

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE INGENIERÍA, CIENCIAS Y ADMINISTRACIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES
INSTITUTO DE AGROINDUSTRIAS



**SEMIOQUÍMICA QUE MEDIA LA INTERACCIÓN INTER- E INTRA-
ESPECIFICA DEL COPÉPODO ECTOPARÁSITO DE ESPECIES
SALMONÍDEAS *Caligus rogercresseyi* (COPEPODA : CALIGIDAE)**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO
DE DOCTOR EN CIENCIAS DE RECURSOS
NATURALES

JORGE EDUARDO PINO MARAMBIO

TEMUCO – CHILE
2007

**SEMIOQUÍMICA QUE MEDIA LA INTERACCIÓN INTER– E
INTRA–ESPECIFICA DEL COPEPODO ECTOPARÁSITO DE
ESPECIES SALMONÍDEAS *Caligus rogercresseyi*
(COPEPODA : CALIGIDAE)**

Esta Tesis fue realizada bajo la supervisión del Director de Tesis, Dr. ANDRES QUIROZ CORTEZ, Departamento de Ciencias Químicas y es presentada para su revisión por los miembros de la comisión examinadora

JORGE EDUARDO PINO MARAMBIO

DIRECTOR PROGRAMA DE
POSTGRADO EN CIENCIAS DE
RECURSOS NATURALES

Dr. Andrés Quiroz C.

Dra. Graciela Palma C.

Dr. Claudio Ramírez R.

DIRECCIÓN DE POSTGRADO
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

Dr. Eduardo Fuentes C.

Dr. Gonzalo Gajardo G.

Con amor para mi Padre, Madre y
Hermanos

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos al Dr. Andrés Quiroz C. por su apoyo, colaboración durante el desarrollo de esta investigación.

También agradezco a los proyectos FONDEF de CONICYT A0411025 y Fundación Andes C-13755 por el financiamiento aportado para el desarrollo de esta tesis, a la Universidad de Aberdeen (Escocia), Rothamsted Research (Inglaterra) y al Centro I-Mar de la Universidad de los Lagos por su colaboración para el desarrollo de esta tesis.

A la comisión evaluadora por sus valiosos aportes y comentarios que contribuyen a esta investigación.

Deseo expresar mi agradecimiento al Laboratorio de Química Ecológica, al Programa de Postgrado y al personal del Departamento de Ciencias Químicas de la Universidad de La Frontera y a todas las personas que de una u otra forma colaboraron en el desarrollo de esta tesis.

Un recuerdo a mis Amigos Ricardo y Gustavo, por el apoyo y amistad. En forma especial quiero agradecer a Andrés por la comprensión y consejos, especialmente por los 10 s al mes!

Finalmente agradezco a Dios y la Virgen por su guía y compañía.

RESUMEN

Los piojos de mar son ectoparásitos asociados a especies de salmones silvestres y cultivados. En Chile, la especie dominante, afectando la salmonicultura nacional, es *Caligus rogercresseyi* (Boxshall & Bravo 2000), el cual está presente en un 99% de las granjas salmoneras, y su utilización de hospederos incluye tanto salmónidos como peces nativos. El objetivo de este estudio, a través de ensayos biodirigidos, fue someter a prueba hipótesis de que las relaciones inter- e intraespecífica del piojo del salmón, *C. rogercresseyi* son mediadas por semioquímicos. Los ensayos biodirigidos están orientados también a determinar cuál es la fracción biológicamente activa disuelta en la matriz acuosa, donde se encuentran las señales químicas que median la semioquímica de este ectoparásito. Los resultados muestran un efecto atrayente cuando agua acondicionada de peces hospederos más susceptibles (*Onchorhynchus mykiss* y *Salmo salar*) fueron usados como fuentes de estímulos. En estudios de susceptibilidad también se observó que los individuos de la primera generación F1 criada en un hospedero específico; mostraron preferencia por el agua acondicionada proveniente del hospedero usado para la crianza de los individuos.

La fracción identificada como biológicamente activa posee características fisicoquímicas similares a los compuestos volátiles usados en interacciones semioquímicas en sistemas terrestres.

Por otra parte, los resultados relacionados a las relaciones intraespecíficas, ambas hembras adultas y juveniles-vírgenes de *C. rogercresseyi* elicitaron una respuesta atrayente de sus machos conespecíficos, por lo tanto una feromona sexual podría estar involucrada.

En resumen, los resultados nos entregan evidencias para la hipótesis que kairomonas son mediadores de la relación parasito-hospederos *C. rogercresseyi* y sus especies de hospederos más

susceptibles *O. mykiss* y *S. salar*, similar a la relación entre el piojo del salmón del hemisferio norte *L. salmonis* y peces hospederos. Adicionalmente, estos resultados apoyan la hipótesis que en estudios de cohabitancia, donde peces hospederos fueron infestados con *C. rogercresseyi* en un mismo estanque. La susceptibilidad que presentan las especies de salmones hospederos podría ser el resultado de la capacidad de *C. rogercresseyi* de identificar el hospedero más susceptible por medio de la señales químicas que los hospederos liberan a la matriz acuosa.

SUMMARY

Sea lice are ectoparasites associated with wild and cultured salmonid species. In Chile, the dominant species affecting aquaculture is *Caligus rogercresseyi* (Boxshall & Bravo 2000), which is present in 99% of the established cultured cages, and is distributed on both salmonid and native hosts. The objective of this study was to test the hypothesis that the intra- and interspecific relationships of the Chilean sea louse, *C. rogercresseyi* are mediated by semiochemicals, and to test the hypothesis that these chemical cues are responsible for differences in the susceptibility of the host. Our results show that an attractant effect was observed when conditioned water from Atlantic salmon, *Salmo salar* was used as the stimulus, indicating that adult males of *C. rogercresseyi* showed a preference for the host conditioned water. A repellent effect was elicited by conditioned water of the non-host, *Hypsoblennius sordidus* on adult males of *C. rogercresseyi*. Moreover, both young and adult females of *C. rogercresseyi* elicited an attractant response from conspecific adult males. A difference in the susceptibility of the host was observed when first generation (F1) of adult male *C. rogercresseyi* reared on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* were used in bioassays. F1 males were attracted to conditioned water of *O. mykiss*, but an avoidance behaviour was observed when they were stimulated by conditioned water of *S. salar*. In summary, our results provide evidence for the hypothesis that semiochemicals mediate the parasite-host interaction between *C. rogercresseyi* and their host is similar to the relationship between *Lepeophtheirus salmonis* with conspecific females and host fish. Furthermore, these results support the hypothesis that semiochemicals could be involved in the difference in the susceptibility of the host.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Ciclo de vida.....	1
1.2. Reproducción.	3
1.3. Localización del hospedero.....	6
1.4. Infestación del piojo de mar en salmónidos.....	7
1.4.1. Susceptibilidad del hospedero a infestación del piojo de mar.	9
1.5. Semioquímica en Copépodos.....	12
1.5.1. Semioquímicos de bajo peso molecular.	14
1.5.2. Semioquímicos de alto peso molecular.	17
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	19
3. OBJETIVO GENERAL	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
4.1. Mantenimiento de peces.....	21
4.2. Obtención de aguas acondicionadas de hospederos y no-hospederos.....	21
4.3. Recolección y mantenimiento de <i>C. rogercresseyi</i>	22
4.3.1. Preparación de primera generación (F1).	22
4.4. Obtención de aguas acondicionadas de hembras de <i>C. rogercresseyi</i>	23
4.5. Aislamiento de semioquímicos desde matriz acuosa.....	23
4.5.1. Extracción en fase sólida de aguas acondicionadas de peces hospedero y no-hospederos	23
4.5.2. Extracción en fase sólida de aguas acondicionadas de hembras de <i>C. rogercresseyi</i> .	24
4.6. Análisis químicos de los extractos.	24
4.6.1. Destilación al vacío.	24

4.6.2.	Extracción líquido-líquido.	25
4.6.3.	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).	25
4.7.	Bioensayos de preferencia.....	26
4.7.1.	Bioensayos con aguas acondicionadas de hospederos y no-hospederos.	26
4.7.2.	Bioensayos de preferencia con extractos y fracciones del aislamiento de semioquímicos de aguas de hospederos y no hospederos.	27
4.7.3.	Bioensayos con aguas acondicionadas de hembras (bioensayos conoespecíficos).	27
4.7.4.	Bioensayos con extractos y residuos del aislamiento de semioquímicos de hembras.	28
5.	RESULTADOS.....	30
5.1.	Relaciones Interespecíficas.	30
5.1.1.	Bioensayos de preferencia.	30
5.1.2.	Susceptibilidad de hospederos.	33
5.1.3.	Fracciones activas.	36
5.2.	Relaciones intraespecíficas.	40
5.2.1.	Bioensayos de preferencia.	40
5.3.	Análisis por cromatografía de gases con detector de masas (GC-MS).....	42
5.3.1.	Señales químicas interespecíficas.	42
6.	DISCUSIÓN.....	47
7.	PROYECCIONES.....	51
8.	CONCLUSIONES.....	53
9.	REFERENCIAS.	54

ANEXO 1: PUBLICACIÓN ACEPTADA;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

ANEXO 2: PUBLICACION EN PREPARACIÓN...;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

ÍNDICE DE ESQUEMAS Y FIGURAS

Esquema 1. Ciclo de vida de especies <i>Caligus</i> ssp y <i>Lepeophtheirus</i> ssp. (Modificada de Sealice Workshop, Canada, 2004).	2
Esquema 2. Organigrama del estudio bio-dirigido para la determinación de la fracción biológicamente activa en el estudio de la Semioquímica de piojo del salmón <i>C. rogercresseyi</i>	29
Figura 1. Respuesta del quimiotaxismo de adultos machos de <i>C. rogercresseyi</i> a estímulos derivados de peces en un tubo Y (* P < 0,05 – Test no-paramétrico de Wilcoxon; ns: ninguna significancia; N =30 - 120).	31
Figura 2. Índice de preferencia de la respuesta direccional de machos adultos de <i>Caligus rogercresseyi</i> a agua de mar artificial fluyendo en ambos brazos del tubo Y.....	31
Figura 3. Índice de preferencia de la respuesta direccional en tubo Y de machos adultos de <i>Caligus rogercresseyi</i> a agua de mar acondicionada con el pez hospedero salmón Atlántico (<i>S. salar</i>) comparada con agua de mar artificial usada como control.	32
Figura 4. Índice de preferencia de la respuesta direccional en tubo Y de machos adultos de <i>Caligus rogercresseyi</i> a agua de mar acondicionada con pez no-hospedero Cachudito (<i>H. sordidus</i>) compara con agua de mar artificial usada como control.	32
Figura 5. Estudio de preferencia de estados adultos de la Generación F1 de <i>Caligus rogercresseyi</i> cultivado en salmón Atlántico (<i>Salmo salar</i>) por	

aguas acondicionadas de peces hospederos salmónidos cultivados en sur de Chile.....	34
Figura 6. Estudio de preferencia de estados adultos de la Generación F1 de <i>Caligus rogercresseyi</i> cultivado en trucha Arcoiris (<i>O. mykiss</i>) por aguas acondicionadas de peces hospederos salmónidos cultivados en sur de Chile.	35
Figura 7. Tiempo de permanencia en las zonas de tubo Y durante bioensayos de preferencia del piojo del salmón <i>C. rogercresseyi</i> a estímulos presentes en tres extracto EFS de peces salmónidos hospederos.....	36
Figura 8. Tiempo de permanencia en las zonas de tubo Y durante bioensayos de preferencia del piojo del salmón <i>C. rogercresseyi</i> a estímulos presentes en agua residual de la extracción fase sólida de dos peces salmónidos hospederos.	37
Figura 9. Tiempo de permanencia en las zonas del Y durante bioensayos de preferencia del piojo del salmón <i>C. rogercresseyi</i> a estímulos presentes en el destilado al vacío de extractos de salmones hospederos <i>O. mykiss</i> y <i>O. kisutch</i>	38
Figure 10. Frecuencia en la visita a zonas del tubo Y durante bioensayos de preferencia del piojo del salmón <i>C. rogercresseyi</i> a estímulos presentes residuos de la destilación al vacío de los extractos EFS de la tres especies de hospederos.	39
Figura 11. Estudio de la respuesta de adultos macho de <i>C. rogercresseyi</i> a estímulos liberados por hembras juveniles y adultas conespecíficas.	40

Figura 12. Número de visitas de machos adultos de <i>C. rogercresseyi</i> a los brazo control y brazo estímulo con hembras vírgenes conespecífica. (* P < 0,05 – Test Chi-cuadrado; N = 15).....	41
Figura 13. Tiempo de permanencia (s) de machos adultos de <i>C. rogercresseyi</i> al estímulo liberado por hembras vírgenes (HV) en agua de mar artificial y su extracto en etanol (EFS).....	42
Tabla 1. Cuadro resumen de compuestos candidatos a kairomonas provenientes de extractos de trucha Arcoiris (<i>O. mykiss</i>), salmón Atlántico (<i>S. salar</i>) y salmón Coho (<i>O. kisutch</i>).	43
Figura 14. Cromatogramas totales de iones correspondientes a los extractos etéreos de agua control (A) y agua acondicionada con hembras vírgenes de <i>C. rogercresseyi</i> (B).....	44
Figura 15. Ampliación entre 31,17 y 36,86 min de los cromatogramas totales de iones correspondientes a los extractos etéreos de agua control (A) y agua acondicionada con hembras vírgenes de <i>C. rogercresseyi</i> (B).....	45
Figura 16. Espectro de masas de la señal obtenida a los 33,53 min liberada por la fracción volátil de hembras vírgenes de <i>C. rogercresseyi</i>	45
Esquema 3. Estrategia Push-Pull en el control del piojo del salmón <i>C. rogercresseyi</i>	52

1. Introducción.

Copépodos son los parásitos más comunes en las especies de salmones silvestres y cultivables, existiendo una literatura bien documentada acerca de su taxonomía, ciclos de vida y relación parasito-hospedero. El termino piojo de mar es generalmente usado para definir las especies de copépodos pertenecientes a las clase Copepoda, familia Caligidae, que son las especies más reportadas, la cuales afectan la salmonicultura alrededor del mundo (Branson, 1999; González y Carvajal, 2003; Hogans y Trudeau, 1989; Johnson *et al.*, 2004; Pike y Wadsworth, 2000; Ritchie *et al.*, 1993; Ritchie *et al.*, 1996a, 1996b).

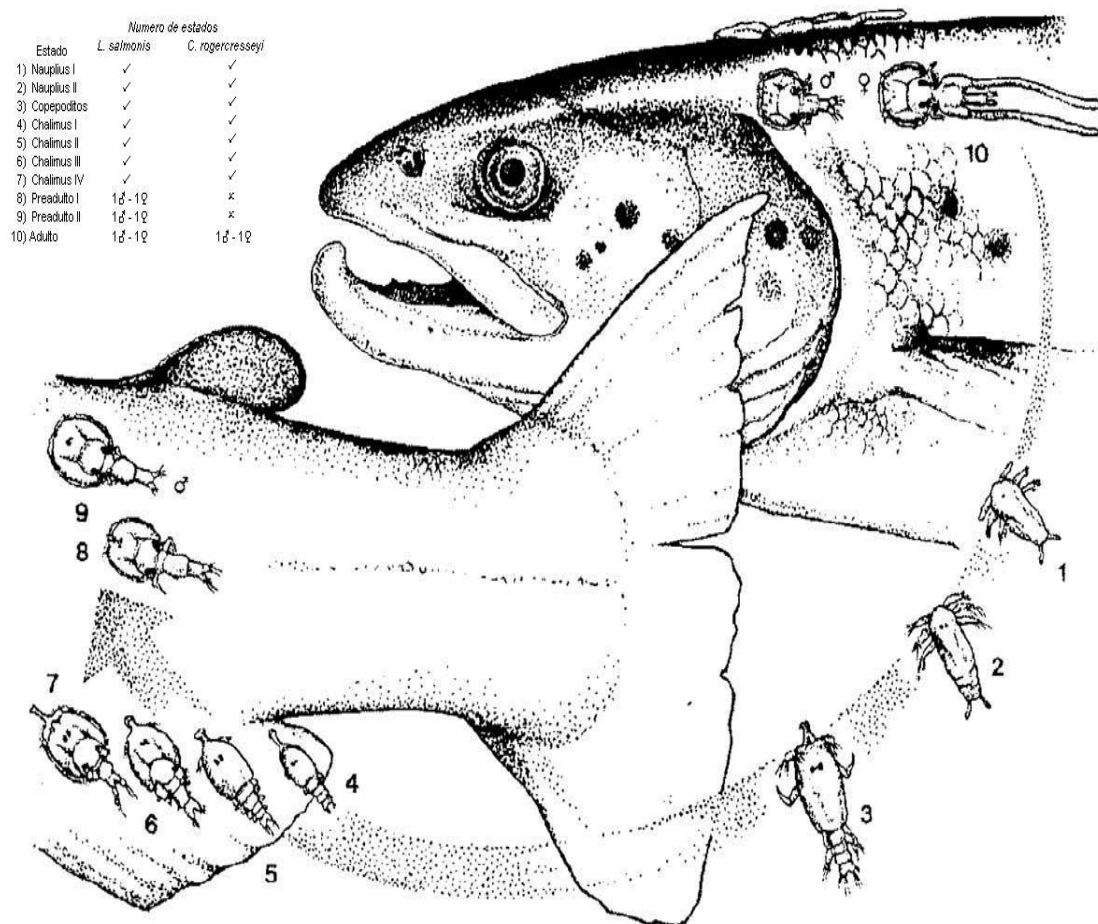
Lepeophtheirus salmonis y *Caligus elongatus* son las dos especies de piojos de mar responsables de serios problemas en salmonicultura en el Hemisferio Norte. Ambas especies han sido reportadas en diferentes regiones, teniendo *C. elongatus* una distribución en el Océano Atlántico, mientras que *L. salmonis* tiene una distribución alrededor del Polo Norte. La presencia de *L. salmonis* está limitada sobre hospederos salmónidos. En cambio *C. elongatus* tiene un amplio rango de hospederos salmónidos y no-salmónidos (Johnson *et al.*, 2004; Kabata, 2003; Pike y Wadsworth, 2000). En Chile la especie dominante que afecta al 99% de los centros de cultivo es *C. rogercresseyi* (Copepoda: Caligidae). Estos copépodos parasíticos se alimentan de mucus y piel de hospedero (González y Carvajal, 2003; Pike y Wadsworth, 2000).

1.1. Ciclo de vida.

En la familia Caligidae, el número de estados varía entre 8 y 11, dependiendo de la presencia de estados pre-adultos. No se han reportados estados pre-adultos en el ciclo de

vida de *C. rogercresseyi*, en el caso de *L. salmonis* el estado preadulto está presente (González y Carvajal, 2003; Pike y Wadsworth, 2000; Ritchie *et al.*, 1993).

González y Carvajal (2003) reportaron 8 estados dentro del ciclo de vida de *C. rogercresseyi*, tres de los cuales son planctónicos y 5 parasíticos. En el grupo de estados planctónicos existen dos estados naupliares y un copepodito, siendo éste el estado infestivo. Los estados parasíticos se caracterizan por tener cuatro estados Chalimus, terminando en un estado adulto de machos y hembras.



Esquema 1. Ciclo de vida de especies *Caligus* ssp y *Lepeophtheirus* ssp. (Modificada de Sealice Workshop, Canada, 2004).

1.2. Reproducción.

La reproducción es esencial para la supervivencia del piojo de mar. La búsqueda de parejas es realizada por los estados adultos machos en presencia de hembras adultas y/o preadultas. Este proceso involucra varios elementos, tanto biológicos como medioambientales, unidos en un complejo sistema de comunicación (Hull *et al.*, 1998; Lazzaretto *et al.*, 1994; Ritchie *et al.*, 1996b). Estudios sobre el comportamiento de apareamiento indican que la localización de la pareja puede ocurrir por la recepción de señales químicas como también por estímulos de contacto (Hull *et al.*, 1998; Lonsdale *et al.*, 1998; Ritchie *et al.*, 1996b). Variados comportamientos específicos asociados al quimiotactismo que existe entre el macho y la hembra, para la selección de parejas; han sido observados durante los periodos de precopulación de *L. salmonis*. Machos adultos forman pares preferentemente con hembra adultas vírgenes recién mudadas (Pike y Wadsworth, 2000; Ritchie *et al.*, 1996b). En Chile no existen estudios sobre del comportamiento reproductivo de *C. rogercresseyi* donde se haya registrado u observado la conducta del macho y la hembra durante el apareamiento.

El apareamiento puede ser definido como el agarre del adulto macho a una hembra juvenil; común entre algunos copépodos, donde una combinación de estímulos táctiles y estímulos químicos superficiales están involucrados durante la precopula (Lonsdale *et al.*, 1998). Anstensrud (1992) reportó que adultos de dos especies de copépodos parasíticos, *Lernaeocera branchialis* y *Lepeophtheirus pectoralis*, tienen apareamientos con diferentes estados de desarrollo, y que los adultos macho son capaces de diferenciar entre machos y

hembras en estado de Chalimus IV. *L. branquialis* y *L. pectoralis* no discriminaron entre hembras preadultas y hembras vírgenes maduras.

De acuerdo con Lonsdale *et al.* (1998), estas relaciones intraespecíficas están relacionadas con el uso eficiente de feromonas. La eficacia en el uso de feromonas va en relación al tamaño del organismo; si el copépodo está sobre el tamaño mínimo en el rango de tamaño para difundir feromonas; se beneficia la localización de pareja. Copépodos debajo de tamañazo mínimo observado por Lonsdale *et al.* (1998) no dedicarían su energía a producir feromonas sexuales y utilizaría otros mecanismos para la localización de parejas.

La estructura del sistema nervioso de los copépodos es simple, sugiriendo que los piojos de mar tienen a capacidad sensorial baja. Sin embargo, a partir de observaciones del comportamiento de copépodos, se han detectado variadas respuestas a cambios hidrodinámicos, calidad e intensidad de luz; temperatura o cambios de dirección frente a la presencia de olores liberados por peces (Bron *et al.*, 1993; Devine *et al.*, 2000; Heuch, 1995; Hull *et al.*, 1998). Snell y Morris (1993) indicaron que los machos localizan a sus hembras conespecíficas a una distancia entre 2 – 20mm de acuerdo al experimento realizado por Katona (1973), usando quimiorreceptores de moléculas difusibles. Además, indicaron que las hembras dependen de la recepción de moléculas que están sobre su cuerpo que son captadas por el macho a través para reconocer una pareja. Dos especies de copépodos *L. salmonis* y *L. pectoralis*, sostienen de la misma forma a la hembra por periodos largos antes de transferir sus espermátóforos, proceso que ocurre sobre el hospedero (Anstensrud, 1992; Pike y Wadsworth, 2000).

El movimiento o agarre durante la copulación y selección de hospederos, es influenciado por señales químicas y mecánicas provenientes de potenciales parejas (Buskey, 1998; Snell

y Morris, 1993). Se ha determinado que la quimiorrecepción es la modalidad sensorial más usada, donde el macho es quién responde a moléculas emitidas por la hembra. Algunos estudios han indicado que es el macho quién busca a la hembra durante la selección de parejas (Hull *et al.*, 1998; Ingvarsdottir *et al.*, 2002a; Lonsdale *et al.*, 1998). La recepción de señales químicas por el macho, le entrega información acerca de la localización de hembra (Buskey, 1998). Adicionalmente, el agarre del macho a la hembra, durante el proceso de copulación ha sido interpretado como la búsqueda del macho por estímulos químicos superficiales. Estudio de apareamiento sugieren que existen señales químicas sobre la superficie de la hembra que son importantes en el reconocimiento de parejas (Snell y Carmona, 1994).

Hull *et al.* (1998) determinaron patrones de formación de parejas y apareamiento en *L. salmonis* y encontraron que la formación de parejas fue significativamente más alta en piojos usados como control que en los piojos con ambas anténulas removidas. La remoción de las anténulas también afectó el número de hembras apareadas; la primera hembra apareada fue observada después de 8 h en ensayos con piojos macho control, mientras en el ensayo con piojos macho con antenas removidas, las primeras hembras apareadas fueron observadas después de 75 h. La remoción de las anténulas afectó el comportamiento del macho adulto reduciendo la formación de parejas, apareamiento y habilidad del macho para reconocer y localizar las hembras, comparada con el grupo control; pero aun es posible que ocurra. Los avances en el entendimiento de la quimiorrecepción y el estudio de la conducta de apareamiento permitirá la identificación de las señales químicas que median las relaciones intraespecíficas del piojo de mar.

1.3. Localización del hospedero.

La infestación del hospedero se inicia con el copepodito, el cual es el último estado de vida libre (planctónico). En estudios de campo se determinó que la luz podría ayudar a los copepoditos a incrementar la ocurrencia en el encuentro con el hospedero, ayudado también por el movimiento del pez, el cual produce cambio en la velocidad de agua y la luminosidad. El nivel de infestación puede reducirse en la ausencia de luz (Pike y Wadsworth, 2000).

Los copepoditos se encuentran cerca de la superficie, reportándose altos niveles de infestación entre los 0 y 4 metros de profundidad (Hevrøy *et al.*, 1997; Hevrøy *et al.*, 2003). Experimentos de laboratorio realizados con *Caligus* ssp. y *Lepeophtheirus* ssp., mostraron que los copepoditos reaccionan positiva y direccional a la luz, en directa relación con la intensidad de la luz, encontrándose una mayor respuesta a intensidades de luz de 550 nm (Bron *et al.*, 1993). Estos autores no encontraron respuesta de los copepoditos hacia estímulos químicos provenientes de piel y fluidos corporales de peces hospederos.

Una vez que los copepoditos se orientan en la columna de agua, la localización del hospedero depende del movimiento y/o señales químicas producidas por el pez hospedero (MacKinnon, 1998). Los copepoditos permanecen cerca de la superficie durante el día, estimulados por la luz. Dado que los salmones de cultivo se alimentan en la superficie durante el día, estos patrones de migración permiten la transmisión de los copepoditos al salmón (Heuch *et al.*, 1995; Hevrøy *et al.*, 1997).

L. salmonis tiene la tendencia a reconocer específicamente a especies de salmones, particularmente en el hábitat del salmón Atlántico. En el sur de Chile, estudios de preferencia indicaron que *C. rogercresseyi* responde a las tres especie de salmones

cultivado, pero esta respuesta no es específica como la del *L. salmonis*, ya que también *C. rogercresseyi* puede ser encontrado en hospederos no salmónidos. Un comportamiento muy similar fue observado en estudios de patrones de infestación del copépodo *C. elongatus* con distribución en el hemisferio norte (Carvajal *et al.*, 1998; González *et al.*, 2000; Pike y Wadsworth, 2000).

1.4. Infestación del piojo de mar en salmónidos.

Lepeophtheirus salmonis es responsable por daños en el tejido del hospedero, como abrasión, coloración oscura y hemorragias en la región perianal. Estas lesiones causadas por la actividad de alimentación del piojo pueden ser clasificadas desde una decoloración hasta la completa remoción de la piel en la zona dorsal y en la cabeza del salmónido (Johnson *et al.*, 1996).

Diferentes grados de daño en la infestación de *L. salmonis* en salmón Sockeye (*Oncorhynchus nerka*) fue reportada por Johnson *et al.* (1996). El nivel de las lesiones fue desde lesiones blancas posterior a la base de la aleta dorsal y región perianal, con extensiva decoloración, descamado y hemorragia, ocurridas al inicio de la infestación. Mientras que severas heridas con notoria exposición de la musculatura, en la misma zonas, fueron observadas cuando los estados adultos de *L. salmonis* estuvieron alimentándose.

Copepoditos adheridos sobre el pez producen repuesta celular local, produciendo pequeños puntos, visibles a simple vista, por la acumulación de melanocitos. Los estados Chalimus por otro lado, usando su filamento frontal, una vez que han atravesado la barrera del

epidermis: la actividad de alimentación de estos estados causa serios daños en una muy limitada área donde el Chalimus esta adherido al hospedero (Pike y Wadsworth, 2000).

Dawson (1998) reportó que estados chalimus de *L. salmonis* causaron serias erosiones en el pez, pero estos estados junto con los copepoditos no afectaron la fisiología del hospedero. Por otro lado, una reducción de la proteínas totales, albúmina y colesterol fue observada en el hospedero cuando los estados adulto aparecieron, efecto mucho mayor que si solo estuvieran los primeros estados o un pez sin infestación. Adultos de *L. salmonis* colocados en zonas como la cabeza, superficie dorsal y zona post-anal, evidenció severos daños. La acción de los estados adultos removi6 por completo de la piel y escamas.

Un incremento de la mortalidad de peces después de la aparición de estado preadultos fue observada por Grimnes y Jakobsen (1996); los efectos fisiológicos de la infestación de piojo de mar en post-smolt de salm6n Atlántico con una presencia de 30 a 250 piojos por pez. Los peces infestados sufrieron desde lesiones hasta fallas osmoregulatorias. Todos los peces infestados comenzaron a sucumbir después de que los estados adultos aparecieron. En todos los casos, la infestación durante el desarrollo de los estados del Chalimus fue severa. Dawson (1998) observó que la trucha silvestre (*Salmo trutta*) evidenciaba un da6o aparente en su piel cuando era infestada con estados móviles preadultos de *L. salmonis*. Dawson et al. (1999) informaron que el salm6n Atlántico artificialmente infestado con estados preadultos y adultos de *L. salmonis* mostraba cambios fisiológicos y da6os en su piel.

La naturaleza y extensión de la infestación por estos parásitos depende de diferentes factores, incluyendo estado del parasito, numero de parásitos presentes, edad del hospedero (MacKinnon, 1998). Las áreas superficiales erosionadas de la epidermis se incrementaron

con la intensidad de la infestación y el tamaño del parásito. Estas erosiones de la epidermis pueden causar una falla osmoregulatoria, permitiendo la pérdida de fluidos corporales, incluyendo sangre, proteínas y electrolitos (Grimnes y Jakobsen, 1996). Este desbalance puede ser restaurado, pero a través de un alto y estresante costo de energía. Si la condición de la infestación continúa, el salmón podría morir debido a la incapacidad de mantener la homeostasis.

La capacidad del piojo de mar para causar efectos patológicos en los salmones está relacionada con la edad, movilidad y severidad de la infestación. Así, el potencial de un estado larval para causar un efecto patológico es limitado comparado con el piojo de mar adulto, el cual es más grande y causa mayor efecto por su libertad de movimiento sobre la superficie del hospedero (Pike y Wadsworth, 2000).

1.4.1. Susceptibilidad del hospedero a infestación del piojo de mar.

Diferencias en la intensidad de la infestación han sido observadas en hospederos del piojo de mar. *Caligus elongatus* infesta a la trucha Ártica (Arctic charr), *Salvelinus alpinus*, más seriamente que al salmón Atlántico, *Salmo salar* cuando ambos se cultivaron en estanque de cohabitancia. Esta diferencia es debido a la alta susceptibilidad de la trucha Ártica, la cual en agua salada experimenta estrés osmoregulatorio, lo que provoca producción de mucus cambiando la composición de la epidermis. Esto crea un ambiente más favorable para el piojo en la trucha Ártica (MacKinnon, 1998).

En Chile, la susceptibilidad reportada por González *et al.* (1997) en especie salmónidas, mostró una influencia estacional en tanques de cultivo; encontrándose altos niveles de ectoparásitos en verano, otoño y primavera. En el conteo de parásitos, el ectoparásito *C.*

rogercresseyi fue encontrado en la piel del hospedero y fue prevalente entre un 14 y 84% en todos los estanques con trucha Arcoiris, *O. mykiss*. Por otro lado, solamente en un estanque con salmón Coho (*O. kisutch*), *C. rogercresseyi* fue encontrado en una baja densidad, mostrando una prevalencia del 25%.

En un estudio comparativo patológico, inmunológico y bioquímico de la sangre y mucus, como también la histología del piel realizado por Fast *et al.* (2002b), tres especies de salmónidos, trucha Arcoiris (*O. mykiss*), salmón Atlántico (*S. salar*) y salmón Coho (*O. kisutch*), fueron infestados con *L. salmonis*. La densidad del piojo de mar fue significativamente baja en salmón Coho, mientras que la infestación persistió en un alto número en trucha Arcoiris y salmón Atlántico. En salmón Coho los niveles de infestación es reducida debido a una respuesta de hospedero no-especifico que incluye hiperplasia epitelial, y respuesta inflamatoria causada por ciertas enzimas y proteínas.

Estudio de susceptibilidad a infestación de *L. salmonis* entre salmón Atlántico (*S. salar*), salmón Chinook (*O. tshawytscha*) y salmón Coho (*O. kisutch*), realizados por Johnson y Albright (1992b), demostraron que salmón Coho fue el más resistente a la infestación, seguido de salmón Chinook y el Atlántico. Los estudio histológicos asociados, mostraron un mejor desarrollo de la hiperplasia epitelial y de respuesta inflamatoria en el salmón Coho infestado con *L. salmonis*.

La población de *C. rogercresseyi* mostró abundancia y densidad en trucha Arcoiris *O. mykiss*, y un nivel alto de estados adultos. Este hospedero fue altamente colonizada por copepoditos infestivos al inicio de la infestación, los que rápidamente alcanzaron el estado adulto (González *et al.*, 2000).

La prevalencia y abundancia de *C. rogercresseyi* mostró ser más significativa en trucha Arcoiris que en salmón Atlántico y salmón Coho, en experimentos realizados en estanques de cohabitancia (González et al., 2000). Entre el salmón Coho y el salmón Atlántico, este último mostró más susceptibilidad a la infestación, mientras que el salmón Coho fue el más resistente.

Johnson y Albright (1992b) reportaron una susceptibilidad similar a la infestación con *L. salmonis* bajo condiciones de laboratorio. Salmón Coho fue el más resistente a la infestación que el salmón Atlántico. Fast et al. (2002b) observaron un lento desarrollo en los copépodos unidos al salmón Coho comparados con la trucha Arcoiris y el salmón Atlántico. Estudios histológicos mostraron que el salmón Coho tiene una respuesta en la epidermis a la presencia a *L. salmonis*. La misma respuesta se observó en el salmón Atlántico pero fue más baja. Esta respuesta causó cambios bioquímicos en la piel y el mucus después de la infestación (Fast et al., 2002b; Johnson y Albright, 1992b; Ross et al., 2000). Esta respuesta no-específica del salmón Coho fue establecida por Johnson y Albright (1992a), quienes observaron una reducción de la hiperplasia como respuesta no-específica a la infestación, en el tejido cuando se utilizó corticoides como supresor, lo cual incrementó la susceptibilidad del salmón Coho.

Experimentos realizados en estanques de cultivo sugieren que la trucha Arcoiris puede ser susceptible a la colonización de *C. rogercresseyi*; y el salmón Coho puede ser más resistente (González et al., 1997). Se estableció una susceptibilidad diferenciada del salmón Coho hacia dos ectoparásitos, al encontrarse que el salmón Coho fue más resistente a *C. rogercresseyi* pero más susceptible a la infestación con el ectoparásito *Ceratothoa*

gaudichaudii (González *et al.*, 1997). La alta resistencia fue confirmada más tarde en un estudio comparativo de la selección de hospedero de *C. rogercresseyi*.

C. rogercresseyi fue encontrado en un mayor número en jaulas con trucha Arcoiris que en jaulas con salmón Atlántico y Coho (González *et al.*, 2000). Muchos de los copépodos encontrados sobre trucha Arcoiris fueron estados adultos, mientras que sobre el salmón Atlántico y Coho; la mayoría de los copépodos encontrados estaban en los primeros estados del ciclo. Ninguna hembra ovígera fue encontrada sobre salmón Coho.

Las diferencias en la susceptibilidad de estas especies podría ser un efecto de las diferentes estructuras en la química de la epidermis de cada especie (Nagasawa *et al.*, 1993). La alta resistencia del salmón Coho a *L. salmonis* depende del desarrollo de la capa en la epidermis del pez hospedero (Johnson y Albright, 1992b).

1.5. Semioquímica en Copépodos.

Las medidas de control alternativas a los quimioterapéuticos actualmente en uso son muy necesarias para reducir los costos y el impacto medioambiental en el cultivo del salmón. Una de estas alternativas es encontrada dentro del área de la Química Ecológica, una disciplina que estudia la comunicación química entre seres vivos.

Las señales químicas que inducen un comportamiento específico en un organismo son denominados semioquímicos (Barbier, 1979; Bernays y Chapman, 1994; Norlund y Lewis, 1976). Estos compuestos son usados por los seres vivos para comunicarse intra o inter específicamente o seleccionar un potencial hospedero (Bernays y Chapman, 1994; Wyatt, 2003).

Los semioquímicos pueden ser agrupados en aleloquímicos y feromonas. Los aleloquímicos son sustancias que median interacciones interespecíficas. De estos, las alomonas proporcionan una ventaja adaptativa al transmisor, y las kairomonas le proporcionan una ventaja adaptativa al receptor (Howse *et al.*, 1998).

Un estudio reciente ha informado que las kairomonas median muchas de las interacciones entre las especies acuáticas (Burks y Lodge, 2002). Estos autores informaron que el pez tiende a actuar como transmisor de kairomonas, mientras los organismos del zooplancton actúan principalmente como receptores.

Diversos precedentes en el género Copepoda sugieren la existencia de comunicación química en algunas especies. Se sabe que muchos copépodos planctónicos usan señales químicas para identificar y encontrar a sus conespecíficos (Katona, 1973; Tsuda y Miller, 1998). Los copépodos usan mecano-recepción y/o quimiorrecepción para detectar a los potenciales compañeros a distancia; otra posibilidad es que un encuentro copulativo pueda ocurrir por un comportamiento aleatorio durante el nado. Se ha indicado que los organismos usan feromonas difusibles, y su utilización está relacionada con el tamaño de organismos. Ha sido determinado que copépodos de tamaño mayor 0,1 mm en su radio esférico, dedican energía a la producción de feromona en vez de al comportamiento aleatorio en el nado. Para organismos más pequeños, la producción de feromonas no aumentó la reproducción. Los copépodos parásitos de salmones están por encima del tamaño mínimo del tamaño para la producción de feromonas, donde el apareamiento se podría ver favorecido con la producción de estas feromonas difusibles (Kabata, 1981; Lonsdale *et al.*, 1998).

La literatura acerca de la comunicación con feromonas sexuales en Crustáceos, incluyendo copépodos, indica que la comunicación química entre estos crustáceos está tan elaborada como ha sido descrito en insectos terrestres (Snell y Morris, 1993).

Varios casos han sido indicados por Lonsdale *et al.* (1998) donde los copépodos usan feromonas difusibles para detectar a conespecíficos. Los cambios en el comportamiento nadador del copépodo *Diaptomus leptopus* fueron observados cuando los machos fueron expuestos a agua previamente acondicionada con hembras fecundas; ningún cambio fue registrado con agua acondicionada de machos o hembras no-fecundadas.

1.5.1. Semioquímicos de bajo peso molecular.

Semioquímicos de peso molecular bajo en ambientes marinos tienen la solubilidad necesaria para ser transportados por un medio acuoso, parecido a los semioquímicos que se transportan por el aire en los sistemas terrestres (Ingvarsdottir *et al.*, 2002b).

Por otra parte, algunas características de los órganos reproductivos de hembras de *L. salmonis* sugieren que las hembras adultas son monógamas, mientras los machos adultos son polígamos; es el macho quien responde a las señales químicas emitidas por las hembras de acuerdo a los estudios de conducta reproductiva de *L. salmonis* realizada por Ritchie *et al.* (1996a).

Varios comportamientos específicos han sido observados durante el período de precópula; durante la cópula y al final de la muda de la hembra. El comportamiento de apareamiento es exhibido por los varones adultos en presencia de hembras adultas y preadultas. Este comportamiento sugiere que el reconocimiento del compañero en *L.*

salmonis podría ser mediado por compuestos químicos o estímulos de contacto (Ritchie *et al.*, 1996b).

Katona (1973) llevó a cabo un estudio conductual para observar el comportamiento en la localización de parejas entre diferentes especies de copépodos; encontrando que la selección de parejas comenzó entre 2 y 20 mm de separación de hembras, que no habían tenido contacto previo, lo cual sugiere que una señal química fue recibida por el macho. Similar comportamiento fue observado cuando machos y hembras fueron separados por una membrana de diálisis, sugiriendo que el peso molecular de las señales químicas sería bajo (Ingvarsdottir *et al.*, 2002a).

Se determinó que la quimiorrecepción es la modalidad sensorial más usada en el reconocimiento de parejas. Las señales químicas ayudan a mejorar la información, estimando la dirección de la fuente, especialmente en ambientes turbulentos (Buskey, 1998). Se ha informado que los movimientos que son desarrollados en el comportamiento copulativo y la selección de parejas son influenciados por estímulos mecánicos y químicos proveniente de potenciales parejas (Buskey, 1998; Snell y Morris, 1993).

Los principales estudios relacionados con el rol de la semioquímica en el ciclo biológico de la familia Copepoda ha estado enfocado sobre *L. salmonis* que se distribuye alrededor del hemisferio norte. Se han identificado algunas estructuras de las antenas, que son responsables de la quimiorrecepción (Gresty *et al.*, 1993).

Devine *et al.* (2000) demostraron que los piojos del mar adultos machos desarrollan comportamientos específicos hacia semioquímicos liberados de salmón, observándose una rheotaxis positiva a señales químicas del salmón Atlántico. Se encontró un comportamiento cinético y/o direccional a una o varias señales químicas derivadas de

Turbot (*Scophthalmus maximus*) y salmón Atlántico (*S. salar*). En las señales químicas presentes en la piel y el moco del pez, los piojos del mar mostraron una respuesta; estas señales en un ambiente natural podrían ser disueltas en el agua o pudieron ser llevadas en las partículas de mucus del hospedero. Las pruebas direccionales realizadas por Devine *et al.* (2000) mostraron que el agua acondicionada de salmón mostró más atracción (preferencia) por los piojos del mar que el agua acondicionada de del pez no hospedero *S. maximus* (Turbot), sugiriendo una respuesta neutral de los piojos cuándo están expuestos a señales de peces de otros grupos taxonómicos. Esto se relacionaría con la especificidad de los piojos por las especies de salmónidos.

Recientemente, Ingvarsdottir *et al.* (2002b) mostró que los machos adultos de *L. salmonis* fueron atraídos por agua acondicionada con salmón, como también a su respectivo extracto. En un estudio de taxis, el agua acondicionada de salmón (AAS) aumentó la actividad de piojos del mar y se incrementó el número de piojos moviéndose hacia la fuente; al mismo tiempo, el extracto de AAS y ambas fracciones volátiles y no volátiles fueron usadas para observar la actividad de los piojos. Sólo en la fracción volátil, se observó un incremento en la actividad comparada con agua de mar artificial usada como control. Esto confirmó el uso de semioquímicos en la selección de hospederos.

Algunos compuestos, como isoforona y 1-octen-3-ol, encontrados en carne de salmón, fueron identificados en la fracción volátil. Estos compuestos activaron una respuesta en los machos adultos del piojos de mar, pero ninguna de las respuestas en el taxismo fue observada (Ingvarsdottir *et al.*, 2002b); en experimentos en tanque con trampas conteniendo isoforona, los piojos del mar machos prefirieron estar adherida a la trampa con isoforona, en vez del pez hospedero usado como control.

El estudio del comportamiento en la selección y búsqueda de hospedero en *L. salmonis* ha sido desarrollado por Mordue *et al.* (2004) quienes se han enfocado en el estudio del comportamiento de los machos adultos del piojo de mar. Los resultados sugirieron que el movimiento de adultos de *L. salmonis* entre hospederos en las jaulas podría ser estimulado por compuestos químicos.

En forma paralela, Ingvarsdottir *et al.* (2002a) ha estado investigando la emisión de posibles feromonas sexuales en hembras de *L. salmonis*. Así, se ha informado que el agua del mar acondicionada con hembras vírgenes prematuras II de *L. salmonis* tiene un efecto atractivo sobre machos conespecíficos, produciendo una respuesta activa y direccional hacia estos estímulos comparados con la actividad observada cuando agua de mar artificial fue utilizado como estímulos de control (Lonsdale *et al.*, 1998). El extracto respectivo mostró el mismo efecto y sólo la “fracción volátil” (la fracción difusible, de peso molecular bajo) aumentó la actividad y las respuestas direccionales de los machos (Ingvarsdottir *et al.*, 2002a).

Los estudios y los avances en semioquímicos, conjuntamente con el estudio de comportamiento copulativo, permitirían la identificación de las señales químicas que median la interacción entre machos y hembras del piojo de mar; y de las señales químicas que se utilizan para la selección de hospederos.

1.5.2. Semioquímicos de alto peso molecular.

Estos compuestos estarían presentes en preparaciones provenientes de áreas del pez donde el ectoparásito se alimenta (mucus, piel y carne). Se ha establecido que hay estímulos emitidos desde la piel, carne y moco del pez. Esto podría indicar la existencia de una

quimiorrecepción de semioquímicos por el piojo de mar, y por consiguiente la composición química de la piel de un tipo específico de salmón podría estar asociada a la selección de hospederos (Johnson y Albright, 1992b). La literatura considera estas sustancias químicas como atractantes, pero estos tipos de compuestos deberían estar clasificados como fagoestimulantes. La infestación de piojos de mar en hospederos susceptibles causa cambios en la composición bioquímica de la piel que podría ayudar a desarrollar un ambiente apropiado para la actividad alimentadora de los piojos. El grado en la respuesta de hospedero no-específico por parte del pez hospedero podría influenciar la permanencia y desarrollo del piojo de mar durante su ciclo biológico (Fast *et al.*, 2002b; Nagasawa *et al.*, 1993).

Las sustancias químicas involucradas en la conducta de localización y reconocimiento parejas y hospederos del piojo de mar tienen diferentes características fisicoquímicas. Las primeras son principalmente moléculas lipofílicas orgánicas y son soluble en matrices acuosas (Ingvarsdottir *et al.*, 2002b). Por otro lado, las últimas involucradas en el reconocimiento son compuesto no-volátiles y de características hidrofílicas (Wyatt, 2003). Estudios quimiosensoriales no han sido desarrollados en relación a la búsqueda de parejas y hospederos de *Caligus rogercresseyi* en Chile. El objetivo de este estudio fue constatar la hipótesis de que las relaciones inter- e intraespecíficas del piojo de mar, *C. rogercresseyi*, son mediadas por semioquímicos. Además de constatar la hipótesis de estas señales químicas están involucradas en las diferencias de susceptibilidad de las distintas especies de hospederos salmónidos.

2. Hipótesis de Trabajo

Hipótesis 1.

Las relaciones intraespecíficas entre individuos de *Caligus rogercresseyi* son mediadas por semioquímicos del tipo feromona, producidas por los estados adultos durante el proceso de selección y búsqueda de parejas.

Hipótesis 2

Las relaciones interespecíficas entre individuos de *Caligus rogercresseyi* y las especies de salmónidos, son mediadas por semioquímicos del tipo kairomonas, utilizadas por el ectoparásito durante la localización y selección del hospedero.

3. Objetivo General

Determinar y caracterizar señales químicas, del tipo feromona y kairomona, involucradas en la relación interespecífica parásito-hospedero, entre el piojo de mar y los salmónidos, y peces no hospederos presentes en las granjas de cultivo; y en la interacción intraespecífica macho-hembra del piojo de mar.

Objetivos específicos 1.

Semioquímicos interespecíficos que median las interacciones parásito-hospedero.

- Determinar la metodología de extracción de potenciales compuesto químicos orgánicos presentes en la interacción parásito-hospedero.
- Estudiar la actividad biológica del extracto proveniente de la interacción parásito-hospedero.
- Fraccionar el extracto en fracciones polar y no polar.
- Estudiar la actividad biológica de las fracciones.

Objetivos específicos 2.

Semioquímicos intraespecíficos que median la interacción entre machos y hembras de *Caligus*.

- Determinar metodología de extracción de potenciales compuesto químicos orgánicos presentes en la interacción *Caligus-Caligus*.
- Estudiar la actividad biológica del extracto proveniente de la interacción entre adultos de *Caligus*.
- Fraccionar el extracto en fracciones de diferente rango de peso molecular.
- Estudiar la actividad biológica de las fracciones.

4. Materiales y Métodos.

4.1. Mantenimiento de peces.

Las especies hospedadoras de *C. rogercresseyi*, salmón Atlántico (*S. salar*), salmón Coho (*O. kisutch*) y trucha Arcoiris (*O. mykiss*), con un peso promedio de 250 g, fueron recolectados desde centros de cultivos de pre-smolt en la zona del lago Llanquihue, X región. La especie no-hospedadora de la familia Blenniidae *Hypsoblennius sordidus* (Cachudito) fue recolectada desde jaulas de cultivo en las costas de Puerto Montt. Todas las especies utilizadas en estos estudios fueron mantenidas en el Laboratorio de Química Ecológica y fueron esmoltificadas a través de un gradiente de salinidad hasta alcanzar 32ppt. La esmoltificación y posterior mantenimiento de los peces se realizó en estanques de fibra de vidrio circulares de 1 m de diámetro y 0,5m de alto, con un volumen de agua de mar de 50 L, manteniendo la salinidad a 32 ppt a una temperatura entre 12-14°C y un flujo de aire mantenido por bombas de acuario.

4.2. Obtención de aguas acondicionadas de hospedadores y no-hospedadores.

Para la preparación de agua acondicionada de pez, un individuo sin infestación (100 – 150 g) fue colocado en estanque elíptico circular por 24 h con 100 L de agua de mar artificial (SeaChem – Aquarium salt) con una salinidad de 32ppt a una temperatura de 12°C. El flujo de agua en el estanque fue de 30 cms⁻¹, con suministro constante de aire (Ingvarsdottir *et al.*, 2002b). El agua contenida en el estanque fue usada para bioensayos de preferencia o congelada para análisis químicos posteriores.

4.3. Recolección y mantención de *C. rogercresseyi*.

Machos y hembras adultos de *C. rogercresseyi* fueron recolectados desde salmón Atlántico recién cosechado desde centros de cultivos de la costa oeste de Puerto Montt (Chile). Los individuos recolectados fueron transportados al laboratorio de Química Ecológica de la Universidad de La Frontera, en frascos de plástico. Machos y hembras fueron separados y colocados en vasos precipitados (600 mL) con agua de mar artificial y mantenidos con suministro de aire a 12°C en absoluta oscuridad. Estos individuos fueron usados para los bioensayos interespecíficos.

4.3.1. Preparación de primera generación (F1).

Hembras ovígeras de *C. rogercresseyi* fueron colectadas desde las tres especies de hospederos salmónidos, trucha Arcoiris (*O. mykiss*), salmón Atlántico (*S. salar*) y salmón Coho (*O. kisutch*) recién cosechados desde centros de cultivos ubicados en la costa oeste de Puerto Montt. Los sacos ovígeros fueron removidos suavemente desde las hembras usando una pinza punta fina y fueron colocados en vasos precipitados separados (600 mL) con agua de mar artificial y mantenidos en suspensión por suministro de aire a 12°C, en absoluta oscuridad hasta que se alcanzó el estado de Copepodito. Machos y hembras adultos de *C. rogercresseyi* provenientes de las tres especies hospederas, se obtuvieron por infestación de *O. mykiss*, *S. salar* y *O. kisutch* de aproximadamente 150-250g cada infestación ocurrió en estanques separados de 200L sin flujo de agua y con aireación continua. Los adultos emergentes fueron usados en bioensayos de susceptibilidad y en bioensayos intraespecíficos.

4.4. Obtención de aguas acondicionadas de hembras de *C. rogercresseyi*.

Hembras en similares condiciones de desarrollos (n= 12) fueron colocadas dentro de pipetas Pasteur en grupos de seis hembras por pipeta. Las pipetas fueron conectadas a cada brazo de un tubo en Y (30 mm d.i., 15 cm longitud de brazos y 15,5 cm longitud de pierna) usando mangueras de plástico (Tygon R-3603). Un flujo de agua de mar artificial pasó por ambas pipetas a una velocidad de 30 mL min^{-1} , con una salinidad de 32ppt y a una temperatura de 12°C. A la salida de la pierna principal del tubo en Y, se recolectó el agua en un matraz Erlenmeyer de 5 L. El agua recolectada fue congelada para posterior análisis químico o usada inmediatamente para bioensayos intraespecíficos.

4.5. Aislamiento de semioquímicos desde matriz acuosa.

4.5.1. Extracción en fase sólida de aguas acondicionadas de peces hospedero y no-hospederos

La Extracción en Fase Sólida (EFS) fue usada para aislar un amplio rango de compuestos químicos que las diferentes especies hospederas y no hospederas liberaron en la matriz acuosa. Este procedimiento fue descrito inicialmente por Ingvarsdottir et al. (2002b). Por medio de esta técnica se extrajeron moléculas polares, neutras y lipofílicas desde aguas acondicionadas de *O. mykiss* (5,0 L), *S. salar* (5,0 L) y *O. kisutch* (5,0 L), además de la especie no-hospedera *H. sordidus*. Las columnas de EFS (Biotage, Uppsala - Sweden) consistieron de cartuchos de vidrio de 6-mL conteniendo dos capas de absorbentes de diferentes propiedades químicas; C2 (500 mg) sobre ENV+ (200 mg)). La extracción se realizó utilizando vacío usando un manifold (VacMaster-10 SPE (Biotage)).

Diez cartuchos de EFS fueron acondicionados previamente con 2mL de metanol grado HPLC, el que fue posteriormente removido con agua grado HPLC (2 mL). Finalizada la extracción de la muestra, la remoción de interferentes fue hecha con agua grado HPLC (2 mL). Los compuestos químicos contenido en la fases C2 y ENV+ fueron eluidos con 2mL de etanol grado HPLC, obteniéndose un volumen de extracto etanólico de 20mL. La mitad del extracto etanólico obtenido (10 mL) fue redissuelto en agua de mar artificial hasta la mitad del volumen inicial (2,5 L) de extracción para bioensayos posteriores. La otra mitad del extracto fue utilizado análisis químicos (Ingvarsdottir *et al.*, 2002b).

4.5.2. Extracción en fase sólida de aguas acondicionadas de hembras de *C. rogercresseyi*.

La extracción se realizó siguiendo el procedimiento anteriormente descrito (ver 2.5.1). La mitad del extracto etanólico (10 mL) obtenido fue redissuelto en agua de mar artificial hasta la mitad del volumen inicial (2,5 L) de extracción para bioensayos posteriores. La otra mitad del extracto fue utilizado análisis químicos (Ingvarsdottir *et al.*, 2002a).

4.6. Análisis químicos de los extractos.

4.6.1. Destilación al vacío.

La separación de las fracción volátil y no volátil provenientes los extractos EFS de las especies hospedadas y no-hospedadas; además de los extractos EFS de hembras y machos conoespecíficas, fue realizada por medio de destilación al vacío. La línea de vacío consta de dos trampas de gases, la primera próxima a la bomba de ultravacío (BOC Edwards) y la segunda trampa fue colocada en línea, para la condensación de la fracción etanólica volátil. Ambas trampas permanecen sumergidas en nitrógeno líquido durante la destilación.

La destilación se desarrolla colocando en un balón de destilación el extracto etanólico proveniente de la EFS (10 mL). El periodo de destilación es de 24h a una presión de vacío de 0,04 torr y a temperatura ambiente (20°C). El destilado etanólico obtenido contiene componentes con rango de masa molecular comparable a aquellos semioquímicos volátiles utilizados por organismos terrestres, mientras que el residuo dejado por la destilación al vacío contiene compuestos con insuficiente o ninguna volatilidad aparente.

4.6.2. Extracción líquido-líquido.

Para el análisis químico del destilado, la fracción volátil en el destilado fue separada por medio de la extracción líquido-líquido, la cual constó de una dilución del destilado en agua destilada (50mL) con el objetivo de aumentar la polaridad de la mezcla agua-etanol. La extracción se realiza tres veces con dietiléter (20mL) el solvente de baja polaridad, éter destilado (3 x 20 mL). Las fases orgánicas obtenidas se mezclan, y se secan con sulfato de calcio anhidro (CaSO₄). El extracto etéreo es filtrado y concentrado hasta 100 µL bajo flujo controlado de nitrógeno. El extracto es almacenado en microviales a -18°C.

4.6.3. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

Alícuotas de 1 µl del concentrado etéreo fueron analizadas por CG-EM a través de un modo de inyección de muestras splitless. Una columna capilar HP-5 GLC (25 m x 1,2 mm i.d. con 0,32 µl) fue conectada directamente al detector de masas (Finnigan FOCUS DSQ). Se usó Helio como gas de arrastre a un flujo de 1,5 mL/min. La puerta de inyección fue fijada a 250 °C. La adquisición del espectro de masas fue llevada a cabo en un rango de masas entre 35 to 500 *m/z*. La ionización fue por impacto electrónico a 70 eV y la fuente iónica

fue fijada a 200 °C. La temperatura del horno fue programada para permanecer a 40 °C durante 1 min, para posteriormente subir 5 °C min⁻¹ hasta 260 °C y permanecer a esa temperatura durante 5 min. La interfase entre el cromatógrafo de gases y el espectrómetro de masas fue fijada a 200 °C.

4.7. Bioensayos de preferencia.

4.7.1. Bioensayos con aguas acondicionadas de hospederos y no-hospederos.

Los estudios conductuales con piojos de mar fueron realizados de acuerdo a la metodología publicada en literatura (Devine *et al.*, 2000; Ingvarsdottir *et al.*, 2002a; Ingvarsdottir *et al.*, 2002b). Una arena de estudio en forma Y (tubo Y) (30 mm d.i., 15 cm longitud de brazos y 15,5 cm longitud de pierna) fue colocada sobre una caja de luz, sobre ella se dispuso una cámara digital (Panasonic) con el objetivo de seguir los movimientos del piojo durante los bioensayos. El tubo Y fue dividido en tres zonas: pierna, brazo control y brazo estímulo. Para cada experimento, un individuo (macho o hembra) fue introducido en la base de la pierna del tubo Y. El movimiento fue grabado por 10 minutos por el computador conectado a la cámara digital, cada grabación fue analizada usando un software de análisis conductual (Ethovision 3.1, Noldus Technology, Netherlands). Agua de mar artificial (SeaChem, sal de acuarios) fue usada como control en los bioensayos de preferencia, con un flujo de 30 mL min⁻¹ y salinidad de 32 ppt a 12°C. Para estudiar la respuesta a diferentes agua acondicionadas *S. salar*, *O. kisutch*, *O. mykiss* y *H. sordidus*, la cuales fueron usadas como estímulos. El agua acondicionada (Fuente de Estímulos) fue colocada en matraces Erlenmeyer (2L). Otro matraz Erlenmeyer (2L) fue usado para almacenar el agua de mar usada como control. Cada matraz fue conectado a uno de los brazos del tubo

en Y por medio de una manguera de PTFE (Tygon R-3603). La velocidad de flujo en ambos brazos fue de 30mL min^{-1} .

El tiempo de permanencia registrado en cada zona fue analizado para establecer diferencias de los piojos de mar por los estímulos comparándolo con el agua de mar artificial usada como control.

4.7.2. Bioensayos de preferencia con extractos y fracciones del aislamiento de semioquímicos de aguas de hospederos y no hospederos.

Cada extracto (20 mL) obtenido desde la extracción en fase sólida de las aguas acondicionadas de las especie hospederas y no-hospedera fue redisolto en agua de mar artificial en el mismo volumen (5,0 L) que se usó para su extracción. Como control, en 5,0 L de agua artificial de mar fueron disueltos 10 mL de etanol (grado HPLC).

Del volumen del destilado obtenido (20 mL), los cuales fueron redisolto en 5,0 L de agua de mar artificial. El residuo de la destilación al vacío fue redisolto en 20 mL etanol (grado HPLC), y luego fueron agregados a 5,0 L de agua de mar artificial. Estas disoluciones fueron utilizadas en bioensayos de preferencia como fue descrito anteriormente en (2.7.1).

4.7.3. Bioensayos con aguas acondicionadas de hembras (bioensayos conoespecíficos).

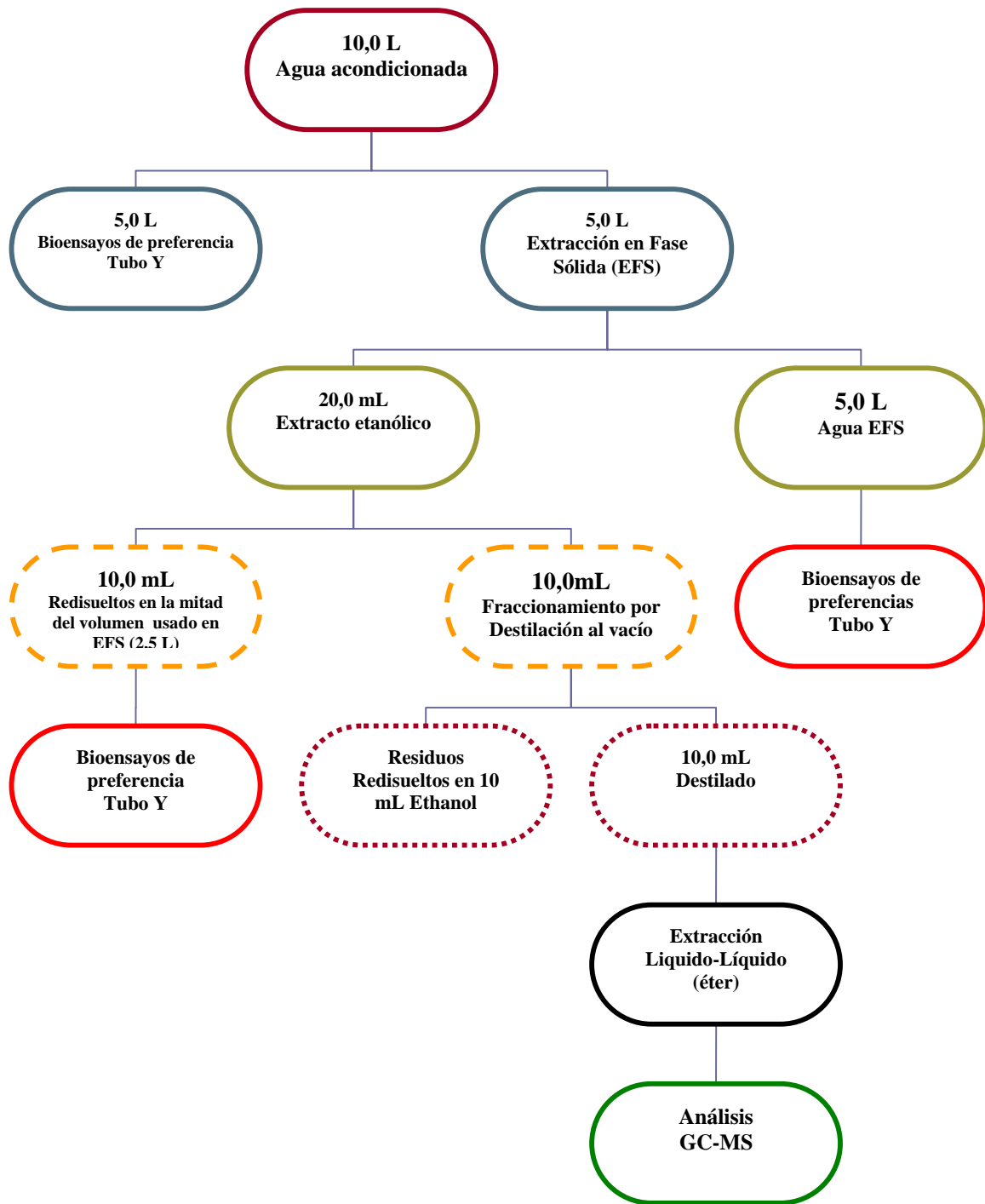
Para el estudio de la respuesta por las agua acondicionadas de macho y hembras conoespecíficos, 6 individuos machos o hembras de diferente estados (vírgenes, fecundadas o ovígeras) fueron colocadas en el interior de una pipeta Pasteur conectada a un extremo de uno de los brazos del tubo Y. Cada brazo está conectado a un matraz Erlenmeyer (2 L), los cuales contienen agua de mar artificial. Por ambos brazos fluye agua de mar artificial a 30mL min^{-1} con una salinidad de 32 ppt a 12°C . Un individuo macho o hembra adulto es

colocado en la base de la pierna del tubo Y. Los movimientos de los individuos se graban por 10 minutos por un computador conectado a la cámara digital. Las grabaciones son analizadas usando un software de análisis conductual (Ethovision 3.1, Noldus Technologies-Netherlands).

4.7.4. Bioensayos con extractos y residuos del aislamiento de semioquímicos de hembras.

Los extractos etanólicos obtenidos desde la extracción en fase sólida de las aguas acondicionadas de hembras y machos adultos de *C. rogercresseyi* fueron diluidos en agua de mar artificial en el mismo volumen que se usó para su extracción. El control en este caso fue el mismo volumen de agua usado para diluir el extracto EFS, pero adicionando solamente un volumen de etanol grado HPLC equivalente al volumen del extracto obtenido. La mitad del volumen del destilado etanólico fue diluido en la mitad del volumen de agua de mar artificial equivalente a volumen de agua acondicionada usada para extracción en EFS. La otra mitad del destilado fue utilizado en el análisis químico (ver 2.6.2 – 2.6.3). El residuo de la destilación al vacío fue redisoluto en el mismo volumen de etanol (grado HPLC) obtenido de la extracción en fase sólida.

Estas redisoluciones fueron utilizadas en bioensayos de preferencia como fue descrito anteriormente en (2.7.3).



Esquema 2. Organigrama del estudio biodirigido para la determinación de la fracción biológicamente activa en el estudio de la Semioquímica de piojo del salmón *C. rogercresseyi*.

5. Resultados

5.1. Relaciones Interspecíficas.

5.1.1. Bioensayos de preferencia.

El agua de mar artificial no mostró atractancia (preferencia) o repelencia sobre los estados adultos de *C. rogercresseyi* (Fig. 1; Test de rangos de Wilcoxon $P = 0,5693$). Se calculó un índice de preferencia (IP) definido como la razón entre el tiempo gastado en el brazo estímulo y el tiempo en el brazo control. Si $IP = 1$, indica que no existe preferencia o evasión; si $IP > 1$ indica una preferencia por los estímulos; si $IP < 1$ indica una evasión o preferencia por el control.

La evolución en el tiempo del bioensayo control -agua de mar artificial v/s agua de mar artificial- mostró que durante los 10 minutos de duración del bioensayo, el IP se mantuvo alrededor de 1; indicando que no existe ni atractancia (preferencia) ni evasión (Fig. 2; $IP = 1$).

Un efecto atractante se observó cuando se utilizó agua acondicionada de salmón Atlántico como fuente de estímulos; comparado con agua de mar artificial usada como control (Fig. 1; (Test de rangos de Wilcoxon; $P < 0,05$), indicando que adultos de *C. rogercresseyi* mostraron preferencia por el agua acondicionada de este hospedero. Este resultado fue corroborado al estudiar el desarrollo de esta conducta en el tiempo. La figura 3 muestra que el valor de IP se mantuvo sobre el valor 1 (Fig. 3) en un 80% de los tiempos evaluados. Un efecto de evasión se observó durante los bioensayos de preferencia, al utilizar agua acondicionada del pez no-hospedero Cachudito (*H. sordidus*) (Fig. 1; Test de rangos de Wilcoxon; $P < 0,001$). Esta conducta de repelencia fue observada durante todo el bioensayo, según lo muestra la figura 4, donde el valor de IP fue siempre inferior a 1.

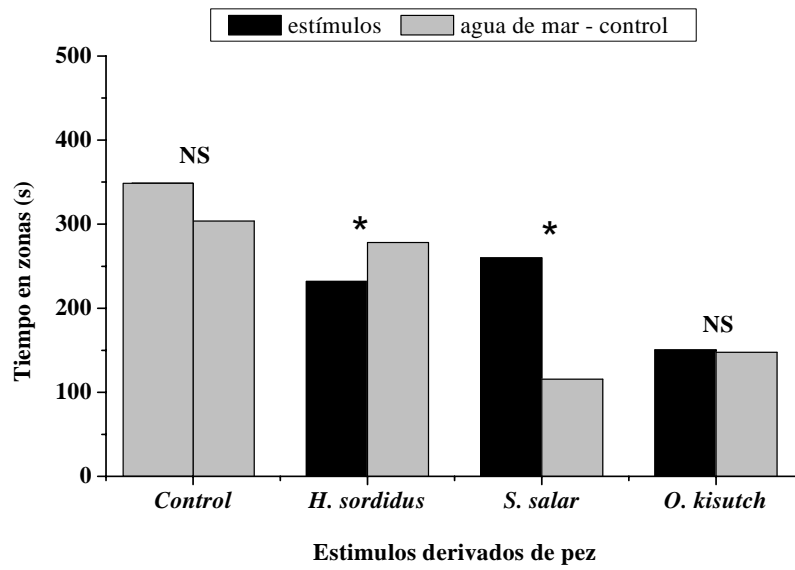


Figura 1. Respuesta del quimiotaxismo de adultos machos de *C. rogercresseyi* a estímulos derivados de peces en un tubo Y (* $P < 0,05$ – Test no-paramétrico de Wilcoxon; NS: ninguna significancia; $N = 30 - 120$).

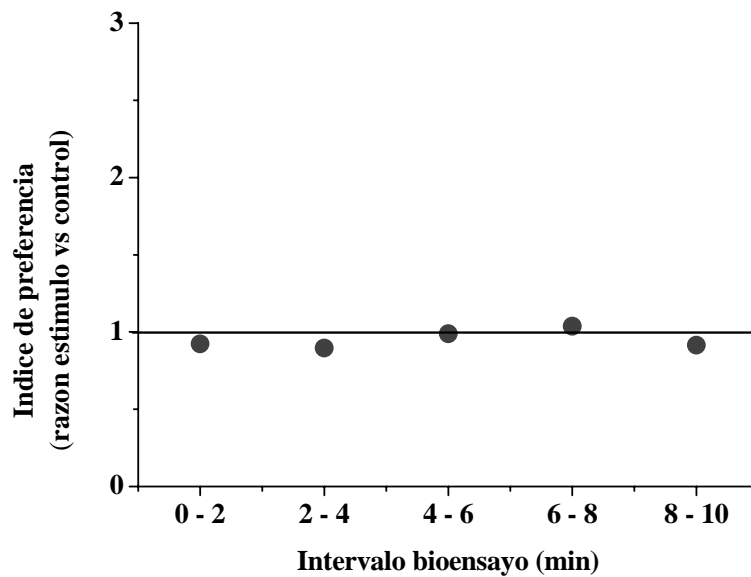


Figura 2. Índice de preferencia de la respuesta direccional de machos adultos de *Caligus rogercresseyi* a agua de mar artificial fluyendo en ambos brazos del tubo Y.

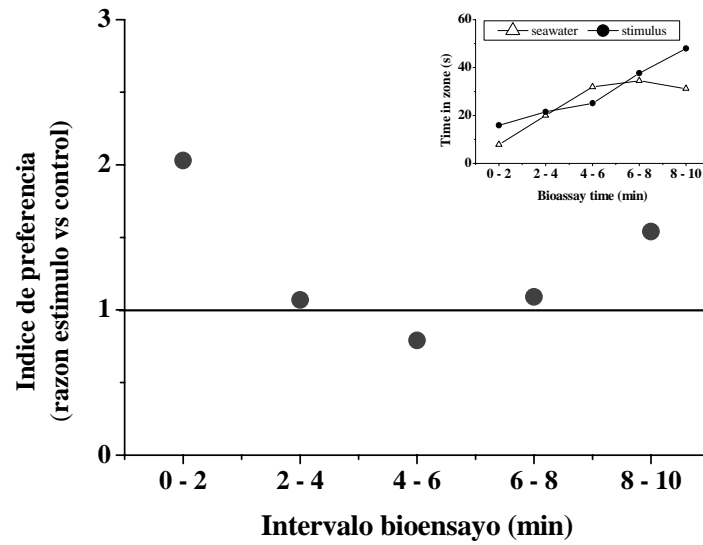


Figura 3. Índice de preferencia de la respuesta direccional en tubo Y de machos adultos de *Caligus rogercresseyi* a agua de mar acondicionada con el pez hospedero salmón Atlántico (*S. salar*) comparada con agua de mar artificial usada como control.

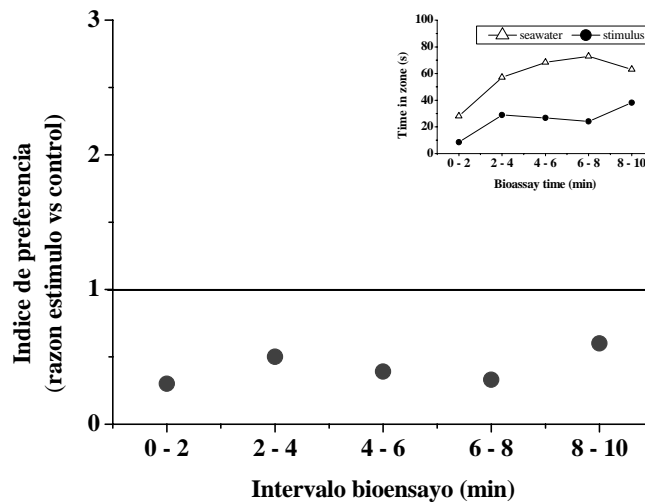


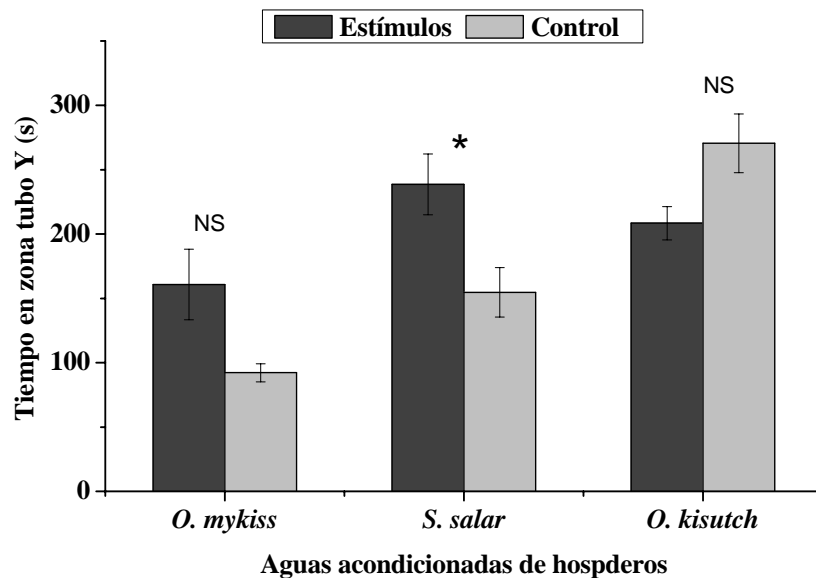
Figura 4. Índice de preferencia de la respuesta direccional en tubo Y de machos adultos de *Caligus rogercresseyi* a agua de mar acondicionada con pez no-hospedero Cachudito (*H. sordidus*) compara con agua de mar artificial usada como control.

El agua acondicionada con salmón Coho (*O. kisutch*) no provocó atractancia o repelencia en individuos adultos del piojo de mar (Fig. 1; $P > 0,6088$).

En resumen se observaron tres tipos de respuesta de individuos adultos de *C. rogercresseyi*: 1) atracción hacia agua acondicionada del pez hospedero (*S. salar*) ($P < 0,05$); 2) repelencia hacia agua acondicionada del pez no-hospedero Cachudito (*H. sordidus*) y 3) indiferencia por agua de mar acondicionada con salmón Coho (*O. kisutch*). Estos resultados sugieren que *C. rogercresseyi* fue capaz de identificar señales químicas disueltas en las respectivas aguas de mar acondicionadas.

5.1.2. Susceptibilidad de hospederos.

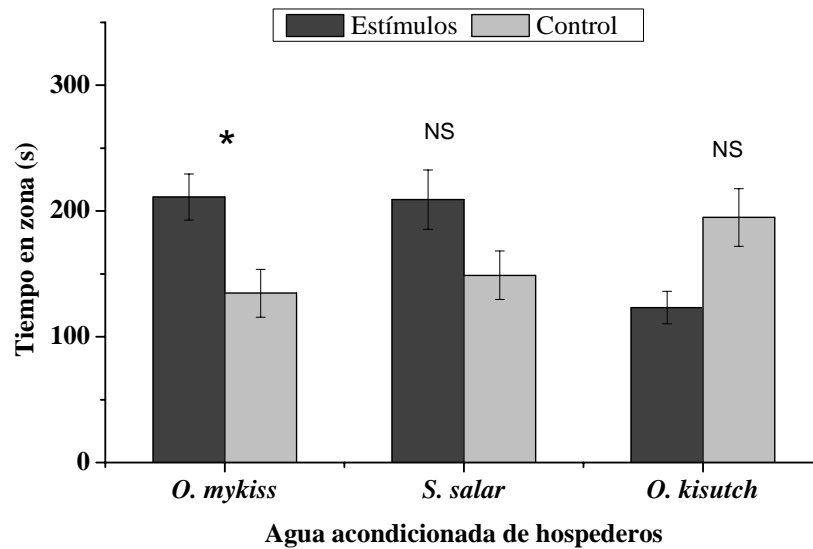
La primera generación de adultos de *C. rogercresseyi* (F1) cultivada en salmón Atlántico (*S. salar*) mostró una preferencia significativa ($P < 0,05$) por el agua acondicionada de salmón Atlántico (Fig.5). No se observaron diferencias significativas en la respuesta de los estados adultos de esta F1, por el agua acondicionada de trucha Arcoiris, pero se observó una tendencia a preferir la zona de estímulo. No se observó una respuesta significativa por el agua acondicionada de salmón Coho (Fig. 5).



(* P < 0,05 - Test no-paramétrico de Wilcoxon; NS: ninguna significancia; N = 55)

Figura 5. Estudio de preferencia de estados adultos de la Generación F1 de *Caligus rogercresseyi* cultivado en salmón Atlántico (*Salmo salar*) por aguas acondicionadas de peces hospederos salmónidos cultivados en sur de Chile.

Por otro lado la generación F1 cultivada sobre trucha Arcoiris, mostró preferencia significativa ($P < 0,05$) por el agua acondicionada del pez hospedero trucha Arcoiris comparada con agua de mar artificial usada como control (Fig. 6). Además, se observó una tendencia a la preferencia de la generación F1 de trucha Arcoiris por los estímulos liberados por el salmón Atlántico, pero no representó una diferencia significativa comparada con el control (Fig 6). Por el contrario, se observó una tendencia a evadir la zona de estímulos liberado por el salmón Coho (Fig. 6), de la misma forma que los hicieron los individuos de la generación F1 criada en salmón Atlántico (Fig. 5).



(* P < 0,05 - Test no-paramétrico de Wilcoxon; NS: ninguna significancia; N = 81)

Figura 6. Estudio de preferencia de estados adultos de la Generación F1 de *Caligus rogercresseyi* cultivado en trucha Arcoiris (*O. mykiss*) por aguas acondicionadas de peces hospederos salmónidos cultivados en sur de Chile.

Estos resultados indican la inducción de un conocimiento previo (una conducta de aprendizaje) de las condiciones óptimas de crecimiento que tuvieron los predecesores de las respectivas generaciones F1. Los individuos de cada generación prefirieron como fuente de estímulo, la perteneciente a la del hospedero que usó para su crianza. Así, la F1 de trucha Arcoiris prefirió significativamente el agua acondicionada de trucha Arcoiris; y la F1 de salmón Atlántico prefirió el agua de mar acondicionada de este mismo hospedero.

En ambos experimentos de preferencia se estableció que salmón Coho es más resistente de los hospederos, y que los más susceptibles son la trucha Arcoiris y el salmón Atlántico.

5.1.3. Fracciones activas.

Los extractos obtenidos de las aguas acondicionadas de peces hospederos fueron redisolto en agua de mar artificial como fue descrito en la sección 4.5.2. Los resultados indican que el extracto etanólico de trucha Arcoiris provocó una respuesta de atracción significativa ($P < 0,06$) en individuos adultos de *C. rogercresseyi* (Fig. 7).

Los otros extractos no indujeron un cambio conductual significativo ($P > 0,06$) en *C. rogercresseyi*. Sin embargo, se pudo observar una tendencia a la preferencia por el extracto de salmón Atlántico (Fig. 7) y una tendencia a la evasión por los estímulos contenido en el extracto de salmón Coho (Fig. 7).

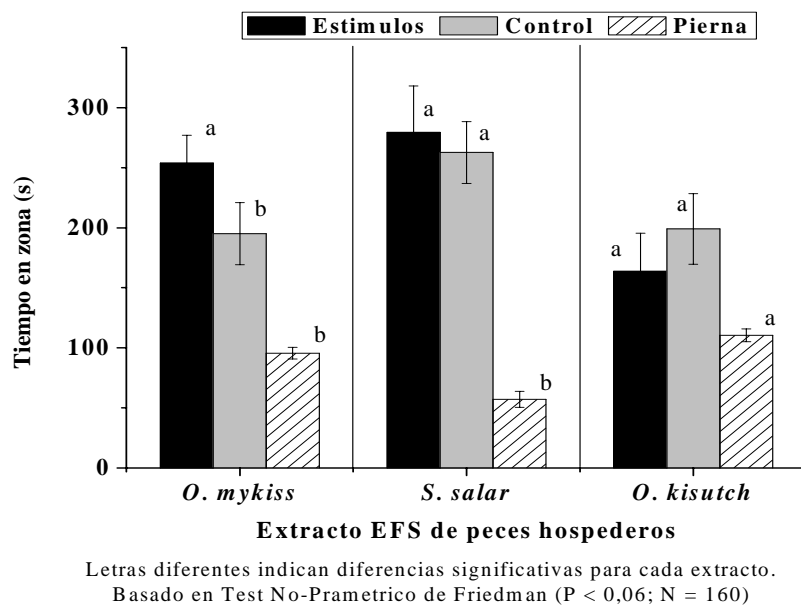


Figura 7. Tiempo de permanencia en las zonas de tubo Y durante bioensayos de preferencia del piojo del salmón *C. rogercresseyi* a estímulos presentes en tres extracto EFS de peces salmónidos hospederos.

El agua residual remanente después de la extracción por fase sólida fue probada en bioensayos de preferencia para establecer si este residuo presentaba alguna bioactividad. Los resultados indicaron que el agua residual, ya sea proveniente de agua acondicionada de trucha Arcoiris o de salmón Coho no presentan una bioactividad significativa (Fig. 8; $P > 0,05$), indicando que la bioactividad de las aguas acondicionadas con los diferentes hospederos radica en el extracto etanólico proveniente de la extracción en fase sólida.

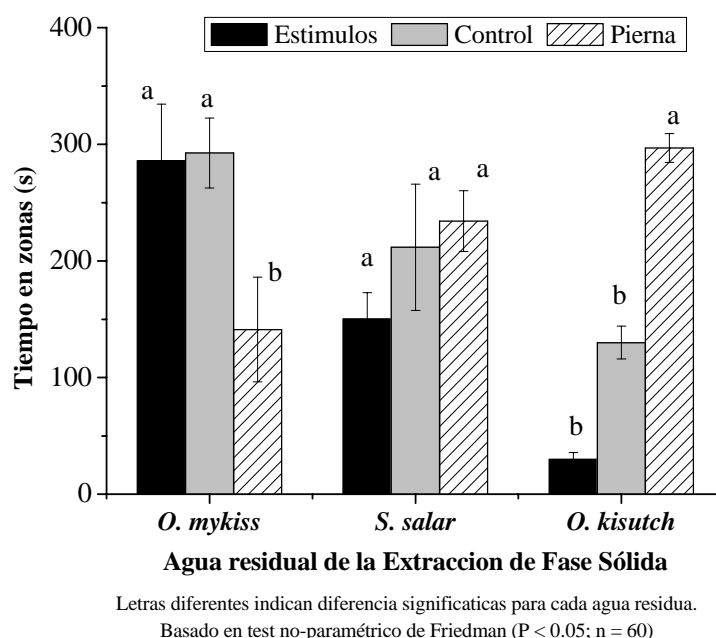


Figura 8. Tiempo de permanencia en las zonas de tubo Y durante bioensayos de preferencia del piojo del salmón *C. rogerresseyi* a estímulos presentes en agua residual de la extracción fase sólida de dos peces salmónidos hospederos.

El fraccionamiento del extracto SPE activo fue realizado por destilación al vacío. Obteniéndose un destilado con la fracción volátil y un residuo compuesto de sales y compuestos de alto peso molecular; el cual fue redisoluto en etanol (grado HPLC). Ambas fracciones fueron probadas en bioensayos de preferencia.

La fracción obtenida en el destilado mostró ser significativamente atractiva ($P < 0,05$) a los individuos de *C. rogercresseyi*, comparadas con agua artificial usada como control. Observándose un tiempo de permanencia mayor en el brazo que contenía el estímulo proveniente del destilado de *O. mykiss* (hospedero más susceptible) (Fig. 9). Se observó también un mayor tiempo de permanencia en brazo estímulo del *O. kisutch*, pero no significativamente diferente al tiempo de permanencia en el brazo control (Fig. 9).

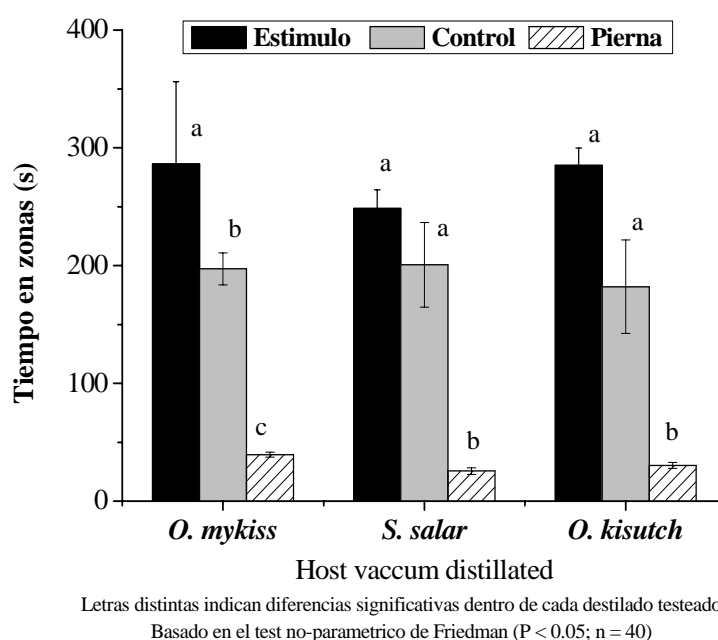
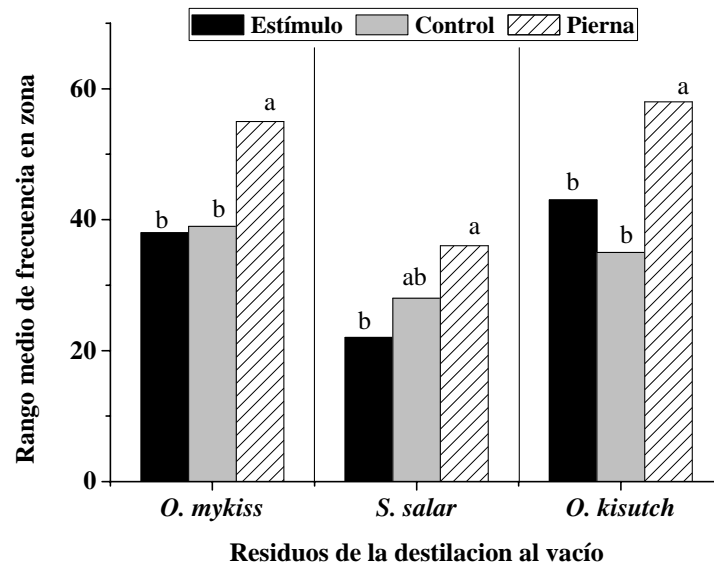


Figura 9. Tiempo de permanencia en las zonas del Y durante bioensayos de preferencia del piojo del salmón *C. rogercresseyi* a estímulos presentes en el destilado al vacío de extractos de salmones hospederos.

El residuo de la destilación redissuelto en etanol no mostró una preferencia de los individuos de *C. rogercresseyi*. Los tres residuos provenientes de los tres especies de salmones no

mostraron diferencias significativas en la preferencias comparadas con el control ($P > 0,06$)

(Fig. 10).



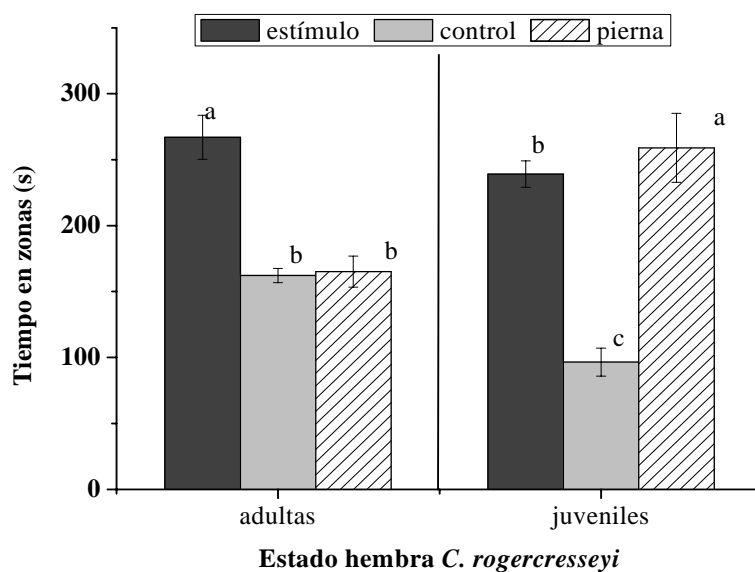
Letras indican diferencia significativa para cada residuo usado.
Basado en test no-parametrico de Friedman ($P < 0.06$; $n = 160$)

Figure 10. Frecuencia en la visita a zonas del tubo Y durante bioensayos de preferencia del piojo del salmón *C. rogercresseyi* a estímulos presentes residuos de la destilación al vacío de los extractos EFS de la tres especies de hospederos.

5.2. Relaciones intraespecíficas.

5.2.1. Bioensayos de preferencia.

Un efecto attractante se observó cuando se utilizó un grupo de seis hembras adultas y seis hembras juveniles como fuente de estímulos; comparado con agua de mar artificial usada como control (Fig. 11; $P < 0,05$). Las diferencias entre estado adulto y juvenil fue dado principalmente por tamaño, no estableciéndose si existen diferencias en el desarrollo sexual de las hembras. Los resultados indican que adultos machos de *C. rogercresseyi* mostraron preferencia por los estímulos de hembras liberados a la matriz acuosa (Fig. 11).



Letras diferente indican diferencias significativas para agua acondicionada de hembras conespecíficas.
Basado en test no-parametrico de Friedman ($P < 0,05$; $n = 55$)

Figura 11. Estudio de la respuesta de adultos macho de *C. rogercresseyi* a estímulos liberados por hembras juveniles y adultas conespecíficas.

Con el objetivo de obtener hembras vírgenes y observar la respuesta de machos frente a los estímulos liberados por estas hembras, se estableció una crianza de individuos machos y hembras de *C. rogercresseyi* vírgenes. Los resultados indican que existe una preferencia significativa (Fig. 12; $P < 0,05$) por las hembras conespecíficas vírgenes.

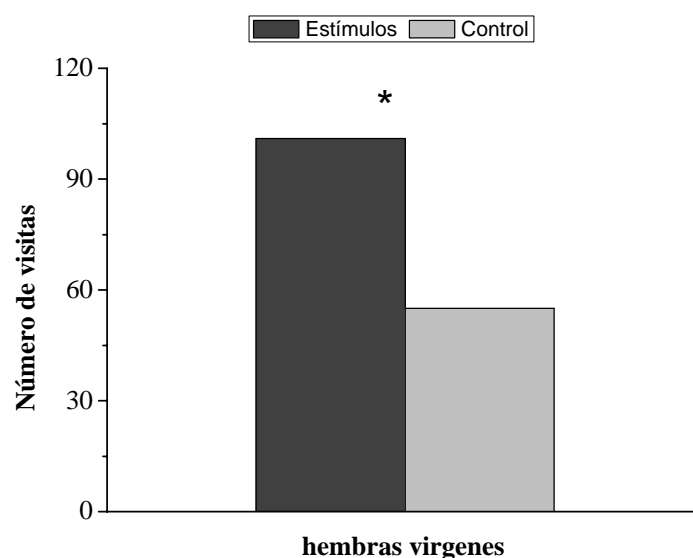


Figura 12. Número de visitas de machos adultos de *C. rogercresseyi* a los brazos control y estímulo con hembras vírgenes conespecíficas. (* $P < 0,05$ – Test Chi-cuadrado; $N = 15$).

El agua acondicionada de hembras vírgenes y el extracto etanólico obtenido por extracción en fase sólida no mostraron un efecto significativo sobre machos conespecíficos de *C. rogercresseyi*. Sin embargo se observa una tendencia a preferir el brazo con la fuente de estímulos (Fig. 13).

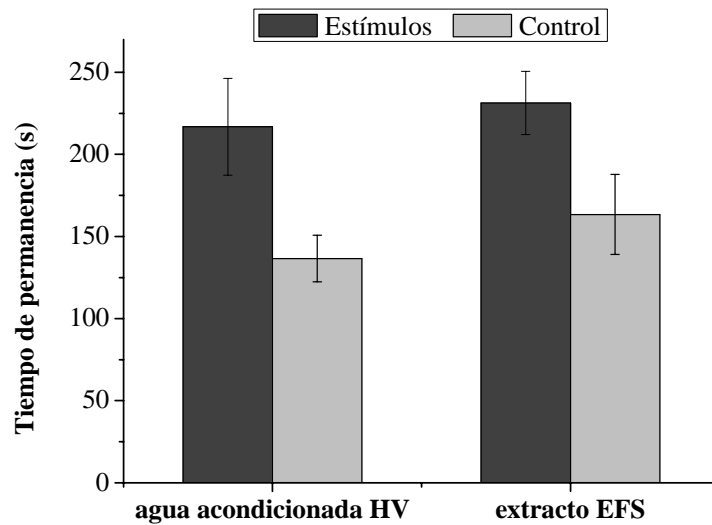


Figura 13. Tiempo de permanencia (s) de machos adultos de *C. rogercresseyi* al estímulo liberado por hembras vírgenes (HV) en agua de mar artificial y su extracto en etanol (EFS).

5.3. Análisis por cromatografía de gases con detector de masas (GC-MS)

5.3.1. Señales químicas interespecíficas.

Se realizó una identificación tentativa, como resultado de comparaciones entre los espectros de masas experimentales con los presentes en la librería de espectros de masas NIST incorporada al programa de análisis cromatográficos Xcalibur. Los compuestos identificados por medio de la librería antes mencionada y que corresponden a las primeras extracciones desde peces hospederos de *C. rogercresseyi* son mostrados en la Tabla 1. Con el objetivo de determinar posibles candidatos a semioquímicos presentes en la interacción entre *C. rogercresseyi* y sus especies hospederas, se efectuó una búsqueda una base de datos de semioquímicos en interacciones terrestres www.pherobase.com. La búsqueda en la base de dato mostró que algunos de los compuestos propuestos posee funciones conductuales en interacciones terrestres, caracterizándolos como feromonas y/o

alomonas. Este es el caso del 2,3-Butanodiol y el Benzotiazol (Tabla 1). Otros compuestos también aparecen en la base de datos pero son mencionados como partes de compuestos volátiles liberados por especies vegetales.

Tabla 1. Cuadro resumen de compuestos candidatos a kairomonas provenientes de extractos de trucha Arcoiris (*O. mykiss*), salmón Atlántico (*S. salar*) y salmón Coho (*O. kisutch*).

TR (min)	NOMBRE	<i>O. mykiss</i>	<i>S. salar</i>	<i>O. kisutch</i>	Actividad semioquímica
		Área relativa (%)			
4,58	A	-	-	15,41%	VF
4,63	B	99,64%	-	22,25%	NR
4,79	C	-	-	2,93%	VF
4,96	D	-	-	14,39%	F-K
5,09	E	-	-	13,63%	F-K
5,47	F	-	11,06%	-	NR
6,11	G	-	-	5,38%	NR
6,23	H	-	-	1,52%	NR
10,72	I	-	-	5,54%	VF
11,88	J	-	-	3,18%	NR
14,21	K	-	-	5,47%	A
16,5	L	-	-	2,16%	NR
19,62	M	0,36%	32,65%	0,37%	NR
22,16	N	-	-	7,77%	NR
24,53	O	-	56,30%	-	NR

VF-volátil de flores; F-feromona; K-kairomona; A-alomona; NR, no encontrado. Base datos www.pherobase.com (El-Sayed, 2007).

5.3.2. Señales químicas intraespecíficas

Los cromatogramas en la figura 14 muestran los perfiles de compuestos presentes en los extractos etéreos de agua acondicionada de hembras vírgenes (Fig. 14B) y su respectivo control (Fig. 14A). La Figura 14 no muestra diferencias significativas entre las señales correspondientes a ambos extractos. Sin embargo, un análisis comparativo exhaustivo entre ambos cromatogramas permitió detectar una señal a un tiempo de retención de 33,53 min (Fig. 15B).

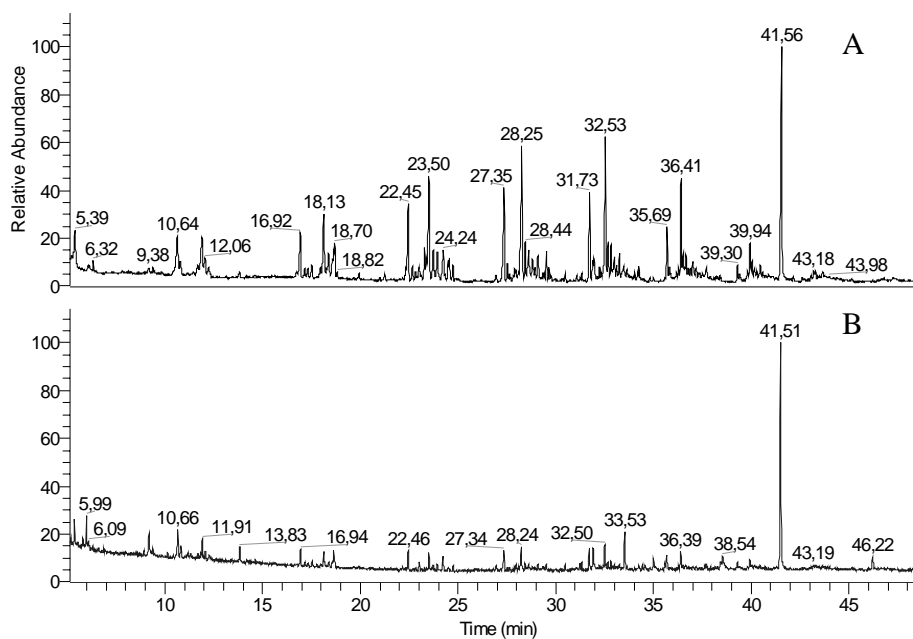


Figura 14. Cromatogramas totales de iones correspondientes a los extractos etéreos de agua control (A) y agua acondicionada con hembras vírgenes de *C. rogercresseyi* (B)

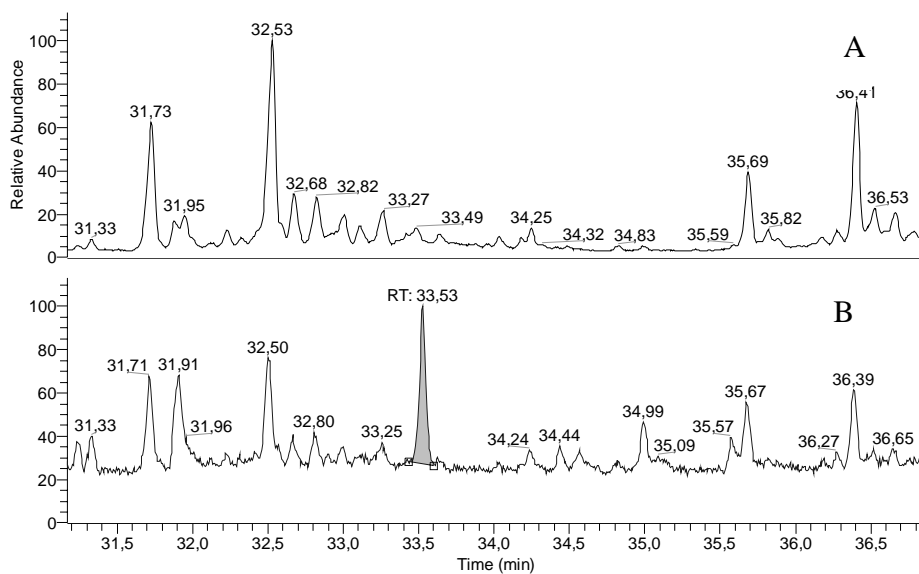


Figura 15. Ampliación entre 31,17 y 36,86 min de los cromatogramas totales de iones correspondientes a los extractos etéreos de agua control (A) y agua acondicionada con hembras vírgenes de *C. rogersesseyi* (B).

Figura 16. Espectro de masas de la señal obtenida a los 33,53 min liberada por la fracción volátil de hembras vírgenes de *C. rogersesseyi*.

El espectro de masa asociado a esta señal (33,53 min) ajusta en 90% a un compuesto clorado de fórmula molecular $C_{14}H_{18}O_3Cl_2$ denominado compuesto feromona I.

Este compuesto no ha sido informado en la literatura como feromona sexual de algún ser vivo. Sin embargo un análisis retrosintético de este compuesto lo fragmenta en una mitad aromática y en otra del tipo éster. El primero de ellos es un contaminante ambiental proveniente de la industria de la celulosa y ha sido reportado como feromona sexual en insectos de la familia Acarina (*Dermacentor variabilis*). En la literatura es posible encontrar un isómero de la mitad éster mencionada más arriba. Este corresponde al 3-hidroxi-butanoato de metilo, el cual ha sido informado como un aroma de plantas (Adedeji *et al.*, 1991). Además, esta mitad éster, sin el grupo hidroxilo, correspondería al butanoato de butilo, compuesto reportado como feromona en insectos de la familia Heteroptera y como kairomona en insectos de la familia Diptera (El-Sayed, 2007).

6. Discusión.

Estudios recientes han informado que existen kairomonas que median muchas interacciones entre especie acuáticas (Burks y Lodge, 2002). Estos autores informaron que los peces tienden a actuar como emisores de kairomonas, mientras que los organismos del zooplancton tienen un rol de receptores de estas señales químicas. La búsqueda de hospederos de *L. salmonis*, un organismo del zooplancton, ha sido estudiada por Mordue *et al.*, (2004), quien se enfocó en el estudio del comportamiento de los estadios adultos del piojo de mar. Estos autores sugirieron que el movimiento de *L. salmonis* entre hospederos en los centros de cultivos podría ser estimulada por señales químicas.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que los estados adultos de *C. rogercresseyi* son capaces de responder a señales químicas liberadas por peces hospederos en forma similar al comportamiento mostrado por *L. salmonis*.

Es sabido que muchos copépodos planctónicos usan señales químicas para identificar y encontrar hospederos (Katona, 1973; Tsuda y Miller, 1998). La bibliografía de la comunicación a través de feromonas sexuales en Crustacea, incluyendo copépodos, indica que la comunicación química entre crustáceos es tan elaborada como se ha descrito en sistemas terrestres (Snell y Morris, 1993). Ingvarsdottir *et al.* (2002a) ha investigado la posible emisión de feromonas sexuales de hembras de *L. salmonis*. A la fecha no se han reportado avances en el aislamiento en esta clase de señales.

Agua acondicionada con hembras preadultas II de *L. salmonis* tuvieron un efecto atractivo sobre machos conespecíficos, produciendo una respuesta direccional y activa comparada con la actividad observada cuando agua de mar artificial fue usada como fuente de

estímulos (Lonsdale *et al.*, 1998). Machos adultos de *C. rogercresseyi* mostraron similar comportamiento cuando fueron estimulados por el agua acondicionada con hembras conespecíficas juveniles y adultas.

Una rheotaxis positiva fue observada en los adultos de *C. rogercresseyi* cuando el agua acondicionada por *O. mykiss* y *S. salar* fue introducida por uno de los brazos del tubo Y indicando que esta especie de copépodos podría usar semioquímicos en la localización del hospedero. El mismo resultado fue observado en estudio previos con *L. salmonis*, realizados por Ingvarsdottir *et al.*, (2002a). Por otro lado, ninguna preferencia se observó por el agua acondicionada por *O. kisutch*, indicando que este hospedero podría ser el más resistente al ataque de *C. rogercresseyi* o que no es capaz de percibir olores que le sean atractantes o que le indiquen la presencia de un potencial hospedero. Se ha reportado que este hospedero no favorece el desarrollo del copépodo (González *et al.*, 1997; González *et al.*, 2000; Johnson y Albright, 1992b). *O. kisutch* podría estar liberando señales que son emitidas como resultado de su alta respuesta de hospedero no-especifico (Fast *et al.*, 2002a; Fast *et al.*, 2002b).

Una respuesta diferente fue observada en el comportamiento de *C. rogercresseyi* cuando agua acondicionada de peces no-hospedero fue usada en bioensayos de preferencia en el tubo Y comparado con agua de mar artificial. Durante todo el bioensayo se observó una evasión por el agua acondicionada del no-hospedero *H. sordidus*. Esta respuesta puede estar relacionada a que *C. rogercresseyi* activa una respuesta de evasión, la cual puede ser interpretada como una señal de alarma, indicándole al piojo la presencia de un posible depredador (Ruther *et al.*, 2002). Hubo una identificación por parte de *C. rogercresseyi* de que *H. sordidus* es un potencial hospedero durante los primeros estado de desarrollo del

ciclo de vida, pero tan pronto *C. rogercresseyi* alcanzó el estado móvil adulto, su número disminuyó en la superficie del pez. Algunos de estos individuos perdidos fueron encontrados en el aparato digestivo del *H. sordidus* (Bollens y Stearns, 1992; Buskey, 1998; Moore *et al.*, 1999; van Duren y Videler, 1996).

Los compuestos involucrados en el comportamiento del *C. rogercresseyi* pueden ser semioquímicos de bajo peso molecular con la suficiente solubilidad para ser transportado en una matriz acuosa. Resultado que pueden ser observados al utilizar la fracción de señales del hospedero obtenida por destilación al vacío. Esta fracción es similar a los semioquímicos volátiles que son transportados en el aire en un sistema terrestre (Ingvarsdottir *et al.*, 2002b). Una identificación preliminar de estas fracciones mostró que estas señales, específicamente para el caso del salmón Coho corresponderían a dioles de cadena carbonada corta. Este tipo de compuestos son polares debido a los grupos hidroxilos (OH), otorgándoles una buena solubilidad en ambiente acuoso y además son compuestos volátiles debido a su bajo peso molecular.

En la relación intraespecífica, los resultados concuerdan con lo informado por (Ingvarsdottir *et al.*, 2002a) donde las señales químicas liberadas por hembras a la matriz acuosa son capaces de orientar al macho hacia la dirección donde se encuentra la fuente de estímulos (Katona, 1973; Lonsdale *et al.*, 1998). Copéodos machos utilizan las señales químicas para localizar e identificar potenciales parejas (Hull *et al.*, 1998; Ritchie *et al.*, 1996b).

Un análisis preliminar de las señales provenientes de hembras vírgenes de *C. rogercresseyi* permitió detectar tentativamente, por medio de una búsqueda en una biblioteca de espectro de masas, una estructura tipo feromona. Es posible distinguir en este compuesto una mitad

aromática (2,4-dicloro fenol), y una mitad éster (Butanoato de butilo). Ambas mitades han sido informadas como feromona sexual en los ordenes Coleóptera y Acarina (El-Sayed, 2007).

En resumen, los resultados obtenidos dan evidencias para sustentar la hipótesis que los semioquímicos median la relación parásito-hospedero entre *C. rogercresseyi* y sus especies hospederas cultivadas en Chile. También estos resultados soportan la hipótesis que estos semioquímicos podrían estar involucrados en la diferencias de susceptibilidad de hospedero, apoyando los resultado de cohabitancia informados por González *et al.* (2000) y González y Carvajal (2003) que reportaron que la trucha Arcoiris es el hospedero mas susceptible a la infestación por *C. rogercresseyi*.

El estudio de la semioquímica involucrada en estas interacciones permitirá la identificación de las señales químicas responsables de la localización de hospederos. Estos semioquímicos una vez identificados podrían tener un rol importante en el control del *C. rogercresseyi*, podrían ser usados como parte de una estrategia de control, basada en lograr un cambio conductual de este parásito a un cambio etológico.

7. Proyecciones.

Futuras estrategias de control.

Los problemas de resistencia del piojo de mar a tratamientos químicos actualmente utilizados y la limitante e ineficacia en los tratamientos de control actualmente usados. Sugieren la necesidad en la aplicación de métodos adicionales en la implementación de alguna estrategia integrada para la reducción de la intensidad de la infestación de *C. rogercresseyi* en salmones.

La ventaja de un tratamiento efectivo en contra de todas las etapas del ciclo biológico evitando su reproducción. Esto unido a tratamientos simultáneos en todas las granjas de cultivo; como periodos de descanso o rotación de cultivos, debería reducir la frecuencia de tratamientos requeridos para el control efectivo además de reducir la prevalencia del piojo.

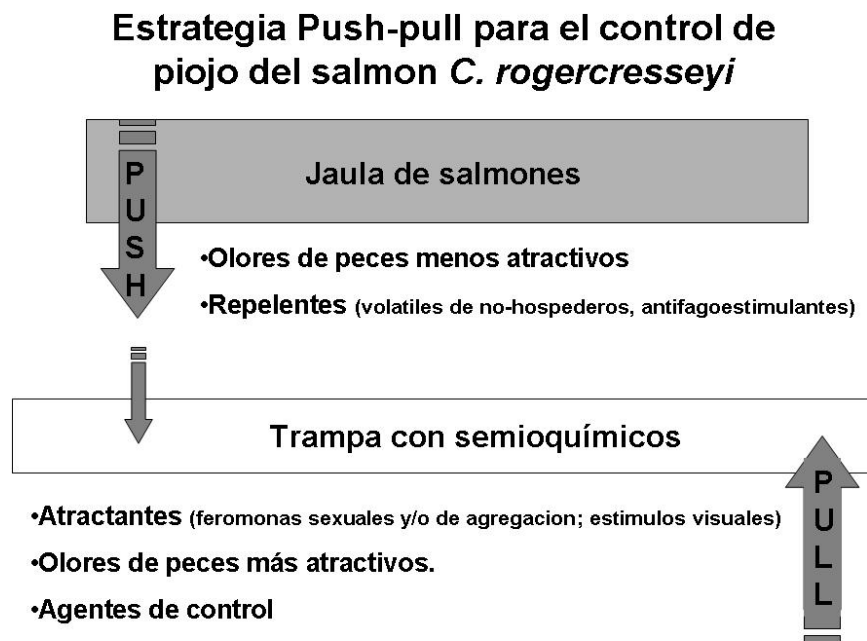
En este sentido la semioquímica podría jugar un rol importante en el control del ciclo de vida del *C. rogercresseyi*; la identificación de feromonas sexuales y/o de agregación que median la localización y reproducción con potenciales parejas. Permitiría interrumpir el ciclo de vida, atrayendo a los machos a trampas con estos semioquímicos identificados y aislados, para aplicar un agente controlador localizado.

Por otro lado, la habilidad sensorial de los copépodos de localizar e identificar sus hospederos por medio de las señales químicas específicas (kairomonas) emitidas por el hospedero. La identificación de estos compuestos atrayentes producidos por la especie hospedera más susceptible (*O. mykiss* y *S. salar*). Junto con la identificación de señales de repelentes en especies más resistentes (*O. kisutch*) o de especies no-hospedera.

Permitirá atraer a machos y hembras, evitando el encuentro con su hospedero, fuente de alimento y lugar de apareamiento.

El uso de la Semioquímica y el conocimiento de la susceptibilidad de los hospederos; ciclo de vida y apareamiento. Permitiría implementar una Estrategia de Manejo Integrado de Plagas para el piojo del salmón, basado en un control etológico, el cual causaría un cambio conductual en el piojo.

La rotación entre tratamientos químicos controladores y estrategia con semioquímicos dentro de un manejo integrado de plagas permitiría incrementar la eficacia en contra de la infestación, como ocurre en el control de plagas agrícolas. Estas sustancias en unión con feromonas sexuales, podrían ser usadas en una estrategia denominada PUSH-PULL (Esquema 3).



Esquema 3. Estrategia Push-Pull en el control del piojo del salmón *C. rogercresseyi*.

8. Conclusiones.

Caligus rogercresseyi es capaz de identificar señales químicas presentes en la matriz acuosa. Señales que le permitirían, en el medio natural, localizar y seleccionar hospederos más susceptibles. Señales químicas que son utilizadas en la localización de potenciales parejas. *C. rogercresseyi* es capaz de diferenciar distintas fuentes de señales provenientes de sus peces hospederos. Indicando que este copépodo sea capaz de diferenciar un hospedero susceptible de otro más resistente. Percepción de olores por *C. rogercresseyi* es otro factor que junto con otros factores como velocidad de nado y profundidad de distribución del hospedero en jaulas de cultivo manifiesta diferencias en la susceptibilidad entre las especies de salmónidos; además de la respuesta de hospedero no-específico que exprese la especie hospedera. Otro factor importante es la respuesta de hospedero no-específico; ya que la producción o el incremento de compuestos bioquímicos podrían jugar un papel como un antifagoestimulante, como en caso del salmón del Coho, al reducir la posibilidad de crecimiento del piojo de mar. La otra posibilidad es que los cambios bioquímicos podrían estimular el desarrollo de piojos del mar en hospederos más susceptibles, actuando como un fagoestimulante.

Se ha determinado por medio de ensayos biodirigidos que la fracción biológicamente activa capaz de causar un cambio conductual en copépodo adulto, tanto en la localización de hospederos o de potenciales parejas, es la fracción polar liberada a la matriz acuosa. Estas señales poseen características fisicoquímicas similares a los compuestos químicos volátiles presentes en sistemas terrestres. Compuestos utilizados por los insectos para localizar sus hospederos.

9. Referencias.

- Adedeji, J., Hartman, T.G., Rosen, R.T., Ho, C.T., 1991. Free and glycosidically bound aroma compounds in hog plum (*Spondias mombins* L.). *J. Agric. Food Chem.* 39, 1494-1497.
- Anstensrud, M., 1992. Mate guarding and mate choice in two copepods, *Lernaecera branchialis* (L) (Pennellidae) and *Lepeophtheirus pectoralis* (Muller) (Caligidae), parasitic on flounder. *J. Crust. Biol.* 12, 31-40.
- Barbier, M., 1979. Introduction to chemical ecology. Longman, London ; New York, xiii, 128 p. pp.
- Bernays, E.A., Chapman, R.F., 1994. Host-plant selection by phytophagous insects. Chapman & Hall, New York, xiii, 312 p. pp.
- Bollens, S.M., Stearns, D.E., 1992. Predator-Induced Changes in the Diel Feeding Cycle of a Planktonic Copepod. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 156, 179-186.
- Branson, E., 1999. Chemical sea lice treatments. *Outlook* 11, 14-15.
- Bron, J.E., Sommerville, C., Rae, G.H., 1993. Aspects of the behaviour of copepodid larvae of the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* (Kroyer, 1837). In: Boxshall, G.A., Defaye, D. (Eds.), *Pathogens of Wild and Farmed Fish: Sea Lice*. Chichester: Ellis Horwood, pp. 125-142.
- Burks, R.L., Lodge, D.M., 2002. Cued in: Advances and opportunities in freshwater chemical ecology. *J. Chem. Ecol.* 28, 1901-1917.
- Buskey, E.J., 1998. Components of mating behavior in planktonic copepods. *J. Mar. Sys.* 15, 13-21.

- Carvajal, J., Gonzalez, L., George-Nascimento, M., 1998. Native sea lice (Copepoda : Caligidae) infestation of salmonids reared in netpen systems in southern Chile. *Aquaculture* 166, 241-246.
- Dawson, L.H.J., 1998. The physiological effects of salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) infections on returning post-smolt sea trout (*Salmo trutta* L.) in western Ireland, 1996. *ICES J. Mar. Sci.* 55, 193-200.
- Dawson, L.H.J., Pike, A.W., Houlihan, D.F., McVicar, A.H., 1999. Changes in physiological parameters and feeding behaviour of Atlantic salmon *Salmo salar* infected with sea lice *Lepeophtheirus salmonis*. *Dis. Aquat. Organ.* 35, 89-99.
- Devine, G.J., Ingvarsdottir, A., Mordue, W., Pike, A.W., Pickett, J., Duce, I., Mordue, A.J., 2000. Salmon lice, *Lepeophtheirus salmonis*, exhibit specific chemotactic responses to semiochemicals originating from the salmonid, *Salmo salar*. *J. Chem. Ecol.* 26, 1833-1847.
- El-Sayed, A.M., 2007. The Pherobase: Database of Insect Pheromones and Semiochemicals (www.pherobase.com).
- Fast, M.D., Sims, D.E., Burka, J.F., Mustafa, A., Ross, N.W., 2002a. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in Rainbow trout, Coho and Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology* 132, 645-657.
- Fast, M.D., Ross, N.W., Mustafa, A., Sims, D.E., Johnson, S.C., Conboy, G.A., Speare, D.J., Johnson, G., Burka, J.F., 2002b. Susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Atlantic salmon *Salmo salar* and Coho salmon *Oncorhynchus kisutch* to experimental infection with sea lice *Lepeophtheirus salmonis*. *Dis. Aquat. Organ.* 52, 57-68.

- González, L., Carvajal, J., 2003. Life cycle of *Caligus rogercresseyi*, (Copepoda : Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. *Aquac* 220, 101-117.
- González, L., Carvajal, J., Medina, A., 1997. Comparative susceptibility of rainbow trout and coho salmon to ectoparasites of economic importance. *Arch. Med. Vet.* 29, 127-132.
- González, L., Carvajal, J., George-Nascimento, M., 2000. Differential infectivity of *Caligus flexispina* (Copepoda, Caligidae) in three farmed salmonids in Chile. *Aquac* 183, 13-23.
- Gresty, K.A., Boxshall, G.A., Nagasawa, K., 1993. Antennular sensors of the infective copepodid larva of the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae). In: Boxshall, G.A., Defaye, D. (Eds.), *Pathogens of Wild and Farmed Fish: Sea Lice*. Chichester: Ellis Horwood, pp. 83-98.
- Grimnes, A., Jakobsen, P.J., 1996. The physiological effects of salmon lice infection on post-smolt of Atlantic salmon. *J. Fish Biol.* 48, 1179-1194.
- Heuch, P.A., 1995. Experimental-Evidence for Aggregation of Salmon Louse Copepodids (*Lepeophtheirus-Salmonis*) in Step Salinity Gradients. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 75, 927-939.
- Heuch, P.A., Parsons, A., Boxaspen, K., 1995. Diel Vertical Migration - A Possible Host-Finding Mechanism in Salmon Louse (*Lepeophtheirus salmonis*) Copepodids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 681-689.
- Hevrøy, E.M., Holm, J.C., Boxaspen, K., 1997. The effect of swimming depth, speed and artificial light treatment in Atlantic salmon (*Salmo salar*) culture on the infestation of the copepod *Lepeophtheirus salmonis*, *Cultivation of Cold Water Species: Production, Technology and Diversification*. European Aquaculture Society/Aquanor, Trondheim, Norway.

- Hevrøy, E.M., Boxaspen, K., Oppedal, F., Taranger, G.L., Holm, J.C., 2003. The effect of artificial light treatment and depth on the infestation of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) culture. *Aquac* 220, 1-14.
- Hogans, W.E., Trudeau, D.J., 1989. *Caligus elongatus* (Copepoda: Caligoida) from Atlantic salmon (*Salmo salar*) cultured in marine waters of the Lower Bay of Fundy. *Can. J. Zool.* 67, 1080-1082.
- Howse, P.E., Stevens, I.D.R., Jones, O.T., 1998. Insect pheromones and their use in pest management. Chapman & Hall, London ; New York, x, 369 p. pp.
- Hull, M.Q., Pike, A.W., Mordue, A.J., Rae, G.H., 1998. Patterns of pair formation and mating in an ectoparasitic caligid copepod *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer 1837): implications for its sensory and mating biology. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* 353, 753-764.
- Ingvarsdottir, A., Birkett, M.A., Duce, I., Mordue, W., Pickett, J.A., Wadhams, L.J., Mordue, A.J., 2002a. Role of semiochemicals in mate location by parasitic sea louse, *Lepeophtheirus salmonis*. *J. Chem. Ecol.* 28, 2107-2117.
- Ingvarsdottir, A., Birkett, M.A., Duce, I., Genna, R.L., Mordue, W., Pickett, J.A., Wadhams, L.J., Mordue, A.J., 2002b. Semiochemical strategies for sea louse control: host location cues. *Pest Manage. Sci.* 58, 537-545.
- Johnson, S.C., Albright, L.J., 1992a. Effects of Cortisol Implants on the Susceptibility and the Histopathology of the Responses of Naive Coho Salmon *Oncorhynchus-Kisutch* to Experimental-Infection with *Lepeophtheirus-Salmonis* (Copepoda, Caligidae). *Dis. Aquat. Organ.* 14, 195-205.

- Johnson, S.C., Albright, L.J., 1992b. Comparative Susceptibility and Histopathology of the Response of Naive Atlantic, Chinook and Coho Salmon to Experimental-Infection with *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda, Caligidae). *Dis. Aquat. Organ.* 14, 179-193.
- Johnson, S.C., Blaylock, R.B., Elphick, J., Hyatt, K.D., 1996. Disease induced by the sea louse (*Lepeophtheirus salmonis*) (Copepoda: Caligidae) in wild sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) stocks of Alberni Inlet, British Columbia. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 2888-2897.
- Johnson, S.C., Treasurer, J.W., Bravo, S., Nagasawa, K., Kabata, Z., 2004. A review of the impact of parasitic copepods on marine aquaculture. *Zool. Stud.* 43, 229-243.
- Kabata, Z., 1981. Copepoda (Crustacea) parasitic on fishes: problems and perspectives. *Adv. Parasitol.* 19, 1-71.
- Kabata, Z., 2003. *Copepods Parasitics on Fishes*. Field Studies Council, London, 274 pp.
- Katona, S.K., 1973. Evidence for sex pheromones in planktonic copepods. *Limnol. Oceanogr.* 18, 574-583.
- Lazzaretto, I., Franco, F., Battaglia, B., 1994. Reproductive-behavior in the harpacticoid copepod *tigriopus-fulvus*. *Hydrobiologia* 293, 229-234.
- Lonsdale, D.J., Frey, M.A., Snell, T.W., 1998. The role of chemical signals in copepod reproduction. *J. Mar. Sys.* 15, 1-12.
- MacKinnon, B.M., 1998. Host factors important in sea lice infections. *ICES J. Mar. Sci.* 55, 188-192.
- Moore, P.A., Fields, D.M., Yen, J., 1999. Physical constraints of chemoreception in foraging copepods. *Limnol. Oceanogr.* 44, 166-177.
- Mordue (Luntz), A.J., Mordue, W., Pike, A.W., 2004. Novel Management Strategies for Sea Lice Control (online). <http://www.abdn.ac.uk/zoology/fishhlth/sealice.htm>.

- Nagasawa, K., Ishida, Y., Ogura, M., Tadokoro, K., Hiramatsu, K., 1993. The abundance and distribution of *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) on six species of Pacific salmon in offshore waters of the North Pacific Ocean and Bering Sea. In: Boxshall, G.A., Defaye, D. (Eds.), Pathogens of Wild and Farmed Fish: Sea Lice. Chichester: Ellis Horwood, pp. 166-178.
- Norlund, A., Lewis, W., 1976. Terminology of chemical releasing stimuli in interspecific and intraspecific interactions. J. Chem. Ecol. 2, 211-220.
- Pike, A.W., Wadsworth, S.L., 2000. Sealice on salmonids: Their biology and control, Adv. Parasitol. Academic Press Inc, San Diego, pp. 233-337.
- Ritchie, G., Mordue, A.J., Pike, A.W., Rae, G.H., 1993. The reproductive output of *Lepeophtheirus salmonis* adult females in relation to seasonal variability of temperature and photoperiod. In: Boxshall, G.A., Defaye, D. (Eds.), Pathogens of Wild and Farmed Fish: Sea Lice. Chichester: Ellis Horwood, pp. 153-165.
- Ritchie, G., Mordue, A.J., Pike, A.W., Rae, G.H., 1996a. Morphology and ultrastructure of the reproductive system of *Lepeophtheirus salmonis* (Kroyer, 1837) (Copepoda: Caligidae). J. Crust. Biol. 16, 330-346.
- Ritchie, G., Mordue, A.J., Pike, A.W., Rae, G.H., 1996b. Observations on mating and reproductive behaviour of *Lepeophtheirus salmonis*, Kroyer (Copepoda: Caligidae). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 201, 285-298.
- Ross, N.W., Firth, K.J., Wang, A.P., Burka, J.F., Johnson, S.C., 2000. Changes in hydrolytic enzyme activities of naive Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. Dis. Aquat. Organ. 41, 43-51.

- Ruther, J., Meiners, T., Steidle, J.L.M., 2002. Rich in phenomena-lacking in terms. A classification of kairomones. *Chemoecology* 12, 161-167.
- Snell, T.W., Morris, P.D., 1993. Sexual Communication in Copepods and Rotifers. *Hydrobiologia* 255, 109-116.
- Snell, T.W., Carmona, M.J., 1994. Surface Glycoproteins in Copepods - Potential Signals for Mate Recognition. *Hydrobiologia* 293, 255-264.
- Tsuda, A., Miller, C.B., 1998. Mate-finding behaviour in *Calanus marshallae* Frost. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* 353, 713-720.
- van Duren, L.A., Videler, J.J., 1996. The trade-off between feeding, mate seeking and predator avoidance in copepods: Behavioural responses to chemical cues. *Journal Of Plankton Research* 18, 805-818.
- Wyatt, T.D., 2003. Pheromones and animal behaviour: communication by smell and taste. Cambridge University Press, Cambridge, UK ; New York, 391 pp.