

Reproduction, olfaction and dominance behaviour in Senegalese sole (*Solea senegalensis*)

Resumen

El lenguado Senegalés (*Solea senegalensis*) es una especie de pez plano que está en constante crecimiento de producción dentro de la industria de la acuicultura debido a su buena capacidad de supervivencia y crecimiento en cautividad, también por poseer un elevado precio en el mercado. En cambio, uno de los principales problemas de expansión del cultivo de esta especie es la disfunción reproductiva asociada al comportamiento complicando el cierre del ciclo de vida del lenguado en cautividad. La disfunción reproductiva se observa en los machos de cultivo (nacidos y criados en cautividad) que no participan en el cortejo, de forma que la mayoría de los huevos obtenidos de lenguados de cultivo están sin fertilizar. Consecuentemente, la producción del lenguado Senegalés incurre en los machos salvajes (procedentes de la naturaleza) siendo insostenible a largo plazo. Esta tesis tiene como objetivo principal entender y buscar posibles soluciones a este problema enfocándose en diferentes aspectos relacionados con la reproducción y el sistema olfativo que podría controlar el comportamiento reproductivo.

Para analizar el efecto de la presencia de lenguados salvajes que se reproducen en el comportamiento y el éxito reproductivo de los lenguados de cultivo, que no se reproducen, se compararon dos grupos formados por lenguados salvajes y de cultivo y un grupo control formado solo con lenguados de cultivo durante tres temporadas consecutivas de puesta. No se obtuvo puestas fecundadas del grupo control. En cambio, sí que se obtuvo puestas fecundadas de los dos grupos mixtos, principalmente de los individuos salvajes. Los machos de cultivo que estaban conviviendo con los salvajes participaron de forma activa en los comportamientos de “Persecución” asociados al cortejo, que son comportamientos relacionados con la competición (sobre todo entre los machos) persiguiéndose entre ellos. Un macho de cultivo fertilizó dos puestas en el año 2014. Durante los tres años, la participación de los machos (y hembras) de cultivo aumentó de forma progresiva indicando un posible proceso de aprendizaje de los comportamientos reproductivos.

Para establecer un posible problema en la comunicación química a nivel estructural, se diseccionaron las rosetas olfativas del lado ocular (UOR) y la del lado ciego (LOR) de diez lenguados juveniles salvajes y diez lenguados de cultivo. Este estudio es el primero en reportar la descripción histológica detallada de las rosetas olfativas del lenguado Senegalés siendo la estructura similar a otras especies descritas, sobre todo a las de peces planos. No se hallaron diferencias significativas en la estructura tisular, tipos de células y distribución celular (neuronas sensoriales olfativas) entre lenguados de diferente origen, en cambio, se encontraron diferencias entre la UOR y la LOR en número total de lamelas y en cantidad de células goblet concentradas en la parte apical de las lamelas siendo más frecuente en la LOR.

Para determinar si los machos y las hembras de lenguado Senegalés poseían la capacidad olfativa de comunicar químicamente, se realizó un perfil transcriptómico de la

UOR usando RNA-seq en tres machos reproductores de cultivo y tres machos salvajes, todos maduros, para después poder comparar dichos perfiles de expresión. Se diferenciaron de forma significativa un total de 2.387 transcritos entre los machos de cultivo y salvajes estando en el mismo grado de madurez. Los transcritos de algunas receptores olfativos (OR, TAAR y V2R-like) y otros transcritos asociados con el control de reproducción (aromatasa cerebral y Tachykinina) demostraron claras diferencias en la funcionalidad de la UOR entre los lenguados de diferentes orígenes. Además, los machos de cultivo presentaron mayor expresión en genes relacionados con las células goblet y producción de mucinas que controlan las respuestas inmunes innata y adaptativa. Muchos de estos cambios se podrían explicar con la diferencia en el estatus nutricional y la preferencia en la dieta.

Para determinar la forma de comunicación química, se evaluó la sensibilidad olfativa a la orina y al fluido ovárico procedentes de conspecíficos maduros de diferente origen (salvajes y de cultivo) de doce lenguados juveniles y doce lenguados adultos, todos de cultivo, usando electro-olfatograma (EOG). La orina se confirmó como un potente estimulante olfativo para ambos estadios, juveniles y adultos, la cual indujo una respuesta amplia en el EOG dependiente de la concentración con niveles de detección a una dilución 1:10⁶. Se encontraron diferencias significativas en la amplitud de percepción de la orina en relación al sexo y al estado de madurez tanto del emisor como del receptor indicando que la orina podría estar implicada en la reproducción comunicando el sexo y el estado de madurez. Además, la orina procedente de hembras maduras produjo un pequeño, pero significativo incremento en plasma de la hormona Luteinizante (LH) en machos maduros, demostrando que los olores liberados con la orina juegan un papel importante en la reproducción del lenguado Senegalés. Sin embargo, la potencia olfativa de la orina procedente de hembras salvajes fue significativamente menor que la orina de hembras de cultivo, contrario a nuestras expectativas.

Para examinar la dominancia en el lenguado Senegalés, dos grupos de diferentes estadios de juveniles (tempranos; $n = 74$ y tardíos; $n = 34$) fueron utilizados para realizar dos pruebas de dominancia diádica (respuesta a la alimentación y preferencia de lugar o espacio) y una prueba de dominancia en grupo (4 grupos; $n = 6$). Asimismo, se examinaron diferentes transcritos relacionados con la dominancia en otras especies para distinguir entre individuos dominantes y subordinados. Este estudio ha sido el primero en reportar la dominancia como comportamiento en esta especie, la cual podría ser relevante debido a la baja contribución parental durante la época de puesta. Las pruebas diádicas encontraron la existencia de la dominancia relacionada con la alimentación y el territorio (zona restringida con arena) y se observó que los animales dominantes exhibieron mayor frecuencia de los comportamientos apoyar la cabeza en un individuo, acercarse y nadar por encima de otro individuo que los animales subordinados, además de dominar la zona con arena en el tiempo final de la prueba y ocupar la arena al momento de terminar la prueba. Igualmente, estos comportamientos se corroboraron en la prueba grupal, donde dos índices (índice de apoyar la cabeza e índice de posición antes de la alimentación) determinaron las dos categorías de dominancia en el mismo grupo. Dos transcritos relacionados con la neurogénesis (*nrd2*) y con la neuroplasticidad (*c-fos*) se expresaron significativamente diferente entre juveniles tempranos de diferente estatus demostrando

que hay diferencias en la actividad transcriptómica entre lenguados dominantes y subordinados.

Los estilos de afrontamiento al estrés (SCS) han sido relacionados con el éxito reproductivo y la expresión génica en algunas especies de peces. En este estudio se determinaron los diferentes SCS (proactivos, intermedios y reactivos) en treinta lenguados juveniles y además se determinó la asociación de dichos estilos con la expresión génica de algunos genes relacionados con SCS en otras especies con la finalidad de encontrar un biomarcador. Se encontraron cuatro transcritos que asociaron los diferentes perfiles de comportamiento con la expresión génica en el cerebro en esta especie, *gapdh-2* (metabolismo), *ppar β* (metabolismo lipídico y comportamiento en la alimentación), *igh-Ia* (crecimiento y comportamiento en la alimentación) y *per1* (ritmos circadianos y comportamiento en la alimentación) siendo todos ellos genes importantes a nivel biológico y funcional.

Esta tesis ha demostrado que la presencia de lenguados salvajes que se reproducen incrementa la participación en el cortejo y puestas de los lenguados de cultivo, sugiriendo la existencia de un proceso de aprendizaje de los comportamientos reproductivos. El sistema olfativo parece tener un papel importante en esos comportamientos reproductivos e implicación en el cortejo con la capacidad de acrecentar los niveles de LH en plasma y diferenciar entre sexo y estado de madurez. Además, se identificaron comportamientos similares al cortejo relacionados con la dominancia en la alimentación y el espacio. Conjuntamente estos avances fortalecen la importancia de estas líneas de investigación como áreas que pueden dar solución a la disfunción reproductiva pudiendo cerrar el ciclo de vida del lenguado Senegalés en cautividad para hacer la producción de dicha especie sostenible en la industria de la acuicultura.