., Duncan, N. J., Pousao-Ferreira, P., Mananos, E. y Sanchez-Vazquez, F. J. (2010). Influence of the lunar cycle on plasma melatonin, vitellogenin and sex steroids rhythms in Senegal sole, *Solea senegalensis*. *Aquaculture* 306, 343-347.

Oliveira, C., García, E. M., Lopez-Olmeda, J. F. y Sánchez-Vázquez, F. J. (2009). Daily and circadian melatonin release in vitro by the pineal organ of two nocturnal teleost species: Senegal sole (*Solea senegalensis*) and tench (*Tinca tinca*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 153, 6.

Oliveira, C., Lopez-Olmeda, J. F., Delgado, M. J., Alonso-Gómez, A. L. & Sánchez-Vázquez, F. J. (2008a). Melatonin Binding Sites in Senegal Sole: Day/Night Changes in Density and Location in Different Regions of the Brain. *Chronobiology International* 25, 645-652.

Oliveira, C., Ortega, A., Lopez-Olmeda, J. F., Vera, L. M. & Sanchez-Vazquez, F. J. (2007). Influence of Constant Light and Darkness, Light Intensity, and Light Spectrum on Plasma Melatonin Rhythms in Senegal Sole. *Chronobiology International* 24, 615-627.

Oliveira, C., Vera, L. M., Lopez-Olmeda, J. F., Guzman, J. M., Mañanós, E., Ramos, J. & Sánchez-Vázquez, F. J. (2008b). Monthly Day/Night Changes and Seasonal Daily Rhythms of Sexual Steroids in Senegal Sole (*Solea Senegalensis*) under Natural Fluctuating or Controlled Environmental Conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology* 152 Part. A, 8.

## P

Padrós, F., C. Zarza, A. Estévez, S. Crespo y Furones, M. D. (2005). Patología como factor limitante para el desarrollo del cultivo del lenguado. IX Congreso Nacional de Acuicultura (Cádiz, mayo 2003). La acuicultura como actividad económica en las zonas costeras: Libro

Pankhurst, N. W. y Fitzgibbon, Q. P. (2005). Characteristics of spawning behaviour in cultured greenback flounder *Rhombosolea tapirina*. *Aquaculture* 253, 279-289.

Parr, A. E. (1931). Sex dimorphism and schooling behavior among fishes. *American Naturalist* 65, 173-180.

Peláez del Hierro, F. y Veà Baró, J., eds. (1997). *ETOLOGÍA*, Bases biológicas de la conducta animal y humana. Madrid.

- Pfaff, D. (2005). Hormone-driven mechanisms in the central nervous system facilitate the analysis of mammalian behaviours. *Journal of Endocrinology* 184, 447-453.
- Pfeiffer, W., Riegelbauer, G., Meier, G. & Scheibler, B. (1985). *Effect of hypoxanthine-3-N-oxide and hypoxanthine-1-N-oxide on central nervous excitation of the black tetra, *Gymnocorymbus ternetzi* (Characidae, Ostariophysi, Pisces) indicated by dorsal light response. *Journal of Chemical Ecology* 11, 507-523.*
- Pitcher, T. J., & Parrish, J. K. (1993). Functions of Shoaling Behaviour in Teleosts.
- Polkinghorne, C. A.; Olson, J. M.; Gallaher, D. G.; Sorensen, P. W. 2001: Larval sea lamprey release two unique bile acids to the water at a rate sufficient to produce detectable riverine pheromonal plumes. *Fish Physiology and Biochemistry* 24: 15-30.
- Porter, M. J. R., Duncan, N. J., Mitchell, D. & Bromage, N. R. (1999). The Use of Cage Lighting to Reduce Plasma Melatonin in Atlantic Salmon *Salmo Salar* / and Its Effects on the Inhibition of Grilising. *Aquaculture* 176, 237-244.
- Porter, M. J. R., Duncan, N., Handeland, S. O., Stefansson, S. O. & Bromage, N. R. (2001). Temperature, Light Intensity and Plasma Melatonin Levels in Juvenile Atlantic Salmon. *Journal of Fish Biology* 58, 431-438.

## Q

- Queirolo, D., Montenegro, I., Gaete, E. & Plaza, G. (2010). Direct Observation of Chilean Hake (*Merluccius Gayi Gayi*) Behaviour in Response to Trawling in a South Central Chilean Fishery. *fisheries research* 102, 327-329.

## R

- Raney, E. C. (1947). Subspecies and breeding behavior of the cyprinid fish *notropis-procne* (Cope). *Copeia*, 103-109.
- Rasines, I., Gómez, M., Martín, I., Rodríguez, C., Mañanós, E. & Chereguini, O. (2011). Artificial Fertilization of Senegalese Sole (*Solea Senegalensis*): Hormone Therapy Administration Methods, Timing of Ovulation and Viability of Eggs Retained in the Ovarian Cavity. *Aquaculture* 326-329, 129-135.
- Reiter, R. (1993). The Melatonin Rhythm: Both a Clock and a Calendar. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 49, 654-664.
- Resink, J.W., Schoonen, W.G.E.J., Albers, P.C.H., Filé, D.M., Notenboom, C.D., Van Den Hurk, R., Van Oordt, P.G.W.J, The chemical nature of sex attracting pheromones from the seminal vesicle of the African catfish, *Clarias gariepinus*, *Aquaculture*, Volume 83, Issues 1-2, 1 December 1989, Pages 137-151
- Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J. L., Cahu, C. y Dinis, M. T. (1999). Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture* 179, 465-473.

Robinson, T.C. , Sorensen P.W., Bayer J.M., Seelye J.G.. Olfactory Sensitivity of Pacific Lampreys to Lamprey Bile Acids. Transactions of the American Fisheries Society Vol. 138, Iss. 1, 2009

Robison, R., Fernald, R.D., Stacey, N.E., 1998. The olfactory system of a cichlid fish responds to steroidal compounds. *Journal of Fish Biology*, 53(1), pp.226-229.

## S

Sánchez Hernández, S. (2008). Efecto Del Color De La Luz Artificial En *Liza Aurata* (Pisces: Mugilidae). *Anales Universitarios de Etología* 2, 87-91.

Sánchez Vázquez, F. J. (2010). Regulation of Appetite. *Aquaculture and Behaviour*, 1-12.

Scott, A. P. & Ellis, T. (2007). Measurement of Fish Steroids in Water—a Review. *General and Comparative Endocrinology* 153, 392-400.

Scott, A. P. & Sorensen, P. W. (1994). Time Course of Release of Pheromonally Active Gonadal Steroids and Their Conjugates by Ovulatory Goldfish. *General and Comparative Endocrinology* 96, 309-323.

Scott, J. W. & Scott-Johnson, P. E. (2002). The Electroolfactogram: A Review of Its History and Uses. *Microscopy Research and Technique* 58, 152-160.

Selset and Døving, 1980 R. Selset, K.B. Døving Behavior of mature anadromous charr (*Salmo alpinus* (L.)) towards odorants produced by smolts of their own population *Acta Physiol. Scand.*, 108 (1980), pp. 113-122

Siefkes, M. J. & Li, W. (2004). Electrophysiological Evidence for Detection and Discrimination of Pheromonal Bile Acids by the Olfactory Epithelium of Female Sea Lampreys (*Petromyzon marinus*). *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 190, 193-199.

Siefkes, M.J., Zielinski, B., Scott, A.P. 2003b. Male sea lampreys, *Petromyzon marinus* L., excrete a sex pheromone from gill epithelia. *Biol. Reprod.* 69: 125-132

Sorensen, P. W. (1992). Hormonally Derived Sex Pheromones in Goldfish: A Model for Understanding the Evolution of Sex Pheromone Systems in Fish. *The Biological Bulletin* 183, 173-177.

Sorensen, P. W. & Stacey, N. E. (2004). Brief Review of Fish Pheromones and Discussion of Their Possible Uses in the Control of Non-Indigenous Teleost Fishes. In *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, pp. 399-417: Taylor & Francis.

Sorensen, P. W. & Winn, H. E. (1984). The Induction of Maturation and Ovulation in American Eels, *Anguilla Rostrata* (Lesueur), and the Relevance of Chemical and Visual Cues to Male Spawning Behaviour. *Journal of Fish Biology* 25, 261-268.

Sorensen, P. W. y Goetz, F. W. (1993). Pheromonal and reproductive function of prostaglandins and their metabolites in teleost fish. Amsterdam, PAYS-BAS: Elsevier.

- Sorensen, P. W. y Stacey, N. E. (1999). Evolution and specialization of fish hormonal pheromones. In *Advances in chemical signals in vertebrates*. (Johnston, R. E., Muller-Schwarze, D. & Sorensen, P. W., eds.), pp. 15-47: Kluwer Academic & Plenum Publishers.
- Sorensen, P. W., and CAPRIO, J. 1998. Chemoreception in fish, pp. 375 - 406, in R. E. Evans (ed.). *The Physiology of Fishes*. 2nd edn. CRC, Florida.
- Sorensen, P. W., Chamberlain, K.J., Stacey, N.E., Hara, T.J. (1987). Differing roles of Prostaglandin F2a and its metabolites in goldfish reproductive behavior. In *Reproductive Physiology of Fish* (Idler, D. R., Crim, L.W., Walsh, J.M., ed.), p. 164. Newfoundland, (Canadá).
- Sorensen, P. W., Christensen, T. A. & Stacey, N. E. (1998). Discrimination of Pheromonal Cues in Fish: Emerging Parallels with Insects. *Current Opinion in Neurobiology* **8**, 458-467.
- Sorensen, P. W., Hara, T.J., Stacey, N.E., Goetz, F.W. (1988). F Prostaglandins Function as Potent Olfactory Stimulants That Comprise the Postovulatory Female Sex Pheromone in Goldfish. *Biology of Reproduction* **39**, 1039-1050.
- Sorensen, P. W., Pinillos, M. & Scott, A. P. (2005). Sexually Mature Male Goldfish Release Large Quantities of Androstenedione into the Water Where It Functions as a Pheromone. *General and Comparative Endocrinology* **140**, 164-175.
- Sorensen, Peter W., Hara, Toshiaki J., Stacey, Norman E., Dulka, Joseph G, 1990. *Extreme olfactory specificity of male goldfish to the preovulatory steroidal pheromone 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*. **166**,3.373-383
- Stacey NE, Sorensen PW, Dulka JG, Van Der Kraak GJ, Hara Ti, 1987. Teleost sex pheromones: recent studies on identity and function. In: Idler DR, Crim LW, Walsh JM (eds.), *Proceedings of the Third International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. St. Johns, Newfoundland: Memorial University Press, pp. 150-54
- Stacey, N. (2003). Hormones, Pheromones and Reproductive Behavior. *Fish Physiology and Biochemistry* **28**, 229-235.
- Stacey, N. E. & Cardwell, J. R. (1995). Hormones as Sex Pheromones in Fish: Widespread Distribution among Freshwater Species. In *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, University of Texas at Austin, Austin, Texas, 2-8 July, 1995* (F. W. G. & Thomas, P., eds.), pp. 244-248. Austin.
- Stacey, N. y Sorensen, P. (2006). Reproductive pheromones. *Fish Physiology* **24**, 359-412.
- Stacey, N., Sorensen, P., Donald, W. P., Arthur, P. A., Susan, E. F., Anne, M. E. y Robert, T. R. (2002). Hormonal Pheromones in Fish. In *Hormones, Brain and Behavior*, pp. 375-434. San Diego: Academic Press.
- Steffen S. Madsen, Skovbølling, S., Nielsen, C. & Korsgaard, B. (2004). 17-Estradiol and 4-Nonylphenol Delay Smolt Development and Downstream Migration in Atlantic Salmon, *Salmo Salar*. *aquatic toxicology* **68**, 11.

- Stoner, A. W., Bejda, A. J., Manderson, J. P., Phelan, B. A., Stehlik, L. L. y Pessutti, J. P. (1999). Behavior of winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, during the reproductive season: laboratory and field observations on spawning, feeding, and locomotion. *Fishery Bulletin* 97, 999-1016.
- Sveinsson, T, Hara, T., Mature males of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* release F-type prostaglandins to attract conspecific mature females and stimulate their spawning behaviour. *Environmental Biology of Fishes*. 42, 3. 253-266. Springer Netherlands
- Swanson, P., Bernard, M., Nozaki, M., Suzuki, K., Kawauchi, H., y Dickhoff, W.W., 1989. Gonadotropins I and II in juvenile coho salmon. *Fish Physiol. Biochem.*, 7: 169-176

## T

- Thrush, M. A., Duncan, N. J. & Bromage, N. R. (1994). The Use of Photoperiod in the Production of out-of-Season Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) Smolts. *Aquaculture* 121, 29-44.
- Tinbergen, N. (1963). On aims and methods of Ethology (Reprinted from *Zeitschrift fur Tierpsychologie*, vol 20, pg 410, 1963). *Animal Biology* 55, 297-321.
- Tinbergen, N. y Vaniersel, J. J. A. (1948). Displacement reactions in the 3-spined stickleback. *Behaviour* 1, 56-63.

## U

- Uz, T., M; A., R; A. & H; M. (2003). The Pineal Gland Is Critical for Circadian Period1 Expression in the Striatum and for Circadian Cocaine Sensitization in Mice. *Neuropsychopharmacology* 28 (12), 2117-2123.

## V

- Valdebenito, I., Paiva, L. y Berland, M. (2011). Atresia folicular en peces teleósteos: una revisión. Follicular atresia in teleost fish: a review. *Arch Med vet.* 43, 11-25.
- Van den Hurk R, Lambert JGD, 1983. Ovarian steroid glucuronides function as sex pheromones for male zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Can J Zoo!* 61:2381-87
- Van den Hurk R, Schoonen WGEJ, van Zoelen GA, Lambert JGD, 1987. Biosynthesis of steroid glucuronides in the testis of the zebrafish *Brachydanio rerio*, and their pheromonal function as ovulation inducers. *Gen Comp Endocrinol* 68:179-88)
- Vázquez, R., González, S., Rodríguez, A. y Mourente, G. (1994). Biochemical composition and fatty acid content of fertilized eggs, yolk sac stage larvae and first-feeding larvae of the Senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Aquaculture* 119, 273-286.
- Vélez, Z., Hubbard, P. C., Barata, E. N. y Canario, A. V. M. (2005). Evidence for functional asymmetry in the olfactory system of the Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Physiological and Biochemical Zoology* 78, 756-765.

- Vélez, Z., Hubbard, P., Welham, K., Hardege, J., Barata, E. & Canário, A. (2009). Identification, Release and Olfactory Detection of Bile Salts in the Intestinal Fluid of the Senegalese Sole (&Lt;I&Gt;Solea Senegalensis&Lt;/I&Gt;). *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 195, 691-698.
- Vera, L. M., Lopez-Olmeda, J. F., Bayarri, M. J., Madrid, J. A. & Sanchez-Vazquez, F. J. (2005). Influence of Light Intensity on Plasma Melatonin and Locomotor Activity Rhythms in Tench. *Chronobiology International* 22, 67-78.
- Vera, L. M., Madrid, J. A. & Sanchez-Vazquez, F. J. (2006). Locomotor, Feeding and Melatonin Daily Rhythms in Sharpnose Seabream (*Diplodus puntazzo*). *Physiology & Behavior* 88, 167-172.
- Volpato, G. L. & Barreto, R. E. (2001). Environmental Blue Light Prevents Stress in the Fish Nile Tilapia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34, 1041-1045.

## W

- Watanabe, W. O., Ellis, E. P., Ellis, S. C. & Feeley, M. W. (1998). Progress in Controlled Maturation and Spawning of Summer Flounder *Paralichthys dentatus* Broodstock. pp. 393-404: Blackwell Publishing Ltd.
- Weinberg, K. L. & Munro, P. T. (1999). The Effect of Artificial Light on Escapement beneath a Survey Trawl. *ICES Journal of Marine Science* 56, 266-274.
- Weisel, G. F. (1947). Breeding behavior and early development of the mudsucker, a gobiid fish of California. *Copeia*, 77-85.
- Wozniak, B. & Dera, J., eds. (2007). *Light Absorption in Seawater*. Springer.

## Z

- Zanuy, S. y Carrillo, M. (1987). La reproducción de los peces teleósteos y su aplicación en acuicultura. *Reproducción en acuicultura*. CAICYT. Madrid, J. Labarta U (eds). 1-131.
- Zhang, C., Brown, S. y Hara, T. (2001). Biochemical and physiological evidence that bile acids produced and released by lake char (*Salvelinus namaycus*) function as chemical signals. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 171, 161-171.
- Zohar, Y. & Mylonas, C. C. (2001). Endocrine Manipulations of Spawning in Cultured Fish: From Hormones to Genes. *Aquaculture* 197, 99-136.
- Zohar, Y. I. O. a. L. R., Eilat (Israel). National Center for Mariculture) (1988). Gonadotropin Releasing Hormone in Spawning Induction in Teleosts: Basic and Applied Considerations. *Reproduction in fish. Basic and applied aspects in endocrinology and genetics*, Tel-Aviv (Israel), 10-12 Nov 1986. *Colloques de l'INRA*. INRA, Paris (France) 44.

Zohar, Y. y Mylonas, C. C. (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197, 99-136.



## **Glosario de términos y abreviaturas**

---

## Glosario de términos

- **Ácidos biliares:** Son compuestos de 24 átomos de carbono dihidroxilados o trihidroxilados, que derivan del colesterol. Por lo tanto son esteroides, una clase de lípidos insaponificables. Además, estos ácidos, son derivados estructurales del ácido cólico, que se caracteriza por tener en el C17 una cadena alifática ramificada de 5 átomos de carbono.
- **Ácidos húmicos:** Son unos de los principales componentes de las sustancias húmicas, las cuales son los constituyentes principales del humus, materia orgánica del suelo. Contribuyen a la calidad físico-químicas del mismo y también son precursores de combustibles fósiles.
- **Analito:** En química analítica un **analito** es el componente (elemento, compuesto o ion) de interés analítico de una muestra. Son especies químicas cuya presencia o concentración se desea conocer. El analito es una especie química que puede ser identificado y cuantificado, es decir, determinar su cantidad y concentración en un proceso de medición química, constituye un tipo particular de mensurando en la metrología química.
- **Atresia:** reducción del peso y volumen de un órgano o tejido por defecto de nutrición u otras causas.
- **Bentónico:** Organismos que habitan el fondo de los ecosistemas acuáticos.
- **Bulbo olfatorio:** El bulbo olfatorio o lóbulo olfativo es una región del cerebro de vertebrados en la cual se interpretan las aferencias sensoriales de las terminaciones nerviosas de los receptores estimulados por odorivectores (olores).
- **Catecolaminas:** También llamadas aminohormonas son neurotransmisores que se vierten al torrente sanguíneo (en lugar de las hendiduras sinápticas, como corresponde normalmente a los

neurotransmisores). Son un grupo de sustancias que incluyen la adrenalina, la noradrenalina y la dopamina, las cuales son sintetizadas a partir del aminoácido tirosina. Contienen un grupo catecol y un grupo amino.

- **Cerebelo:** (del latín "cerebro pequeño"; PNA: cerebellum) es una región del encéfalo cuya función principal es la de integrar las vías sensitivas y las vías motoras. Existe una gran cantidad de haces nerviosos que conectan el cerebelo con otras estructuras encefálicas y con la médula espinal. El cerebelo integra toda la información recibida para precisar y controlar las órdenes que la corteza cerebral manda al aparato locomotor a través de las vías motoras.
- **Ciclo circadiano:** En biología, los ritmos circadianos (del latín circa, que significa 'alrededor de' y dies, que significa 'día') o ritmos biológicos son oscilaciones de las variables biológicas en intervalos regulares de tiempo. Patrón estacional de cambio en el número de horas de luz al día, se considera el más importante en la señalización y sincronización de la reproducción en la mayoría de peces teleósteos, los ritmos biológicos se han clasificado de acuerdo a su frecuencia y a su periodo. Los ritmos circadianos han sido los más estudiados y su valor de periodo les permite sincronizar a los ritmos ambientales que posean un valor de periodo entre 20 y 28 horas, como son los ciclos de luz y de temperatura. Los ritmos circadianos son endógenos y establecen una relación de fase estable con estos ciclos externos alargando o acortando su valor de periodo e igualándolo al del ciclo ambiental.
  - Poseen las siguientes características: Son endógenos, y persisten sin la presencia de claves temporales. En condiciones constantes presentan una oscilación espontánea con un periodo cercano a las 24 horas (de ahí el nombre circadianos). El ritmo se desorganiza bajo ciertas condiciones ambientales como luz brillante. En oscilación libre o espontánea, generalmente el período para especies diurnas es mayor de 24 horas y para especies nocturnas el período es menor a las 24

horas (Ley de Aschoff), aunque tiene más excepciones que ejemplos que cumplen la regla. Al cambio cíclico ambiental que es capaz de sincronizar un ritmo endógeno se le denomina sincronizador o Zeitgeber (el término equivalente en alemán). Los ritmos circadianos son regulados por relojes circadianos, estructuras cuya complejidad varía según el organismo al que corresponda. Son también denominados nictimerales

- **Ciclo circanual:** En la biología, los ritmos circanales (del latín circa, que significa 'alrededor de' y anual, que significa 'año') o ritmos biológicos son oscilaciones de las variables biológicas en intervalos prolongados y regulares de tiempo. Conllevan la necesidad de muchos cambios ambientales. Y en algunos casos, el cierre del ciclo anterior para poder reiniciarse, como la reabsorción gonadal en algunos Teleósteos, previo al nuevo desarrollo gonadal
- **Cortisol:** Hormona esteroidea, o glucocorticoide, producida por la glándula suprarrenal. Se libera como respuesta al estrés y a un nivel bajo de glucocorticoides en la sangre.
- **Demersal:** Que viven cerca del fondo del mar.
- **Dextrógiros:** Se dice que un giro es dextrógiro cuando gira en el mismo sentido que las agujas del reloj en contraposición al sentido levógiro. El concepto también se conoce como dextrorrotatorio.
- **Efectores:** Son células para ejecutar respuestas. Todas las células de un animal tienen que responder de forma coordinada. Existen células especializadas (efectoras) en elaborar respuestas, la secreción de sustancias y el movimiento coordinado.
- **Electroolfatograma:** Representación gráfica de los potenciales de acción generados por las neuronas sensitivas del olfato, generadas al detectar compuestos específicos.
- **Eoceno:** Es una división de la escala temporal geológica, es una época geológica de la Tierra, la segunda del período Paleógeno en la Era Cenozoica. Comprende el tiempo entre el final del Paleoceno (hace  $55,8 \pm 0,2$  millones de años) y el principio del Oligoceno (hace  $33,9 \pm 0,1$  millones de años)

- **Eppendorf:** los tubos de microcentrífuga empleados en laboratorio, sean o no de esta marca.
- **Esteroides:** son derivados del núcleo del ciclopentano-perhidrofenantreno o esterano; posee en total 17 átomos de carbono. En los esteroides esta estructura básica se modifica por adición de diversos grupos funcionales, como carbonilos e hidroxilos (hidrófilos) o cadenas hidrocarbonadas (hidrófobas).
- **Etograma:** Catálogo de descripciones de patrones de comportamientos discretos, típicos de las especie-objeto, que forman el repertorio comportamental básico de la especie
- **Etología:** Del griego «*ηθος*» *ethos*, costumbre, y «*λόγος*» *logos*, razonamiento, estudio, ciencia. Es la rama de la biología y de la psicología experimental que estudia el comportamiento de los animales en libertad o en condiciones de laboratorio, aunque son más conocidos por los estudios de campo.
- **Fotoperiodo:** Regulación utilizando como parámetros la alternancia de los días y las noches del año y su duración según las estaciones y el ciclo solar.
- **Freza:** En biología, es el desove, es el acto de verter los huevos por las hembras de peces y anfibios en su ambiente. Es también la nube de huevos que resulta de lo anterior.
- **Hipófisis:** O glándula pituitaria es una glándula endocrina que segrega hormonas encargadas de regular la homeostasis incluyendo las hormonas tróficas que regulan la función de otras glándulas del sistema endocrino, dependiendo en parte del hipotálamo el cual a su vez regula la secreción de algunas hormonas.
- **Hipotálamo:** Es una glándula endocrina que forma parte del diencéfalo, y se sitúa por debajo del tálamo. Libera hormonas que actúan como inhibidoras o estimulantes en la secreción de otras hormonas. En conjunto con la hipófisis, realiza la homeostasis del organismo, por medio de un sistema de realimentación negativa.
- **IEM:** Índice del estado externo de madurez de hembras (Anguis y Cañavate, 2005)

- **Levógiro:** Se dice que un giro es levógiro cuando gira en el sentido contrario a las agujas del reloj, en contraposición al sentido dextrógiro. El concepto también se conoce como levorotatorio.
- **Linfocistis:** Infección vírica. Lymphocystivirus (fam. Iridoviridae).
- **Médula oblonga:** bulbo raquídeo: Sus funciones son la transmisión de impulsos de la médula espinal al encéfalo. También se localizan las funciones cardiacas, respiratorias, gastrointestinales y vasoconstrictoras.
- **Melatonina:** N-acetil-5-metoxitriptamina es una hormona encontrada en animales superiores y en algunas algas, en concentraciones que varían de acuerdo al ciclo diurno/nocturno
- **Nocturnidad:** es un mecanismo adaptativo a diversas situaciones: ocupar un nuevo nicho ecológico (cuya separación es temporal en vez de espacial), evitar la predación o bien aumentar el éxito reproductivo llevando a cabo las puestas en condiciones adversas para los depredadores.
- **Pasteurelosis:** infección provocada por bacterias (Gram-) del gen. *Pasteurella*.
- **Pelágico:** Organismos que habitan la parte del océano que está sobre la zona pelágica, o sea, la columna de agua del océano que no está sobre la plataforma continental
- **Rabdovirus:** Infección vírica, (fam. Rabdoviridae), causa en peces la septicemia hemorrágica vírica.
- **Serotonina:** 5-hidroxitriptamina (5-HT), es una monoamina neurotransmisora sintetizada en las neuronas serotoninérgicas en el Sistema Nervioso Central (SNC) y las células enterocromafines (células de Kulchitsky) en el tracto gastrointestinal de los animales y del ser humano. La serotonina también se encuentra en varias setas y plantas, incluyendo frutas y vegetales.
- **Téctum óptico:** Del latín, techo óptico o simplemente tectum es una estructura pareada que forma el componente más importante del mesencéfalo de los vertebrados.

- **Tenacibaculosis:** Infección en peces marítimos, provocada por *Tenacibaculum maritimum*.
- **Vibriosis:** Infección provocada por un grupo de proteobacterias (Gram-), denominadas Vibrio.
- **Vitelogenina:** La vitelogenina es una proteína precursora de la formación del huevo.

## Abreviaturas

- EOG: electroolfatograma.
- Fam.: Familia.
- FOM: siglas en ingles. Final oocyte maturation. Maduración final de los oocitos
- G1: 1<sup>a</sup> generación totalmente criada en cautividad. Producto de la puesta de salvajes mantenidos en cautividad.
- G2: 2<sup>a</sup> generación totalmente criada en cautividad (descendiente de la G1)
- Gen.: Genero.
- Sp.: Especie.
- Ssp.: Especies.
- Subsp.: Subespecie.

## ESPECIES CITADAS

- (*Clarias gariepinus*, Burchell, 1822) Mu fish
- (*Paralichthys dentatus*) (L., 1766) Summer flounder
- (*Tarphops oligolepis*) (Bleeker, 1858)
- (*Zeugopterus punctatus*), Topknot
- (*Astatotilapia burtoni*, Günther, 1894)
- *Anguila* (*Anguilla anguilla*), European eel
- Espinado (*Gasterosteus aculeatus aculeatus*) (L., 1758) Three-spined stickleback
- Kobe (*Crossorhombus kobensis*) Kobe flounder
- Lamprea (*Petromyzon marinus*) (L. 1758), Sea lamprey
- Lenguado común (*Solea solea*) (Linnaeus, 1758) Common sole
- Lenguado de charco (*Bothus ocellatus*) (Agassiz, 1831) Eyed flounder
- Lenguado de florida (*Paralichthys lethostigma*) (Jordan & Gilbert, 1884) Southern flounder.
- Lenguado ocelado (*Bothus lunatus*) (Linnaeus, 1758) Plate fish
- Lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) (Kaup, 1858) Senegalese sole
- Limanda (*Limanda ferruginea*) (Storer, 1839) Yellowtail flounder
- Pedas (*Bothus podas*) (Delaroche, 1809) Wide-eyed flounder
- Pez cebra (*Danio rerio*) (Hamilton, 1822) Zebra fish
- Pez rojo (*Carassius auratus auratus*) (L., 1758) Goldfish
- Rodaballo (*Scophthalmus máximus*) (L., 1758) Turbot.
- Salmón (*Salmo salar*) (L., 1758) Atlantic salmon.
- Solla europea (*Pleuronectes platessa*) (Linnaeus, 1758) European plaice
- Solla roja (*Pseudopleuronectes americanus*) (Walbaum, 1792) Winter flounder
- Trucha ártica (*Salvelinus alpinus alpinus*) (L., 1758) Arctic char



# Anexo 1

---

**The effect of night illumination, red and infrared light, on melatonin, locomotor activity and behaviour of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) broodstock.**

Ignacio Carazo<sup>1\*</sup>, Fernando Norambuena<sup>1</sup>, Catarina Oliveira<sup>2</sup>, Francisco Javier Sánchez-Vázquez<sup>2</sup>, Neil John Duncan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>IRTA Sant Carles de la Rápita, AP200, 43540 Sant Carles de la Rápita, Tarragona, Spain

<sup>2</sup>Department of Physiology, Faculty of Biology, University of Murcia, 30100 Murcia, Spain

**Abstract**

Plasma melatonin, locomotor activity and four types of behaviour were analysed in groups of 12 adult Senegalese sole (*Solea senegalensis*) reared in captivity and held under four night illumination treatments: total darkness (control), high 50 lux intensity red light (group RH), low 5 lux intensity red light (group RL) and infrared light (group IR). All groups experienced the same conditions during the day (lights on from 07:00 to 19:00) with white lighting of 125 lux. Plasma melatonin, at mid-dark was not significantly different between the control and groups RL and IR, while melatonin was significantly lower in group RH compared to the control. All treatments presented a daily rhythm in locomotor activity with high activity from 14:00 to 18:00 and low activity from 21:00 to 12:00. The sole exposed to the high intensity red light at night appeared to be disturbed as during the low nocturnal locomotor activity period group RH presented higher activity and significantly higher nocturnal behaviour related to escape or fear than was observed in the other groups. The groups control, RL and IR

exhibited similar levels of nocturnal locomotor activity and nocturnal behaviour related to escape or fear. The authors recommended low intensity red night illumination for the non-invasive study of nocturnal behaviour of Senegalese sole adults.

Keywords: *Solea senegalensis*, night illumination, melatonin, locomotor activity, behaviour.

\*Corresponding author: Ignacio Carazo. [ignacio.carazo@gmail.com](mailto:ignacio.carazo@gmail.com)

Short title: Effect of night illumination on *S. sole*.

## INTRODUCTION

The daily change from daylight to darkness has a fundamental control on both circadian and circannual rhythms in fish and other organisms. Clear and obvious correlations exist between the daily light-dark periods and the activity and behaviour of an organism (Goldman, 2001; Falcon *et al.*, 2007; Bayarri *et al.*, 2004). Whilst the annual photoperiod cycle has been demonstrated to control processes in fish such as growth (Boeuf & Le Bail, 1999; Duncan *et al.*, 2002), maturation (Porter *et al.*, 1999; Bromage *et al.*, 2001) and changes in physiology and migrations such as related to smoltification (Duston & Saunders, 1992; Duncan & Bromage, 1998). Circulating melatonin has been shown to change in response to the daily light-dark change (Porter *et al.*, 1999; Bromage *et al.*, 2001) and the quality of light, spectrum and intensity, affects the melatonin response which in turn indicates how the fish perceives the light (Porter *et al.*, 2001; Migaud *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2007; Vera *et al.*, 2010). These

characteristics are being used by the aquaculture industry to control the biology of fish (Thrush *et al.*, 1994, Porter *et al.*, 1999; Bromage *et al.*, 2001).

The Senegalese sole (*Solea senegalensis*) is no exception and the light-dark change or photoperiod has been shown to influence locomotor activity (Bayarri *et al.*, 2004), maturation (Garcia-Lopez *et al.*, 2006) and melatonin levels (Bayarri *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2007; 2010). Locomotor activity indicated nocturnal habits with low activity during the day and high activity at night, especially the first half of the night period (Bayarri *et al.*, 2004). Constant photoperiod was observed to disrupt gonadal maturation indicating that the naturally changing photoperiod is required for normal maturational development (Garcia-Lopez *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2011). Melatonin levels were characteristically high during the night and low during the day (Bayarri *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2007; 2010) and Senegalese sole were found to be sensitive to light as both a 1 hour pulse of white light during the dark period with an intensity of 5.3 mW cm<sup>-2</sup> (Oliveira *et al.*, 2007) and 0.3 lux of moon light (Oliveira *et al.*, 2010) significantly suppressed melatonin production.

It is clear that light and light cycles affect behaviour and biological rhythms or processes in Senegalese sole and fish in general. However, this also highlights that great care must be taken when light is used to study the behaviour of fish as the light can clearly change the behaviour that is under study. The quality of the light must also be considered as water is known to absorb the red to infrared part of the spectrum (Wozniak & Dera, 2007). Oliveira *et al.*, (2007) found that a 1 hour pulse of 5.3 mW cm<sup>-2</sup> red light during the night did not significantly suppress the melatonin levels and suggested that red light was safe to use for sampling fish in the dark. Similar observations have been made when red light illumination was used during the night for Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Migaud *et al.*, 2007) European seabass (*Dicentrarchus labrax*), and Atlantic cod (*Gadus morhua*) (Vera *et al.*, 2010). Studies that aimed to study

nocturnal behaviour have used various approaches that included discarding the possibility of studying nocturnal behaviour, and using types of illumination such as white, red and infrared light. Moran *et al.*, (2007) studying spawning behaviour in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) restricted recording to daylight hours considering that lighting may negatively affect spawning behaviour. Xiao *et al.*, (2005) observed the nocturnal behaviour of the Yangtze finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*) using normal artificial white lighting with an intensity of 10 lux at the surface of the water during the night period, which compared to tens to hundreds of lux during the day and the authors argued that during a three week acclimation period the porpoises habituated to this night lighting and, therefore, presented normal nocturnal behaviour during the study period. Various studies have used low intensity red lighting during the night period and assumed that the lighting did not affect the nocturnal behaviour of common sole (*Solea solea*) (Baynes *et al.*, 1994) or greenback flounder (*Rhombosolea tapirina*) (Pankhurst & Fitzgibbon 2006). Durieux *et al.*, (2009) studying nocturnal behaviour of juvenile common sole used infrared night lighting to which fish are not sensitive. However, to date a study has not been completed to determine or compare the type of night illumination that can be used to observe the normal behaviour of fish during the night. In addition Senegalese sole naturally inhabit areas that do not receive much light and have been demonstrated to be sensitive to low intensity illumination (Oliveira *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2010). The present study was completed to examine the effect of night illumination on the melatonin levels, locomotor activity and behaviour in Senegalese sole to determine a lighting system that could be used non-invasively to video record the nocturnal spawning behaviour of this important aquaculture species.

## MATERIALS AND METHODS

All the experimentation on fish that formed part of this study were in agreement with the Spanish and European regulations on animal welfare (Federation of Laboratory Animal Science Associations, FELASA) and approved by the Animal Ethics Committee of IRTA.

## HUSBANDRY

Forty eight adult Senegalese sole (*Solea senegalensis*) with a mean weight of  $689.9 \pm 113.2$ g were distributed randomly into four groups and each group was placed in an identical circular fiberglass tank, (diameter 1.7m, depth 1m, volume  $2\text{m}^3$ ) to give a biomass of  $8279 \pm 136$ g tank<sup>-1</sup>. The fish had been reared from egg in captivity under simulated natural temperature and photoperiod conditions and ages ranged from 4-6 years old. The tanks were supplied with recirculated water with a water exchange of 250 L hour<sup>-1</sup> and a temperature during the experiment of  $15 \pm 1$ °C, which was a natural temperature for the time of year March-April. The fish were fed between 15:00 - 16:00, six days a week, three days with a dry diet at 0.5% kg<sup>-1</sup> bodyweight (two days with Vitalis Repro 8mm and one day with Elite 7mm, Skretting España S.A., Burgos, Spain) and one day with each frozen food, mussels (*Mytilus chilensis*, Iberica de Congelados SA, Vigo, Spain), squid (*Loligo patagonica*, Congelados Sariago SL, Lugo, Spain) and polychaetes (*Nereis virens*, Topsy Baits, Zeeland, Netherlands), at 0.7% kg<sup>-1</sup> bodyweight.

## TANK ILLUMINATION

Each tank was covered with a light proof cover. During the experiment the day period was 12 hours from 07:00 to 19:00, which was a natural photoperiod for the time of year

March-April. The daytime illumination was provided with two white fluorescent 58w tubes installed inside the covers to give 125 lux at the surface of the water. The four tanks were given different night illumination to form four experimental night illumination treatments: Group C, a control tank that had no night illumination, total darkness. Group RL, low intensity red light night illumination was provided with one white fluorescent 58w tube covered with a red filter (supergel ROSCO IBERICA S.A. Madrid, Spain) through which only red light with wavelengths >600 nm passed, the light was on during the entire 24 hour period and the night intensity was adjusted to 5 lux at the surface of the water. Group RH, high intensity red light night illumination was provided as in group RL but the night intensity was adjusted to 50 lux (10 times group RL) at the surface of the water. Group IR, infrared illumination was provided with two LED infrared lights (TIR-8001 Outdoor Infrared Illuminator, Regular Electronics Co. Ltd. Taiwan) that provided light with a wavelength of 850nm and 1 lux was registered at the surface of the water during the night, the lights were on during the entire 24 hour period. Each group of fish was held for a two week period with each type of night illumination, the first week was considered as a period of acclimation and no experimental measurements were made, activity and behaviour were monitored during the second week and at the end of the two week period the fish were blood sampled for melatonin analysis and moved into a different night illumination treatment. Each group of fish was tested in each of the three types of night illumination and the control with no illumination during four replicas of the experiment.

## MELATONIN

On the final day of each experimental period of two weeks (one week of acclimation and one week of behavioural and activity observations) the fish were blood sampled at

mid-light (13:00) and mid-dark (01:00). Six randomly selected fish were anaesthetised (0.2 mL L<sup>-1</sup> phenoxyethanol) and blood sampled from the cordial vein at mid-dark and the remaining six fish were blood sampled at mid-light. For mid-dark sampling fish were caught and anaesthetised in the dark, the head of the animal was then covered with tin foil and the fish was blood sampled using low intensity red lighting (Oliveira *et al.*, 2007). Heparinised blood samples were centrifuged at 3000 g, at 4°C for 15 minutes and the plasma was frozen and stored at -80°C. Plasma melatonin was measured using a radioimmunoassay kit (Melatonin Direct RIA, Biosource, Nivelles, Belgium) and radioactivity was counted with a g counter (WALLAC 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Waltham Massachusetts, USA) as described by Oliveira *et al.*, (2007). The measurements had a lower limit of detection of 2 pg mL<sup>-1</sup>.

#### LOCOMOTOR ACTIVITY

Locomotor activity was measured in two ways; with infrared sensors and by the analysis of digital videos. The infrared sensors (SUNX-CX400 series, Compact photoelectric sensor, Panasonic Electric Works España S.A., Madrid, Spain) registered when a fish passed the sensor and broke the beam of infrared light (Vera *et al.*, 2006) the sensors had a range of detection in water of 35cm. Two sensors were placed in the same position in each tank, one 5cm and a second 25cm above the bottom of the tank. The activity was presented as the mean numbers of times a fish passed the sensor during an hour. Five days of sensor registered activity were included for each group of fish in each night illumination treatment to give a total of n=20 days of observations for each night illumination treatment. A digital camera (Square black and white CCD camera, model F60B/N80-50G, KT&C Co. Ltd., Korea Technology and Communications, Korea, supplied in waterproof housing by Praesentis S.L. Barcelona,

Spain) was placed above each tank so that the field of view covered the bottom of the tank. The camera was connected to a digital video recorder (model DVR-0804HB, supplied by Praesentis S.L.) and 24 hour recordings were made. To analysis the activity the same line was drawn across the video image from each tank and it was registered each time a fish passed the line. As with the sensors activity was presented as the mean numbers of times a fish passed the line during an hour during five days for each group of fish in each night illumination treatment to give a total of n=20 days of observations for each night illumination treatment.

## BEHAVIOUR

The videos were also analysed to observe particular behaviours. Four behaviours were chosen, tremor, swim apart, follow and rest head. Tremor was a behaviour that represented “fear or escape” and was when a fish gave tremors in a kind of wave that when sediment is present would enable the fish to bury itself. Two behaviours that represented “active interaction” were swim apart and follow. Swim apart was when on the bottom of the tank one fish swam away from another, for example one fish would swim towards another to make contact but the second fish swam away. Follow was when two or more fish were observed to swim one following another. Rest head, was a “resting social” behaviour and was when the head of one fish rested on another fish that accepted this behaviour. These behaviours were registered during four half hour time periods during each day 16:00-16:30, 18:00-18:30, 22:00-22:30 and 01:00-01:30. The data was presented as number of observed behaviours during a half hour period. The time periods were randomly selected, two from the first half of the night and two from the period of the day with higher activity and after technical staff had left the holding facility. Only daytime observations were made for the control group, which could not

be seen in the dark. Three days of videos were analyzed for each group of fish in each night illumination treatment to give a total of 12 days of observations for each night illumination treatment and n=24 observations.

## DATA ANALYSIS

All means are presented as  $\pm 1$  standard error mean. The dependant variables day melatonin level, night melatonin level, mean hourly locomotor activity during the day (07:00-19:00) and night (19:00-07:00) and number of each observed behaviour, rest head, swim away, follow and tremor during the day or night were compared amongst the independent variable night illumination treatment. Some melatonin and locomotor activity data were not normally distributed. Melatonin level was compared with both a one-way ANOVA and Kruskal-Wallis ranked ANOVA and the same significant differences were found with the two types of ANOVA, but P values were slightly different. Locomotor activity was compared with Kruskal-Wallis ranked ANOVA. Behaviour was compared with an ANOVA. Following an ANOVA when differences were detected the Holm-Sidak multiple comparison procedure was applied to identify differences between treatments. Following the Kruskal-Wallis ranked ANOVA the DUNNS Test multiple comparison procedure was applied to identify differences between treatments. For each night illumination treatment mid-light and mid-dark melatonin levels were compared with the Mann-Witney paired comparison. A value of  $P < 0.05$  was considered to indicate a significant difference. The Pearson correlation was used to examine the correlation between activity measured from the videos and with the infrared sensors. Sigma Stat 3.1 package (Systat Software Inc., Germany) was used for all statistical analyses.

## RESULTS

### VIDEO IMAGES

Video images used to observe the fish behaviour were graded, for clarity of image for the human observer, from best to worst as follows, group RA > group RL > group IR > group C. No observations could be made in group C during the dark period. Observations were easily made in treatment groups RH and RL and if necessary individual fish with morphological differences could be identified. Images were poor in group IR with infrared lighting and it was difficult or not possible to identify fish that were not directly below the infrared lighting.

### MELATONIN

There were no differences between mid-light levels of melatonin amongst the different night illumination treatments and means ranged from  $34 \pm 33$  pg mL<sup>-1</sup> in group IR to  $50 \pm 35$  pg mL<sup>-1</sup> in group RH. All night illumination treatments presented significantly ( $P < 0.05$ ) higher levels of melatonin at mid-dark (Fig 1.) compared to the mid-light. Night illumination significantly affected the level of melatonin at the mid-dark sampling point (Fig. 1). Plasma melatonin was significantly higher in groups C and IR ( $195 \pm 55$  and  $190 \pm 60$  pg mL<sup>-1</sup> respectively) and significantly lower in group RH ( $80 \pm 50$  pg mL<sup>-1</sup>). Group RL ( $140 \pm 45$  pg mL<sup>-1</sup>) was intermediate with no difference from the other groups.

### LOCOMOTOR ACTIVITY

The incidence of registration of movement with the sensor 25cm from the bottom of the tank was low and only the results from the sensor at 5cm from the tank bottom were presented. The two forms of analysis, with sensors and videos, gave similar patterns of locomotor activity and were significantly ( $P<0.05$ ) correlated with a correlation coefficient of  $r=0.94$ . However, the sensors detected a lower amount of activity and the readings from the videos were approximately 2.4 times higher than readings from the sensors. The fish in all night illumination treatments had the same pattern of locomotor activity (Fig. 2). Locomotor activity was low during the night and morning period from 21:00 to 12:00. Locomotor activity in all treatments gradually increased from 12:00 to 14:00 and the highest period of activity was from 14:00 to 18:00, before activity decreased gradually returning to a low level at 21:00. The mean hourly locomotor activity during the night (19:00-07:00) was significantly higher ( $P<0.05$ ) in group RH ( $6.7\pm 0.3$  activities hour<sup>-1</sup>) compared to groups IR ( $2.6\pm 0.4$ ) and C ( $3.6\pm 0.7$ ). Nocturnal activity in group RL ( $4.4\pm 0.4$ ) was not different to groups RH and C, but was significantly higher ( $P<0.05$ ) than activity in group IR. During the day (07:00-19:00), mean hourly locomotor activity was significantly higher in groups C ( $11.8\pm 2.0$ ) and RH ( $11.3\pm 1.0$ ) compared to group IR ( $5.9\pm 1.3$ ), whilst group RL ( $6.3\pm 0.9$ ) activity was not different from any other group.

## BEHAVIOUR

There were significant differences ( $P<0.05$ ) in all four behaviours observed in the different treatments of night illumination (Fig. 3). During the night group RH presented significantly ( $P<0.05$ ) more tremor behaviours compared to groups RL and IR that were not different. During the day tremor behaviour was significantly highest in group IR and group RH was significantly higher than group C, with group RL

between groups RH and C with no difference. Rest head did not present differences during the night and during the day the same profile was observed with significant differences ( $P < 0.05$ ). During the day, groups control and RL presented the highest levels, group C was significantly ( $P < 0.05$ ) the highest followed by group RL. Groups RH and IR were not different and presented significantly ( $P < 0.05$ ) less behaviours rest head. Swim away presented a similar pattern for the different treatments during the day and night, group RL presented significantly more swim away during the day and night followed by group RH and C (group C only in the day) and group IR exhibited the lowest behaviours swim away. The behaviour follow was only observed in groups RL and C (day only).

## DISCUSSION

From the point of view of observing the fish the two intensities of red light were clearly superior. The infrared lighting was barely sufficient partially because infrared light is absorbed by seawater and despite using two of the most powerful lights on the market the infrared light was not sufficient to penetrate the 1m water column to illuminate the bottom of the tank that had an area of 2.3m<sup>2</sup>. The difference in cost was also considerable and at the time of the study the cost of the two infrared LED lights was 25 times greater than the cost of the fluorescent light covered with a red filter. The aim of the study was to determine a lighting system that could be used non-invasively to observe the nocturnal spawning behaviour of Senegalese sole. Broodstock need space to spawn and Senegalese sole generally spawned successfully in tanks that had a bottom with an area of <14m<sup>2</sup> and 1m depth of water (personal observation; Anguis &

Cañavate, 2005). Durieux *et al.*, (2009) studied the nocturnal behaviour of juvenile common sole (*Solea solea*) and successfully used infrared light to illuminate the bottom of the tank through a 35cm water column. The space requirements of broodstock complicate the use of infrared lighting.

In the present study, the Senegalese sole in all night illumination treatments maintained a significant difference between levels of plasma melatonin at mid-light compared to mid-dark. While at mid-dark compared to the group C (control, complete darkness), plasma melatonin was significantly reduced in group RH (50 lux of red light) and not different in groups RL (5 lux red light) or IR (infrared). This indicates that the infrared and low intensity red light night illumination treatments were perceived physiologically as night or the dark period. It is unclear how the high intensity red light treatment was perceived and caution is required in the interpretation. Porter *et al.*, (1999) observed a similar situation and found that Atlantic salmon (*Salmo salar*) responded to night illumination as an extended or continuous day period and exhibited a reduced incidence of maturation of 6% compared to 63% in the control group held under a natural short day length. The salmon were held in sea cages that were exposed to full natural daylight and given artificial night lighting to simulate a long 24 hour day length. As was observed in the high intensity red light group in the present study, the salmon maintained a circadian melatonin rhythm similar to the control, but the mid-dark melatonin was significantly reduced compared to the control. Therefore, the melatonin profiles of the salmon (Porter *et al.*, 2001) and sole (present study) indicated that the night illumination was both not perceived (circadian rhythm) and perceived (suppressed melatonin levels), but in the case of the salmon it was clear that the organism perceived a long day photoperiod and responded with a reduced incidence of maturation. In the present study, the low intensity red lighting did not significantly affect melatonin levels at mid-dark or the

difference between mid-dark and mid-light, which indicates that the sole had not perceived the night illumination. This result agrees with similar results for other species (Migaud *et al.*, 2007; Vera *et al.*, 2010) and Senegalese sole (Oliveira *et al.*, 2007), which did not present any difference in plasma melatonin when a 1 hour pulse of 5.3 mW cm<sup>-2</sup> red light was applied during the night.

Locomotor activity was measured by two methods, counting movement in the videos and the registration of movement with infrared sensors. The two methods gave the same result and were closely correlated ( $r=0.94$ ), which can be considered as a validation of the sensors and an indication that the result was robust as two approaches gave the same result. The pattern of locomotor activity was not affected by the different night illumination treatments. The pattern had a daily rhythm, as has been observed in other species (Vera *et al.*, 2006) including Senegalese sole (Bayarri *et al.*, 2004). In the present study, a high period of activity was observed from 14:00 to 18:00, which coincided with the feeding period. The low activity period was from 21:00 to 12:00 and during the night period (19:00-07:00) activity was significantly higher in group RH compared to groups IR and C, whilst group RL was intermediate and not different from groups RH and C. The higher activity in group RH may indicate that the sole were disturbed by the high intensity red night illumination. However, the differences in amount of activity during the day did not appear to be related to the night illumination treatments or any obvious aspect of the experiment. Bayarri *et al.*, (2004) working with 300g Senegalese sole described the sole as a nocturnal species that exhibit 84.3% of daily activity during the dark period from 20:00 to 08:00, particularly the hours from 20:00 to 24:00. The present study, working with adult Senegalese sole that were 4-6 years old, observed most activity from 14:00-18:00. This represents a difference or shift in high activity period of 6 hours. It is possible that the adult sole have different circadian rhythms or that in the present study the fish had become

acclimatized or habituated to diurnal activity due to many years of day time husbandry practices such as feeding, which produced a phase shift in the circadian activity rhythm. The observation that the pattern of locomotor activity was not affected by the different night illumination treatments also suggests that the circadian activity rhythm continues despite of changes in night illumination, possibly with an endogenous control. European seabass held under constant illumination maintained a circadian rhythm in activity that changed from a 24 to 28 hour circadian pattern indicating that circadian activity patterns continue despite of the photoperiod due to exogenous or endogenous factors other than photoperiod (Bayarri *et al.*, 2004).

The different types of behaviour during the dark period could not be compared to the control. As was observed in locomotor activity, during the dark period the sole in group RH appeared to be disturbed by the high intensity red light exhibiting significantly more tremor behaviour, a behaviour related to escape or fear and perhaps being exposed by the red night illumination. However, other behaviours during the dark period or behaviours during the light period did not appear to be closely related to the night illumination treatments.

The present study has highlighted the complexity of studying behaviour and offers at times a confused picture, perhaps partially due the complexity of the factors that control behavioural responses and locomotor activity. However, some clear conclusions can be drawn. The higher nocturnal activity and significant effects on plasma melatonin and nocturnal behaviours associated with fear and escape (tremor) indicated that high intensity red light should not be used to study behaviour in Senegalese sole. While conversely, nocturnal activity similar to the control group, no significant affects on plasma melatonin, and significantly lower nocturnal behaviours associated with fear and escape (tremor) indicated that low intensity red light and infrared can be used to study behaviour in Senegalese sole. Thus, the authors

recommend the use of low intensity red lighting to video record broodstock Senegalese sole nocturnal behaviour in consideration of the present study and the cost and ease of use of a red light system.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully thank J. Canoura, N. Gras, X. Ingles, D. Carmona and R. Gras for technical support. This research was funded by two projects; 1) Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente -JACUMAR Sole Project coordinated nationally by P. Cañavate and in Catalonia by ND and 2) Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentarias (INIA)-FEDER project RTA2005-00113-00-00 coordinated by ND and the PhD grant awarded to IC by INIA-FEDER.

#### REFERENCES

- Anguis, V. & Cañavate, J. P. (2005). Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture* 243, 133-145.
- Bayarri, M. J., Muñoz-Cueto, J. A., López-Olmeda, J. F., Vera, L. M., Rol de Lama, M. A., Madrid, J. A. & Sánchez-Vázquez, F. J. (2004). Daily locomotor activity and melatonin rhythms in Senegal Sole (*Solea senegalensis*). *Physiology & Behavior* 81, 577-583.
- Baynes, S. M., Howell, B. R., Beard, T. W. & Hallam, J. D. (1994). A description of spawning behaviour of captive Dover sole, *Solea solea* (L.). *Netherlands Journal of Sea Research* 32(3/4), 271-275.

- Boeuf, G. & Le Bail, P.-Y. (1999). Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture* 177, 129-152.
- Bromage, N. R., Porter, M. & Randall, C. (2001). The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture* 197, 63-98.
- Duncan, N. J. & Bromage, N. (1998). The effect of different periods of constant short days on smoltification in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 168, 369-386.
- Duncan, N. J., Thrush, M. A., Elliott, J. A. K. & Bromage, N. R. (2002). Seawater growth and maturation of Atlantic salmon (*Salmo solar*) transferred to sea at different times during the year. *Aquaculture* 213, 293-309.
- Durieux, E. D. H., Le Duigou, M., Millot, S., Sasal, P. & Begout, M.-L. (2010). Sedentary behaviour establishment in O-group common sole *Solea solea*: a laboratory video-tracking study. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 90, 1257-1262.
- Duston, J. & Saunders, R. L. (1992). Effect of 6-month, 12-month, and 18-month photoperiod cycles on smolting and sexual-maturation in juvenile Atlantic salmon (*Salmo-salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49, 2273-2280.
- Falcón, J., Besseau, L., Sauzet, S., Boeuf, G., 2007. Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 18(2), 81-88
- García-López, A., Pascual, E., Sarasquete, C. & Martínez-Rodríguez, G. (2006). Disruption of gonadal maturation in cultured Senegalese sole *Solea senegalensis* Kaup by continuous light and/or constant temperature regimes. *Aquaculture* 261, 789-798.

- Goldman, B. D. (2001). Mammalian photoperiodic system: Formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *Journal of Biological Rhythms* 16, 283-301.
- Migaud, H., Cowan, M., Taylor, J. & Ferguson, H. W. (2007). The effect of spectral composition and light intensity on melatonin, stress and retinal damage in post-smolt Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 270, 390-404.
- Moran, D., Smith, C. K., Gara, B. & Poortenaar, C. W. (2007). Reproductive behaviour and early development in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi* Valenciennes 1833). *Aquaculture* 262, 95-104.
- Oliveira, C., Ortega, A., López-Olmeda, J. F., Vera, L. M. & Sánchez-Vázquez, F. J. (2007). Influence of constant light and darkness, light intensity, and light spectrum on plasma melatonin Rhythms in Senegal Sole. *Chronobiology International* 24, 615-627.
- Oliveira, C., N.J. Duncan, P. Pousão-Ferreira, E. Mañanós, F.J. Sánchez-Vázquez, (2010). Influence of the lunar cycle on plasma melatonin, vitellogenin and sex steroids rhythms in Senegal sole, *Solea senegalensis*. *Aquaculture* 306, 343-347
- Oliveira, C., Mañanos, E., Ramos, J., Sanchez-Vazquez, F.J., (2011). Impact of photoperiod manipulation on day/night changes in melatonin, sex steroids and vitellogenin plasma levels and spawning rhythms in Senegal sole, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 159, 291-295
- Pankhurst, N. W. & Fitzgibbon, Q. P. (2006). Characteristics of Spawning Behaviour in Cultured Greenback Flounder *Rhombosolea Tapirina*. *Aquaculture* 253, 279-289.
- Porter, M. J. R., Duncan, N., Handeland, S. O., Stefansson, S. O. & Bromage, N. R. (2001). Temperature, light intensity and plasma melatonin levels in juvenile Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* 58, 431-438.

- Porter, M. J. R., Duncan, N. J., Mitchell, D. & Bromage, N. R. (1999). The use of cage lighting to reduce plasma melatonin in Atlantic salmon *Salmo salar* / and its effects on the inhibition of grilising. *Aquaculture* 176, 237-244.
- Thrush, M. A., Duncan, N. J. & Bromage, N. R. (1994). The use of photoperiod in the production of out-of-season Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Aquaculture* 121, 29-44.
- Vera, L. M., J. A. Madrid & F. J. Sanchez-Vazquez (2006). Locomotor, feeding and melatonin daily rhythms in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Physiology & Behavior*, 88(1-2), 167-172
- Vera, L. M., Davie, A., Taylor, J. F. & Migaud, H. (2010). Differential light intensity and spectral sensitivities of Atlantic salmon, European sea bass and Atlantic cod pineal glands ex vivo. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 25-33.
- Wozniak, B. & Dera, J. (2007). Light absorption in seawater. *Atmospheric and oceanographic Sciences library*, 33, 447.
- Xiao, J., Wang, K. & Wang, D. (2005). Diurnal Changes of Behavior and Respiration of Yangtze Finless Porpoises (*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*) in Captivity. *Zoo Biology* 24, 531-541.

Figure 1. Plasma melatonin level ( $\text{pg mL}^{-1}$ ) at mid-dark (01:00) in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) adults (n=24) given four different nocturnal illumination treatments, total darkness (control), high 50 lux intensity red light (group RH), low 5 lux intensity red light (group RL) and infrared light (group IR). Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

Figure 2. Locomotor activity measured with two methods observations of fish passing a line per hour in videos (Fig 2a.) and registered movements per hour by infrared sensors (fig2b.) of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) adults given four different nocturnal illumination treatments, total darkness (control), high 50 lux intensity red light (group RH), low 5 lux intensity red light (group RL) and infrared light (group IR). Activity was observed during 5 days for each of four groups of 12 fish to give a total of n=20 observation per hour (4 groups x 5 days = 20).

Figure 3. Mean number of observations of four different behaviours, rest head, tremor, swim away and follow during a half hour period of observation of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) adults given four different nocturnal illumination treatments, total darkness (control), high 50 lux intensity red light (group RH), low 5 lux intensity red light (group RL) and infrared light (group IR). Behaviour was observed during three days and four half hour periods (two during the day and two during the night) for each of four groups of 12 fish to give a total of n=24 observation per half hour (4 groups x 3 days x 2 half hour periods = 24).

## Figures

Figure 1.

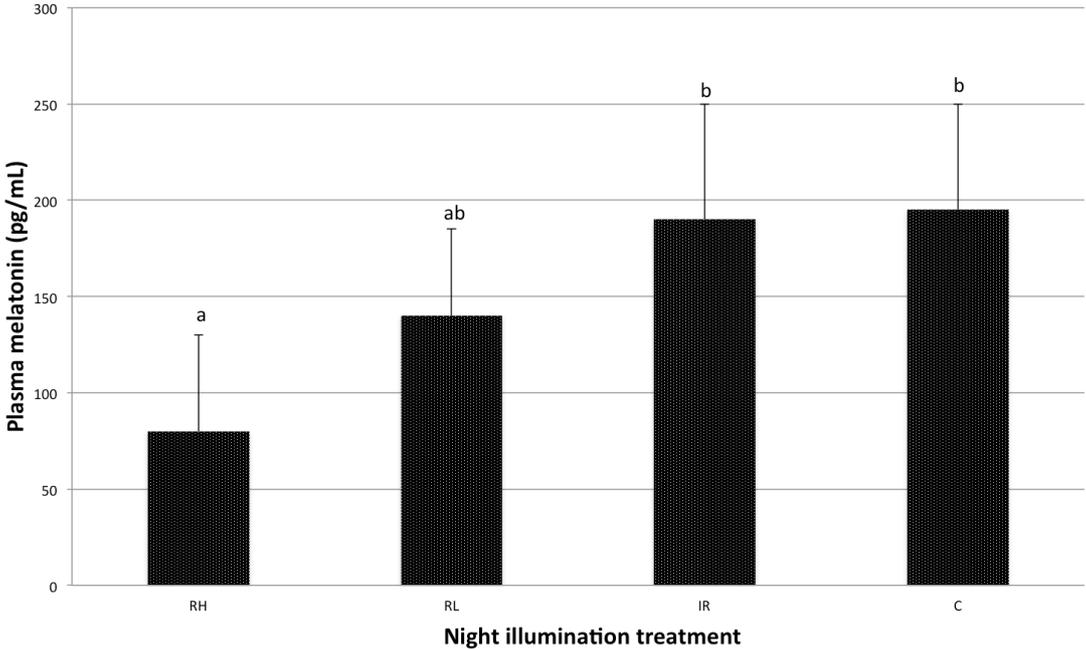
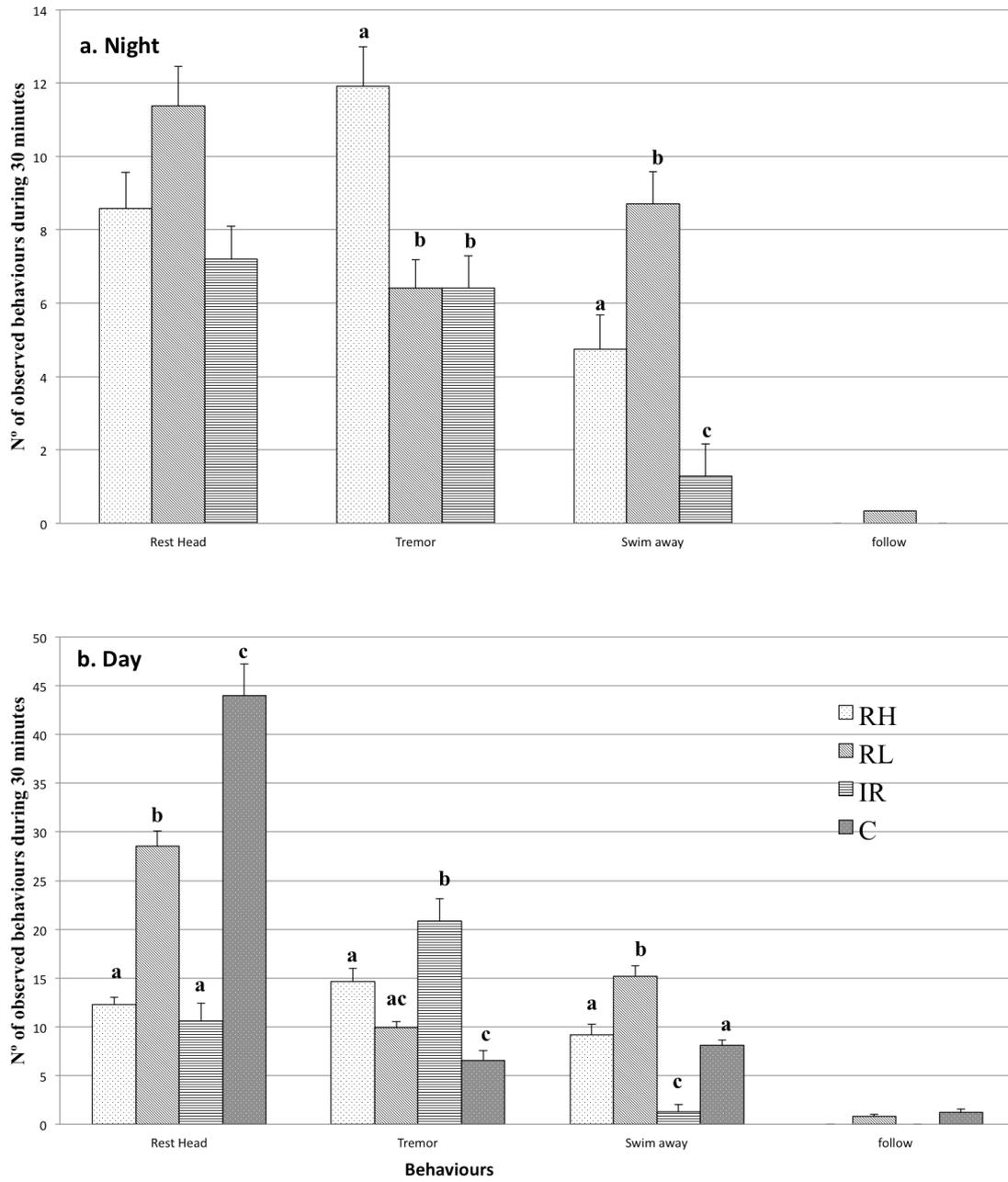


Figure 2.



Figure 3.





## Anexo 2

---

## **Justificación y Propósito del Etograma general del Lengudo.**

Este estudio de comportamiento se ha llevado a cabo a fin de llenar un importante vacío existente en cuanto a la reproducción y cultivo intensivo del lengudo senegalés. El estudio del comportamiento reproductivo de esta especie puede aportar pistas clave para la resolución de los problemas existentes, no solo a nivel experimental sino también a nivel industrial.

El etograma que se presenta a continuación recoge los resultados de distintos experimentos, incluyendo observaciones personales, que pueden resultar de gran utilidad no sólo en el ámbito de la investigación sino también a nivel productivo. No pretende ser un manual de estudio del comportamiento del lengudo sino una guía introductoria para poder interpretar algunas situaciones que se producen dentro del tanque y que pueden suponer una clara ventaja para el cultivador (si se detecta la posibilidad de que haya un cortejo, los planes de trabajo se pueden modificar y obtener como resultado una puesta fecundada y viable) o para la especie (mejores condiciones de estabulación y/o alimentación).

### **Descripción de comportamientos**

Para la descripción final de los comportamientos se han invertido un número considerable de horas de observación, análisis y descripción.

La descripción de comportamientos se ha realizado utilizando términos y conceptos ya utilizados en estudios similares con otros animales.

A lo largo del documento se han usado las definiciones de Craig (1918) de comportamientos apetitivo y aversivo así como los términos utilizados por Gibson, (2005) y Stoner (2009) en la descripción del comportamiento de otros peces planos.

### **Materiales**

- Se utilizaron 3 grupos diferentes de peces

1º: 29 peces (14 hembras y 15 machos) salvajes (origen: Huelva) de 6 años de edad y con un peso medio de 1,688 kg  $\mp$  0,01.

2º: 21 peces (10 hembras y 11 machos) salvajes (origen: Huelva) de 8 años de edad, con un peso medio de 1,541 kg  $\mp$  0,01.

3º: El último grupo, compuesto 16 peces, animales G1 (8 hembras y 8 machos). Con un peso medio de 1,415 kg  $\mp$  0,07.

- 2 tipos de tanque:

1º: tanque rectangular (2,5m x5,6 m) de fibra de vidrio de 14 m<sup>3</sup> de capacidad

2º: tanque circular con fondo cónico de 12,5 m<sup>3</sup>

- y otros recursos

4 cámaras subacuáticas (F60B/NIR580-50G, Praesentis, S.L., Barcelona)

Grabadora digital de cuatro entradas (UCDI DV41-50 Praesentis, S.L., Barcelona).

- Condiciones de iluminación

Fotoperiodo: 16 horas de luz (08:00 a 00:00h). Fluorescentes de 58W de luz blanca atenuados con rafia. Durante la noche los 2 fluorescentes de 58W se cubrían con un filtro rojo supergel ROSCO que permite el paso de la radiación infrarroja y de rojo profundo >720 nm

## Etograma

### *Permanecer quieto:*

El mantenimiento de la postura y la situación es una actitud importante en organismos que viven en grupo. En los peces planos es un concepto complicado debido a que generalmente son animales bastante estáticos y con poco movimiento. El lenguado senegalés en cautividad presenta un índice de inactividad diaria de más del 70% con diferencias entre machos y hembras. Así los machos presentan una media de 1 movimiento cada 1,67 minutos mientras que las hembras lo hacen cada 4,34 minutos.

### *Quieto (Q): Ausencia de movimiento. Permanece estático en el fondo.*

- Individual (Q1): El animal, sólo o rodeado por otros individuos pero sin interacción aparente, permanece quieto. Varios individuos pueden encontrarse en esa misma situación sin que exista ninguna relación entre ellos. Las hembras presentan menor actividad que los machos, pasan mucho más tiempo quietas. El animal permanece estático durante un tiempo elevado (a determinar por el observador según la época, la actividad del tanque, la hora del día o de la noche), no forma parte al menos aparentemente de ningún otro comportamiento ni se encuentra relación con los comportamientos precedentes o posteriores



Figura 1: *Quieto (Q)*

- Con acciones sobre él (Q2): El animal permanece estático aunque otros animales **actúen sobre él**. El pez fuerza el estar quieto, incluso cuando existen acciones directas, como

empujones con el morro por parte de otros peces. (Se ha observado, que estos animales pueden tensarse ejerciendo un efecto ventosa en superficies lisas. Este comportamiento supone que el pez tensa la musculatura

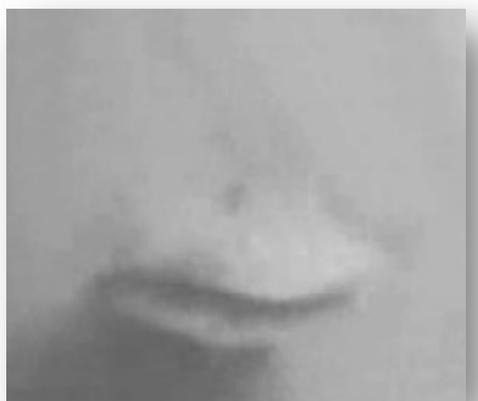
periférica dorsal y ventral del lado izquierdo o ciego, dificultando el paso del agua a modo de ventosa (aversivo) Aunque el animal o animales objeto de estudio permanezcan estáticos, otros individuos presentes en el tanque interactúan con ellos desplegando otros comportamientos. El tiempo que permanecen quietos suele ser menor que en el comportamiento anterior (Q1), debido al efecto derivado de las interacciones de unos peces sobre otros, rompiendo ese comportamiento inicial. La acción (respuesta) es permanecer quieto. Habitualmente no se realizan comportamientos agresivos sino que son únicamente meras insistencias de la que el ejemplo más habitual es el de la hembra cuando no acepta las acciones del macho en época de reproducción.

### ***Natación:***

Natación (N): Son de tres tipos, de fondo, del fondo a la columna de agua y de ahí a la superficie del agua. La natación puede agruparse de diferentes maneras



**Figura 2:** *Acompañado por otros animales*



**Figura 3** *Acoplados nadando en sincronía*

### **Descripción por las características de la actividad**

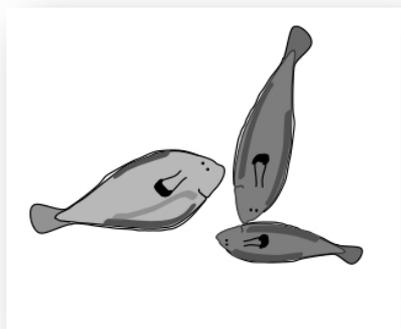
- Individual (N1): El animal nada solo en la columna de agua.
- Exploración (EX): El animal inspecciona una superficie o algún elemento cercano, como otro individuo del tanque.
- Acompañado por otros animales (N2) (*Fotografía 2*): El individuo en estudio nada junto con otros individuos que a su vez nadan a su alrededor,

imitando sus movimientos tanto en dirección como en velocidad.

- Acoplados (N3): Tipo de Natación en la que un individuo (macho) se sitúa por debajo de otro individuo (hembra) levanta la cabeza ligeramente hacia atrás situándose pegado y simétrico al otro individuo, nadando hacia la superficie. (Fotografía 3)

#### Descripciones de natación por velocidad y desplazamiento:

- Natación lenta o de recolocación: la velocidad es baja, se demoran varios segundos en recorrer un metro (>10s). La distancia del desplazamiento suele ser de pocos centímetros por cada vez que lo llevan a cabo. Es más un cambio de posición que un desplazamiento real. (Neutro)
- Natación normal: Aproximadamente un metro cada 2-4 segundos. Suele implicar un cambio en la situación dentro del tanque se prolonga por varios metros. (Neutro).
- Natación rápida: Mas de 1m por segundo. Habitualmente en respuesta a un estímulo externo, suele comenzar con una cabriola o despegue brusco y suele durar lo que dura el estímulo (otro pez) o la reacción al estímulo (ruido, golpe). En ocasiones el animal termina en el mismo lugar del que partió si el estímulo ha desaparecido (normalmente aversiva). Sin objetivo: el pez comienza a nadar, lo hace durante varios minutos dando vueltas por el tanque sin un objetivo concreto, al menos apreciable. En muchas ocasiones vuelve al mismo lugar que ocupaba minutos antes.



**Figura 4** Apartar a otro, empujar a otro con el morro

#### De inicio de interacción

- Apartar al otro (N4): Comportamiento que implica que un animal empuja activamente a otro, habitualmente con el morro aunque se han observado casos en los que lo hacen con la cola. (Aversivo)

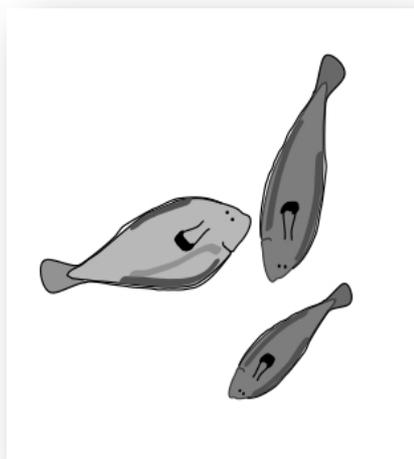


Figura 5 *Apartarse de otro*

(Ilustración 1)

- Apartarse de otro (N5): Parece ser una reacción a la aproximación de otro animal. Puede ser brusca (reacción rápida) o lenta. (Aversivo) (Ilustración 2)

- Acercarse a otro animal (N6): Comportamiento básico, acompaña prácticamente a todos los demás. Habitualmente indica el comienzo de

las acciones o interacciones sociales. Nadar y acercarse a otro animal, acercarse y temblar sobre, acercarse y apartar al otro... (Apetitivo).

#### *Por el inicio de la natación:*

- Provocado / Sin aparente provocación: El inicio de la natación puede ser por una provocación clara de otro animal o de otro factor (encendido de las luces en el tanque), o bien no estar provocado por nada perceptible para el observador.
- Brusco - Lento: Se inicia como una natación brusca y tras un primer impulso se inicia una natación de desplazamiento.
- Brusco - rápido: se ha observado después de producirse ruidos bruscos en el tanque.
- Lento - natación normal

#### *Otras nataciones:*

- Natación Vertical: Observada en hembras maduras que pivotan al inicio sobre la gónada híper-desarrollada. El movimiento comienza como una natación pausada en la que es necesario mayor empuje pero, debido a la rigidez de la gónada y a que el animal pivota sobre la zona de roce de la gónada, rápidamente se dispone como un pez nadando en vertical, posición que mantiene durante varios metros.
- Natación Errática: tanto la velocidad, como la dirección y la profundidad de natación varían rápidamente. No se observa ningún objetivo y ésta

empieza y termina bruscamente. Se incluyen en esta natación actos como saltos sin desplazamiento, contorsiones y ondas y finaliza con una rápida relajación posterior.

### *Persecuciones*

Variedad de la natación en grupo, muy específica de la época de reproducción. Un pez nada detrás de otro siguiendo sus gestos y cambios de dirección. Puede ser un juego o competición. **Este comportamiento puede ser usado como señal predictiva de comportamiento reproductivo.** (Fotografía 2)

Es probablemente parte del cortejo, de la competición entre machos o de la exhibición frente a la hembra. Se observó en todos los casos en los que hubo puesta. Se han observado nataciones en paralelo, a baja velocidad y corta duración (Fotografía 4).

- Sigue a (Fto): Es importante describir si el animal que estamos observando es parte del séquito que sigue a un animal que encabeza la natación.
- Seguido por (Fby): La otra posibilidad es que sea el que encabeza el grupo. En tres casos de todos los observados se pudo corroborar que el macho que realizaría después el cortejo era el que encabezaba las persecuciones. Es importante no solo por la diferenciación entre el animal que estamos tomando en consideración en nuestro estudio y el resto de los animales del tanque, si no por las posibles implicaciones de este orden, es decir, el animal principal de esta interacción puede ser el que va a participar en los posteriores cortejos. ¿Sería por tanto una competición para definir el macho dominante?

### *Temblor (T1):*

Agitación brusca de todo el cuerpo, es una agitación de la aleta periférica, que a cámara lenta representa una serie de vibraciones en forma de onda a lo largo de todo el cuerpo. En el medio natural y sobre substrato suelto presenta una función muy definida la de enterrarse. Las ondulaciones provocan la

suspensión momentánea de la arena sobre la que se encuentra que, al caer de



Figura 6 Temblando

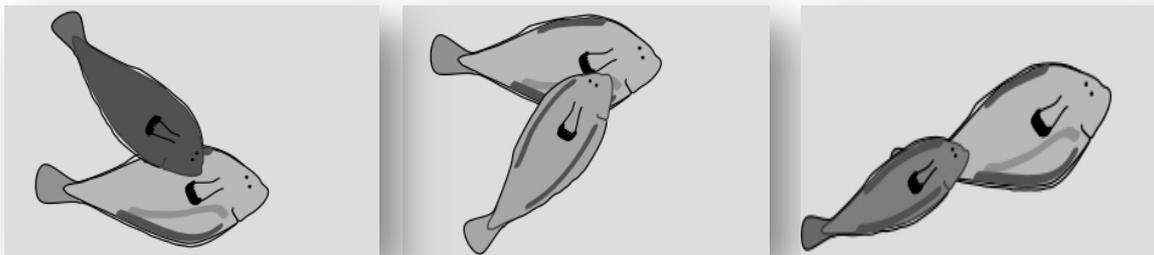
nuevo, cubre el cuerpo del animal. Dependiendo de la agresividad del movimiento y la duración, el enterramiento será más o menos pronunciado.

- Temblar encima de otro (T2): (Apetitivo) Puede ser considerado como una forma de "molestar" (provocar una respuesta de natación en las hembras para poder situarse debajo en la época de reproducción) o "estimular" a otro individuo. No está claro si este comportamiento forma parte del cortejo o es consecuencia de la adaptación a las condiciones de cautividad en la que el macho ha de provocar la natación de la hembra.
- Temblores bajo o junto a otro (T3): Temblor cuando hay un pez junto o encima del que tiembla. (Aversivo)

Se ha observado, como variación de este comportamiento, el desplazamiento por temblores.

#### *Acciones entre individuos:*

- **Cubrir a otro:**
  - Cubrir con el cuerpo (CC): Cubrir la cabeza con el cuerpo;
  - Cubierto por otro (Cpo): Cuando a un animal que se encuentra Quieto, se le acerca otro que se sitúa encima y comienza una serie de comportamientos como reposar la cabeza sobre el lomo, sobre la gónada cubriendo completamente el cuerpo del otro. (Apetitivo)
    - Reposar la cabeza (R): Es una acción muy repetida y parece formar parte de las interacciones básicas en estos animales. Ocurre en diferentes contextos y sobre diferentes partes del cuerpo. Puede pasar rápidamente a un *abrazo*. (Apetitivo)



**Figura 7** Diferentes posibilidades del comportamiento apoyar la cabeza.



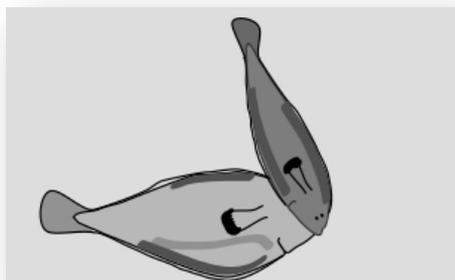
**Figura 8** Sobre el lomo. (R1)



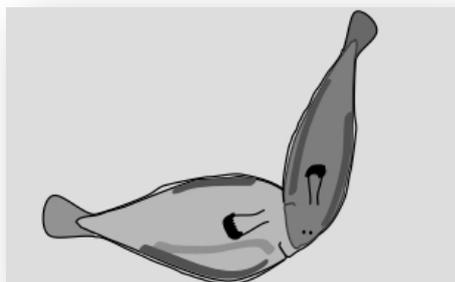
Sobre la gónada. (R2)



Sobre la cola. (R3)



**Figura 8** cubriendo la cabeza de la hembra y tapándola frente a otros machos



**Figura 9** llega a cubrir toda la cabeza y se interpone entre la hembra y otro macho

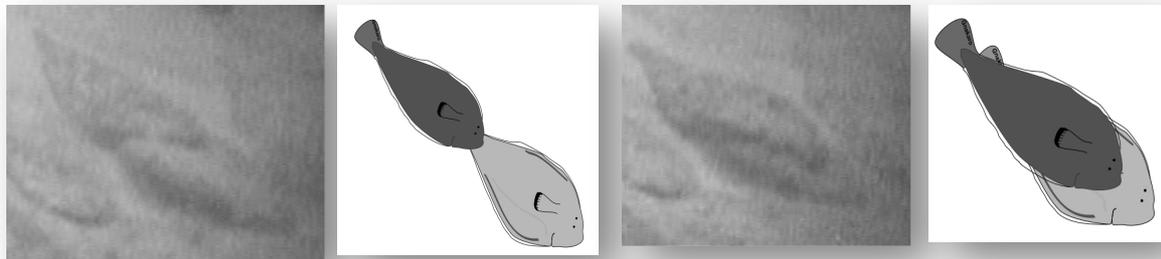
### **Guardián: (G)**

Es a la vez una actitud que se observa en los animales del grupo y protectora o acaparadora frente a la hembra objeto de la interacción.

Frente a otros machos: Interpone el cuerpo entre un macho cercano y la hembra, permaneciendo siempre entre ellos y nadando alrededor de la hembra. Llega a expulsar con el morro o a apartar con la cola al otro macho.

En ciertas ocasiones este comportamiento es más una actitud frente a la hembra, para que no elija al macho 2. Para ello el pez cubre la cabeza o todo el cuerpo de la hembra con su cuerpo llegando al abrazo cuando la hembra trata de alejarse.

**Abrazo (E):** Forma parte de la misma actitud de guardián, aunque en este caso va dirigida a la contención de la hembra para que no se escape. Un pez abraza a otro por la cola llegando hasta la mitad del cuerpo, tensando el cuerpo para



**Figura 10** secuencia, cubriendo todo el cuerpo, puede pasar a un abrazo para que el macho impida la natación de la hembra o a cubrir la cabeza como parte del comportamiento de guardián.

adoptar una forma convexa, que sujeta e impide el movimiento normal y evita el desplazamiento (apetitivo como respuesta a un comportamiento aversivo de la hembra, que se marcha). En los casos que se ha podido describir, se observa un número elevado de machos alrededor de la pareja. Durante el cortejo este tipo de actitud no se observa ya que la pareja previamente se ha separado del grupo principal. Ocurre a veces, aunque no es muy habitual

**Apartar a otro con un empujón:** Puede ser incluido dentro del comportamiento de guardián, por el número de veces que han sido observados ambos comportamientos a la vez aunque este ha sido observado en circunstancias diferentes. (Aversivo)

**Apartarse de otro:** Cuando la llegada de un individuo a una zona, provoca la huida de uno o más individuos. No es exclusivo de un periodo concreto. Ha sido observado en diferentes contextos. (Aversivo)

### *Elevar la cabeza*

Tenemos 3 tipos totalmente diferentes.

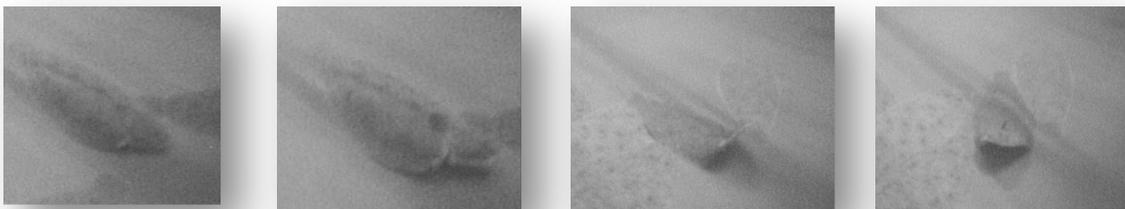
**Inicio de la natación brusca:** El cuerpo se arquea, tras una brusca sacudida, a modo de látigo. Es usado muchas veces como arranque de una natación brusca o de comienzo brusco

**Posición alerta o de enfrentamiento:** La elevación del cuerpo es acompañada por una bajada de cabeza y la posición se estabiliza durante unos segundos. (*Secuencia*)

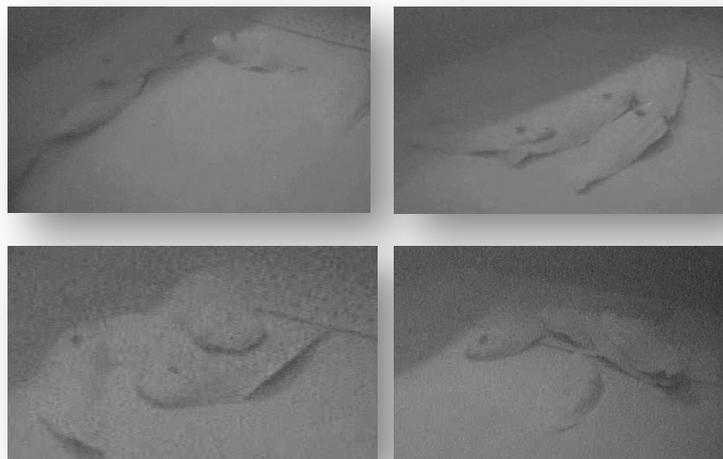
**Tirón:** La elevación es brusca, es la propia elevación la que supone un latigazo, aunque no lleva asociado un movimiento de desplazamiento asociado, es típica de la obtención de comida y parece estar más asociada a la captura y extracción de gusanos. Se repite como un movimiento reflejo incluso en la ingesta de pienso, extrayendo un gusano del sedimento. (Acción refleja relacionada con la alimentación) (Apetitivo)

#### SECUENCIAS DE COMPORTAMIENTO:

##### Postura "Alerta"



**Figura 11** secuencia de la postura de alerta.



**Figura 12** Diferentes instantáneas de persecuciones



## Anexo 3

---

## Anexo 3 Protocolos

### Protocolo de extracción de DNA a partir de sangre y protocolo de extracción de esteroides

Los peces son anestesiados con 2-phenoxyethanol a una concentración de 1:20000 (sigma Chemical Company Ltd.) para permitir la recolección de muestras (350  $\mu$ l) a través de la aorta dorsal caudal, con jeringuillas heparinizadas (2  $\mu$ l · jeringuilla) (4mg/ml, Sigma Chemical Company Ltd.)

1: Extracción de ADN a partir de células sanguíneas (preservamos la sangre en etanol).

2: Extracción de esteroides presentes en el plasma (requiere un 2º paso antes de congelar las muestras).

#### Materiales

1

- 160  $\mu$ l de sangre.
- Re suspensión buffer
- Lysis buffer
- Proteinasa K (10 mg/ml)
- NaCl (6M)
- Hielo
- Isopropanol.
- Etanol
- TE buffer

2

- Plasma sanguíneo
- Metanol absoluto
- Tubo eppendorf 1,5 ml
- Metanol
- Tampón RB

### **Métodos**

- 160  $\mu$ l de sangre preservada en etanol
- Adicionar 2.4 ml de re suspensión buffer
- Adicionar 2.4 ml de lysis buffer
- Agitar ligeramente
- Adicionar 72  $\mu$ l /ml de proteinasa K (10 mg/ml)
- 55 °C para 2 horas o 37 °C para toda la noche
- Adicionar 1.6 ml de NaCl 6M
- Agitar vigorosamente (máquina vórtex) durante 15 s.
- Introducir en hielo durante 5 - 10 minutos
- Centrifugar a 4000 rpm durante 30 minutos
- Si no esta limpio, se transfiere a un nuevo tubo y se centrifuga de nuevo durante 15 minutos
- Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo
- Se añaden 4.8 ml de isopropanol.
- Se invierte el tubo 3 veces

- Se centrifuga a 4000 rpm unos 15 minutos
- Limpiar pellet en etanol, secar moderadamente
- DNA re-suspendido en 300  $\mu$ l de TE buffer

Recolectamos alícuotas de 200  $\mu$ l. Estas están centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante es recolectado y mantenido a -80 °C para su posterior estudio.

## Extracción de plasma para el análisis de esteroides (E2, T y 11KT) por EIA

### Materiales

- Metanol absoluto
- Tampón RB
- Hielo
- Plasma sanguíneo
- Tubo eppendorf 1,5ml

1. Descongelar el plasma y centrifugar para eliminar sólidos (3000 g, 10 min, 4°C)
2. Recuperar el plasma centrifugado en un tubo nuevo (ie eppendorf .1,5 ml) y extraerlo con metanol absoluto (1:6, v:v)
3. 100 µl plasma + 600 µl metanol
4. Agitar bien con el vórtex (3 veces 10 s), manteniendo los tubos en frío (10 minutos)
5. Centrifugar (3000 g, 15 min, 4°C)
6. Recuperar el sobrenadante y pasarlo a tubos nuevos bien marcados (tubo eppendorf 1,5 ml ). Puedes llevar al speed-vac e ir secando a 40°C. El sobrenadante puede evaporarse dejando los tubos abiertos sobre la poyata a 37°C, el secado durará aproximadamente dos días.
7. Re-extraer pellet (2x)
8. Añadir 200 µl de metanol al pellet, agitar con vórtex y centrifugar (3000 g, 15 min, 4°C). Recuperar el sobrenadante y añadirlo al que se esta secando y continuar evaporando

9. Repetir con el pellet re-extraído
10. Cuando las muestras estén secas (pellet húmedo pero sin restos de metanol) re-suspender en tampón RB, volumen determinado según dilución que se quiera.
11. Pellet +200  $\mu$ l RB. Dilución 1/2
12. Agitar bien con vórtex (3x10 s) para re-suspender el pellet
13. Guardar a -20 °C, bien etiquetado.

## Protocolo de extracción de DNA a partir de aleta

### Materiales

- Tampón de lisis I. (re suspensión buffer)
- Aleta
- Tampón de lisis II.
- Proteínasa K
- NaCl 6M (solución de precipitación)
- RNAasa A
- Isopropanol
- Etanol 70 %
- H<sub>2</sub>O bidestilada estéril.

Tras cortar la muestra, la mantenemos en etanol 70% .

Previamente tenemos que retirar el alcohol, para lo cual centrifugamos a 3000 rpm durante 3 minutos y eliminar el alcohol manteniendo el pellet.

1. Añadir 300 µl de tampón de lisis I (re-suspensión buffer).
2. Añadir la aleta troceada (50 µl de sangre).
3. Añadir 300 µl de tampón de lisis II.
4. Agitar en el vórtex durante 15 s.
5. Añadir 20 µl de Proteínasa K (20 mg/ml) y 32 µl de solución de precipitación (NaCl 6M a saturación). (En nuestro caso tenemos la proteínasa a 10 mg/ml con lo que hemos de poner 40 µl).
6. Dejar a 55 °C toda la noche.

7. Dejar atemperar durante 15 min y añadir 10 µl de RNAasa A (10 mg/ml).
8. Poner a 37 °C durante 1 hora.
9. Añadir 160 µl de solución de precipitación (NaCl 6M a saturación).
10. Invertir el tubo 25 veces.
11. Dejar en hielo durante 10 min.
12. Centrifugar 3 min a 4 °C y 14.000 rpm.
13. Recuperar con mucho cuidado el sobrenadante y pasarlo a un nuevo eppendorf.
14. El sobrenadante recuperado se centrifuga de nuevo 3 min a 4 °C y 14.000 rpm.
15. Recuperar con mucho cuidado el sobrenadante y pasarlo a un nuevo eppendorf.
16. Añadir un volumen (~ 600 µl) de Isopropanol (2-propanol) e invertir el tubo 25 veces, observándose entonces la maraña de ADN.
17. Dejar a temperatura ambiente durante 10 min.
18. Centrifugar 3 min a 4 °C y 14.000 rpm.
19. Retirar el sobrenadante con cuidado de no perder el pellet de ADN.
20. Añadir 500 µl de etanol 70 % frío.
21. Centrifugar 3 min a 4 °C y 14.000 rpm.
22. Retirar el sobrenadante con cuidado de no perder el pellet de ADN.
23. Dejar secar bien y añadir ~ 150 µl de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril.

NOTA: Si se obtiene mucha cantidad de ADN diluir hasta obtener una concentración aproximada de 200 ng/µl

## Protocolo para la extracción de muestras de agua, heces, orina y mucus

Obtención de muestras de compuestos no polares que puedan actuar en la comunicación conespecífica en el lenguado senegalés (*solea senegalensis*) en Santander

### **Materiales**

Extracción de muestras de agua:

Caja que no sea de poliestireno

Botellas de cristal para el agua

Para el pre filtrado, membrana de 5 micras

Manifol

Jeringuillas de cristal.

Filtrado (sep.-pack) . 1 unidad por muestra.

Metanol: (total 15 ml x muestra + metanol para limpieza de instrumentos)

- 5 ml de metanol (para configurar el sep-pack)
- 10 ml de metanol (mantenimiento de la muestra)
- 20 ml de metanol (limpieza de los diferentes elementos)

Guantes (1 caja): Estos animales te huelen con facilidad, no introducir la mano en el agua....

**Las muestras recogidas, por grupo, serán:**

- Agua a la entrada del tanque (muestra control).
- Agua a la salida del tanque (muestra del grupo de peces a estudio).

- Agua del macho (se introduce un macho en el agua de un tanque de 30 litros durante unas 4 horas se lleva a cabo una homogenización del agua y se recoge una muestra de un litro).
- Agua de una hembra (se introduce una hembra y mismo tratamiento).

Al finalizar la toma de agua, el animal se pasa a un tanque con anestesia y antes de devolverle al agua se le toman muestras de:

- Mucus (con un porta).
- Orina (jeringuilla), mediante una ligera presión abdominal.
- Heces (mediante la entrada de una sonda unos 3 cm y aspiración).

### **Materiales**

- **Extracción de muestras de mucus**
  - Recogerlo con un porta de cristal
  - 1 ml en un eppendorf
  - 10 ml de agua destilada x muestra
- **Extracción de muestras de heces**
  - Sonda 1mm  $\odot$
  - Eppendorf
- **Extracción de muestras de orina.**
  - Jeringuilla
  - Eppendorf

**Tratamiento de las muestras (a realizar en el lugar de recogida por la necesidad de hacerlo en breve, una vez recogido):**

Orina y heces se recogerán en un eppendorf y se congelarán automáticamente,

Mucus, se retira un ml de mucus con un porta y se recoge en un tubo de 15 ml, se rellena con 10 ml de agua destilada y se centrifuga, se retira el sobrenadante y se mantiene el resto de la muestra congelada.

Agua:

- 1º se recoge usando en todos los pasos cristal.
- 2º se filtra en un quitasato con un filtro de 5 micras de poro.
- Lo resultante se filtra por un cartucho C18 que extrae los compuestos no polares, se desecha el resto de la muestra.
- Se transfieren con 10 ml de metanol a tubos de cristal de 10 ml.
- Se congelan las muestras.

Protocolo de la casa "Waters", 5ml de metanol y 5 ml de agua destilada. Cuando ya ha pasado el litro de agua, pasamos 5 ml de agua destilada y continuado 5ml de metanol, para retirar la muestra.

Los compuestos son retenidos por el sep-pack C18 (retiene esteroides y lipófilos polares, es como una jeringa rellena de polvo blanco, cartridge C18) el sep. pack no se puede secar nunca.

## PROTOSCOLOS DE INDUCCIÓN

### **Materiales generales para la inducción hormonal.**

- Bisturí
- Jeringuillas
- Agujas
- Fenoxietanol
- Tanque de 50 l
- Yodo
- Novecutane (apósito adhesivo)
- Implantes previamente preparados
- Hormonas preparadas para la inducción según la recomendación del fabricante.
- Suero fisiológico

### Protocolos de inducción

#### **Metodología de inducción hormonal (protocolo de inducción).**

Tras la captura se lleva a cabo una sedación ligera con Fenoxietanol (2 ml/10 l) durante tres minutos aproximadamente dependiendo del tamaño del animal.

Cuando el animal se encuentra sedado, se le aplicaron las diferentes hormonas de la siguiente forma:

Inyección de GnRH<sub>a</sub> intramuscular: previamente se disuelve la GnRH en la solución salina a una concentración de 50µg/mL. Para aplicar una dosis de 5µg /kg a un pez de 1800 g, se aplico 0,18 mL de la solución de GnRH.

Implante de GnRH: se practica una pequeña incisión en el lomo superior, para la inclusión del implante también de forma intramuscular, a los animales que son implantados se les limpia posteriormente con yodo y se les aplica una ligera

capa plástica de Novecutane. Implante (2 concentraciones diferentes x peso del animal: implante de 50  $\mu$ g e implante de 75  $\mu$ g) con la relación, 50  $\mu$ g/Kg. de peso del animal implantado

hCG inyección: Inyección de hormona hCG intramuscular a la concentración necesaria, por ejemplo 1000 IU /Kg. cada dosis

PG: Inyección de PG intramuscular a la concentración necesario, por ejemplo 1000 IU /Kg. cada dosis



## Anexo 4

---

## Anexo 4 parentesco genético

### Material

- 109 muestras de ADN genómico de la especie *Solea senegalensis*
- Se detallan los códigos correspondientes a las muestras, la concentración de ADN y su pureza (medida como la razón de absorbancia a 260/280 nm).

Como grupo de referencia externo se ha utilizado una población de *S. senegalensis* de origen salvaje, capturada en las costas del Atlántico sur (Cádiz). Este grupo (WTout) representa una población estable y homogénea.

El estudio genético fue realizado por la empresa: BIOTECHNOLOGY CONSULTING S.L. dirigida por el Dr. Javier Porta

#### 1. Valoración de la concentración y calidad de las muestras

En términos generales las muestras recibidas presentan cantidades de ADN adecuadas, así como un alto grado de pureza.

#### 2. Caracterización genética de la población

La caracterización genética revela que el stock analizado representa una población heterogénea desde el punto de vista genético con frecuencias alélicas en desequilibrio frente a las proporciones esperadas según Hardy-Weinberg (caracterizadas por un déficit de heterocigotos). Los parámetros genéticos indican niveles medios de variabilidad genética en este grupo. Por otro lado, los valores de exclusión 1 y 2 y el contenido de información polimórfico (PIC) muestran el gran potencial de esta herramienta en su aplicación al análisis de pedigrí.

#### 3. Caracterización genética de las subpoblaciones

La caracterización genética de las subpoblaciones revela que los valores de variabilidad más altos corresponden a las subpoblaciones Salv y Cult.3, mientras que los valores más bajos corresponden a las subpoblaciones Cult.1 y

Cult.2. Sin embargo, el reducido número de individuos de cada subgrupo impide que estos resultados sean estadísticamente significativos

#### 4. *Comparación genética entre subpoblaciones*

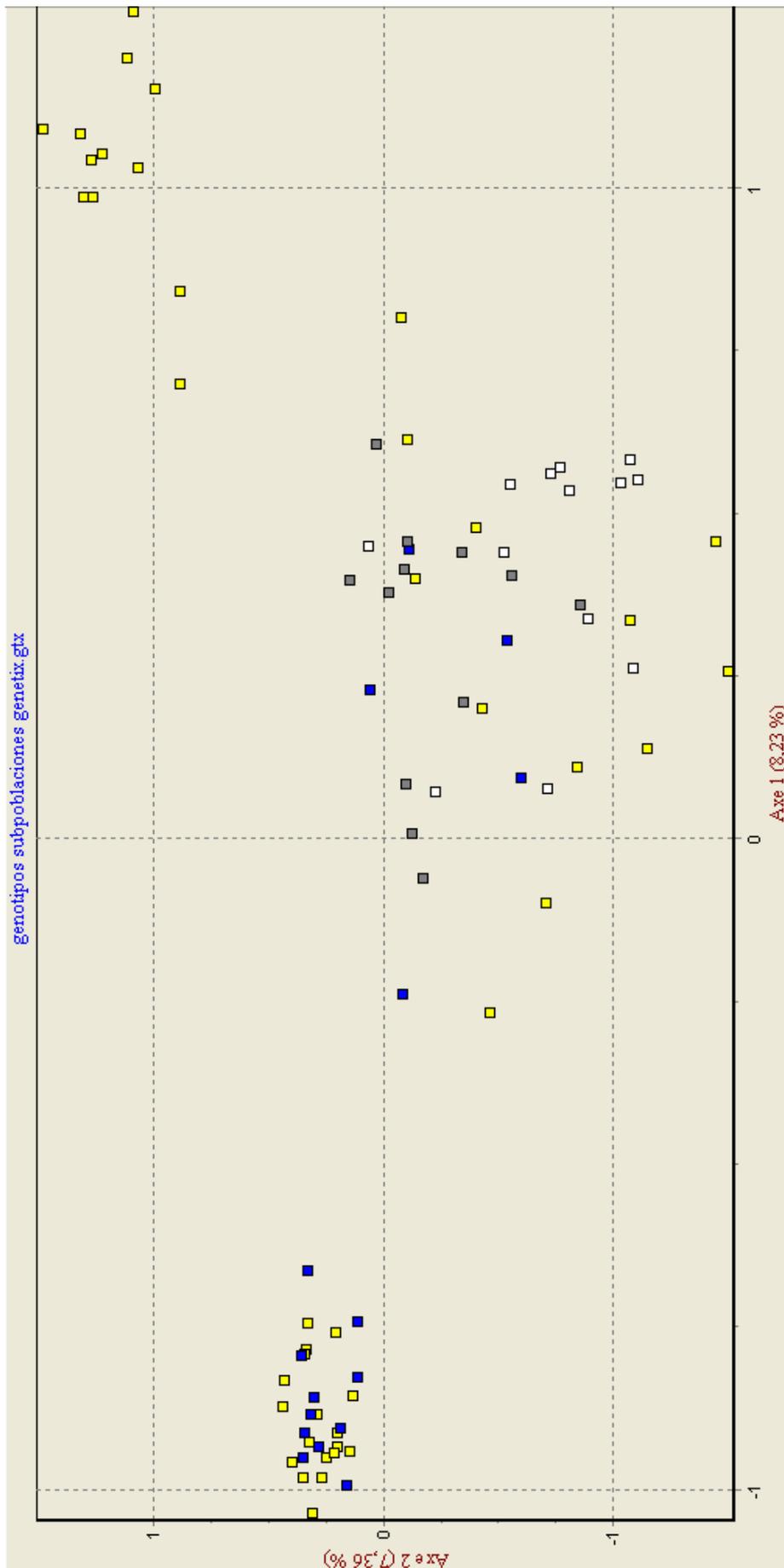
El estudio revela que los grupos Cult.1 y Cult.2 representan muestras de la misma población. Por el contrario, los valores de  $F_{st}$  para el resto de comparaciones por pares revelaron diferencias significativas entre el resto de poblaciones

#### 5. *Comparación genética de las distintas subpoblaciones con respecto a una población de referencia*

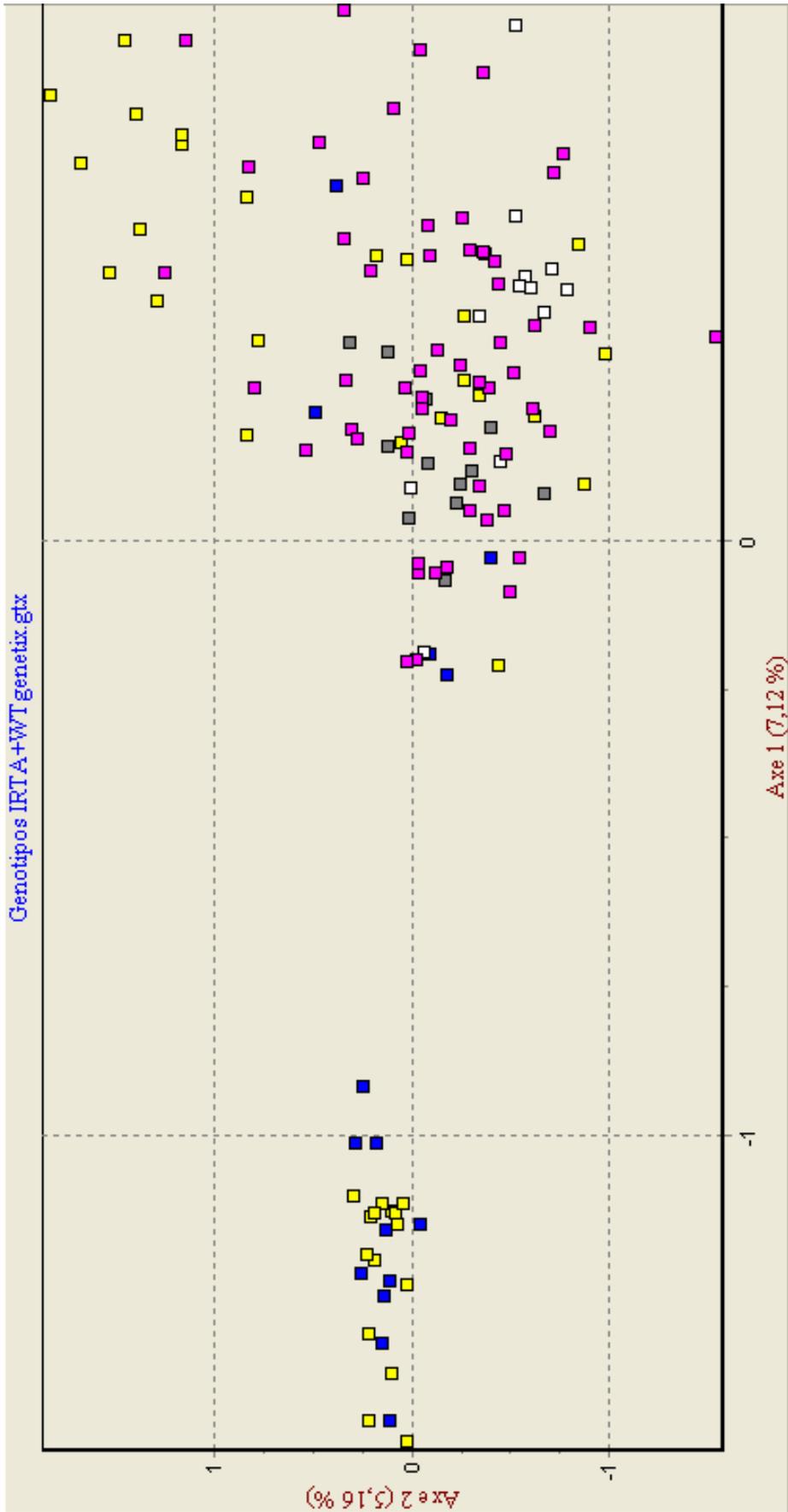
La inclusión en el estudio de una población de origen salvaje a modo de población de referencia acentúa las carencias genéticas del grupo muestreado. De esta forma se observa como el grupo de referencia presenta valores de variabilidad significativamente mayores al resto de grupos. Además se observa como el subgrupo Cult.3 parece proceder del mismo origen que esta población de referencia. Este resultado es concordante con los datos de origen que coinciden en la zona de captura y cría de los individuos.

#### 6. *Estimación de los valores de parentescos entre individuos*

Los resultados de las estimas de parentesco entre los individuos del stock analizado revelan estrechas relaciones de parentesco entre los individuos. Esto es especialmente relevante en el caso de las subpoblaciones Cult.1 y Cult.2, donde la mayoría de los individuos son hermanos y medios hermanos. Las similitudes genéticas entre estos dos grupos revelan que estos individuos proceden del cruce entre unos pocos reproductores. De los datos se deduce que estos dos subgrupos están formados básicamente por dos familias de hermanos completos



graf 1: Análisis Factorial de la Correspondencia (AFC) de las distintas subpoblaciones. En amarillo se representan los individuos de la subpoblación Cult.1, en azul Cult.2, en blanco Cult.3 y en gris la subpoblación Salv.



graf 2 Análisis Factorial de la Correspondencia (AFC) de las distintas subpoblaciones y la población de referencia (WTout). En amarillo se representan los individuos de la subpoblación Cult.1, en azul Cult.2, en blanco Cult.3, en gris la subpoblación Salv. y en rosa WTout.

FileName	Pop	Sma x2a	Sma x2b	GATA a	GATA b	SolI 4a	SolI 4b	SolI 9a	SolI 9b	CAI 3a	CAI 3b	CA13 b	SolMI Ia	SolMI Ib			
Solea105	CultI	100	104	136	176	205	209	155	165	141	159	132	136	172	184	142	154
Solea106	CultI	72	72	148	148	213	227	145	155	143	145	126	128	196	196	139	151
Solea107	CultI	72	96	128	156	213	227	145	155	145	145	126	132	181	214	151	151
Solea108	CultI	96	104	160	160	205	209	155	165	141	143	128	132	172	181	142	154
Solea109	CultI	90	100	160	160	203	215	167	167	141	159	128	132	172	184	142	154
Solea110	CultI	72	72	148	148	213	227	145	155	145	145	128	132	181	196	151	151
Solea111	CultI	100	104	128	160	203	209	167	167	141	143	126	132	172	184	154	157
Solea112	CultI	96	96	148	148	203	205	165	173	145	159	134	136	181	205	148	151
Solea113	CultI	72	72	128	148	213	215	145	155	143	145	126	132	181	196	139	151
Solea114	CultI	72	96	200	220	199	211	165	167	133	153	128	128	178	178	151	154
Solea130	CultI	76	98	148	224	219	231	147	151	159	161	128	134	181	205	142	148
Solea132	CultI	100	104	128	160	205	215	155	165	143	157	128	132	172	184	142	154
Solea133	CultI	90	96	136	176	203	215	167	167	141	143	132	132	172	181	154	157
Solea172	CultI	96	104	136	176	205	209	165	167	141	143	126	132	172	181	154	157
Solea173	CultI	72	76	148	180	223	225	145	149	141	141	128	136	178	181	154	160
Solea174	CultI	72	72	128	156	213	215	145	155	143	145	126	132	196	196	139	151
Solea175	CultI	78	90	200	220	205	205	145	195	145	153	132	132	178	178	154	160
Solea177	CultI	72	96	156	156	213	215	145	155	143	145	128	128	214	214	151	151
Solea178	CultI	72	72	156	156	213	227	145	155	143	145	128	128	181	214	151	151
Solea179	CultI	72	96	148	156	213	227	145	155	145	145	128	132	181	214	139	151
Solea180	CultI	72	72	148	148	209	215	145	155	145	145	128	128	196	196	139	151
Solea181	CultI	100	104	128	160	203	215	165	167	143	157	126	132	172	184	142	154
Solea182	CultI	76	98	148	148	193	231	147	151	159	161	128	136	178	205	139	151
Solea186	CultI	72	96	128	148	209	215	145	155	145	145	128	128	214	214	151	151
Solea24	CultI	100	104	160	176	205	215	155	169	141	143	126	132	172	184	154	157
Solea26	CultI	76	92	148	148	215	219	151	155	161	163	134	136	181	205	139	151
Solea35	CultI	96	104	160	176	205	215	155	167	141	143	132	132	172	184	154	157
Solea49	CultI	72	72	128	148	209	227	145	155	145	145	128	128	196	196	139	151
Solea50	CultI	72	96	148	156	209	215	145	155	143	145	128	132	196	196	151	151
Solea51	CultI	72	72	148	148	209	227	145	155	145	145	126	132	214	214	151	151
Solea61	CultI	72	72	168	168	215	231	167	177	145	149	128	134	181	205	139	148
Solea78	CultI	72	98	148	148	211	231	167	177	145	149	132	134	187	205	139	148
Solea79	CultI	72	72	128	156	213	215	145	155	145	145	126	128	181	214	139	151

Solea80	Cult1	100	104	128	136	205	209	167	167	157	159	126	132	172	181	154	157
Solea81	Cult1	72	88	180	180	203	207	161	165	143	155	128	132	178	181	151	154
Solea82	Cult1	72	96	148	148	213	227	145	155	143	145	0	0	181	214	151	151
Solea83	Cult1	72	72	148	148	209	215	145	155	145	145	126	132	181	214	139	151
Solea85	Cult1	72	72	128	148	209	215	145	155	143	145	128	132	214	214	139	151
Solea86	Cult1	76	98	148	224	215	219	155	161	157	161	128	134	162	178	142	151
Solea87	Cult1	72	72	128	156	209	215	145	155	143	145	126	128	181	214	151	151
solea23	Cult1	72	98	148	148	215	215	147	161	145	145	128	132	181	205	139	139
solea25	Cult1	100	104	0	0	205	215	165	167	143	157	0	0	172	181	142	154
Solea100	Cult2	72	96	148	148	209	227	145	155	145	145	128	128	181	214	139	151
Solea168	Cult2	72	72	148	148	213	227	145	155	145	145	126	128	181	214	151	151
Solea169	Cult2	72	96	148	156	213	227	145	155	143	145	128	132	214	214	139	151
Solea170	Cult2	72	72	128	148	209	227	145	155	145	145	132	132	214	214	139	151
Solea72	Cult2	72	96	148	156	209	227	145	155	143	145	126	132	181	196	151	151
Solea73	Cult2	76	102	152	152	205	215	145	147	145	159	126	128	178	181	160	160
Solea74	Cult2	72	72	128	156	213	215	145	155	145	145	126	128	181	196	151	151
Solea75	Cult2	74	92	148	156	215	223	147	169	141	157	128	140	181	184	139	157
Solea76	Cult2	74	92	148	156	0	0	147	173	145	145	132	140	184	184	139	157
Solea77	Cult2	72	96	148	156	209	215	145	155	143	145	126	132	181	196	139	151
Solea88	Cult2	72	96	148	148	213	215	145	155	145	145	128	132	214	214	151	151
Solea91	Cult2	72	96	148	184	217	227	149	165	143	145	128	132	181	187	139	151
Solea93	Cult2	72	96	148	148	209	215	145	155	145	145	128	128	181	214	139	151
Solea96	Cult2	72	72	148	156	209	227	145	155	143	145	128	132	181	196	151	151
Solea97	Cult2	72	96	148	156	213	215	145	155	143	145	126	128	196	196	151	151
Solea98	Cult2	74	92	140	148	223	223	145	169	145	145	132	132	181	205	148	148
Solea101	Cult3	88	92	148	192	219	223	165	165	151	157	128	128	178	187	139	148
Solea146	Cult3	88	92	148	148	195	223	149	153	157	159	126	132	178	178	139	166
Solea147	Cult3	90	92	152	160	205	205	145	165	141	145	128	132	187	187	139	151
Solea150	Cult3	88	96	148	148	205	223	149	161	151	157	128	132	178	205	148	151
Solea153	Cult3	88	90	124	152	205	207	145	161	159	161	126	132	178	187	151	160
Solea154	Cult3	88	96	148	148	219	219	149	161	151	157	128	128	178	205	148	151
Solea156	Cult3	76	80	140	148	205	223	165	171	157	163	128	132	178	184	139	151
Solea163	Cult3	72	102	152	160	203	205	161	161	149	159	128	136	178	181	148	151
Solea165	Cult3	76	88	148	148	205	223	165	171	157	163	132	136	184	199	139	151
Solea167	Cult3	76	80	148	148	215	219	149	169	157	163	132	136	178	205	142	148

Solea89	Cult3	72	102	148	160	225	227	149	161	149	157	126	128	205	205	148	151
Solea92	Cult3	86	96	128	144	207	217	161	173	143	155	126	132	178	196	139	148
Solea99	Cult3	88	92	148	148	205	223	165	165	151	157	128	132	178	178	151	166
Solea155	Cult4	74	104	160	180	205	205	155	161	135	143	128	132	187	187	139	148
Solea160	Cult4	90	92	124	160	205	223	161	165	139	145	128	132	187	199	148	151
Solea162	Cult4	72	88	148	152	215	215	149	161	151	159	128	128	178	199	139	151
Solea116	WT	74	96	224	224	205	217	145	165	143	159	126	140	184	187	154	160
Solea117	WT	78	96	148	184	209	217	145	145	149	159	128	132	187	187	139	154
Solea118	WT	78	78	148	152	219	225	155	171	157	159	128	134	181	181	148	160
Solea119	WT	74	118	184	224	215	219	165	171	145	159	132	132	181	187	139	142
Solea121	WT	72	88	148	160	0	0	145	145	149	153	126	140	181	187	151	160
Solea122	WT	74	88	148	224	205	211	145	157	143	159	128	132	199	205	139	160
Solea124	WT	78	78	148	152	215	215	145	165	149	159	128	128	187	205	151	154
Solea125	WT	72	74	156	224	205	219	145	165	159	159	126	128	187	187	142	157
Solea126	WT	76	96	172	172	213	227	165	169	143	149	128	128	208	208	142	151
Solea127	WT	72	88	160	224	215	219	165	165	143	159	128	140	187	196	154	160
Solea94	WT	88	96	142	160	0	0	0	0	141	143	128	128	0	0	139	160
Solea95	WT	74	96	160	184	203	215	165	165	145	159	128	140	187	187	139	139
Solea84	nosesa bc	74	88	148	152	0	0	147	147	147	157	132	134	184	184	139	148



## Anexo 5

---

## Otros trabajos realizados a lo largo de la tesis: periodo 2007-2011

### Participación en congresos:

**Carazo, I.; Martin, I.; Chereguini, O; Duncan, N.** Etograma de la reproducción del Lenguado senegalés *Solea senegalensis* (Kaup 1858). A: **XIII Congreso Nacional de Acuicultura**. Barcelona, 21 - 24 Noviembre 2011 (Presentación Oral).

**Carazo, I.; Martin, I.; Hubbard, P.; Chereguini, O; Mañanos, E.; Canario, A; Duncan, N.** Reproductive behaviour, the absence of reproductive behaviour in cultured (g1 generation) and chemical communication in the Senegalese sole (*solea senegalensis*). **International symposium of reproductive physiology of fish. Cochin (India)** 9-14 Agosto 2011. (Presentación Oral).

**Carazo, I.; Chereguini, O.; Huntingford, F.; Martin, I.; Norambuena, F.; Duncan, N.** (2009). Observaciones del cortejo de lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) salvaje mantenido en cautividad. A: **XII Congreso Nacional de Acuicultura. Madrid**, 24 - 26 Noviembre, 2009 (Presentación Oral).

**Carazo, I.; Mañanos, E.; Norambuena, F.; Duncan, N.** (2008). Preliminary observations of behaviour of Senegal sole broodstock (*Solea senegalensis*) induced to ovulate and release eggs using different male and female hormone (GnRH $\alpha$  and hCG) treatments. A: **Sixth International Symposium on Fish Endocrinology. Calgary (Alberta, Canada)**, 22 - 27 June 2008 (Poster).

### Difusión de resultados:

De la difusión de los resultados extraídos de la tesis, los presentados en el capítulo 2 y 3 ha sido la más extensa, haciendo hincapié en los resultados y las observaciones personales del etograma y el cortejo del lenguado senegalés. La difusión se ha llevado a cabo en los lugares del apartado “congresos” así como en las presentaciones de otras personas en:

**Iñaki Carazo, Catarina Oliveira, F. Javier Sánchez-Vázquez and Neil Duncan.** “The effect of night illumination, red and infrared light, on melatonin, locomotor

activity and behaviour of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) broodstock".  
**FSBI Conference Norwich, UK, 9-14. July 2012. Presenter, Email: neil.duncan@irta.es.**

Duncan, N.; **Carazo**, I.; Chereguini, O.; Norambuena, F.; Mañanos, E.; Estévez, A. (2008). Reproductive behaviour of Senegal sole (*Solea senegalensis*). A: **Fourth Workshop on the Cultivation of Soles. Faro, (Portugal)**, 11 - 13 Noviembre, 2008 (Comunicación).

Norambuena, F.; **Carazo**, I.; Estévez, A.; Duncan, N. (2009). Desarrollo reproductivo de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*): Descripción del comportamiento y estado nutricional de peces salvajes y de cultivo. A: **II Congrés d'Aqüicultura Mediterrània. II Simposi d'Aqüicultura de Catalunya. XXV Jornades Tècniques de l'Exporàpita. Sant Carles de la Ràpita**, 15 - 16 Octubre, 2009 (Comunicación).

**Ignacio Carazo**, Ignacio Martin, Olvido Chereguini, Evaristo Mañanós, **Neil Duncan**. The absence of reproductive behaviour in cultured (G1 generation) Senegalese sole (*Solea senegalensis*) explains poor reproductive performance. Co-author Oral communication. **Workshop V The Cultivation of Soles**. Book of Abstracts. CCMAR, University of the Algarve, Faro, Portugal. 5-7 April 2011

Norambuena, F., Vallés, R., **Carazo**, I., **Duncan**, N., Estévez, A., and Roque, A. Anesthesia of broodstock Mediterranean fish. Poster. **Humane Slaughter Association Centenary International Symposium**. Recent Advances in the Welfare of Livestock at Slaughter Book of Abstracts. Portsmouth Historic Dockyard, Portsmouth, UK. 30th June & 1st July, 2011

### Trabajos derivados de la participación en otros estudios

#### Participación en congresos

Duncan, N.; Padros, F.; Aguilera, C.; Montero, F.E.; Norambuena, F.; **Carazo**, I.; Carbó, R.; Estévez, A. (2007). Domestication and GnRHa induced-spawning of meagre (*Agyrosomus regius*). A: **8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish**. Saint Maló (France), 3 - 8 June, 2007 (Póster).

Duncan, N.; Porta, J.; **Carazo, I.**; Porta, J.M.; Agulleiro, M.J.; Cerdà, J. (2007). Genetic diversity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) stocks reared in captivity. A: **Proceedings 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish**. Saint Maló (France), 3 - 8 June 2007, 318 (Comunicación Oral).

Estévez, A.; Gisbert, E.; **Carazo, I.**; Norambuena, F.; Vallés, R.; Duncan, N. (2009). Egg quality and biochemical composition from meagre broodstock (*Argyrosomus regius*). A: **Larvi 2009: 5th fish & shellfish larviculture symposium**. Ghent (Belgium), 7 - 10 September 2009 (Poster).

Norambuena, F.; Estévez, A.; Andrés, M.; **Carazo, I.**; Duncan, N. (2008). Preliminary comparison of nutritional status of wild and cultured broodstock of Senegal sole (*Solea senegalensis*). A: **XIII International Symposium on Fish Nutrition and Feeding**. Florianópolis (Brasil), 1 - 5 June, 2008 (Poster).

#### Publicaciones

Duncan, N.; Estévez, A.; Padros, F.; Aguilera, C.; Montero, F.E.; Norambuena, F.; **Carazo, I.**; Carbó, R.; Mylonas, C.C. (2008). Acclimation to captivity and GnRHa-induced-spawning of meagre (*Agyrosomus regius*). *Cybium. International Journal of Ichthyology* **32** (2):332-333.

Duncan, N.; Porta, J.; **Carazo, I.**; Porta, J.M.; Agulleiro, M.J.; Cerdà, J. (2008). Genetic diversity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) stocks reared in captivity. *Cybium. International Journal of Ichthyology* **32** (2):336-336.

Roque, A.; Yavuzcan Yildiz, H.; **Carazo, I.**; Duncan, N. (2010). Physiological stress responses of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) exposure. *Aquaculture* **304** (1-4):104-107.

Norambuena, F., Estévez, A., Bell, J.G., Carazo, I., Duncan, N.J. 2012. Proximal and fatty acid composition in muscle, liver and gonads of wild versus cultured broodstock of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 356-357: 176-185

Norambuena, F., Estévez, A., Mañanós, E., Bell, J.G., Carazo, I., Navarro, J.C., Duncan, N. 2012. Self-selection of diets with different content of Arachidonic acid by Senegalese sole (*Solea senegalensis*) broodstock. *Aquaculture*, 364-365: 198-205

### Participación en Proyectos

Estudio del efecto del ambiente (temperatura) y del comportamiento (densidad poblacional) en la puesta de lenguado senegalés (*solea senegalensis*) nacido en cautividad (generación f1)

No del proyecto: rta2005-00113-00-00

Entidad financiadora: instituto nacional de investigación y tecnología agraria y alimentaria (INIA)

Duración desde: dic 2005 hasta: dic 2008

Investigador/a principal: **Dr. Neil Duncan**

Plan nacional cultivo del lenguado iii. Bases para el control de la reproducción y conocimiento del sistema de defensas naturales en el lenguado (*solea senegalensis*).

Nº del proyecto: PNCM/2009

Entidad financiadora: junta nacional asesora de cultivos marinos (jacumar).

Duración desde: enero 2009 hasta: dic 2011

Investigador/a principal: coordinador nacional: Dr. Pedro Cañavate

Coordinador Cataluña: **Dr. Neil Duncan**

Plan nacional cultivo del lenguado ii. Análisis y estudio de factores de cultivo que condicionan la producción industrial del lenguado senegalés (*solea senegalensis*).

Entidad financiadora: junta nacional asesora de cultivos marinos (jacumar).

Duración desde: abril 2006 hasta: abril 2009

Investigador/a principal: coordinador nacional: Dr. Pedro Cañavate

Coordinador Cataluña: **Dr. Neil Duncan**

Plan nacional de cría de corvina (*Argyrosomus regius*), acrónimo : PLANACOR

Entidad financiadora: junta nacional asesora de cultivos marinos (jacumar), planes nacionales de cultivos marinos.

Duración desde: abril 2005 hasta: abril 2008

Investigador/a principal: Biol. Salvador cárdenas rojas

Coordinador Cataluña: **Dra. Alicia Estévez**

Participante del área de reproducción en cautividad: Neil Duncan

### Logística

Diseño del sistema de grabación e iluminación y registro de actividad por sensores, para el estudio del comportamiento nocturno del lenguado senegalés. Ignacio Carazo, Neil Duncan, Rafael Grass, Mike Hites.

Marcaje visual de lenguados para el reconocimiento videográfico. Ignacio Carazo.

### Estancias científicas en otros laboratorios y en el extranjero durante la realización de la tesis.

- **IEO** (Planta de Cultivos Marinos el Bocal) Instituto Español Oceanográfico (IEO) Santander, España, Investigador responsable: Dra. Olvido Chereguini: 3 meses (15/04/2008-4/05/2008, 15/03/2009-4/04/2009).
- **IATS** (Instituto de Acuicultura Torre La Sal), CSIC, Ribera de Cavanés, Castellón, España Investigador Responsable Dr. Evaristo Mañanós Duración: 3 semanas (desde 28/09/08 hasta 06/10/08 y 07/07/2010 hasta 20/7/2010).
- **Glasgow University** (Glasgow, Scotland, UK) Dra. Felicity Huntingford, 2 meses (15/09/2008 - 14/11/2008).
- **NOFIMA MARIN** (Ringvassøya, Trømso) Investigador responsable: Borge Damsgård: 2 meses (1/09/2009-1/11/2009).
- **CCMAR** (Campus de Gambelas) Faro, Algarbe, Portugal, Investigador Responsable: Dr. Peter Hubbard, 3 meses ( 25/1/2010-25/4/2010).

