



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología  
Universidad Nacional Autónoma de México



EFFECTO DE LA PROPORCIÓN SEXUAL EN LAS  
CONDUCTAS DE COMPETENCIA INTRA-SEXUAL Y DE  
CORTEJO EN *Hippocampus erectus* Y SU RELACIÓN CON  
LOS NIVELES DE ANDRÓGENOS CIRCULANTES.

**T E S I S**

que para obtener el grado académico de Maestro en Ciencias  
(Biología Marina)

*p r e s e n t a*

**SAYURI MUÑOZ ARROYO**

Director de Tesis: **DRA. MAITÉ MASCARÓ MIQUELAJÁUREGUI**

Comité Tutorial: **DR. XAVIER CHIAPPA CARRARA**  
**DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ**  
**DR. ALEJANDRO CÓRDOBA AGUILAR**  
**DR. ÓSCAR RÍOS CÁRDENAS**  
**DRA. ANA LILIA CERDA MOLINA**

Mérida Yuc., 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EFFECTO DE LA PROPORCIÓN SEXUAL EN LAS CONDUCTAS DE  
COMPETENCIA INTRA-SEXUAL Y DE CORTEJO EN *Hippocampus erectus* Y SU  
RELACIÓN CON LOS NIVELES DE ANDRÓGENOS CIRCULANTES.

COMITÉ JURADO

---

Dr. Roberto Domínguez Casalá  
Presidente

---

Dra. Maité Mascaró Miquelajáuregui  
Secretario

---

Dr. Xavier Chiappa Carrara  
Vocal

---

Dr. Alejandro Córdoba Aguilar  
Suplente

---

Dr. Óscar Ríos Cárdenas  
Suplente

## **DEDICATORIAS**

A mis padres, María de la Luz y José Manuel.

A Maurizio Mascherini por impulsarme a seguir adelante y compartir su vida conmigo.

A mis amigos y compañeros, Radha Flores, Leticia Jiménez, Hugo Enrique Ponce, Nicolás Vite y Ali Espinosa por sus consejos y apoyo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue realizado en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de la Facultad de Ciencias, UNAM con sede en Sisal, Yucatán, con el apoyo financiero de PAPIIT No. IN208009 y CONACyT Ciencia Básica 101610 bajo la dirección de la Dra. Maité Mascaró Miquelajáuregui.

Al Consejo Nacional De Ciencias Y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (240617) durante el periodo 2010-2012.

A la Dra. Maité Mascaró Miquelajáuregui por permitirme formar parte del proyecto y por lo aprendido durante este proceso formativo.

A los integrantes del jurado Dr. Roberto Domínguez Casalá, Dr. Xavier Chiappa Carrara, Dr. Alejandro Córdoba Aguilar, Dr. Óscar Ríos Cárdenas y asesor externo Dra. Ana Lilia Cerda Molina, por sus comentarios y aportaciones.

A los Técnicos Académicos M. en C. Gemma Martínez y M. en C. Alfredo Gallardo y al equipo de caballito de mar de la UMDI.

## RESUMEN

Los roles sexuales son convencionales cuando las hembras son el recurso limitante para el éxito reproductivo de los machos, y por lo tanto, éstos últimos compiten más intensamente por el acceso a la pareja que las primeras; el patrón inverso produce roles sexuales invertidos. Actualmente se considera que los roles sexuales presentan gran plasticidad y pueden variar marcadamente entre poblaciones de una misma especie, o incluso dentro de una misma población a lo largo del tiempo, y fluctúan dependiendo de factores ambientales como la densidad poblacional y la movilidad de los individuos. Por otra parte, en los peces teleósteos la testosterona (T) y 11-cetotestosterona (11-KT) estimulan la expresión de los comportamientos sexuales y agresivos en los machos, mientras que se ha sugerido que la T promueve el comportamiento agresivo en las hembras. Además, los andrógenos pueden ser modificados por la interacción entre co-específicos, y se sugiere una relación bidireccional entre los andrógenos y la conducta.

En el presente estudio se analizaron las alteraciones en los comportamientos de cortejo y competencia en los machos y hembras de *Hippocampus erectus* asociadas a cambios contrastantes en la proporción sexual (3:1 a 1:1 a 1:3 hembras: machos), y su relación con los niveles circulantes de 11K-T y T en machos y hembras respectivamente. Los resultados confirmaron roles sexuales convencionales, por lo que se sugiere que existe una plasticidad limitada con respecto a este rasgo conductual. La menor plasticidad en los roles sexuales de *H. erectus* podría explicarse si la función del cortejo asociada a la selección y competencia sexual no fuera tan relevante en la población, y que las señales transmitidas a través de éste tuvieran un mayor valor como sincronizador reproductivo, asegurando una cópula exitosa. Además no hubo una variación consistente en los niveles circulantes de 11-KT y T entre tratamientos, lo cual concuerda con los resultados conductuales. No hubo diferencias entre los niveles de andrógenos en los distintos tratamientos, y las correlaciones entre dichos niveles y la conducta de cortejo y competencia en ambos sexos fueron en general no significativas (salvo entre la 11-KT y el cortejo de los machos del tratamiento 3:1). A pesar de lo anterior, con base en los resultados sugiero que la escala temporal en la que fueron tomadas las muestras de sangre influye en los niveles hormonales registrados, por lo que, se sugiere que los andrógenos deben ser medidos cada día de observación para mostrar un patrón temporal que se corresponda con aquel de la conducta.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIAS.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
RESUMEN.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
1.INTRODUCCIÓN.....	1
2.ANTECEDENTES.....	4
2.1 Selección sexual y patrones de selección sexual.....	4
2.2 Inversión de roles sexuales en los Syngnatidos.....	6
2.3 Regulación neuroendocrina de la conducta reproductiva en peces teleósteos.....	8
2.4 <i>Hippocampus erectus</i> .....	11
3.OBJETIVOS.....	14
4. HIPÓTESIS.....	14
5.MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1 Obtención y mantenimiento de los organismos experimentales.....	15
5.2 Diseño experimental.....	17
5.3 Análisis estadístico.....	20
6.RESULTADOS.....	23
6.1 Identificación de comportamiento de cortejo y de competencia.....	23
6.2. Experimentos de alteración de la proporción sexual.....	23
6.3. Conductas de cortejo y competencia intra-sexual relevantes (a partir del RDA).....	32
6.4. Análisis de los niveles hormonales.....	32
7.DISCUSIÓN.....	37
8.CONCLUSIONES.....	47
BIBLIOGRAFIA CITADA.....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribución de <i>Hippocampues erectus</i> (Lourie et al., 2004).....	11
Figura 2. Diagrama mostrando el sistema de recirculación cerrado conectando los acuarios de mantenimiento y experimentales donde se mantuvieron los <i>H. erectus</i> durante este estudio.....	16
Figura 3. Diagrama mostrando las combinaciones de machos y hembras de <i>H. erectus</i> para la ejecución de los experimentos del efecto de la alteración de la proporción sexual en los comportamientos de cortejo y de competencia de machos y hembras. Los organismos focales se denotan dentro del círculo y los modelos fuera de éste.....	20
Figura 4. Diagrama triplot resultado del análisis de redundancia aplicado a las 13 variables conductuales y los factores “sexo” y “tratamiento” (proporción H:M) de los individuos <i>H. erectus</i> de la matriz 1 (A) y 2 (B) indicando la ordenación de las muestras con respecto a los dos primeros ejes canónicos. Los acrónimos empleados para las conductas fueron: SujetSO = sujetar al sexo opuesto, SegSO = seguir al sexo opuesto, Carav = caravana, Apunt = apuntar, Chasq = chasquido, Bomb = bombo, SujetMS = sujetar al mismo sexo, SegMS = seguir al mismo sexo, Retor = retorcerse, Constr = constreñir, Inter = interposición.....	31
Figura 5. Frecuencia de los comportamientos de cortejo A) “seguir”, B) “sujetar”, C) “caravana”, y D) “bombo” presentados por los machos y E) “apuntar” por las hembras de <i>H. erectus</i> en los experimentos con proporciones sexuales contrastantes: tratamientos con 3:1, 1:1 y 1:3 H:M. Los datos son valores promedio ( $\pm$ error estándar) de n= 8 réplicas correspondiente a los dos bloques. Notar cambio de escala.....	34
Figura 6. Frecuencia de los comportamientos de competencia intra-sexual A) “seguir”, B) “sujetar”, C) “interposición”, D) “golpear” y E) “retorcerse” presentados por los machos <i>H. erectus</i> en los experimentos con proporciones sexuales contrastantes: tratamientos con 1:1 y 1:3 H:M. Los datos son valores promedio ( $\pm$ error estándar) de n= 8 réplicas correspondiente a los dos bloques. Notar cambio de escala.....	35
Figura 7. A) Correlación entre niveles de 11-KT y frecuencia de conductas de cortejo para los tratamientos 3:1, 1:1 y 1:3, y B) de los niveles de 11-KT y conductas de competencia para los tratamientos 1:1 y 1:3, en el día 5 de observación presentada por los machos de <i>H. erectus</i> respectivamente. Los datos son raíces cuadradas de n= 7 réplicas para el tratamiento 3:1, n= 4 réplicas para el tratamiento 1:1, y n=6 réplicas para el tratamiento 1:3 y, de n= 3 réplicas para el tratamiento 1:1, y n=6 réplicas para el tratamiento 1:3 correspondiente a los dos bloques de cada correlación respectivamente.....	36

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de los comportamientos de cortejo y competencia intra-sexual desplegados por hembras, machos o ambos sexos de <i>H. erectus</i> en el contexto reproductivo, y estando en una proporción sexual paritaria (1H:1M).....	25
Tabla 2. Resultados del análisis de redundancia (RDA) para los cuatro primeros ejes de ordenación de las frecuencias de ocurrencia de conductas presentadas por hembras y machos de <i>H. erectus</i> en tratamientos con proporciones sexuales contrastantes (3:1, 1:1 y 1:3 H:M). Los datos fueron analizados en la matriz 1 y 2 por separado. Los resultados son: los eigenvalores de cada eje; índice de correlación de Pearson (r) entre las variables ambientales y los ejes canónicos; porcentaje de la	



varianza total explicada por cada eje, y por cada eje canónico; sumatoria de la varianza explicada por los ejes canónicos.....28

Tabla 3. Resultados de las prueba de permutación de Monte Carlo aplicadas a los eigenvalores de los ejes canónicos que resultaron del análisis de redundancia (RDA; Tabla 2) aplicado las frecuencias de ocurrencia de conductas presentadas por hembras y machos de *H. erectus* en tratamientos con proporciones sexuales contrastantes (3:1, 1:1 y 1:3 H:M). Los datos fueron analizados en la matriz 1 y 2 por separado. Los resultados son los valores del estadístico  $F$  y la probabilidad  $p$  asociada a dicho valor bajo la hipótesis nula (empírica).....28

## 1. INTRODUCCIÓN

En los caballitos de mar, como en otras especies de la familia Syngnathidae, los machos son los encargados de la gestación (Vincent, 1992). Sin embargo, el cuidado parental a cargo de los machos no es sinónimo de inversión de los roles sexuales (Gronell, 1984; Vincent *et al.*, 1992; Foster y Vincent, 2004). Una especie presenta roles sexuales convencionales cuando las hembras son el recurso limitante para el éxito reproductivo de los machos, y por lo tanto, éstos últimos compiten más intensamente por el acceso a la pareja que las primeras (Anderson, 1994; Clutton-Brock y Vincent, 1991); cuando hay un patrón inverso los roles sexuales están invertidos (Trivers, 1972; Williams, 1975; Anderson, 1994; Berglund *et al.*, 1986 ab; Berglund *et al.*, 1989; Clutton-Brock y Vincent, 1991; Clutton-Brock y Parker, 1992).

La intensidad y dirección de la selección sexual (roles sexuales) está determinada por las diferencias entre el número de machos y hembras disponibles para la reproducción en un lugar y un momento dado, ya que éstas definen el sexo que se constituye como el recurso limitante del potencial reproductivo del otro. Mientras que estas nociones han servido para identificar de forma general los roles sexuales de una especie (Emlen y Orgin, 1977; Clutton-Brock y Vincent, 1991; Vincent, 1992; Clutton-Brock y Parker, 1992), recientemente se ha reconocido que los roles sexuales pueden variar marcadamente entre poblaciones de una misma especie (Koko y Rankin, 2006) o incluso dentro de una misma población a lo largo del tiempo (Okuda, 1999).

Las hormonas y su papel regulador han sido un recurrente objeto de estudio en la búsqueda de las causas proximales (mecanismos bioquímicos, fisiológicos) que explican la conducta. En los peces teleósteos, la testosterona (T) y la 11-cetotestosterona (11-KT) estimulan la expresión de las conductas reproductivas (cortejo y competencia) y el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios de los machos (Kime, 1993; Moyle *et al.*, 2004; Saraiva *et al.*, 2010); mientras que se ha sugerido que la T promueve el comportamiento agresivo en las hembras (Goncalves y Oliveira, 2010). De acuerdo con algunos autores, el patrón de variación de los andrógenos se encuentra también en función del cuidado parental

y del sistema de apareamiento (Wingfield *et al.*, 1990; Oliveira *et al.*, 2001). La presencia atípica de la inversión de los roles sexuales en los peces pipa ha brindado la oportunidad para investigar la base hormonal de las diferencias sexuales en el comportamiento reproductivo y parental (Mayer *et al.*, 1993), pero la información sobre estos aspectos en los caballitos es muy escasa (Scobell y Mackenzie, 2011). *Hippocampus erectus* junto con el caballito de mar enano *H. zosterae*, y *H. reidi* son las tres especies que habitan el Atlántico mexicano, mientras que en la costa del Pacífico mexicano se distribuye *H. ingens* (Lourie *et al.*, 2004). En particular, *H. erectus* se ha considerado de gran importancia económica para la medicina tradicional y como especie de ornato (Correa *et al.*, 1989; Vincent, 1990; Scarratt, 1995; Lourie *et al.*, 1999). Las poblaciones de caballitos de mar en México se pescan incidentalmente por barcos de arrastre camaronero y otras pesquerías que usan redes inapropiadas (Baum *et al.*, 2003). Además son afectadas por la degradación de los ambientes costeros en los que habitan (Walker *et al.*, 1989). Esto, aunado a algunas de sus características biológicas, como poca movilidad, distribución amplia, somera y fácil captura (Foster y Vincent, 2004), y con base en el Principio Precautorio, hizo que en el 2003 *H. erectus* fuera clasificado como vulnerable (Código VU A4cd) en la lista de especies amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (IUCN; <<http://www.iucnredlist.org>>). En este mismo sentido y como una medida de conservación, el género *Hippocampus* en su totalidad fue incluido en el Apéndice II del CITES en noviembre de 2002. Actualmente se ha logrado el cultivo exitoso de varias especies de caballitos (Vincent, 1995; Masonjones y Lewis, 1996; Lockyear *et al.*, 1997; Woods, 2000; Silveira, 2000; Payne y Rippingale, 2000; Faleiro *et al.*, 2008). Sin embargo, se desconocen algunos rasgos importantes de la conducta sexual y las condiciones requeridas para estimular la reproducción de la mayoría de las especies.

En el presente estudio se analizaron las alteraciones en los comportamientos de cortejo y competencia en los machos y hembras de *H. erectus* asociados a los cambios en la proporción sexual, y su relación con los niveles de andrógenos circulantes. Con base en la información obtenida, es posible que se pueda mejorar la reproducción en cautiverio de la especie, volviéndola más eficiente y rentable. El suministro de especímenes cultivados al

mercado ornamental ayudará a disminuir las presiones por pesca que actualmente recaen en las poblaciones naturales, fortaleciendo los pasos hacia la conservación de la especie.

## 2. ANTECEDENTES

### *2.1 Selección sexual y patrones de selección sexual*

El concepto de selección sexual inicialmente propuesto por Darwin en 1871 explica las diferencias en el éxito reproductivo de machos y hembras y se basa en dos mecanismos: la selección intersexual, donde los individuos de un sexo (normalmente las hembras) eligen a individuos del sexo opuesto basándose en características morfológicas y conductuales conspicuas, y la selección intra-sexual o competencia entre los individuos del mismo sexo (por lo general los machos) para acceder a las parejas sexuales e involucra rasgos morfológicos y conductuales que aventajan a alguno de los individuos (Anderson, 1994; Jones y Ratterman 2009).

Se ha sugerido que los roles sexuales se definen inicialmente a partir de las diferencias en los gametos entre los sexos, o “anisogamia” (Anderson e Iwasa, 1996), en donde el éxito reproductivo de las hembras se ve limitado por el acceso a los recursos para producir gametos grandes y energéticamente costosos (Bateman, 1948), mientras que en los machos se ve limitado por la disponibilidad de parejas sexuales (Anderson, 1994). Esto dio lugar al concepto de inversión parental (IP), que se refiere al tiempo y energía que cada padre invierte en su descendencia desde la formación de los gametos (Trivers, 1972). Al aumentar la IP se incrementa la probabilidad de supervivencia de la descendencia a costa de la posibilidad de ese progenitor de invertir en la descendencia futura. Si las hembras invierten mayor energía en sus gametos y proveen de mayor cuidado parental (Clutton-Brock, 1991), su IP excede a la de los machos, lo que afecta la cantidad de hembras disponibles para ser fertilizadas. Así, la intensidad de la selección sexual, y por ende la competencia, serán más fuertes en el sexo que invierte menos recursos en la descendencia (usualmente los machos; Andersson e Iwasa, 1996).

Una revisión de la teoría de la selección sexual basada en la IP sugirió a la proporción sexual operativa (OSR, “proporción de hembras fertilizables por machos

sexualmente activos en una población en un lugar y un tiempo dado”) como una medida empírica de los sesgos sexuales (Emlen y Oring, 1977). Esta medida, considera a los individuos sexualmente maduros que además están disponibles para reproducirse (e. g. no están preñados, no tienen pareja, o ambas; Emlen y Oring, 1977). Las poblaciones con una OSR sesgada hacia los machos hace que sean ellos los que compiten más por el acceso a las hembras y éstas sean el recurso limitante (roles convencionales). En las poblaciones donde la OSR esta sesgada hacia las hembras, se predice un patrón inverso (roles sexuales invertidos; Emlen y Oring, 1977).

Debido a que la selección sexual medida a través de la IP y la ORS no siempre puede estimarse experimentalmente (Knapton, 1984; Clutton-Brock y Vincent, 1991) se ha propuesto el concepto de tasa reproductiva potencial (PRR, “máximo número de descendencia independiente que cada sexo puede producir por unidad de tiempo”) como una medida alternativa para predecir los roles sexuales, particularmente para especies que presentan cuidado parental (Clutton Brock, y Vincent, 1991; Clutton-Brock y Parker, 1992). Así, independientemente de cuál sea el sexo proveedor del cuidado parental, el sexo con una PRR mayor competirá más intensamente por obtener pareja (Clutton-Brock y Vincent, 1991). También se ha sugerido que los roles de ambos sexos están determinados por una combinación de PRR, la OSR, y los periodos que cada sexo dedica a actividades reproductivas diversas (“time out”; e. g. recuperarse de un evento de apareamiento, en el cuidado de las crías, o ambas) y aquellos en que cada sexo se encuentra disponible para aparearse (“time in”; Clutton-Brock y Parker, 1992; Parker y Simmons, 1996).

La variación en el éxito de apareamiento propuesta por Bateman se formuló cuantitativamente como la “oportunidad de selección sexual” ( $I_s$ ) (Crow 1958; Wade, 1979; Arnold y Wade, 1984). Actualmente gran parte de las teorías predicen que la intensidad de la selección sexual está determinada por la OSR y puede estimarse con una medida estandarizada de la variación intra-sexual en el éxito de apareamiento (Wade, 1979; Klug *et al.*, 2010). La intensidad de la selección sexual en un determinado sexo aumenta conforme aumenta la  $I_s$ , basado en la premisa de que cuanto mayor sea la variación en la adecuación, mayor será la intensidad de la selección (Shuster y Wade, 2003). Sin embargo, a pesar de que la OSR y la  $I_s$  son ampliamente utilizadas para medir la intensidad de la selección, sus

predicciones son exactas únicamente cuando la monopolización de la pareja es extremadamente fuerte (Klug *et al.*, 2010). De acuerdo con Shuster y Wade (2003)  $I_{mates}$  es una mejor medida estandarizada de la intensidad de la selección sexual, debido a que resulta de la competencia entre los machos por las parejas y mide la intensidad de la selección sexual derivada de la variación en el número de parejas de estos (Wade, 1979; Wade y Arnold, 1980; Wade 1995).

Mientras que en sus inicios se contemplaban los roles sexuales de forma relativamente estática, las revisiones más recientes de la teoría sexual predicen variaciones en los roles sexuales como resultado de fluctuaciones en factores ambientales determinantes para la reproducción, como la temperatura y la disponibilidad de alimento, en la PRR de ambos sexos, y la ORS (Kokko y Rankin, 2006). Estas fluctuaciones generan cambios tanto en la intensidad como en la dirección de la selección sexual. La densidad poblacional y la movilidad de los individuos pueden tener un fuerte efecto sobre los roles sexuales, lo que estimula la plasticidad de estos rasgos (Kokko y Jonstone, 2002), tanto entre poblaciones como en una misma población a lo largo del tiempo (Kvarnemo y Ahnesjö, 1996; Almada *et al.*, 1995).

## 2.2 *Inversión de roles sexuales en los syngnátidos.*

Se habla de roles sexuales invertidos cuando las hembras presentan mayor competencia por una pareja sexual, tienen mayor variación en el éxito reproductivo y desarrollan caracteres sexuales secundarios más conspicuos, así como despliegues de cortejo más intensos que los machos (Emlen y Oring, 1977; Berglund *et al.*, 1989; Clutton-Brock y Vincent, 1991; Clutton-Brock y Parker, 1992; Anderson, 1994). Se pueden esperar roles sexuales invertidos en especies en las que los machos almacenan huevos, embriones o ambos en su cuerpo, ya que existirán en ellos restricciones en la disponibilidad de espacio, actividades alimentarias, “time in”, etc. (Kuwamura, 1985; Balshine-Earn y Mc Andrew, 1995; Sweson, 1997). También sería de esperar dicha inversión, en aquellas especies donde los machos presenten cuidado parental muy prolongado o construyen nidos (Sweson, 1997),

lo que generará una limitación en el tamaño y la cantidad de descendencia en este sexo comparado con las hembras (Vincent *et al.*, 1992).

Dada la alta especialización funcional del marsupio y el cuidado parental prolongado (Carpucino *et al.*, 2002), los primeros estudios con caballitos de mar asumieron roles sexuales invertidos, y sólo estudios posteriores reportaron que los hipocampos presentan roles sexuales convencionales (Vincent, 1994b; Masonjones y Lewis, 2000). Muchos de los estudios más recientes apoyan la hipótesis propuesta por Clutton-Brock y Vincent (1991) en el sentido de que los machos con una PRR alta compite más intensamente por la pareja que las hembras. A partir de los resultados de estudios sobre *Hippocampus fuscus* (Vincent, 1994ab) se sugirió que entre los individuos que están en busca de pareja la OSR se encuentra sesgada hacia los machos, debido a que permanecen receptivos por periodos más largos que las hembras promoviendo la competencia entre machos. En el mismo sentido, en *Hippocampus zosterae* se observó una PRR alta en los machos y un bajo “time out” reproductivo comparado con las hembras (Masonjones y Lewis, 2000).

A pesar de lo anterior, en algunas poblaciones de caballitos donde se presentan agregaciones numerosas como parte de su estructura social (*Hippocampus abdominalis*: Wilson y Martin-Smith 2007; *Hippocampus guttulatus*: Naud *et al.* 2009; *Hippocampus subelongatus*: Kvarnemo *et al.*, 2000), se han reportado evidencias de selección sexual operando entre las hembras, a favor de aquellas con las mayores tallas (Kvarnemo *et al.*, 2007). En el estudio referido, la proporción sexual estuvo fuertemente sesgada hacia la hembras, y los autores reportaron una frecuencia alta de cambios de pareja de un evento reproductivo a otro (Kvarnemo *et al.*, 2000). Si algunos factores como la densidad, la movilidad y la proporción sexual son determinantes en los roles sexuales (Wilson y Martin-Smith 2007; Koko y Rankin, 2006), entonces la plasticidad de estos rasgos puede ser evaluada por medio de la presentación de individuos de ambos sexos bajo distintos contextos sociales.

En varios hipocampos se presentan conductas denominados saludos diarios (“daily greetings”) cuya función ha sido asociada al reforzamiento de los vínculos de la pareja y a proporcionar información sobre su condición reproductiva (Vincent, 1995). Evaluar



diariamente a la pareja durante la preñez permite a la hembra sincronizar la hidratación de los huevos con el parto en el macho, posiblemente reduciendo el intervalo entre eventos reproductivos. Otros autores han sugerido que los saludos diarios entre individuos con acceso a múltiples parejas podrían constituir un mecanismo de estimación del tamaño o alguna otra característica asociada a la calidad de la pareja (Naud *et al.* 2009). Los reportes indican que tanto los saludos diarios como el cortejo en los caballitos constituyen un ritual prolongado, estructurado y complejo (Vincent, 1994a; Masonjones y Lewis, 1996; Jiménez *et al.*, 2011).

Considerando que en el contexto reproductivo la competencia se puede definir como cualquier interacción intra o intersexual para adquirir más parejas que los rivales (Kvarnemo y Ahnesjö, 1996), algunas de las conductas consideradas de cortejo en varias especies de *Hippocampus* también han sido reportadas como competencia intra-sexual (Vincent, 1994a; Vincent y Sadler, 1995; Faleiro *et al.* 2008; Naud *et al.* 2009; Wilson y Matin-Smith, 2007; Mattle y Wilson, 2009; Masonjones y Lewis, 2000; Fiedler, 1954). Aunque éstas no parecen ser importantes en el mantenimiento de la pareja (Vincent, 1995), no se conoce su repercusión en lo que se refiere a la adquisición de la misma. Observaciones de *Hippocampus erectus* en cautiverio revelaron una frecuencia muy alta de comportamientos de cortejo y competencia por parte de machos recién paridos, especialmente bajo condiciones de alta densidad. Experimentos para evaluar la forma como cambia la frecuencia de comportamientos relacionados con la adquisición de la pareja (cortejo y competencia) dependiendo del contexto social brindarían información sobre su papel funcional en estos organismos.

### 2.3 Regulación neuroendocrina de la conducta reproductiva en peces teleósteos

El sistema endocrino de los peces, como el de otros vertebrados, está íntimamente asociado al sistema nervioso y juntos actúan en la coordinación del proceso reproductivo (Criscuolo, 2005). La recepción de estímulos ambientales y sociales por los receptores sensoriales de los centros nerviosos desencadenan una cascada de eventos en el eje neuroendocrino reproductivo que involucra órganos jerárquicamente relacionados

(Criscuolo, 2005; Zanuy *et al.*, 2009). En cada nivel del eje, un número limitado de células blanco está bajo la influencia de diversas sustancias mediadoras. La respuesta celular final resulta de los efectos integrados de estos mediadores sobre los componentes de la transducción de señales intracelulares (Criscuolo, 2005).

La percepción de estímulos ambientales regida por el sistema nervioso incluye el paso de la información desde los receptores sensoriales hasta el hipotálamo en el cerebro, órgano encargado de disparar la actividad de la glándula pituitaria o hipófisis, por medio de hormonas liberadoras de gonadotrofinas (GnRH). Éstas estimulan la liberación de gonadotropinas por la pituitaria (LH y FSH) a la circulación sanguínea (Zanuy *et al.*, 2009; Moyle *et al.*, 2004), cuyo destino es la gónada. En la gónada se sintetizan esteroides sexuales que regulan tanto la producción de gametos, como de respuestas fisiológicas y conductuales específicas (Maruska *et al.*, 2009; Zanuy *et al.*, 2009; Moyle *et al.*, 2004; Oliveira y Goncalves, 2008). Si la percepción del contexto social juega un papel importante en la expresión de la conducta a través de mecanismos de regulación neuro-endócrina, entonces la conducta se corresponderá con los niveles de andrógenos en cada sexo dependiendo del contexto social.

La relación entre la competencia entre machos y los niveles de andrógenos circulantes fue la base para plantear la hipótesis del reto (“challenge hypothesis”) propuesta por Wingfield, *et al.* (1990). Esta hipótesis se refiere a la frecuencia e intensidad de las conductas de competencia entre machos (e. g. establecimiento y mantenimiento de un territorio reproductivo y el resguardo de la pareja), y su relación directa con los niveles circulantes de andrógenos. La interacción entre machos funciona como un circuito de retroalimentación positiva, en donde al aumentar los niveles de andrógenos se eleva la frecuencia e intensidad de las conductas de competencia. Dichos niveles permanecen en un nivel máximo hasta que el estímulo que las produce desaparece (e. g. un macho es rechazado por una hembra o ésta deja de ser receptiva), haciendo que éstos caigan nuevamente hasta su línea base inicial.

En los peces teleósteos la 11-cetotestosterona (11-KT) es el andrógeno predominante en los machos, y circula en concentraciones más altas que la testosterona (T) (Nagahama, 1994). Ambos estimulan la expresión de las conductas reproductivas, el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y la espermatogénesis en estos organismos (Kime, 1993; Moyle *et al.*, 2004; Saraiva *et al.*, 2010). Las variaciones en los niveles de 11-KT se asocian con conductas reproductivas, territoriales y de cuidado parental en muchos peces (Mayer *et al.*, 2004; Maruska *et al.*, 2009), y son regulados por el ambiente social (Oliveira *et al.*, 2002).

Por su parte, los peces hembra producen principalmente hormonas estrogénicas. El estrógeno con mayor actividad biológica es el 17 *B*-estradiol (E2) que estimula la producción de vitelogenina (VGT), el fosfoglicopeptido precursor de la yema. Durante la vitelogénesis los niveles de E2 y T se elevan, y los ovocitos aumentan de tamaño (Nagahama, 1994; Moyle *et al.*, 2004). Al finalizar la vitelogénesis la concentración de T y E2 disminuyen y aumenta la de progesterona 17,20 $\beta$ -P, hormona inductora de la maduración (MIH) de los ovocitos (Nagahama, 1994), cuya función también ha sido atribuida a la de una feromona preovulatoria (Sorensen *et al.*, 1995; Stacey, 2003). Las prostaglandinas (PG) inducen la liberación del ovocito maduro del folículo ovárico “ovulación”, siendo la PGF2 $\alpha$  la más potente (Nagahama, 1994). Las PG tienen tres funciones: 1) actúan de forma parácrina estimulando la ruptura folicular, 2) activan la receptividad sexual de la hembra y el comportamiento de desove, 3) actúan como feromonas postovulatorias (Sorensen y Goetz, 1993; Stacey, 2003).

Existen pocos estudios acerca de la regulación hormonal del comportamiento en las hembras, y se ha sugerido que la T promueve el comportamiento agresivo (Goncalves y Oliveira, 2010; Munro y Pitcher, 1985).

Las diferencias hormonales entre los dos sexos muestran que en los machos, los niveles de E2 en el plasma son muy bajos o indetectables, y los de 11-KT son elevados, mientras que se presenta un patrón inverso en las hembras (Oliveira y Goncalves, 2008). Los niveles de T, sin embargo, no exhiben esta diferencia sexual, y dado que la T es un precursor

bioquímico en la síntesis de 11-KT y E2, normalmente se encuentran en niveles similares en ambos sexos (Oliveira y Goncalves, 2008; Godwin, 2010).

A pesar de que a partir de algunos de los primeros estudios se propuso que niveles elevados de andrógenos eran responsables de la inversión de los roles sexuales (Höhn y Cheng, 1967), no se ha logrado confirmar que las hembras presenten niveles elevados de andrógenos, ni en peces (e.g. *Nerophis ophidion*, *Syngnathus taylori*, *S. acus*: Mayer *et al.*, 1993) ni en otros grupos (Eens y Pinxten, 2000), y probablemente se debe a que los esteroides también regulan la diferenciación sexual, los aspectos fisiológicos de la reproducción y el desarrollo de caracteres sexuales primarios y secundarios (Oring y Fivizzani, 1991; Nelson, 2005).

#### 2.4 *Hippocampus erectus*

*Hippocampus erectus* se distribuye en la costa oeste del Atlántico, desde el Sur de Nueva Escocia en Canadá, hasta Venezuela, pasando por el Golfo de México y el Caribe (Figura 1, Robins y Ray, 1986; Lourie *et al.*, 1999; Lourie *et al.*, 2004). Sin embargo, hay reportes donde se extienden hasta las Guyanas, Brasil, Uruguay y Argentina (Lourie *et al.*, 2004, figura 1). Habita zonas costeras, lagunas y estuarios donde abundan las praderas de *Thalassia* spp, *Zoostera* spp y *Sargassum* spp., y es considerada una especie capaz de tolerar amplios rangos de temperatura (5.0 a 29.9 °C) y salinidad (10.0 a 36.6 ‰; Teixeira y Musick, 2001).

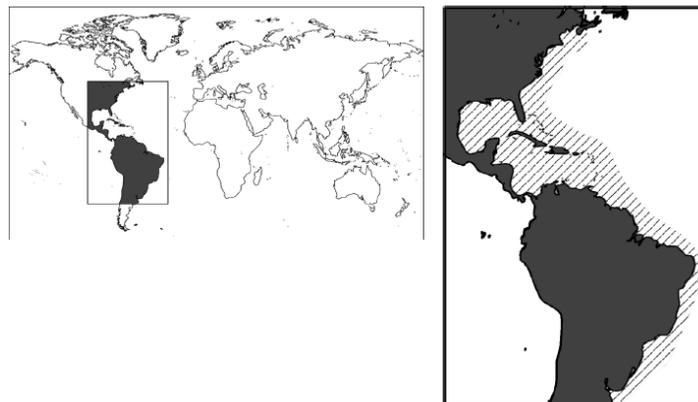


Figura 1. Mapa de distribución de *Hippocampus erectus* (Lourie *et al.*, 2004).

En la etapa adulta *H. erectus* alcanza una talla máxima de 19.0 cm (Lourie *et al.*, 1999). Presentan un dimorfismo sexual incipiente que consiste en la posición de las aberturas genital y anal (Foster y Vincent, 2004). En general, machos y hembras tienen altura total (AT) similar, aunque las proporciones de ciertas partes del cuerpo difieren de un sexo al otro (Lourie *et al.*, 2004; Curtis y Vincent, 2006).

Las hembras de *H. erectus* presentan desarrollo sincrónico (Teixeira y Musick, 2001) y son desovadoras por lotes (Selman *et al.*, 1991; Poortenaar *et al.*, 2004), mientras que el marsupio proporciona a los embriones protección, una correcta oxigenación, osmoregulación, y permite que los desechos embrionarios sean removidos a través de la sangre del macho (Carcupino *et al.*, 2002; Stolting y Wilson, 2007). La temporada reproductiva de *H. erectus* varía con la latitud, y depende directamente de la luz, la temperatura y la disponibilidad de alimento (Bye, 1984; Lin *et al.*, 2006; Foster y Vincent, 2004), pero en poblaciones de *H. erectus* en cautiverio la gestación varía de 12 a 22 días (Lin *et al.*, 2008b). Aunque los machos pueden presentar varios embarazos durante una temporada reproductiva, la frecuencia con la que cada individuo se reproduce no ha sido claramente establecida.

En un estudio de *H. erectus* en la Bahía de Chesapeake, Teixeira y Musick (2001) reportaron una abundancia baja (0.02% del total de peces colectados), el pico reproductivo en los meses relativamente cálidos del verano, y la proporción sexual (1:0.6 hembras:macho) fuertemente sesgada hacia las hembras (Teixeira y Musick, 2001). Además los autores reportan una mayor frecuencia de apareamientos entre individuos de tallas similares (“size-selective breeding”), sugiriendo que en esta población natural el macho se constituye como recurso limitante para el éxito reproductivo de las hembras, pues la cantidad de huevos transferidos depende de la capacidad del marsupio del macho (Teixeira y Musick, 2001). En nuestro país la información sobre *H. erectus* es escasa, pero en un estudio reciente sobre la población de la laguna de Chelem, Yucatán, se registró una proporción sexual en general paritaria, aunque ocasionalmente sesgada hacia las hembras (Jiménez *et al.*, 2011; Ponce *et*

*al.*, 2011). Los datos mostraron un aumento de la actividad reproductiva durante la época de nortes, cuando hay un incremento en la entrada de nutrientes y registran valores bajos de temperatura (20 a 24°C) e intermedios de salinidad (30 y 32 ups).

Con base en los conocimientos presentes sobre las características reproductivas de *H. erectus*, en el presente estudio se analizaron los cambios en los comportamientos de cortejo y competencia intra-sexual en ambos sexos de *H. erectus* asociado a tres proporciones sexuales contrastantes (3:1 a 1:1 a 1:3 hembras: machos) y su relación con los niveles de andrógenos (11-KT y T) circulantes.

### **3. OBJETIVOS (GENERALES Y ESPECÍFICOS)**

Describir y cuantificar los cambios en los comportamientos de cortejo y competencia intra-sexual en machos y hembras de *H. erectus* en función de la proporción sexual y su relación con los niveles de dos hormonas esteroides en sangre.

1.- Describir las conductas de cortejo y competencia intra-sexual en hembras y machos de *H. erectus*, identificando las que son exclusivas de cada sexo y aquéllas que se presentan en ambos.

2.- Cuantificar y comparar los cambios en la frecuencia de las conductas de cortejo y competencia intra-sexual en hembras y machos de *H. erectus* que han sido expuestos a alteraciones contrastantes de la proporción sexual.

3.- Cuantificar los niveles de testosterona (T) y 11-cetotestosterona (11-KT) circulantes en hembras y machos de *H. erectus*, respectivamente, que han sido expuestos a alteraciones contrastantes de la proporción sexual, y examinar su relación con los cambios conductuales que se registren.

### **4. HIPÓTESIS**

1.- La frecuencia de conductas de cortejo y competencia intra-sexual en los machos y hembras de *H. erectus* variarán en función de la proporción de ambos sexos como resultado de la influencia del contexto social en los roles sexuales.

2.- Los niveles circulantes de 11-cetotestosterona y testosterona variarán en los machos y las hembras de los diferentes tratamientos como resultado de la influencia del contexto social en los roles sexuales, y se corresponderán con cambios en la frecuencia de conductas de cortejo y competencia intra-sexual exhibida por los individuos de ambos sexos.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### *5.1 Obtención y mantenimiento de los organismos experimentales*

Los organismos fueron colectados mediante una red de arrastre tipo chinchorro o directamente con la mano en la Laguna de Chelem (21°15'47"N y 89°43'40" W) durante los meses de febrero a mayo de 2011. Se colectaron organismos adultos en buen estado de salud, y en números similares de machos y hembras. Los organismos capturados fueron identificados como machos con base en la presencia de marsupio, y su condición reproductiva fue identificada como preñado si el marsupio se observaba redondeado y sin embriones en el marsupio si este presentaba pliegues o se encontraba flácido (Lourie, 2003). El número total de organismos empleados para este estudio fue de 30 hembras y 30 machos (48 individuos focales y 12 modelos), con una altura promedio ( $\pm$  desviación estándar) de  $14.7 \pm 0.92$  y  $15.3 \pm 0.91$  cm en hembras y machos respectivamente, y el mínimo y máximo fue de 13.5 y 16.4 cm en hembras y 13.5 y 16.5 cm en machos.

Los caballitos de mar fueron transportados a las instalaciones de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación en Sisal en bolsas de plástico, con agua de la localidad y con aireación suministrada mediante una bomba portátil. Las bolsas se colocaron en hieleras para disminuir el metabolismo. Una vez en el laboratorio, la altura total (AT cm: altura desde la distancia máxima entre el extremo distal de la corona y la cola estando esta estirada) de todos los individuos fue registrada y éstos fueron etiquetados para su identificación individual con cuentas de chaquiras de vidrio de colores similares a la coloración que ostentaban. Las marcas se ataron con un monofilamento 100% nylon alrededor del cuello de los organismos. El uso de este tipo de marcas ha sido reportado como un procedimiento que no interfiere con el comportamiento reproductivo de los caballitos (Vincent y Sadler, 1995).

Los organismos fueron colocados y mantenidos en acuarios de vidrio de 30 x 50 x 70 cm (ancho, largo y alto) hasta ser usados en los experimentos. Los organismos se separaron por sexo y se aislaron visualmente permaneciendo de 4 a 5 organismos por



acuario. Dentro de los acuarios se colocaron estructuras artificiales (de rafia trenzada) simulando la vegetación sumergida. Los colores de dichas estructuras fueron similares a aquellos que caracterizan a la población de *H. erectus* en Chelem, (café oscuro, café claro, beige, blanco, gris, anaranjado y amarillo).

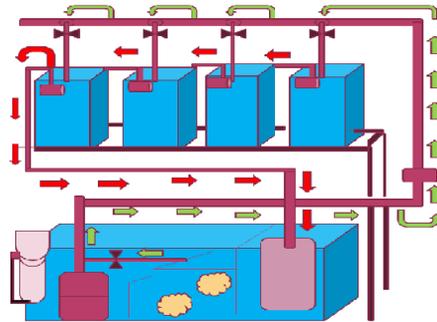


Figura 2. Diagrama mostrando el sistema de recirculación cerrado conectando los acuarios de mantenimiento y experimentales donde se mantuvieron los *H. erectus* durante este estudio.

Los acuarios formaban parte de un sistema cerrado de recirculación. Dicho sistema se encontraba conectado a un reservorio de 500 a 1000 litros con agua de mar filtrada y con tres filtros externos: dos mecánicos y uno biológico (Figura 2). Un 30% del agua del sistema fue cambiada una vez por semana con base en las mediciones semanales que se hicieron de los niveles de nitritos y amonio utilizando un kit comercial. Las condiciones fisicoquímicas generales del agua en los acuarios se mantuvieron siguiendo lo propuesto por Lin *et al.* (2008b) para el mantenimiento de esta especie en cautiverio (35 ‰ de salinidad; 28 °C de temperatura; 7.6-8.3 pH; > 6.5 mg/l de oxígeno disuelto). El fotoperiodo se mantuvo constante a 10 h oscuridad, 3 h media luz, 8 h de luminosidad total y 3 h de media luz. Se usaron periodos de 3 h de media luz, simulando el amanecer y atardecer, respectivamente, porque experimentos piloto permitieron identificar a éste como el periodo del día en que se presenta la mayor actividad sexual y social. Los organismos fueron alimentados 3 veces al día con una dieta de *Artemia spp.* viva y enriquecida con DHA-protein-Selco<sup>MR</sup> producto comercial usado en acuicultura (Hilomen-Garcia *et al.*, 2003; Quintas *et al.*, 2007) a fin de proveer a los organismos con componentes básicos de la dieta como ácidos grasos esenciales y vitaminas como la E y C, y ocasionalmente se les alimentó con anfípodos de agua dulce y marinos (*Melita planaterga*). La alimentación se realizó *ad libitum* tres veces al día. Dos

horas después de la alimentación se limpió el fondo de los acuarios retirando los restos de alimento mediante sifón (Lu *et al.*, 2001), y reponiendo los niveles de agua.

## 5.2 Diseño experimental

### *Identificación de conductas de cortejo y agonísticas*

Con la finalidad de identificar todos los comportamientos relativos al cortejo y competencia intra-sexual de machos y hembras de *H. erectus*, se hicieron observaciones de un total de 20 organismos (10 machos y 10 hembras). Para asegurar que los organismos estaban, en un estado reproductivo similar (los machos sin embriones en el marsupio, y las hembras en el periodo refractario pos-copulatorio), todos los animales solo fueron utilizados en los experimentos tras 2-3 semanas de aislamiento durante el mantenimiento.

Se colocaron individuos hembras y machos vacíos de tamaño similar en parejas aisladas (1:1), o de dos en dos parejas (1:1) en acuarios de vidrio transparente con las mismas dimensiones de los acuarios de mantenimiento y se registraron los comportamientos sexuales y de competencia de ambos sexos de manera continua durante 1 h cada día, comenzando a las 8:30 a.m., durante el periodo de media luz. Las observaciones permitieron la identificación y familiarización con las conductas que posteriormente fueron cuantificadas. Se llevó a cabo un procedimiento de observación y cuantificación (simultánea de dos observadores) de diferentes parejas de organismos cortejando, con la finalidad de controlar los sesgos por parte del observador, asegurando un 90% de concordancia entre dos observadores. Las observaciones se realizaron detrás de una cortina oscura para evitar que la presencia de los observadores alterara las conductas de los organismos. Se tomaron registros video grabados de cada pareja, con la finalidad de contar con un respaldo de la información generada, pero las conductas exhibidas fueron registradas en vivo. Los organismos fueron siempre alimentados después de las observaciones.

### *Efectos de la alteración de la proporción sexual*

Para cuantificar las modificaciones en las conductas de cortejo y competencia de *H. erectus* bajo distintas proporciones sexuales, se utilizaron tres tratamientos contrastantes:

sesgada hacia los machos, 1:3 H: M (tratamiento 1), paritaria o control, 1:1 H: M (tratamiento 2), y sesgada hacia las hembras, 3:1 H: M. En los tres casos la densidad de organismos se mantuvo constante (4 individuos) para que modificaciones en la conducta debidas a la probabilidad de encuentro en los acuarios (con las mismas dimensiones) no afectara los resultados. El efecto del tamaño de los individuos en la frecuencia de conductas de cortejo y agonistas fue controlado utilizando individuos cuya altura total presentase un coeficiente de variación bajo  $\leq 10\%$  de la altura total (en cada cuarteto). Para evitar el efecto de la familiaridad en los comportamientos registrados se aseguró que los individuos que formaban un cuarteto nunca hubiesen estado en el mismo acuario durante el periodo de mantenimiento previo a los experimentos (de 2 a 3 semanas).

Dado que la conducta muchas veces depende de las características particulares de los individuos involucrados, y para cumplir con los requisitos de independencia estadística, los diseños experimentales recomiendan utilizar siempre individuos distintos y aleatoriamente escogidos y asignados a los distintos tratamientos. Sin embargo, para evitar la utilización de un número elevado de individuos distintos se usó un diseño con 2 bloques aleatorios dentro de cada tratamiento, donde cada cuarteto utilizaba 2 individuos focales que siempre fueron distintos y 2 modelos que se repitieron dentro del bloque para las distintas réplicas (Figura 3; 2 machos, 2 hembras o 1 macho y 1 hembra, para los tratamientos, 1:3, 3:1 y 1:1, respectivamente). Se utilizaron 4 réplicas para cada bloque en cada tratamiento (Figura 3), lo que suma 8 réplicas verdaderas por cada tratamiento (24 hembras y 24 machos, diferentes y aleatoriamente asignados).

Las observaciones de cada uno de los tratamientos se realizaron durante 1 h a lo largo de 5 días consecutivos iniciando a las 8:30 hrs, durante la cual se registró la frecuencia de las conductas de cortejo y competencia de los individuos focales en el cuarteto. Las conductas consideradas fueron aquellas identificadas durante las observaciones preliminares (Tabla 1).

Los organismos empleados en cada uno de los tratamientos fueron elegidos de manera aleatoria y se trasladaron de sus acuarios de mantenimiento a los de observación el día que ésta se llevó a cabo. Los organismos permanecieron juntos durante los 5 días de observación, a cuyo término se les colocó nuevamente en sus acuarios de mantenimiento.

Los individuos modelo permanecieron separados por sexo en dichos acuarios por lo menos 15 días antes de ser reutilizados en otra réplica de ese bloque, mientras que los focales no fueron usados más de una vez en el experimento. Durante todo el experimento, los organismos fueron alimentados tres veces al día, siendo la primera inmediatamente posterior a las observaciones.

#### *Cuantificación de los niveles de hormonas*

El nivel de andrógenos circulantes en los machos y hembras focales fue cuantificado a partir de muestras de sangre tomadas de la vena caudal antes (día 1 de observación) y después de cada corrida experimental (día 5 de observación). A los organismos focales (un macho y una hembra) se les tomó una muestra de sangre de 100  $\mu$ l en cada ocasión, mientras que a los organismos modelo se les introdujo la aguja de una jeringa vacía para exponerlos al mismo manejo que a los focales.

Se evaluaron los niveles de testosterona (T) y 11-cetotestosterona (11-KT) en hembras y machos respectivamente. La muestra de sangre fue tomada con agujas de 27G x 13 mm heparinizadas y se colocaron en tubos Eppendorf (heparinizados) de 1.5 ml. Las muestras fueron mantenidas en hielo hasta que fueron centrifugadas aproximadamente 1-2 horas después de las observaciones. Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 8000 rpm y se obtuvieron 50  $\mu$ l de plasma (cantidad mínima indispensable para medir tres hormonas). El plasma se congeló a una temperatura de -20°C hasta el momento de su análisis (Cavaco *et al.*, 2001; Saraiva *et al.*, 2010).

Las muestras de plasma fueron enviadas al Laboratorio de Etología del Instituto Superior de Psicología Aplicada (Portugal) para determinar los niveles de andrógenos mediante técnica de ELISA, empleando kits para la determinación de T y 11-KT (Cayman Chemical Company, # 582701 y # 582751, respectivamente).

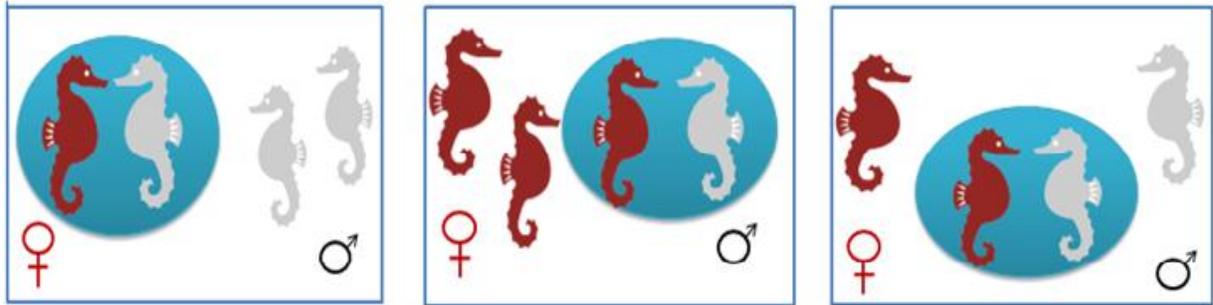


Figura 3. Diagrama mostrando las combinaciones de machos y hembras de *H. erectus* para la ejecución de los experimentos del efecto de la alteración de la proporción sexual en los comportamientos de cortejo y de competencia de machos y hembras. Los organismos focales se denotan dentro del círculo y los modelos fuera de este.

### 5.3. Análisis estadístico

Los valores promedio de los comportamientos de cortejo y competencia para todos los individuos de todos los sexos y tratamientos fueron comparados mediante una prueba de Mann-Whitney. La variación en los comportamientos de cortejo y de competencia desplegadas por los individuos asignados a los distintos tratamientos fue evaluada mediante un análisis de redundancia (RDA por sus siglas en inglés) con el programa CANOCO (Ter Braak, 1986). El objetivo del análisis es el de ordenar los individuos (“muestras” en CANOCO) con respecto a los comportamientos de cortejo (i.e. desplegadas hacia el sexo opuesto y antecedidas o seguidas de otras típicamente de cortejo), y de competencia (i.e. desplegadas hacia el mismo sexo) registradas en total a lo largo de los 5 días de observación (“especies” en CANOCO), y relacionar el resultado de esa ordenación de manera directa con las variables categóricas correspondientes a los 2 sexos (M y H) y a los 3 tratamientos (3, 2, 1 como 3:1, 1:1 y 1:3 H:M, respectivamente) (“variables ambientales” en CANOCO).

Dada la falta de independencia estadística entre los machos y hembras focales que formaron parte de cualquier cuarteto, la matriz original total fue separada en dos matrices parciales: Matriz 1: con los comportamientos de los 4 de los machos de cada tratamiento en el bloque 1 y los de las 4 hembras de los tratamientos correspondientes en el bloque 2 (24 réplicas en total, 8 por tratamiento); y Matriz 2: con los comportamientos de los 4 machos de cada tratamiento en el bloque 2 y los de las 4 hembras de los tratamientos correspondientes en el bloque 1 (24 réplicas en total, 8 por tratamiento). Las dos matrices se analizaron por

separado y fueron consideradas cada una, una repetición de la otra. Previo al análisis, los datos fueron transformados (con logaritmo) para homogenizar algunos comportamientos cuya frecuencia era extremadamente alta y restarle peso a los datos extremos. Asimismo, los datos individuales fueron restados de la media ("centrados"), pero no fueron divididos por la desviación estándar ("estandarizados"), por tratarse de datos con unidades similares. El escalamiento fue enfocado a las correlaciones entre los comportamientos.

Para determinar la significancia de los ejes de ordenación canónicos (3 ejes en total) con respecto a las variables ambientales en ambos casos se utilizó un método de permutaciones aleatorias de Montecarlo con base en 499 iteraciones. La significancia de los estadísticos fue determinada considerando un  $\alpha < 0.05$ .

Los resultados fueron graficados utilizando un triplot de correlación con los comportamientos representados por vectores, las variables categóricas representadas por centroides, y las muestras representadas por puntos calculados sobre la base de los promedios recíprocos (sin restringirlos mediante una regresión múltiple contra las variables categóricas). Para interpretar estos gráficos, es importante considerar que a mayor longitud del vector mayor es el porcentaje de variabilidad con que contribuye esa variable y cuanto menor es el ángulo entre las variables y los ejes de ordenación, mayor es su asociación estadística. Además, los vectores tienen la misma dirección en la que crece la contribución de la variable que representan, tal que las contribuciones son positivas si tienen la dirección en la que el eje aumenta, y son negativas si tienen la dirección en la que este disminuye. La interpretación gráfica de los centroides se basa en las proyecciones de su ubicación sobre los vectores, ya sea en su porción positiva (los valores positivos del vector están asociados al centroide) o en su porción negativa (los valores negativos del vector están asociados al centroide). Finalmente, las muestras cercanas a un centroide son aquellas que mejor se ven representadas por él.

Se aplicó un ANOVA de una vía para comparar si se presentaban diferencias significativas de los niveles de andrógenos circulantes en los diferentes tratamientos (1:3 a 1:1 a 3:1 H:M) para cada sexo por separado. En el caso de los machos, el ANOVA se aplicó

con 14 de los datos de los niveles de 11-KT que fueron tomados al finalizar el día 5 de observación. En el caso de las hembras se utilizó un diseño por bloques al azar dado que el número y balance de los datos así lo permitieron. Previo al análisis los datos fueron transformados mediante raíz cuadrada para conformar con los requisitos de normalidad y homogeneidad de varianzas.

Asimismo, se realizó un análisis de correlación (coeficiente de correlación de Spearman,  $r_s$ ) para examinar la potencial asociación entre los niveles de 11-KT en los machos y de T en las hembras al finalizar el día 5 de observación y las conductas de cortejo y competencia desplegadas por éstos el mismo día. Para este fin se utilizaron los datos de todos los tratamientos. No fueron tomados en cuenta para el análisis los datos correspondientes a las muestras de plasma en donde los niveles hormonales eran poco confiables (i. e. aquellas donde las muestras estaban muy concentradas o muy diluidas, y el lector de ELISA las registró con una longitud de onda fuera de la curva estándar), o bien, no fueron detectados. Todos los datos fueron transformados mediante raíz cuadrada previo al análisis.

## 6. RESULTADOS

### *6.1 Identificación de comportamiento de cortejo y de competencia*

El repertorio de conductas de cortejo y de competencia de *H. erectus* que fueron identificadas, y descritas durante las observaciones preliminares para cada uno de los sexos se encuentran en la Tabla 1. Para cada conducta se incluye su descripción, el sexo que la realiza y el contexto social en el que fue observada. De las 11 conductas identificadas, únicamente “bombeo” y “golpear” fueron desplegadas por machos, mientras que todas las demás lo fueron por ambos sexos (Tabla 1). Algunas conductas fueron registradas tanto en el contexto de cortejo, como en el de competencia. Por lo anterior, en las conductas de “sujetar” y “seguir” se registró el individuo hacia el cual la conducta había sido desplegada, diferenciando con ello si ésta era de cortejo o de competencia. Lo mismo no pudo ser registrado para el caso de la exhibición de “chasquidos” y “coloración brillante”, en las que dicho sujeto era difícil de ser identificado.

### *6.2. Experimentos de alteración de la proporción sexual*

Todos los comportamientos de cortejo y competencia descritos durante las observaciones preliminares fueron presentados por los individuos durante los experimentos, y no se observó ningún comportamiento nuevo que no hubiese sido registrado con anterioridad. Algunos (3) individuos sufrieron enfermedades (burbujas e infecciones micobacterianas en la piel) y murieron durante los 5 días de duración del ensayo. En esos casos la réplica no fue considerada para el análisis y los organismos fueron sustituidos para repetir el ensayo.

Del total de 24 cuartetos replicados, únicamente en 3 hembras se presentó un tronco visiblemente distendido indicando que se había llevado a cabo la hidratación de los huevos. Sólo en un caso (tratamiento 1:1) se llevó a cabo una cópula exitosa, con el macho liberando a las crías 14 días después de las observaciones. En los otros dos casos, se encontraron los



huevos en el fondo del acuario en los días 3 y 5 del experimento (pertenecientes a los tratamientos 3:1 y 1:1, respectivamente).

Tabla 1. Descripción de los comportamientos de cortejo y competencia intra-sexual desplegados por hembras, machos o ambos sexos de *H. erectus* en el contexto reproductivo, y estando en una proporción sexual paritaria (1H:1M).

<b>Comportamiento</b>	<b>Descripción</b>	<b>Sexo</b>	<b>Contexto</b>
<b>Sujetar</b>	El individuo focal enrosca la cola, ya sea en la cola o en el tronco de otro individuo, sujetándolo.	<i>Ambos</i>	<i>Cortejo</i> <i>Competencia</i>
<b>Caravana</b>	El individuo focal inclina la cabeza hacia abajo, mientras eleva la región pectoral (anillos 4 al 6) hacia arriba y adelante aproximándola a la mandíbula inferior.	<i>Ambos</i>	<i>Cortejo</i>
<b>Apuntar</b>	El individuo focal levanta la cabeza, mientras dirige el hocico y la región pectoral (anillos 4-6) hacia la superficie.	<i>Ambos</i>	<i>Cortejo</i>
<b>Chasquido</b>	El individuo focal produce un sonido corto y seco acompañado de la apertura momentánea de la boca.	<i>Ambos</i>	<i>Cortejo</i> <i>Competencia</i>
<b>Bombeo</b>	El individuo focal extiende el cuerpo y lo contrae mostrando la apertura del marsupio. El marsupio se observa turgente y redondeado (debido a la entrada de agua).	<i>Macho</i>	<i>Cortejo</i>
<b>Golpear</b>	El individuo focal pega con la punta del hocico a otro generalmente sobre el opérculo.	<i>Macho</i>	<i>Competencia</i>
<b>Seguir</b>	Estando dos individuos cercanos uno del otro (distancia $\leq 10$ cm), el individuo focal nada siguiendo la trayectoria del otro que se ha movido y lo hace en un tiempo $\leq 3$ s.	<i>Ambos</i>	<i>Cortejo</i> <i>Competencia</i>
<b>Retorcerse</b>	Estando sujeto por otro individuo (véase arriba), el individuo focal mueve el cuerpo y la cola en forma de zig-zag, siguiendo el eje mayor o vertical del cuerpo.	<i>Ambos</i>	<i>Competencia</i>
<b>Interposición</b>	Mientras una pareja presenta cambios de coloración y caravanas, el individuo focal nada en su dirección, colocándose entre ambos.	<i>Ambos</i>	<i>Competencia</i>
<b>Constreñir</b>	El individuo focal sujeta de la cola a otro del mismo sexo, doblando el cuerpo hacia un costado sobre el cuerpo del individuo sujetado. Mientras que este toma una posición horizontal contra el fondo.	<i>Ambos</i>	<i>Competencia</i>
<b>Coloración brillante</b>	En individuos castaños: opérculo, tronco y región pectoral de muy pálido a blanco; base de la cola blanquecina y marsupio blanco brillante. En individuos blancos: opérculo, tronco, región pectoral, y porción superior de la cola gris oscuro.	<i>Ambos</i>	<i>Cortejo</i> <i>Competencia</i>

Asociado a los 3 intentos de transferencia de huevos (fueran estos exitosos o no), se observó un incremento en la frecuencia de “bombeo” por parte del macho (desde 10 hasta 50 veces en una hora) y de “apuntar” por parte de la hembra (desde 53 hasta 99 veces en una hora). Este incremento ocurrió en los periodos de observación correspondientes a los días 3 a 5 en los tres casos.

Considerando todos los individuos de ambos sexos y en todos los tratamientos, se puede decir que en general hubo una mayor frecuencia de comportamientos de cortejo que de competencia intra-sexual ( $Z = 4.94$ ;  $p < 0.001$ ), con frecuencias promedio de  $137.8 \pm 148.5$  y  $29 \pm 48.9$ , respectivamente.

El RDA sobre ambas matrices mostró que el primer eje canónico tuvo eigenvalores de 0.24 y 0.33 en las matrices 1 y 2, respectivamente, en tanto que el segundo eje canónico tuvo eigenvalores mucho más bajos (0.05 y 0.06, respectivamente; Tabla 2). La correlación entre los comportamientos ordenados y las variables categóricas de sexo y tratamientos (correlación especie-ambiente) tanto para el primer eje canónico como para el segundo, fue alta en ambas matrices (primer eje:  $r = 0.768$  y  $r = 0.764$ ; segundo eje:  $r = 0.595$  y  $r = 0.532$ ; Tabla 2). Estos resultados indican que los primeros dos eje canónicos sólo consiguen explicar el 29 y 39% de la información contenida en los comportamientos de las matrices 1 y 2, respectivamente. Sin embargo, estos ejes explican un porcentaje alto de la variación al considerar la relación entre los comportamientos (especies) y los tratamientos de proporción sexual y el sexo (variables ambientales) para las dos matrices (primer eje: 81 y 84%; segundo eje: 16 y 15%; Tabla 2).

Asimismo, la prueba de permutación de Monte Carlo mostró una correlación significativa con las variables ambientales tanto para el primer eje canónico de ambas matrices, como para el conjunto de ellos (Tabla 3). A partir de estos resultados sugiero que a pesar de la variación relativamente grande en los comportamientos registrados, las muestras (individuos) se ordenaron claramente en los dos primeros ejes, y que dicha ordenación se

explica de forma significativa cuando las variables de sexo y tratamiento son tomadas en cuenta.

Tabla 2. Resultados del análisis de redundancia (RDA) para los cuatro primeros ejes de ordenación de las frecuencias de ocurrencia de conductas presentadas por hembras y machos de *H. erectus* en tratamientos con proporciones sexuales contrastantes (3:1, 1:1 y 1:3 H:M). Los datos fueron analizados en la matriz 1 y 2 por separado. Los resultados son: los eigenvalores de cada eje; índice de correlación de Pearson ( $r$ ) entre las variables ambientales y los ejes canónicos; porcentaje de la varianza total explicada por cada eje, y por cada eje canónico; sumatoria de la varianza explicada por los ejes canónicos.

Resumen RDA					
Ejes de ordenación	Primer	Segundo	Tercer	Cuarto	Total
Matriz 1					
Eigenvalores	0.241	0.049	0.008	0.349	1.000
Correlaciones especies-variables ambientales	0.768	0.595	0.343		
Varianza acumulada (%)					
de las especies	24.1	29.0	29.8	64.7	
de la relación especie-variables ambientales	81.0	97.3	100		
Suma de todos los eigenvalores canónicos	0.241	0.049	0.008		0.298
Matriz 2:					
Eigenvalores	0.331	0.058	0.006	0.284	1.000
Correlaciones especies-variables ambientales	0.764	0.532	0.334		
Varianza acumulada (%)					
de las especie	33.1	38.9	39.6	68.0	
de la relación especie-variables ambientales	83.7	98.4	100.0		
Suma de todos los eigenvalores canónicos	0.331	0.058	0.006	0.284	0.396

Tabla 3. Resultados de las prueba de permutación de Monte Carlo aplicadas a los eigenvalores de los ejes canónicos que resultaron del análisis de redundancia (RDA; Tabla 2) aplicado las frecuencias de ocurrencia de conductas presentadas por hembras y machos de *H. erectus* en tratamientos con proporciones sexuales contrastantes (3:1, 1:1 y 1:3 H:M). Los datos fueron analizados en la matriz 1 y 2 por separado. Los resultados son los valores del estadístico  $F$  y la probabilidad  $p$  asociada a dicho valor bajo la hipótesis nula (empírica).

Resumen	permutaciones	Monte	Carlo		
			Eigenvalor	$F$	$p$
Matriz 1:					
Para el primer eje canónico			0.241	6.367	0.012
Para todos los ejes canónicos			0.298	2.834	0.010
Matriz 2:					
Para el primer eje canónico			0.331	9.899	0.006
Para todos los ejes canónicos			0.396	4.363	0.006

En las figura 4A y 4B se muestran dos gráficos de triplot con las asociaciones entre los vectores que representan los comportamientos y los centroides que representan las variables ambientales categóricas (sexo y tratamientos de proporción sexual). Se puede observar que el primer eje de ordenación claramente separa a las muestras (individuos) con respecto al sexo, mientras que el segundo lo hace con respecto al tratamiento.

El primer triplot (Figura 4A) muestra que el centroide representando a los machos se ubicó hacia la izquierda y el de las hembras lo hizo a la derecha del primer eje (que va de -1 a 0.6), mientras que el centroide representando al tratamiento 3 (3:1 H: M) se ubicó hacia arriba, y los del 2 y 1 (1:1 y 1:3 H: M, respectivamente) lo hicieron hacia abajo del segundo eje. Los comportamientos que más contribuyeron a la ordenación en el primer eje (sexos) fueron “seguir al sexo opuesto”, “sujetar al sexo opuesto”, “bombeo”, “caravana” y en menor grado, “chasquido” (cuya frecuencia fue mayor en los machos), en tanto que “apuntar” fue mayor en las hembras. También asociados a los machos, pero contribuyendo a la ordenación en el segundo eje (tratamientos), estuvieron los comportamientos de “coloración brillante” más frecuentes en el tratamiento 3, mientras que “seguir al mismo sexo”, “sujetar al mismo sexo”, “golpear”, “retorcerse” e “interposición” lo fueron en los tratamientos 1 y 2. El comportamiento “sujetar al mismo sexo”, estuvo más fuertemente asociado al tratamiento donde la proporción estaba sesgadas fuertemente hacia los machos (Figura 4A). Asociado a las hembras y en particular al tratamiento 3, estuvo el comportamiento de “constreñir” (Figura 4A).

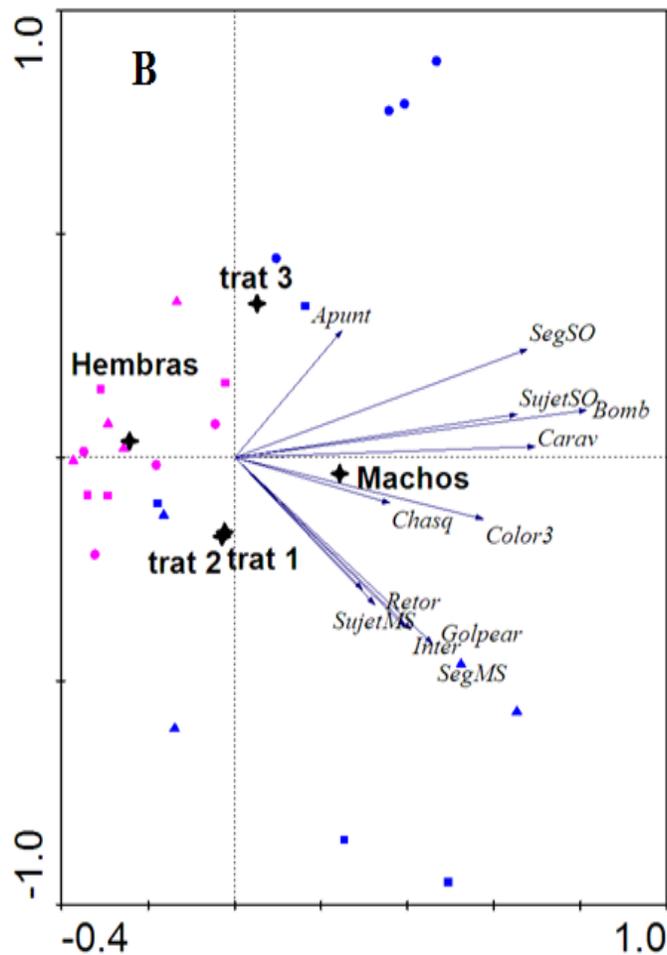
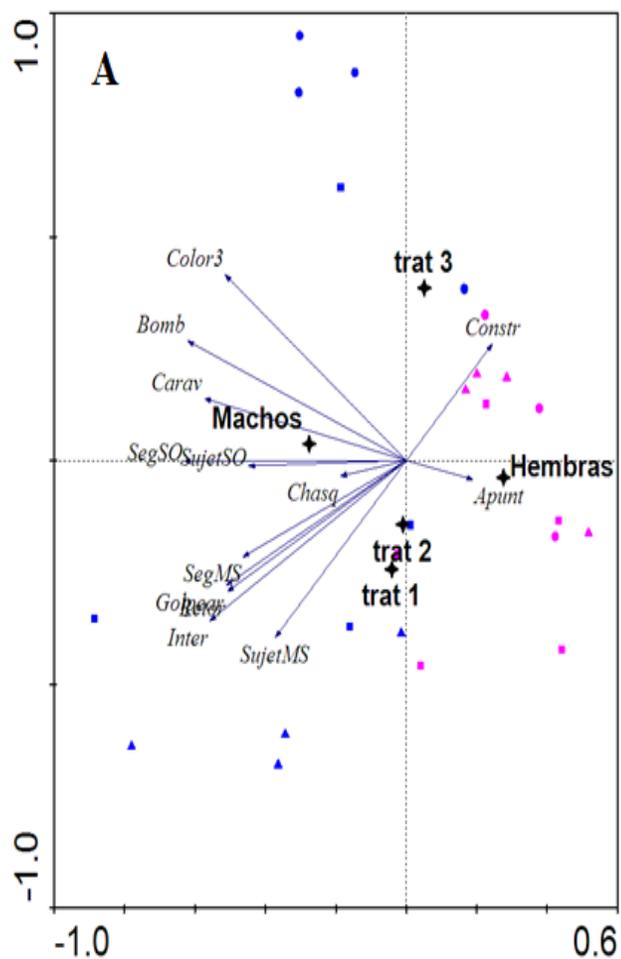
Las conductas de “coloración brillante” y “sujetar al mismo sexo” estuvieron claramente asociados a los machos en el lado izquierdo del gráfico, mientras que “constreñir” lo estuvo con las hembras en el lado derecho del gráfico, pero todos con valores de correlación menores indicando una contribución menor a la ordenación en este eje (Figura 4A).

En el segundo triplot (Figura 4B) las muestras se ordenaron en las mismas 4 direcciones que en el primero (Figura 4A): los machos y las hembras se ordenaron en direcciones opuestas del primer eje (que va de -0.4 a 1.0), mientras que los tratamientos de proporciones sexuales lo hicieron en el segundo eje, con el tratamiento 3 hacia arriba y el 2 y

1 hacia abajo. De manera similar al primer triplot, los comportamientos que más contribuyeron a explicar la ordenación en el primer eje fueron “caravana”, “bombero”, “sujetar al sexo opuesto”, “seguir al sexo opuesto” y “chasquido”, todos más frecuentes en los machos. Pero, a diferencia del primer caso, “apuntar” fue un comportamiento asociado a los machos y contribuyó a la ordenación en el segundo eje, mientras que el comportamiento “coloración brillante” contribuyó más a explicar la ordenación en el primer eje (sexos) que en el segundo (tratamientos) (Figura 4B). Los comportamientos “seguir al mismo sexo”, “sujetar al mismo sexo”, “golpear”, “retorcerse” e “interposición” se encontraron nuevamente asociados a los tratamientos 2 y 1, contribuyendo a ordenar las muestras en el segundo eje.

En resumen el RDA aplicado a ambas matrices y sus respectivas representaciones gráficas fueron en general consistentes, y mostraron que en general los comportamientos de cortejo son desplegados principalmente por los machos, y que su frecuencia de ocurrencia es independiente de la proporción en la que se encuentran ambos sexos. Asimismo, a partir de los resultados sugiero que “seguir” “sujetar” “bombero” y “caravana” son los comportamientos de cortejo más relevantes desplegados por los machos, mientras que “apuntar” fue presentado por ambos sexos: cuando las hembras apuntaron, lo hicieron con frecuencia similar en todos los tratamientos; pero cuando los machos apuntaron, lo hicieron más frecuentemente en el tratamiento en el que había más hembras que machos (tratamiento 3).

De la misma manera, los resultados indican que los comportamientos de competencia son desplegados principalmente por los machos, y que su frecuencia es independiente de si se encontraban en una proporción sexual paritaria o sesgada hacia los machos. Los comportamientos de “seguir”, “sujetar”, “interposición”, “golpear” y “retorcerse” fueron todos igualmente importantes en lo que competencia entre machos se refiere. Los comportamientos “coloración” y “chasquido” no se pueden asociar particularmente al cortejo ni a la competencia de los machos de esta especie.



→ Variables conductuales

★ Centroides

Machos	● Trat 3:1	●	Hembras
	■ Trat 1:1	■	
	▲ Trat 1:3	▲	

Figura 4. Diagrama triplot resultado del análisis de redundancia aplicado a las 13 variables conductuales y los factores “sexo” y “tratamiento” (proporción H:M) de los individuos *H. erectus* de la matriz 1 (A) y 2 (B) indicando la ordenación de las muestras con respecto a los dos primeros ejes canónicos. Los acrónimos empleados para las conductas fueron: SujetSO = sujetar al sexo opuesto, SegSO = seguir al sexo opuesto, Carav = caravana, Apunt = apuntar, Chasq = chasquido, Bomb = bombo, SujetMS = sujetar al mismo sexo, SegMS = seguir al mismo sexo, Retor = retorcerse, Constr = constreñir, Inter = interposición.



### 6.3. Conductas de cortejo y competencia intra-sexual relevantes (a partir del RDA).

Una vez identificados los comportamientos que más contribuyeron a la ordenación de las muestras en los ejes, se examinaron los cambios en la frecuencia de estos con la finalidad de analizar sus patrones temporales. Los resultados indican que mientras los comportamientos “seguir”, “sujetar” y “caravana” se presentaron en frecuencias parecidas a lo largo de los 5 días, “apuntar” en las hembras y “bombeo” en los machos tuvieron frecuencias distintas dependiendo del día de observación y del tratamiento (Figura 5). Los machos del tratamiento 3:1 H:M presentaron la conducta de “bombeo” más frecuentemente en los días 3 y 4, mientras que en los tratamientos 1:1 y 1:3 H:M la frecuencia de “bombeo” fue similar a lo largo del tiempo (Figura 5D). Las hembras, por su parte, presentaron la conducta “apuntar” únicamente a partir del día 3 en todos los tratamientos. Sin embargo, dada la gran variación asociada a las estimativas de la frecuencia de “apuntar”, no fue posible distinguir diferencias en el patrón temporal de este comportamiento a partir del día 3 en adelante (Figura 5E).

A diferencia de los comportamientos de cortejo, los de competencia intra-sexual en los machos no mostraron ningún patrón temporal consistente, y fueron presentadas por los machos en frecuencias bastante similares a lo largo de tiempo tanto en el tratamiento 1:1 como en el 1:3 H:M (Figura 6).

### 6.4. Análisis de los niveles hormonales

Ninguna de las pruebas de ANOVA aplicadas a las concentraciones de hormonas tanto en los machos como en las hembras de los distintos tratamientos resultaron significativas ( $F_{gl: 2, 12} = 1.26, p = 0.32$ ;  $F_{gl: 2, 3} = 3.57; p = 0.16$ , para 11-KT y T, respectivamente), indicando que los niveles de andrógenos circulantes registrados en el día 5 de las observaciones tanto en machos como en hembras no variaron de forma consistente entre los distintos tratamientos. En el caso de la T en hembras, la variación introducida por los bloques no fue significativa ( $F_{gl: 3, 17} = 0.58; p = 0.63$ ).

En la Figura 7A se observa la correlación entre el nivel de 11-KT y las conductas de cortejo desplegadas por los machos de los tres tratamientos. Únicamente en el caso del tratamiento con 3:1 H:M, dicha correlación fue estadísticamente significativa ( $r_s = 0.785$ ,  $p < 0.05$ , mientras que para los otros dos tratamientos no resultó así (desde  $r_s = 0.20$  a  $-0.54$ ,  $p > 0.05$ ). De la misma manera, en la Figura 7B se muestra la correlación entre la 11-KT y las conductas de competencia para el tratamiento 1 (1:3 H:M) y 2 ( 1:1H:M ), sin embargo la prueba de correlación de Spearman no resultó significativa para el tratamiento 1,  $r_s = 0.782$ ,  $p > 0.05$ , ni para el tratamiento 2,  $r_s = -0.50$ ,  $p > 0.05$ .

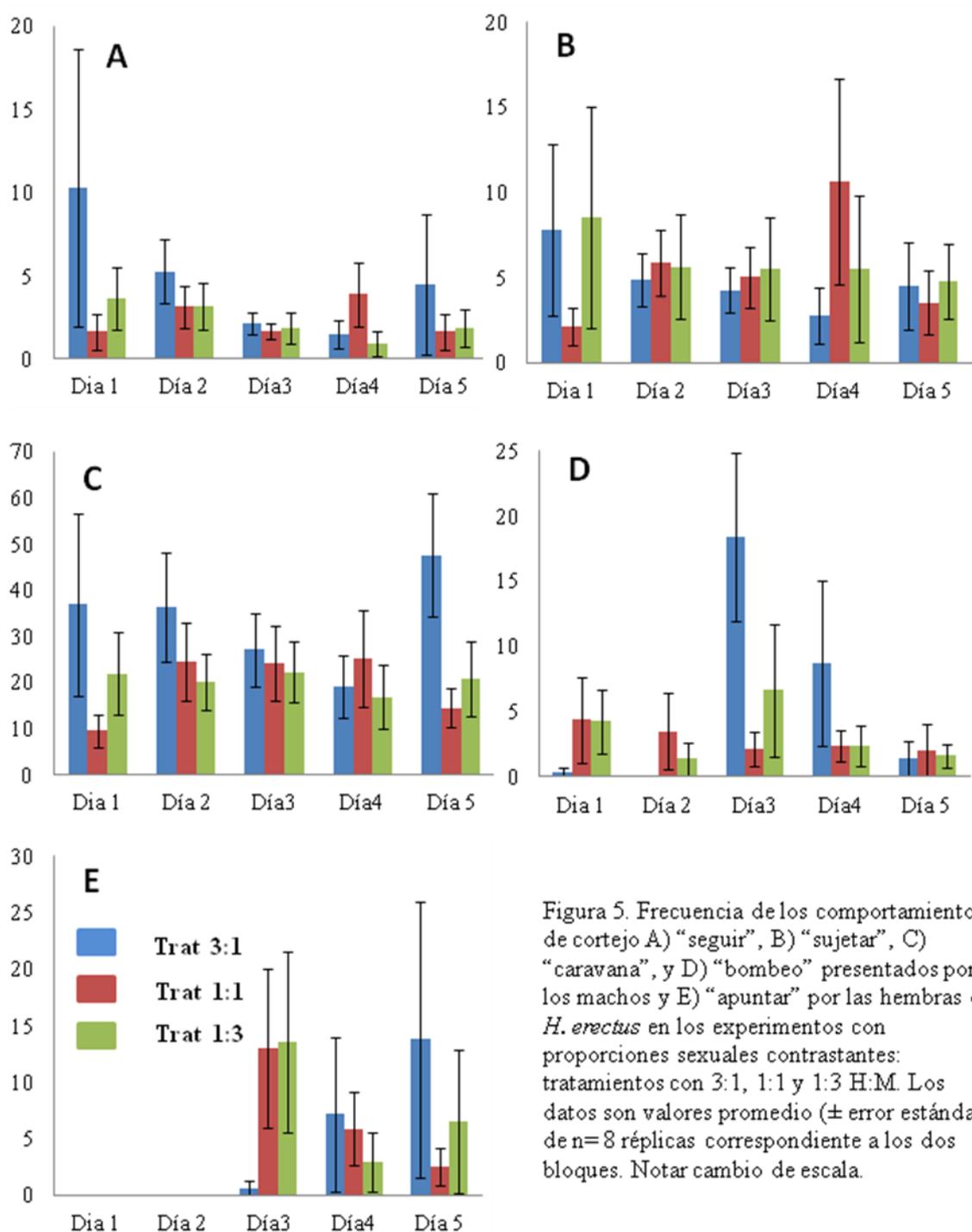


Figura 5. Frecuencia de los comportamientos de cortejo A) "seguir", B) "sujetar", C) "caravana", y D) "bombeo" presentados por los machos y E) "apuntar" por las hembras de *H. erectus* en los experimentos con proporciones sexuales contrastantes: tratamientos con 3:1, 1:1 y 1:3 H:M. Los datos son valores promedio ( $\pm$  error estándar) de n=8 réplicas correspondiente a los dos bloques. Notar cambio de escala.

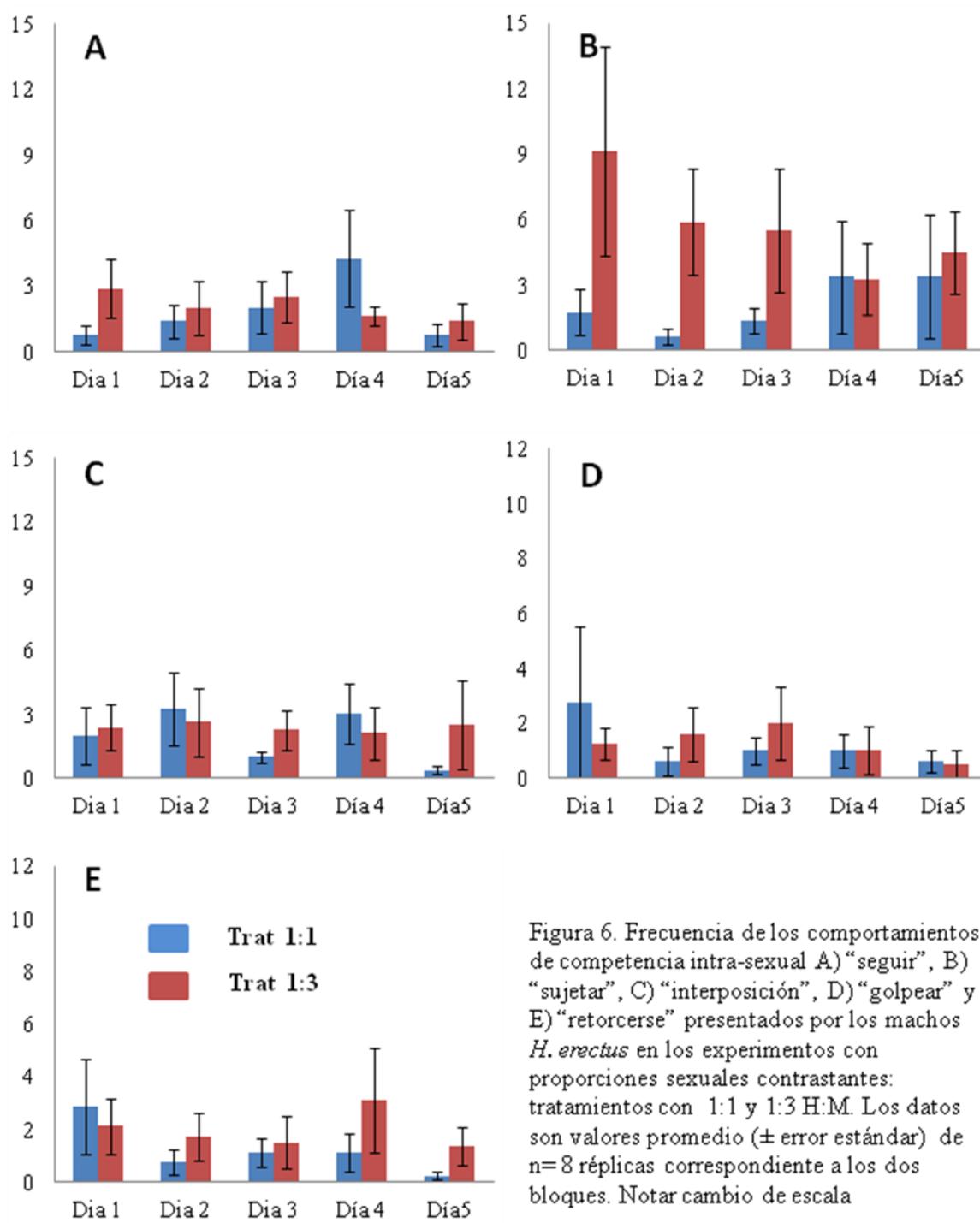
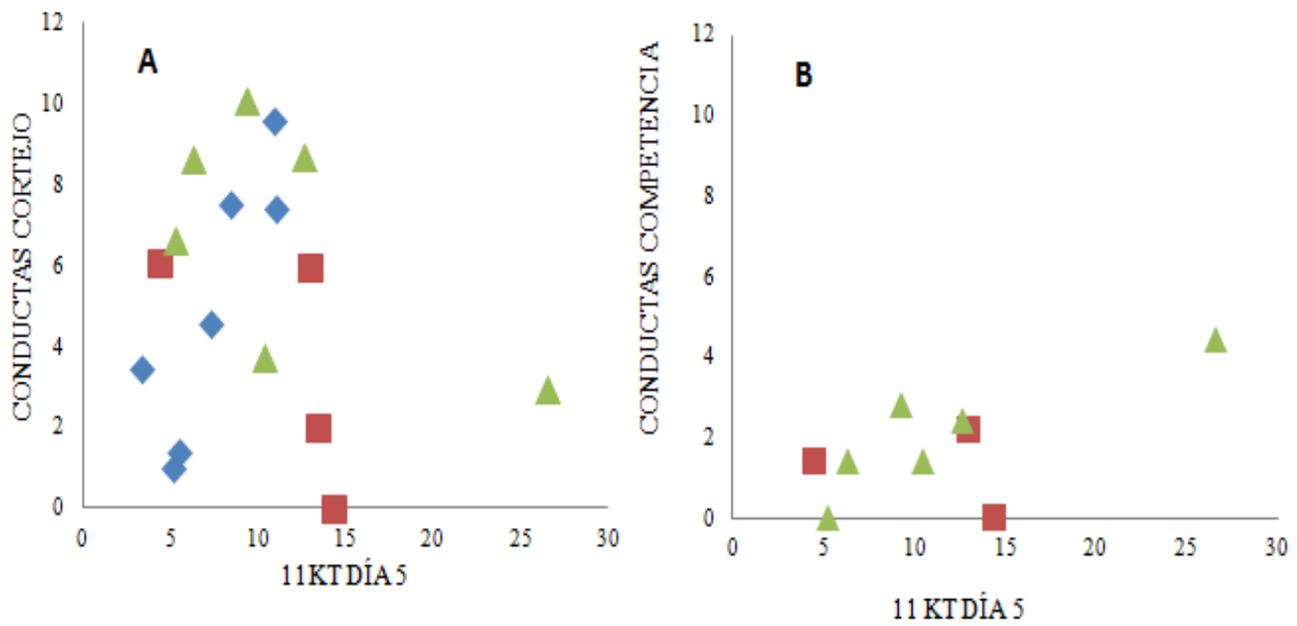


Figura 6. Frecuencia de los comportamientos de competencia intra-sexual A) "seguir", B) "sujetar", C) "interposición", D) "golpear" y E) "retorcerse" presentados por los machos *H. erectus* en los experimentos con proporciones sexuales contrastantes: tratamientos con 1:1 y 1:3 H:M. Los datos son valores promedio ( $\pm$  error estándar) de n=8 réplicas correspondiente a los dos bloques. Notar cambio de escala



- ◆ Trat 3:1
- Trat 1:1
- ▲ Trat 1:3

Figura 7. A) Correlación entre niveles de 11-KT y frecuencia de conductas de cortejo para los tratamientos 3:1, 1:1 y 1:3, y B) de los niveles de 11-KT y conductas de competencia para los tratamientos 1:1 y 1:3, en el día 5 de observación presentada por los machos de *H. erectus* respectivamente. Los datos son raíces cuadradas de n= 7 réplicas para el tratamiento 3:1, n= 4 réplicas para el tratamiento 1:1, y n=6 réplicas para el tratamiento 1:3 y, de n= 3 réplicas para el tratamiento 1:1, y n=6 réplicas para el tratamiento 1:3 correspondiente a los dos bloques de cada correlación respectivamente.

## 7. DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios sobre conducta sexual tanto *in situ* como en condiciones de laboratorio coinciden en que los hipocampos presentan roles sexuales convencionales (Vincent, 1994b; Clutton-Brock y Vincent 1991; Vincent *et al.* 1992). Que los hipocampos machos sean el sexo que corteja y compite a pesar de que en ellos recae el cuidado parental exclusivo y altamente especializado de las crías durante la preñez, ha sido explicado con base en la razón sexual operativa (ORS), y más específicamente en términos del tiempo relativo que ambos sexos requieren para prepararse para la cópula (Masonjones y Lewis, 2000; Foster y Vincent, 2004). De acuerdo con estos autores los machos tienen un “tiempo fuera” reproductivo (periodo refractario) más corto que el de las hembras, y en consecuencia, su tasa reproductiva potencial (PRR) es mayor que la de las hembras (Masonjones y Lewis, 2000).

A pesar de lo anterior, estudios recientes han reconocido que los roles sexuales pueden presentar gran plasticidad tanto entre poblaciones como en una misma población a lo largo del tiempo (Kokko y Jonstone; 2002, Kvarnemo y Ahnsejo, 1996; Almada *et al.*, 1995), y que fluctuaciones en factores ambientales relevantes para la reproducción, tales como la densidad poblacional y la movilidad de los individuos (Kokko y Jonstone, 2002), además de la temperatura y la disponibilidad de alimento (Kokko y Rankin, 2006) tienen un efecto en determinar cuál es el sexo que se constituye en un recurso limitante del potencial reproductivo del otro.

Las observaciones de la conducta sexual en *H. erectus* registradas durante el presente estudio mostraron que la modificación del contexto social, por medio de la presentación de los individuos bajo proporciones sexuales contrastantes, no tuvo un efecto significativo sobre la frecuencia de los comportamientos de cortejo ni de competencia (Figuras 4A y 4B). No solo no hubo alteraciones en la frecuencia de comportamientos entre tratamientos, sino que los machos consistentemente cortejaron al sexo opuesto y compitieron más entre sí que las hembras independientemente de la proporción sexual en la que se encontraban (Figuras 4A y 4B). Estos resultados confirman la presencia de roles sexuales

convencionales entre los caballitos de mar, y sugiero que *H. erectus* tiene una plasticidad limitada con respecto a este rasgo conductual.

A partir de los resultados de investigaciones previas se sugiere que en los caballitos de mar la plasticidad en la expresión de las conductas de cortejo y competencia dependen directamente de la densidad y la proporción sexual en la población (e.g. Faleiro *et al.*, 2008; Kvarnemo *et al.*, 2007; Wilson y Martin-Smith, 2007; Woods, 2000). Dado que la probabilidad de encuentro entre individuos de cualquier sexo se incrementa con la densidad, es de esperar que la frecuencia de cortejo y competencia sexual aumente con la densidad de individuos que se encuentran reproductivamente disponibles. En ese sentido, en las especies de caballitos de mar donde se reportan densidades poblacionales, ya sea altas o variables, se han observado cortejos con parejas múltiples (e.g. *H. abdominalis*: Wilson y Martin-Smith, 2007; *H. guttulatus*: Naud *et al.*, 2009), mientras que en otras con densidades poblacionales bajas los autores han reportado monogamia social (cortejos exclusivos con un individuo) y mantenimiento de la pareja a través del tiempo (e.g. *H. whitei*: Vincent y Sadler, 1995; Vincent *et al.*, 2004; *H. angustus*: Jones *et al.*, 1998) aun habiendo oportunidad para la poligamia. Cabe señalar que los estudios sobre paternidad usando herramientas moleculares realizados en hipocampos han mostrado que en el grupo existe monogamia genética para un mismo evento reproductivo, i.e. todos los individuos de una camada comparten un mismo padre y madre (Wilson y Martin-Smith, 2007; Kvarnemo *et al.*, 2007).

De la misma manera, en una población de *H. subelongatus* donde la proporción sexual está sesgada hacia las hembras se ha reportado inversión de roles sexuales, con la selección sexual operando más fuertemente en las hembras (oportunidad de selección,  $I_s = 1.59$ ) que entre los machos ( $I_s = 0.271$ ) (Kvarnemo *et al.*, 2007). Asimismo, Wilson y Martin-Smith (2007) reportan roles sexuales invertidos en las poblaciones naturales de *H. abdominalis* con densidades altas y una proporción sexual sesgada hacia las hembras, mientras que en el laboratorio los roles sexuales de esta especie son convencionales cuando se encuentran en una combinación de densidades altas y proporción sexual paritaria (Woods, 2000).

Junto con la densidad poblacional, la movilidad también puede influir en los roles sexuales, las estrategias de apareamiento y la evolución de la plasticidad fenotípica (Kokko y Rankin, 2006). En aquellas poblaciones con mayor densidad y migración, las tasas de encuentro entre los individuos pueden variar enormemente en períodos relativamente cortos, favoreciendo la plasticidad de los roles sexuales y la evolución de las estrategias reproductivas (Kokko y Jonstone; 2002). En las poblaciones de *H. abdominalis* en donde los roles sexuales se invierten, además de presentar variaciones en la densidad poblacional (Kuitert, 2000; Martin-Smith y Vincent, 2005), se piensa que los individuos se desplazan grandes distancias, un orden de magnitud de 2-3 mayor que otras especies de caballito de mar (Martin-Smith, datos sin publicar). Por el contrario, en las especies cuyas poblaciones se encuentran en bajas densidades, tienen poca movilidad o ambas, es de esperarse que los roles sexuales sean más consistentes porque su conducta responde al conjunto de presiones para encontrar una pareja que esté disponible en una ventana de tiempo relativamente corta (e.g. *H. whitei*: Vincent y Sadler, 1995).

La menor plasticidad en los roles sexuales de *H. erectus* podría explicarse si la función del cortejo asociada a la selección sexual y competencia por obtener pareja no fuera tan relevante, y que las señales transmitidas mediante el cortejo tengan valor como sincronizador reproductivo, asegurando una cópula exitosa. Así, el elaborado cortejo del macho adquiere relevancia como mecanismo para que el individuo muestre su disponibilidad para recibir los huevos maduros provenientes de una hembra. Esta, a su vez, responde al cortejo en la medida en que se lleva a cabo la parte final de la gametogénesis (hidratación de los huevos) y se prepara fisiológicamente para llevar a cabo la transferencia. En el presente estudio, los comportamientos de cortejo más relevantes en *H. erectus* fueron “bombeo”, “caravana”, “sujetar” y “seguir” en los machos, y “apuntar” en las hembras. Tanto “bombeo” como “caravana” son comportamientos mediante los cuales los machos mostraron la condición vacía del marsupio (Tabla 1), lo que en otros estudios se ha señalado como una señal de disponibilidad para recibir los huevos de la hembra (Woods, 2000). Por su parte, la hembra respondió al “bombeo” y “caravana” con “apuntar” (Figuras 5C, D y E), comportamiento que constituye el prelude para la cópula de acuerdo con los reportes sobre cortejo en caballitos de mar (Vincent, 1994a).



Asimismo, los caballitos en general presentaron significativamente más comportamientos de cortejo que de competencia, y la única correlación que resultó significativa fue entre la 11-KT y los comportamientos de cortejo más importantes (Figura 7A). Tomados en conjunto, a partir de estos resultados sugiero que la mayor parte de las interacciones reproductivas en *H. erectus* están más dirigidas a la señalización entre machos y hembra que entre individuos del mismo sexo durante la formación de la pareja.

Una caracterización funcional del cortejo como la anterior sería de esperar en poblaciones donde hay poco potencial para la competencia sexual. Es decir, donde hay una baja probabilidad de encuentro, donde la proporción sexual se encuentra en la vecindad de 1:1 H:M, donde la fisiología reproductiva de los individuos impone ciertas limitaciones temporales al éxito y eficiencia de las cópulas, o ambas. *Hippocampus erectus*, como la mayoría de los caballitos (Perante *et al.*, 2002; Bell *et al.*, 2003; Martin-Smith y Vincent, 2005), se encuentra en poblaciones de baja densidad. Aunque no se tienen estimaciones de la movilidad de machos y hembras de *H. erectus* en la laguna de Chelem, la densidad de esta población es particularmente baja (desde 0.0002 hasta 0.0010 individuos/m<sup>2</sup>, Jiménez, 2010) comparada tanto con otras poblaciones de la misma (Texeira y Musick, 2001; Baum *et al.*, 2003) como de otras especies (Foster y Vincent, 2004). Al igual que en otras especies, los adultos de *H. erectus* de ambos sexos se distribuyen en zonas con vegetación sumergida que le proporciona al hábitat una complejidad estructural intermedia (Jiménez *et al.*, 2011). Algunos autores han sugerido incluso que la preferencia por hábitats estructuralmente menos complejos está directamente relacionado con la ventajas que le proporciona a un individuo ser detectado visualmente por una pareja potencial (Morgan y Vincent, 2007).

Por otra parte, el desarrollo sincrónico de los ovocitos en las hembras (Texeira y Musick, 2001; Selman *et al.*, 1991; Poortenaar *et al.*, 2004; Planas *et al.*, 2010), la hidratación obligatoria de los huevos previo al desove (Boisseau, 1967) y la concordancia en el intervalo entre los desoves en las hembras y la gestación de los machos (Planas *et al.*, 2008b) llevan a proponer que la fisiología reproductiva de los sexos en los hipocampos presenta un patrón temporal sincronizado (Vincent y Sadler, 1995; Curtis, 2007), y podría limitar la ocurrencia de cópulas exitosas a una ventana de tiempo relativamente pequeña. En

una situación de baja disponibilidad de machos vacíos, si el tiempo de hidratación no se corresponde con la receptividad de un macho en particular, las hembras corren el riesgo de perder su lote de huevos (Vincent y Sadler, 1995; Naud, 2009). Se ha reportado que las hembras de *H. guttulatus* portan los huevos hidratados durante 2 a 3 días (Curtis, 2007), por lo que tienen más posibilidades de reproducirse con éxito si permanecen con su pareja (Naud, 2009). Es de esperar que esta posibilidad constituya todavía una mayor ventaja en aquellas poblaciones donde encontrarse con un individuo reproductivamente disponible sea reducida.

Existen muchos reportes que señalan la monogamia y el mantenimiento de la pareja a lo largo de más de un evento reproductivo en varias especies de *Hippocampus* (e.g., *H. whitei*, Vincent y Sadler, 1995; *H. reidi*, Nijhoff, 1993; *H. zosterae*, Masonjones y Lewis, 2000; *H. comes*, Perante *et al.*, 2002). Vincent (1990, 1994a, 1995) ha reportado una serie de comportamientos denominados saludos diarios (“daily greetings”) similares a los del cortejo, y que se repiten diariamente de tal manera que promueven el mantenimiento de una pareja a través del tiempo ya que refuerzan los vínculos de pareja. Además, los saludos diarios pueden servir como formas de proporcionar información sobre el estado reproductivo de la pareja. Por lo anterior, se propone que el cortejo pudiera funcionar como un sistema de señalización de dos vías para indicar que el macho está disponible para la cópula (mostrando el marsupio vacío durante el bombeo) y que los huevos de la hembra han sido hidratados (comienza la hembra a apuntar). Dichas señales constituirían la forma de dar una señal al macho de que la transferencia puede comenzar. En este sentido, Vincent (1994a) reporta que la latencia de “apuntar” y “bombeo” se correlaciona positivamente con el tiempo en el cual sucede el apareamiento. En el presente estudio esta correlación no pudo ser corroborada, pero en general los comportamientos de “apuntar” y “bombeo” ocurrieron paralelamente y con mayor frecuencia a partir del día 3 del periodo de observación (Figuras 5E y D).

Otra explicación de los “saludos diarios” es la evaluación del estado de salud del macho por parte de la hembra antes de hidratar los huevos (Vincent, 1994a). Para una hembra un desove no exitoso es muy costoso (representa entre 8 y 29% peso seco), y le toma un largo tiempo prepararse fisiológicamente para uno subsecuente (Masonjones y Lewis,

2000). En consecuencia, será ventajoso para una hembra asegurar la disponibilidad del macho antes de iniciar la fase final del cortejo que consiste en hidratar los huevos (Vincent, 1994b; Masonjones y Lewis, 2000). Con los saludos diarios se asegura el éxito en eventos reproductivos subsecuentes (Vincent y Sadler, 1995). Además, debe considerarse sin los “saludos diarios” las hembras difícilmente podrían predecir la duración del embarazo, ya que este varía con la temperatura del agua, los huevos no se hidratan instantáneamente y no pueden mantenerse hidratados por largos períodos (Vincent 1994b).

Durante todos los experimentos, sólo fueron registrados tres intentos de cópula, y únicamente uno de ellos fue exitoso. A pesar de la baja frecuencia en las propias tentativas de cópula, estos resultados sugieren que existen algunas dificultades para su éxito, por lo menos en condiciones de cautiverio. En este y otros estudios de laboratorio se ha observado que a pesar de que se dan cópulas exitosas, la transferencia total de huevos no siempre se logra (Curtis, 2007; Planas, 2008b, 2010). En un estudio de laboratorio, Planas (2008b) observó que no todas las hembras de *H. guttulatus* mantenidas en cautiverio tuvieron huevos maduros durante la temporada reproductiva. La causa de estas diferencias en la maduración de las hembras se desconoce, aunque se sugiere que la relación entre maduración / producción de huevos y la talla de los individuos, los patrones de cortejo y de apareamiento, así como diversos factores nutricionales pueden estar relacionadas. Otros autores también han reportado que cuando hay otros individuos del mismo sexo cortejando existen interrupciones en el apareamiento (Faleiro *et al.*, 2008; Woods, 2000). En este sentido, sería de gran interés obtener estimaciones más realistas de la frecuencia de cópulas exitosas, la duración de la gestación y los intervalos entre gestaciones, así como sus consecuencias en cuanto a la calidad y cantidad de descendientes vivos en individuos mantenidos bajo distintas densidades.

Aunque las ventajas de una sincronización reproductiva constituya la base de la conducta de cortejo observada en *H. erectus*, no se puede descartar la competencia y selección sexual como factores moduladores de la conducta reproductiva en la especie. Que se hubiese disparado la frecuencia de “bombeo” en el macho en el tratamiento 3:1 H:M más que en cualquier otro (Figura 5D) puede considerarse una respuesta débil de plasticidad

conductual de los machos ante una preponderancia de hembras. Asimismo, es posible que dicha respuesta haya sido mediada por la 11 KT, tal y como lo sugiere la única correlación significativa entre los niveles hormonales y la conducta de *H. erectus* encontrada en el presente trabajo (Figura 7A). Al igual que en otras poblaciones de la misma (Texeira y Musick, 2001; Baum *et al.*, 2003) y de otras especies (e. g. Perante *et al.*, 2002; Curtis y Vincent, 2006; Naud *et al.*, 2009; Wilson y Martin-Smith, 2007), la proporción sexual de *H. erectus* en Chelem también varía entre la paridad y un sesgo hacia las hembras (Ponce *et al.*, 2011). La limitada plasticidad registrada en el presente trabajo podría representar una respuesta a las condiciones de proporción sexual en las que estos individuos tienen mayor probabilidad de encontrarse en su hábitat natural.

La ausencia de un efecto estadísticamente medible como consecuencia de los tratamientos usados en el presente estudio podría dejar dudas sobre lo adecuado de éstos. Se podría discutir que las diferencias en la proporción sexual entre tratamientos o el tiempo de exposición de 5 días de los experimentos no fueron suficientes para provocar cambios en el comportamiento de los organismos experimentales. Sin embargo, las proporciones sexuales de 3:1 y 1:3 se encuentran por fuera del intervalo máximo y mínimo registrado en poblaciones naturales de *H. erectus* (2:1 y 1:0.6 H:M: Chelem, Yucatán: Ponce *et al.*, 2011), Chesapeake Bay, Caroline del Norte: Texeira y Musick, 2001; Baum *et al.*, 2003). Asimismo, del total de 24 parejas observadas, en 15 las hembras presentaron la conducta “apuntar” entre el día 3 y el día 5 de observación (en las restantes 9 las hembras no lo presentaron; Figura 5E), un comportamiento que se asocia comúnmente con la fase final del cortejo, cuando ambos se elevan en la columna de agua para llevar a cabo la transferencia de huevos y que coincide con lo observado para otras especies de *Hippocampus* (Vincent, 1994a; Vincent y Sadler, 1995; Masonjones y Lewis, 1996; Woods, 2000; Naud *et al.*, 2009). Esto también está en concordancia con lo reportado en un estudio previo con *H. erectus*, donde se encontró que las hembras “apuntan” de forma más frecuente en el tercer que el primer día del encuentro (Jiménez *et al.*, 2011). En el presente estudio las observaciones fueron efectuadas hasta el día 5, dando suficiente tiempo para que las parejas que podían cortejar lo hicieran.

En los acuarios experimentales usados en el presente estudio, las densidades de individuos empleadas en todos los tratamientos fueron altas ( $0.26 \text{ ind} \cdot \text{m}^{-3}$ ), por lo que se sugiere que de haber un efecto de la densidad, este sería el de incrementar la frecuencia de las conductas de cortejo y de competencia aún más que en el medio natural. Experimentos de laboratorio con *H. guttulatus* (Faleiro *et al.*, 2008) mostraron que los individuos expuestos a altas densidades aumentan su actividad sexual, y que la densidad tiene influencia en el número de grupos que se forman. Aunque se sugiere que las bajas densidades encontradas en las poblaciones de *Hippocampus* en el medio natural son una característica reciente, consecuencia de la sobreexplotación y la degradación de su hábitat (Perante *et al.*, 2002), existen actualmente poblaciones de caballitos de mar que registran densidades de 1.5 hasta 10 individuos  $\text{m}^2$  (Vincent, 1996, Curtis y Vincent, 2006; Martin-Smith y Vincent, 2005), o bien, que presentan agregaciones temporales de 10-15 individuos  $\text{m}^2$  (Naud *et al.*, 2009).

En cuanto a los niveles circulantes de hormonas, los resultados mostraron que las diferencias en los niveles de 11-KT y T en los machos y hembras de *H. erectus*, respectivamente, no fueron significativas. Dado que dichas hormonas son las que estimulan la conducta sexual en machos y hembras respectivamente de muchos peces teleósteos (Munro y Pitcher, 1985; Kime, 1993; Moyle *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2002; Saraiva *et al.*, 2010; Goncalves y Oliveira, 2010), y considerando que no se presentaron diferencias en la frecuencia de conductas de cortejo y competencia importantes entre las proporciones sexuales utilizadas (Figura 4), la ausencia de una variación consistente en los niveles de 11-KT y T entre tratamientos está en concordancia con los resultados obtenidos.

Mientras que el contexto social tiene una influencia en el comportamiento a través de la percepción del ambiente social inmediato (Oliveira *et al.*, 2001), las hormonas juegan un papel central en la regulación de la expresión de los comportamientos reproductivos, además de otros aspectos de la biología reproductiva de los peces teleósteos (Munakata y Kobayashi, 2010). Estudios en distintos grupos de vertebrados han mostrado un papel estimulante (o permisivo) de los andrógenos T y 11-KT en la expresión de los comportamientos sociales, tanto sexuales como agresivos en los machos (Oliveira *et al.*, 2002). Los andrógenos además de ser un factor causal de los comportamientos

reproductivos, también pueden ser modificados por la interacción entre co-específicos, y se sugiere que hay una relación bidireccional entre los andrógenos y la conducta (Villars, 1983). Estos resultados se han interpretado como una adaptación de los individuos para ajustar su motivación agonística y responder a cambios en su entorno social (Oliveira *et al.*, 2002).

Tomando esto en cuenta se puede argumentar que la escala de tiempo en la que fueron medidas las hormonas en el presente estudio no fue la adecuada. Se sabe que los andrógenos producidos al estimular el hipotálamo representan una forma de responder de forma inmediata a estímulos visuales, químicos, o táctiles producidos por un contexto social y modifican la conducta sexual (cortejo y competencia por las parejas) (Wingfield *et al.*, 1990; Oliveira *et al.*, 2001). Si la escala temporal de activación de este andrógeno es del orden de minutos, hubiera sido posible encontrar una correlación entre los niveles de 11-KT y los comportamientos de cortejo y competencia a lo largo de una hora de observación.

A excepción de las conductas asociadas con la fase final del cortejo (“apuntar” en las hembras y de “bombeo” en los machos) que se presentaron entre el día 3-5 (Figura 5), no hubo un patrón temporal en las conductas registradas. Aunque no se encontraron evidencias de que las hormonas pudieran tener un efecto acumulado a lo largo del tiempo (en el día 5 de observación), sugiero que los andrógenos podrían haber mostrado algún patrón temporal asociado al “bombeo” y “apuntar” si hubieran sido medidos cada día de observación. Sin embargo, lo mismo no se puede decir en el caso de una asociación entre los andrógenos y las conductas de competencia registradas en el presente estudio. Aunque hay reportes de que la competencia entre los machos es más intensa en los primeros días de interacción (Woods, 2000), las conductas de competencia más relevantes en los machos de *H. erectus* se presentaron en frecuencias similares a lo largo del tiempo (Figura 6). Asimismo, no hubo ninguna correlación entre los comportamientos agresivos entre machos y los niveles de 11-KT (Figura 7B).

El coeficiente de correlación de Spearman únicamente mostró un valor significativo para la correlación entre la 11-KT y las conductas de cortejo en los machos del el

tratamiento de proporción sexual 3:1 H:M. Estos resultados sugieren que la influencia del contexto social tiene limitaciones, tal que sólo condiciones de fuerte sesgo hacia las hembras podrían incrementar el comportamiento de cortejo regulados a través de los niveles de 11-KT. Cabe hacer notar que aunque no de una forma marcada, la conducta de “bombeo” estuvo más fuertemente correlacionada con el tratamiento 3:1 que con cualquier de los otros dos en los triplots que resultaron del análisis de redundancia (Figuras 4 y 5D).

Debido a que las hembras generalmente desempeñan un papel pasivo durante el cortejo, se han realizado pocos estudios acerca de las hormonas que regulan su conducta reproductiva (p.e. Lubzens *et al.*, 2010; Munakata y Kobayashi, 2010; Stacey, 2011). Aunque la T se ha relacionado con las conductas de competencia en las hembras (Oliveira y Goncalves, 2008), en las hembras de *H. erectus* no se observaron diferencias en el nivel de T para los distintos tratamientos, y tampoco se observó ninguna correlación entre la T y las conductas de competencia. Esto quizás esté relacionado con el hecho de que *H. erectus* no defiende un territorio reproductivo, ni construye un nido, ambas conductas comúnmente asociados a la competencia en hembras y a su control hormonal por la T (Munro y Pitcher, 1985; Reinboth y Rixner, 1970; Wapler-Leong y Reinboth, 1974; Oliveira y Goncalves, 2008; Desjardins *et al.*, 2008).

Actualmente, la literatura de la endocrinología de los syngnátidos está limitada a un pequeño número de estudios acerca de los niveles basales de las hormonas esteroides reproductivas (Scobell y Mackenzie, 2011; Mayer *et al.*, 1993; Poortenaar *et al.*, 2004). Sin embargo, muchos de sus resultados indican que la variabilidad detectada en los niveles de andrógenos y las fallas para la detección de estrógenos se relacionan con muestreos relativamente poco frecuentes, el uso de “pools” de muestras cuando hay poca cantidad de plasma, la baja sensibilidad de los ensayos para la determinación de hormonas, y el estrés inducido por la captura y la toma de sangre. Sin embargo, estos estudios proporcionan una visión más amplia acerca de los aspectos fundamentales de la endocrinología reproductiva en los peces, y muestran que la medición de las hormonas esteroides es posible en los syngnátidos (Scobell y Mackenzie, 2011).

## 8. CONCLUSIONES

1. En el presente estudio se corroboró que la frecuencia de la conducta de cortejo y competencia intra-sexual en los machos y hembras de *Hippocampus erectus* no varía dependiendo de la proporción sexual. Los machos consistentemente cortejan al sexo opuesto y compiten más entre sí que las hembras independientemente de la proporción en la que se encuentran ambos sexos. Con ello se confirman los roles sexuales convencionales y se propone que los roles sexuales tienen una plasticidad limitada en *H. erectus*.

2. La causa de que no se presentaran cambios en el comportamiento de los organismos experimentales no puede relacionarse al poco tiempo de exposición de los animales a los tratamientos. Si en este estudio la densidad tuviera un efecto, sería el incremento en la frecuencia de las conductas de cortejo y de competencia aún más que en el medio natural, debido a que las densidades de individuos empleadas en todos los tratamientos fueron altas.

3. En el presente estudio no se observaron variaciones significativas en los niveles de 11-KT y T en los machos y hembras de *H. erectus* sometidos a los diferentes tratamientos, observaciones explicables ante el hecho de que no se presentaron diferencias en la frecuencia de conductas de cortejo y competencia importantes entre éstos. A pesar de lo anterior, a partir de los resultados sugiero que la escala temporal en la que fueron tomadas las muestras de sangre influye en los niveles hormonales registrados, por lo que, se sugiere que los andrógenos deben ser medidos cada día de observación para conocer si existe o no un patrón temporal que concuerda con aquel de la conducta.

4. Cabe mencionar que varios factores como los muestreos relativamente poco frecuentes debido a la cantidad de sangre obtenida de los individuos, la baja sensibilidad de los ensayos para la determinación de estas hormonas, y el estrés inducido por la captura y la toma de sangre pudieron haber influido en la determinación de la T y 11-KT en ambos sexos de *H. erectus*. Lo cual concuerda con la información obtenida con los estudios sobre la



endocrinología de los syngnátidos, que indican que la variabilidad detectada en los niveles de hormonas reproductivas se relaciona con estos factores.

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

Almada, V. C., Goncalves E. J., Oliveira R. F. & Santos A. J. 1995. Courting females: ecological constraints affect sex roles in a natural population of the blennid fish *Salaria pavo*. *Anim. Behav.* 49:1125-1127.

Anderson, M. 1994. *Sexual selection*. Princenton, New Jersey: Princenton University Press.

Andersson, M. & Iwasa Y. 1996. *Sexual selection*. *Trends in Ecology and Evolution*. 11:53-58.

Arnold, S.J. & Wade, M.J. 1984. On the measurement of natural and sexual selection: theory. *Evolution*. 38:709-719.

Balshine-Earn, S. & Mc Andrew B. J. 1995. Sex-role reversal in the Black-chinned Tilapia, *Sarotherodon melanotheron* (Rüpel) (Ciclidae). *Behaviour*. 132: 861-874.

Bateman, A. J. 1948. Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*. 2:349-368.

Baum, J. K., Meeuwig, J. J., & Vincent, A. C. J. 2003. Bycatch of lined seahorse (*Hippocampus erectus*) in Gulf Mexico shrimp trawl fishery. *Fish. Bull.* 101:721-731.

Bell, E. M.; Lockyear, J. F.; McPherson, J. M.; Marsden, A. D. & Vincent, A. C. J. 2003. First field studies of an endangered South African seahorse, *Hippocampus capensis*. *Environ. Biol. Fish.* 67:35-46.

Berglund, A., Rosenqvist, G. & Svensson, I. 1986a. Reversed sex roles and parental energy investment in zygotes of two pipefish (Syngnathidae) species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 29: 209-215.

Berglund, A., Rosenqvist G. & Svensson I. 1986b. Mate choice, fecundity and sexual dimorphism in two pipefish species (Syngnathidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 19:301-307.

Berglund, A., Rosenqvist G. & Svensson I. 1989. Reproductive success of females limited by males in two pipefish species. *Am. Nat.* 133:506-516.

Boisseau, J. 1967. Les regulations hormonales de l'incubation chez un Vertebre male: recherches sur la reproduction de l'Hippocampe. D.Sc. thesis, Universite de Bordeaux, France.

Bye, V. J. 1984. The role environmental factors in the timing of reproductive cycles. In: Fish reproduction: strategies and tactics (Potts, G. W. y Wooton, R. J. Eds.). London, U. K. Academic Press Inc. 187- 205 pp.

Cavaco, JE, Bogerd J, Goos H & Schulz RW 2001 Testosterone inhibits 11-ketotestosterone-induced spermatogenesis in African catfish (*Clarias gariepinus*). Biology of Reproduction. 65:1807-1812.

Carpucino, M., Baldacci A., Mazzini M. & Frazoi P. 2002. Functional significance of the male brood pouch in the reproductive strategies of pipefishes and seahorses: amorphological and ultrastructural comparative study on three anatomically different pouches. Journal of Fish Biology. 61:1465-1480.

Clutton-Brock, T. H. 1991. The Evolution of Parental Care. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.

Clutton-Brock, T. H. & Vincent A. C. J. 1991. Sexual selection and the potential reproductive rates of males and females. Nature. 351:58-60.

Clutton-Brock, T. H. & Parker G. A. 1992. Potential reproductive rates and the operation of sexual selection. Quarterly Review of Biology. 67:437-456.

Correa, M., Chung, K.S. & Manrique, R. 1989. Cultive experimental del caballito de mar, *Hippocapus erectus*. Bol. Inst. Oceanogr. Venez. 28 (1-2): 191-196.

Criscuolo, U. E. 2005. Bases fisiológicas de la reproducción en peces tropicales. En: Reproducción de los peces en el trópico. Bogotá, Colombia. INCODER. pp. 23-42.

Crow, J. F. 1958. Some possibilities for measuring selection intensities in man. Human Biol. 30:1-13.

Curtis, J. M. R. & Vincent A. C. J. 2006. Life history of unusual marine fish: survival, growth and movements patterns of *Hippocampus guttulatus* Cuvier 1829. Jour. Fish. Biol. 68:707-733.

Curtis J. M. R. 2007. Validation of a method for estimating realized annual fecundity in a multiple spawner, the long-snouted seahorse (*Hippocampus guttulatus*), using underwater visual census. Fish Bull. 10:327-336.

Darwin, C. 1871. The descent of man, and selection in relation to sex. London, UK: Murray.

Desjardins, J. K., Stiver K. A., Fitzpatrick J. L., Milligan N., Van Der Kraak, G. J. & Balshine, S. 2008. Sex and status in a cooperative breeding fish: behavior and androgens. Behavioral Ecology and Sociobiology. 62:785-794.

Eens, M. & Pinxten R. 2000. Sex role reversal in vertebrates: behavioural and endocrinological accounts. Horm. Behav. 37:126-134.

Emlen, S. T. & Orgin L. W. 1977. Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. Science. 197:215-223.

Faleiro, F., Narciso L. & Vicente L. 2008. Seahorse behaviour and aquaculture: How to improve *Hippocampus guttulatus* husbandry and reproduction? Aquaculture. 282:33-40.

Fiedler, K. 1954. Vergleichende Verhaltenstudien an Seenadeln, Schlangennadeln und Seepferdchen (Syngnathidae). Zeitschrift für Tierpsychologie. 11:358-416.

Foster, S. J. & Vincent C.J. 2004. Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. Journal of Fish Biology. 6:1-61.

Godwin, J. 2010. Neuroendocrinology of sexual plasticity in teleost fishes. Frontiers in Neuroendocrinology. 31:203-216.

Goncalves, E.J. & Oliveira R.F. 2010. Hormones and Sexual Behavior of Teleost Fishes. Chapter 7. 119-147 pp.

Gronell, A.M. 1984. Courtship, spawning and social organization of the pipefish, *Corythoichthys intestinalis* (Pisces: Syngnathidae) with notes on two congeneric species. *Zeitschrift für Tierpsychologie*. 65:1-24.

Hilomen-Garcia, G. V; Delos Reyes, R. & Garcia C. M. H. 2003. Tolerance of seahorse *Hippocampus kuda* (Bleeker) juveniles to various salinities. *J. Appl. Ichthyol.* 19: 94-98.

Höhn, E.O. & Cheng S.C. 1967. Gonadal hormones in Wilson's phalarope (*Steganopus tricolor*) and other birds in relation to plumage and sex behavior. *Gen. Comp. Endocrinol.* 8:1-11.

Jiménez, G. L., Ponce H. Muñoz A. S., Simoes N. & Mascaró M. 2011. Distribución de *Hippocampus erectus* en la laguna de Chelem, Yucatán y su relación con algunos aspectos de su conducta de cortejo. Segundo Simposium para el conocimiento de los recursos costeros del Sureste de México.

Jones, A. G., Kvarnemo C., More G. I., Simmons L. W. & Avise J. C. 1998. Microsatellite evidence for monogamy and sex-biased recombination in the Western Australian seahorse *Hippocampus angustus*. *Molecular Ecology*. 7:1497-1505.

Jones, A. G. & Ratterman N. L. 2009. Mate choice and sexual selection: What have we learned since Darwin? *PNAS*. 106:10001-10008.

Kime, D. E. 1993. "Classical" and "non classical" reproductive steroids in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 3:160-180

Klug, H., Heuschele J., Jenions M.D. & Kokko H. 2010. The mismeasurement of sexual selection. *J. EVOL. BIOL.* 23:447- 462.

Knapton, R. W. 1984. Parental investment: The problem of currency. *Canadian Journal of Zoology*. 62:2673-2674.

Kokko, H. & Johnstone R.A. 2002. Why is mutual mate choice not the norm? Operational sex ratios, sex roles and the evolution of sexually dimorphic and monomorphic signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 357:319-330.

Kokko, H. & Rankin D. J. 2006. Lonely hearts or sex in the city? Density dependent effects in mating systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 361: 319-334.

Kuiter, R. H. 2000. *Seahorses, Pipefishes and their Relatives: A Comprehensive Guide to Syngnathiformes*. Chorleywood, U.K.: TMC Publishing.

Kuwamura, T. 1985. Social and reproductive behavior of three mouthbrooding cardinalfishes, *Apogon doederleini*, *A. niger* and *A. notatus*. *Environmental Biology of Fishes*. 13:17-24.

Kvarnemo, C. & Ahnesjö I. 1996. The dynamics of operational sex ratios and competition for mates. *Trends Ecol. Evol.* 11: 404-408.

Kvarnemo, C. Moore I. G., Jones W. Nelson S. & Avise J. C. 2000. Monogamous pair bonds and mate switching in the Western Australian seahorse *Hippocampus subelongatus*. *J. EVOL. BIOL.* 13:882-888.

Kvarnemo, C., Moore I. G. & Jones A. G. 2007. Sexually selected females in the monogamous Western Australian seahorse. *Proc. R. Soc. B*. 274: 521-525.

Lin, Q., Lu J., Gao Y., Li S., Cai J. & Luo J. 2006. The effect of temperature on gonad, embryonic development and survival rate of juvenile seahorses, *Hippocampus kuda* Bleeker. *Aquaculture*. 254:701-713.

Lin, Q., Lin J. & Zhang D. 2008b. Breeding and juvenile culture of the lined seahorse, *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture*. 277:287-292.

Lockyear, J., Kaiser H. & Hecht T., 1997. Studies on the captive breeding of the Knysna seahorse, *Hippocampus capensis*. *Aquar. Sci. Conserv.* 1:129-136.

Lourie, S. A., Vincent A. C. J. & Hall H. J. 1999. *Seahorses - An Identification Guide to the World's Species and their Conservation*. Project Seahorse. London. UK, 213 pp.

Lourie, S. 2003. Measuring seahorse. Project seahorse, Technical Report Serie No. 4. Version 1. Project Seahorse, Fisheries Center, University of British Columbia 15 pp.

Lourie, S.A., Foster S.J., Cooper E.W. & Vincent, A.C., 2004. A Guide To The Identification Of Seahorses. Project Seahorse and TRAFFIC North America, Washington, D.C., 120 pp.

Lu, J.Y., Wu, J.Y. & Yang, D.W. 2001. Growth rate of *Hippocampus kuda* Bleeker under intensive culture. Journal of Fisheries of China. 26 (1): 61-66.

Lubzens, E., Young G., Bobe J. & Cerdà, J. 2010. Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*. 165:367-389.

Martin-Smith, K. M. & Vincent, A. C. J. 2005. Seahorse declines in the Derwent estuary, Tasmania in the absence of the fishing pressure. *Biol. Conserv.* 123:533-545.

Maruska, K. P., Korzan W. J. & Mensinger A. F. 2009. Individual, temporal, and population-level variations in circulating 11-ketotestosterone and 17 $\beta$ -estradiol concentrations in the oyster toadfish *Opsanus tau*. 152:569-578.

Masonjones, H. D. & Lewis S. M. 1996. Courtship behavior in the dwarf seahorse, *Hippocampus zosterae*. *Copeia*. 1996:634-640.

Masonjones, H. D. & Lewis S. M. 2000. Differences in potential reproductive rates of male and female seahorses related to courtship roles. *Anim. Behav.* 59:11-20.

Mattle, B. & Wilson A. B. 2009. Body size preferences in the pot-bellied seahorse *Hippocampus abdominalis*: Choosy males and indiscriminate females. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 63:1403-1220.

Mayer, I., Rosenqvist G., Borg B., Ahnesjö I., Berglund A. & Schulz R.W. 1993. Plasma levels of sex steroids in three species of pipefish (Syngnathidae). *Can. J. Zool.* 71:1903-1907.

Mayer, I., Borg B. & Páll M. 2004. Hormonal control of male reproductive behavior in fishes: a stickleback perspective. *Behaviour*. 141:1499-1510.

- Morgan, S. K. & Vincent, A. C. J. 2007. The ontogeny of hábitat associations in the tropical tiger tail seahorse *Hippocampus comes* Cantor, 1850. Jour. Fish Biol. 71:701-724.
- Moyle, P.B; Joseph J. & Cech Jr. 2004. Fishes an introduction to ichthyology. Reproduction.USA. Prentice Hall. 150-154 pp.
- Munakata, A. & Kobayashi M. 2010. Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. General and Comparative Endocrinology. 165:456-468
- Munro, A. D. & Pitcher, T. J. 1985. Steroid hormones and agonistic behavior in a cichlid teleost, *Aequidens pulcher*. Hormones and Behavior. 19:353-371.
- Naud, M. J., Curtis J. M. R. & Woodall M. G. L 2009. Mate choice, operational sex ratio, and social promiscuity in a wild population of the long-snouted seahorse *Hippocampus guttulatus*. Beh. Ecol. 20: 160-164.
- Nagahama, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. Int. J. Dev. Biol. 38:217-229.
- Nelson, R. 2005. An introduction to behavioural endocrinology. 3rd ed. Sunderland, MA: Sinauer.
- Nijhoff, M. 1993. Voortplantingsecologie van het zeepaardje *Hippocampus reidi* op het koraalrif van Bonaire. MSc Thesis. Rijksuniversiteit, Groningen, Holland.
- Oliveira, R.F., Adelino L., Canário A.V.M. & Grober M.S. 2001. Male sexual polymorphism, alternative reproductive tactics, and androgens in Combtooth Blennies (Pisces: Blenniidae), Horm. Behav. 40:266-275.
- Oliveira, R. F., Hirschenhauser K., Carneiro L. A. & Canario A.V.M. 2002. Social modulation of androgen levels in male teleost fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 132: 203-215.
- Oliveira, R. F. & Gonçalves D. 2008. Hormones and social behaviour of teleost fish. In: C. Magnhagen, V.A. Braithwaite, E. Forsgren & B.G. Kapoor (Eds.), "Fish behaviour". Science Publishers Inc., Enfield, N.H. 61-94 pp.



Okuda, N. 1999. Sex roles are not always reversed when the potential reproductive rate is higher in females. *Am. Nat.* 153:540-548.

Oring, L.W. & Fivizzani, A.J. 1991. Reproductive endocrinology of sex-role reversal. *Acta XX Congressus Internationalis ornithologici*. 20 pp. 2072-2080.

Payne, M.F. & Rippingale R.J. 2000. Rearing West Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepod nauplii and enriched Artemia. *Aquaculture*. 188:353-361.

Parker, G. A. & Simmons L. W. 1996. Parental investment and the control of sexual selection: predicting the direction of sexual competition. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 263:315-321.

Perante, N. C., Pajaro M. G., Meeuwing J. J. & Vincent A. C. 2002. Biology of a seahorse species, *Hippocampus comes*, in the central Philippines. *Jour. Fish. Biol.* 60:821-837.

Planas, M., Chamorro, A., Quintas, P. & Balcázar, J.L. 2008b. Maturation of long-snouted seahorse *Hippocampus guttulatus* females under culture conditions. *EAS, Special Pub.* 37:531-532.

Planas, M Quintas P., Chamorro A. C. & Silva C. 2010. Female maturation, egg characteristics and fatty acids profile in the seahorse *Hippocampus guttulatus*. *Animal Reproduction Science.* 122:66-73.

Poortenar, C. W., Woods C. M. C., James P. J., Giambartolomei F. M. & Lokman P. M. 2004. Reproductive biology of female big-bellied seahorses. *Journal of Fish Biology.* 64:717-725.

Ponce, H., Jiménez L., Simoes N. & Mascaro M. 2011. Variaciones espacio-temporales en algunas medidas corporales de *Hippocampus erectus*, en la laguna de Chelem, Yucatán. Segundo Simposium para el conocimiento de los recursos costeros del Sureste de México.

Quintas, P.; Chamorro, A., Piñeiro S., Medina I., & Planas M. 2007. Producción de artemia para la alimentación de caballito de mar *Hippocampus guttulatus* Cuvier 1829 en cautividad. XI congreso nacional de acuicultura, Vigo. Spain, pp 203- 206. 24-28 de septiembre del 2007.

Reinboth, R. & Rixner, W. 1970. Verhalten des kleinen Maulbruters *Hemihaplochromis multicolor* nach Kastration und Behandlung mit Testosteron. Unpublished manuscript, Gottingen.

Robins, C. R. & Ray G. C. 1986. A field guide to Atlantic coast fishes of North America. Houghton Mifflin Co. New York. USA. 354 pp.

Saraiva, J.L., Goncalves D. M. & Oliveira R. F. 2010. Environmental modulation of androgen levels and secondary sex characters in two populations of the peacock blenny *Salaria pavo*. *Hormones and Behavior*. 57:192-197.

Scarratt, A.M. 1995. Techniques for raising lined seahorses (*Hippocampus erectus*). *Aquarium Front*. 422: 24-29.

Scobell, S. K. & MacKenzie D. S. 2011. Reproductive endocrinology of Syngnathidae. *Journal of Fish Biology*. 78:1662-1680.

Selman, K., Wallace R. A. & Player D. 1991. Ovary of the seahorse, *Hippocampus erectus*. *Journal of Morphology*. 209:285-304.

Shuster, S. M., & Wade M. J. 2003. *Mating Systems and Strategies*. Princeton University Press: Princeton, NJ.

Silveira, R.B. 2000. Comportamento reprodutivo e crescimento inicial do cavalo marinho *Hippocampus reidi* Ginsburg (Pisces, Syngnathiformes, Syngnathidae) em laboratório. *Biociências*. 8:115-122.

Sorensen, P. W. & Goetz F. W. 1993 Pheromonal function of prostaglandin metabolites in teleost fish; *J. Lipid. Mediat*. 6:385-393.

Sorensen, P. W., Scott A. P., Stacey N. E. & Bowdin L. 1995. Sulfated 17, 20b-dihydroxy-4-pregnen-3-one functions as a potent and specific olfactory stimulant with pheromonal actions in the goldfish. *General and Comparative Endocrinology*. 100:128-142.

Stacey, N. E. 2003. Hormones, pheromones and reproductive behavior. *Fish Physiology and Biochemistry*. 28: 229-235.

Stacey, N. 2011. Hormonally derived sex pheromones in fishes. In *Hormones and Reproduction of Vertebrates*, Vol. 1 (Norris, D. O. & Lopez, K. H., eds). Amsterdam: Academic Press. 169–192 pp.

Stolting, K. N. & Wilson, A. B. 2007. Male pregnancy in seahorse and pipefish: beyond the mammalian model. *BioEssays*. 29:884-896.

Swenson, R.O. 1997. Sex-role reversal in the tidewater goby, *Eucyclogobius newberryi*. *Environmental Biology of Fishes*. 50:27-40.

Ter Braak , C.J.F. 1986. Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology*. 67:1167-1179.

Teixeira, R. L. & Musick, J. A. 2001. Reproduction and food habits of the lined Seahorse, *Hippocampus erectus* (Teleostei: Syngnathidae) of Chesapeake bay. Virginia. *Rev. Brasil. Bol. Rev. Brasil. Biol.* 61:79 -90.

Trivers, R. L. 1972. Parental investment and sexual selection. In *sexual selection and the descent of man*. Ed. by B. Campbell. Chicago: Aldine. 136-179 pp.

Villars, T.A. 1983. Hormones and aggressive behaviour in teleost fishes. In: Svare, B.B. (Ed.), *Hormones and Aggressive Behaviour*. Plenum Press, New York. 407-433 pp.

Vincent, A. C. 1990. Reproductive ecology of seahorses. PhD Thesis. University of Cambridge.

Vincent, A. C. J. 1992. Prospects for sex role reversal in teleost fishes. *Neth. J. Zool.* 42:392-399.

Vincent, A. C. J., Ahnesjo I., Berglund A. & Rosenqvist, G. 1992. Pipefishes and seahorses: are they all sex role reversed? *Trends in Ecology and Evolution*. 7:237-241.

Vincent, A. C. J. 1994a. Operational sex ratios in seahorses. *Behaviour*. 128:153-167.

Vincent, A. C. J. 1994b. Seahorses exhibit conventional sex roles in mating competition, despite male pregnancy. *Behaviour*. 128:135-151.

Vincent, A. C. J. 1995. A role for daily greetings in maintaining seahorse pair bonds. *Anim. Behav.* 49: 257-259.

Vincent, A. C. J. & Sadlers L. M. 1995. Faithful pair bonds in wild seahorses, *Hippocampus whitei*. *Anim. Behav.* 50:1557-1569.

Vincent, A. C. J., 1996. The international Trade in seahorse Cambridge: TRAFFIC International.

Vincent, A. C. J.; Marsden, A. D.; Evans, K. L. y Sadler, L. M. 2004. Temporal and spatial opportunities for polygamy in a monogamous *Hippocampus whitei*. *Behav.* 141: 141 -156.

Wade, M. J. 1979. Sexual selection and variance in reproductive success. *Am Nat.* 114:742-764.

Wade, M. J. & Arnold S. J. 1980. The intensity of sexual selection in relation to male sexual behaviour, female choice, and sperm precedence. *Anim Behav* 28:446-461.

Wade, M. J. 1995. The ecology of sexual selection: Mean crowding of females and resource-defence polygyny. *Evol. Ecol.* 9:118-124.

Walker, D. I., Lukatelich R. J., Bastyan G. & Mc Comb A. J.. 1989. Effect of boat moorings on seagrass beds near Perth, Western Australia. *Aquat. Bot.* 36: 69-77.

Wapler-Leong, D. C. Y. & Reinboth R. 1974. The influence of androgenic hormone on the behavior of *Haplochromis burtoni* (Cichlidae). *Fortschritte der Zoologie.* 22:334-339.

Williams, G. C. 1975. *Sex and evolution*. New Jersey: Princenton University Press.

Wilson, A. B. & Martin-Smith K. M. 2007. Genetic monogamy despite social promiscuity in the pot-bellied seahorse (*Hippocampus abdominalis*). *Molecular Ecology.* 16:2345-2352.

Wingfield, J.C., Hegner R.E., Dufty A. M. & Ball G. F. 1990. The challenge hypothesis: theoretical implications for patterns of testosterone secretion, mating systems, and breeding strategies. *Am. Nat.* 136: 829-846.

Woods, C. M. 2000. Preliminary observations on breeding and rearing the seahorse *Hippocampus abdominalis* (Teleostei: Syngnathidae) in captivity. *New Zealand Jour. Mar. Freshw. Res.* 34:475-485.

Zanuy, S., Carrillo M., Rocha A., Molés G. 2009. Regulación y control hormonal del proceso reproductor de los teleósteos. In: J. E. de los Monteros, M. Carrillo, (Eds.), *La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura*. Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Madrid. 99-172 pp.