

REPRODUCTION, OLFACTION AND DOMINANCE BEHAVIOUR IN SENEGALESE SOLE (*Solea senegalensis*) (E. Fatsini)

Resum

El llenguado Senegalès (*Solea senegalensis*) es una espècie de peix pla que està en constant creixement de producció dins de la indústria de l'aqüicultura degut a la seua capacitat de supervivència i creixement en captivitat, a més de posseir un elevat preu al mercat. En canvi, un dels principals problemes d'expansió del cultiu d'aquesta espècie és la disfunció reproductiva associada al comportament que complica tancar el cicle de vida del llenguado en captivitat. La disfunció reproductiva s'observa als mascles de cultiu (nascuts i criats en captivitat) que no participen al seguici, de forma que la majoria dels ous obtinguts de llenguados de cultiu es troben sense fertilitzar. Conseqüentment, la producció del llenguado Senegalès depèn dels mascles salvatges (procedents de la natura) el qual es insostenible a llarg termini. Esta tesi té com objectiu principal entendre i buscar possibles solucions a aquest problema enfocant-se en diferents aspectes relacionats amb la reproducció i el sistema olfatiu que podria controlar el comportament reproductiu.

Per analitzar l'efecte de la presència de llenguados salvatges que es reproduïen en el comportament i el èxit reproductiu dels llenguados de cultiu, que no es reproduïen, es van comparar dos grups formats per llenguados salvatges i de cultiu amb un grup control format només amb llenguados de cultiu durant tres temporades consecutives de posta. No es van obtenir postes fecundades del grup control. En canvi, sí que es van obtenir postes fecundades dels dos grups mixtos, principalment del individus salvatges. Els mascles de cultiu que estaven convivint amb els llenguados salvatges van participar de modo actiu en els comportaments de "Persecució" associats al seguici, que són comportaments relacionats amb la competició (sobre tot entre els mascles) perseguint-se entre ells. Un mascle de cultiu va fertilitzar dos postes en el any 2014. Durant els tres anys, la participació dels mascles (i femelles) de cultiu va augmentar de forma progressiva indicant un possible procés d'aprenentatge dels comportaments reproductius.

Per establir un possible problema en la comunicació química a nivell estructural, es van dissecionar les rosetes olfatives del costat ocular (UOR) i del costat cec (LOR) de deu llenguados salvatges juvenils i deu llenguados de cultiu juvenils. Aquest estudi és el primer en reportar la descripció histològica detallada de les rosetes olfatives del llenguado Senegalès sent la estructura similar a la d'altres espècies descrites, sobre tot especies de peixos plans. No es van obtenir diferències significatives en la estructura tissular, tipus de cèl·lules i distribució cel·lular, en canvi, es van obtenir diferències entre la UOR i la LOR en número total de lamel·les i en quantitat de cèl·lules goblet concentrades en la part apical de les lamel·les que són més freqüents en la LOR.

Per a determinar si els mascles i femelles de llenguado Senegalès posseïen la capacitat olfativa de comunicar químicament, es va realitzar un perfil transcriptòmic de la UOR utilitzant RNA-seq en tres mascles reproductors de cultiu i tres mascles reproductors salvatges, tots madurs, per a després poder comparar els nomenats perfils

d'expressió. Es van diferenciar de forma significativa 2.387 transcrits entre mascles de cultiu i salvatges els quals estaven al mateix grau de maduresa. Els transcrits d'alguns receptors olfactivs (OR, TAAR i V2R-like) i altres transcrits associats amb el control de reproducció (aromatasa cerebral i Tachykinina) van demostrar clares diferències en la funcionalitat de la UOR entre els llenguados de diferent origen. A més a més, els mascles de cultiu van presentar major expressió en gens relacionats amb les cèl·lules goblet i producció de mucines que controlen les respostes immunes innata i adaptativa. Molts d'aquests canvis es podrien explicar amb la diferència en el estatus nutricional i la preferència de la dieta.

Per a determinar la forma de comunicació química, es va avaluar la sensibilitat olfactiva de l'orina i el fluid ovàric procedents de conspecifics madurs de diferent origen (salvatges i de cultiu) de dotze llenguados juvenils i dotze llenguados adults, tots de cultiu, utilitzant electró-olfactogram (EOG). L'orina es va confirmar com un potent estimulant olfactiv per a ambos estadis, juvenils i adults, la qual va induir una resposta amplia en el EOG depenent de la concentració amb nivells de detecció a una dilució 1:10⁶. Es van trobar diferències significatives en la amplitud de la percepció de l'orina en relació al sexe i a l'estat de maduresa tant de l'emissor com de receptor indicant que l'orina podria estar implicada en la reproducció comunicant el sexe i l'estat de maduresa. A més, l'orina procedent de femelles madures va produir un petit, però significant increment en plasma de la hormona Luteïnitzant (LH) en mascles madurs, demostrant que els productes alliberats amb l'orina juguen un paper important en la reproducció del llenguado Senegalès. Però, la potència olfactiva de l'orina procedent de femelles salvatges va ser significativament menor que l'orina de femelles de cultiu, contràriament a les nostres expectatives.

Per a examinar la dominància en el llenguado Senegalès, dos grups de diferents estadis de juvenils (primerencs; $n = 74$ i tardans; $n = 34$) van ser utilitzats per a realitzar dos probes de dominància diàdica (resposta a l'alimentació i preferència de lloc o espai) i una prova de dominància en grup (4 grups; $n = 6$). Així mateix, es van examinar diferents transcrits relacionats amb la dominància en altres espècies per a distingir entre individus dominants i subordinats. Aquest estudi ha sigut el primer en reportar l'existència de la dominància com a comportament en aquesta espècie, la qual podria ser rellevant degut a la baixa contribució parental durant l'època de posta. Les probes diàdiques van trobar l'existència de la dominància relacionada amb l'alimentació i el territori (zona restringida amb sorra) i es va observar que els animals dominants exhibien major freqüència dels comportaments recolzar el cap en un individu, apropar-se i nadar per damunt d'un altre individu que els animals subordinats, a més de dominar la zona amb sorra en el temps final de la prova i ocupar la sorra al moment de terminar la prova. Igualment, aquests comportaments es van corroborar en la prova grupal, on dos índex (índex de recolzar el cap e índex de posició abans de l'alimentació) van determinar les dues categories de dominància en el mateix grup. Dos transcrits relacionats amb la neurogènesis (*nrd2*) i la neuroplasticidad (*c-fos*) es van expressar significativament diferent entre juvenils primerencs de diferent estatus social demostrant que hi ha diferències en l'activitat transcriptòmica entre llenguados dominants i subordinats.

Els estils d'afrontament a l'estrès (SCS) han sigut relacionats amb l'èxit reproductiu i l'expressió gènica en algunes espècies de peixos. En aquest estudi es van determinar els diferents SCS (proactius, intermedis i reactius) en trenta llenguados juvenils i a més es va determinar l'associació d'aquests estils amb l'expressió gènica d'alguns gens relacionats amb SCS en altres espècies amb la finalitat de trobar un biomarcador. Es van trobar quatre transcrits que van associar els diferents perfils de comportament amb l'expressió gènica del cervell en aquesta espècie, *gapdh-2* (metabolisme), *pparβ* (metabolisme lipídic i comportament en l'alimentació), *igh-Ia* (creixement i comportament en l'alimentació) y *per1* (ritmes circadians i comportament en l'alimentació) sent tots ells gens importants a nivell biològic i funcional.

Aquesta tesi ha demostrat que la presència de llenguados salvatges que es reproduïen incrementa la participació en el seguici i postes dels llenguados de cultiu, suggerint l'existència d'un procés d'aprenentatge dels comportaments reproductius. El sistema olfatiu pareix tindre un paper important en aquests comportaments reproductius e implicació en el seguici amb la capacitat d'incrementar els nivells de LH en plasma i diferenciar entre sexe i maduresa. A més a més, es van identificar comportaments similars als del seguici relacionats amb la dominància en l'alimentació i el territori. Conjuntament aquests avanços enforteixen la importància d'aquestes línies d'investigació com àrees que puguin donar solució a la disfunció reproductiva podent tancar el cicle de vida del llenguado Senegalès en captivitat per a fer la producció d'aquesta espècie sostenible en l'indústria de l'aqüicultura.