

Διερεύνηση της ικανότητας μάθησης του Ευρωπαϊκού λαβρακιού και της έκφρασης σχετικών γονιδίων του εγκεφάλου

Διάκος, Ε., Μπατζίνα, Α., Θεοδώρου, Γ., Καρακατσούλη, Ν.

Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, nafsika@aua.gr, alkistibatztina@gmail.com, georgeten2@gmail.com, emandiak@hotmail.gr

Περίληψη

Σκοπός της μελέτης ήταν να διερευνηθεί η ικανότητα μάθησης του λαβρακιού σε σχέση με την έκφραση των γονιδίων *c-fos* και *egr-1* του εγκεφάλου, γονίδια που συνδέονται με τις λειτουργίες της μάθησης/μνήμης στα σπονδυλωτά ζώα. Σχεδιάστηκαν δοκιμές εξαρτημένης μάθησης με θετική ενίσχυση. Μετά την εκπαίδευση έγινε λήψη εγκεφάλου (τελεγκέφαλος, υποθάλαμος/υπόφυση, λοιπός εγκέφαλος) από άτομα που δεν μαθαίνουν (ΔΜ) ή μαθαίνουν (Μ). Διαπιστώθηκε ότι η έκφραση των *c-fos* και *egr-1* στον τελεγκέφαλο ήταν στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη στα Μ συγκριτικά με τα ΔΜ άτομα. Τα αποτελέσματα ενισχύουν τις απόψεις περί εμπλοκής του τελεγκέφαλου στην υποστήριξη των γνωστικών ικανοτήτων των ιχθύων.

Λέξεις κλειδιά: εξαρτημένη μάθηση, *c-fos*, *egr-1*, τελεγκέφαλος, γνωστικές ικανότητες

Learning ability of European seabass and expression of related genes in the brain

Diakos, E., Batztina, A., Theodorou, G., Karakatsouli, N.

Faculty of Animal Science and Aquaculture, Agricultural University of Athens, nafsika@aua.gr, alkistibatztina@gmail.com, georgeten2@gmail.com, emandiak@hotmail.gr

Abstract

The present study investigated the learning abilities of seabass and how they relate to the expression of brain *c-fos* and *egr-1* genes. These genes are known to be involved in the functions of learning/memory in other vertebrates but data in fish are scarce. Trials of associative learning with positive reinforcement were used. Upon the completion of the training, brain was removed from fish that never learned the task (NL) or fish that successfully completed learning (L). Relative expression of *c-fos* and *egr-1* was significantly higher in the telencephalon of L compared to NL fish. Results obtained support the involvement of telencephalon in fish cognitive abilities.

Keywords: associative learning, *c-fos*, *egr-1*, telencephalon, cognition

1. Εισαγωγή

Τα έως τώρα ερευνητικά δεδομένα περί γνωστικών ικανοτήτων πτηνών και θηλαστικών οδήγησαν στην επίσημη αποδοχή τους ως όντα με ικανότητα συναίσθησης (Συνθήκη της Λισαβόνας C2010/083/01) και στην θέσπιση νομοθεσίας ώστε να εξασφαλιστεί καλή ποιότητα ζωής και να διασφαλιστεί η ευζωία τους. Παρόμοιοι κανονισμοί για τους εκτρεφόμενους ιχθύς κατά την περίοδο του παραγωγικού κύκλου, δεν υπάρχουν, κυρίως λόγω των αμφισβητήσεων περί ικανότητας συναίσθησης (Cottee, 2012). Είναι γεγονός ότι ο εγκέφαλος των ιχθύων στερείται νεοφλοιού, την εξωτερική στοιβάδα του φλοιού του εγκεφάλου των θηλαστικών, όπου λαμβάνουν χώρα οι ανώτερες νοητικές λειτουργίες (π.χ. σκέψη, συνείδηση, γλώσσα). Ο νεοφλοιός, σε συνεργασία με το μεταιχμιακό σύστημα, ιδιαίτερα τις περιοχές της αμυγδαλής και του υπόκαμπου, υποστηρίζουν λειτουργίες όπως τη μνήμη και τη μάθηση. Στους ιχθύς οι λειτουργίες του μεταιχμιακού συστήματος υποστηρίζονται από ομόλογες περιοχές του πρόσθιου εγκεφάλου (τελεγκέφαλος) (Salas, 2006). Επιπλέον, πρόσφατα στοιχεία αποδεικνύουν ότι οι γνωστικές τους ικανότητες είναι υπαρκτές και δεν μπορούν να παραβλέπονται. Για παράδειγμα, έχει διαπιστωθεί ότι οι ιχθύς έχουν ικανότητα μάθησης και μνήμης (EFSA, 2009; Brown et al., 2011). Για τα άλλα σπονδυλωτά ζώα, έχουν εντοπιστεί γονίδια που εκφράζονται στα τμήματα εκείνα του εγκεφάλου που συνδέονται με

τις λειτουργίες της μάθησης/μνήμης. Συγκεκριμένα, τα γονίδια *c-fos* και *egr-1* εκφράζονται στο μεταιχμιακό σύστημα και η λειτουργία τους συνδέεται όχι μόνο με την μνήμη/μάθηση αλλά και με συναισθηματικά φορτισμένες καταστάσεις (π.χ. πόνος) (Bullitt, 1990; Pagel & Deindl, 2011). Στην περίπτωση των ιχθύων, πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι τα γονίδια *c-fos* και *egr-1* εκφράζονται στον τελεγκέφαλο ανάλογα με την ικανότητα μάθησης (Harvey-Girard et al., 2010; Wood et al., 2011; Emmanuel Rajan et al., 2011). Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί η ικανότητα μάθησης του Ευρωπαϊκού λαβρακιού *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) σε σχέση με την έκφραση των γονιδίων *c-fos* και *egr-1* του εγκεφάλου.

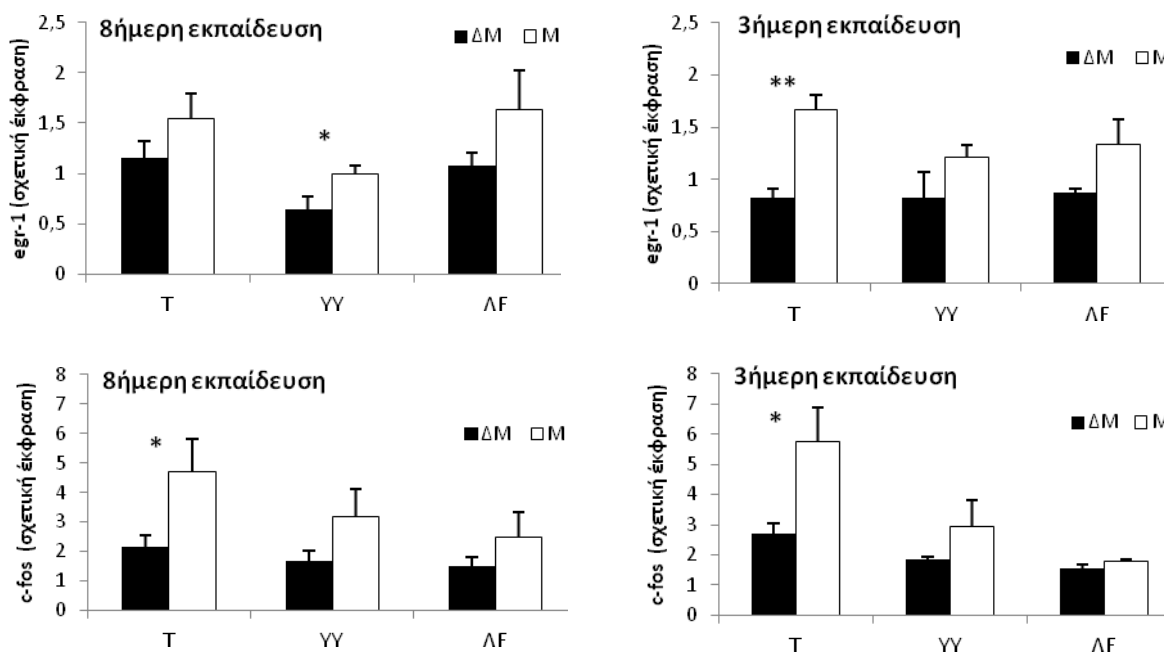
2. Υλικά και μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκαν 92 άτομα Ευρωπαϊκού λαβρακιού (μέσο βάρος 119.9 ± 2.65 g) παρόμοιας προέλευσης και ηλικίας (1+). Σχεδιάστηκαν δοκιμές εξαρτημένης μάθησης με θετική ενίσχυση. Κατά την διαδικασία της μάθησης τα ψάρια εκπαιδεύτηκαν να συνδέουν ένα ουδέτερο ερέθισμα (χρωματιστή διακριτική σήμανση) με ένα θετικό ερέθισμα επιβράβευσης (παρουσία ομοειδούς ατόμου και χορήγηση τροφής). Οι δοκιμές μάθησης πραγματοποιήθηκαν ατομικά σε άτομα χωρίς προηγούμενη εμπειρία χρησιμοποιώντας κατάλληλα διαμορφωμένο λαβυρίνθο. Το εξεταζόμενο άτομο, για να προσλάβει την επιβράβευση έπρεπε να μάθει να διέρχεται από την πόρτα εκείνη που ήταν σημασμένη με το ουδέτερο ερέθισμα. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: κάθε άτομο, μετά από τετραήμερη απομόνωση, εισάγεται και περιορίζεται στον χώρο εκκίνησης του λαβυρίνθου όπου παραμένει για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, ανοίγουν οι πόρτες που οδηγούν είτε στον χώρο επιβράβευσης (πόρτα με σήμανση) είτε σε κενό χώρο (πόρτα χωρίς σήμανση, χώρος χωρίς ομοειδές άτομο και χορήγηση τροφής). Το κάθε άτομο καταγράφεται (βιντεοσκόπηση) για μέγιστο χρόνο 30 λεπτών. Εάν επιτύχει νωρίτερα την σωστή επιλογή, η δοκιμή διακόπτεται, και το άτομο επιστρέφει στον χώρο εκκίνησης για την επόμενη δοκιμή. Κάθε άτομο υποβλήθηκε σε τρεις δοκιμές ανά ημέρα. Από το συνολικό αριθμό ατόμων που δοκιμάστηκε τα 44 εκπαιδεύτηκαν για 8 ημέρες και τα 48 για 3 ημέρες. Σε κάθε δοκιμή η θέση του χρωματικού ουδέτερου ερεθίσματος εναλλασσόταν μεταξύ του αριστερού και δεξιού τμήματος του λαβυρίνθου. Ένα άτομο θεωρήθηκε ότι έμαθε όταν κάθε ημέρα βελτιώνει το χρόνο επιτυχούς ολοκλήρωσης της διαδρομής του λαβυρίνθου σε τουλάχιστον δύο διαδοχικές δοκιμές. Ας σημειωθεί ότι όλα τα άτομα είχαν κινητικότητα εντός του λαβυρίνθου. Από τα αποτελέσματα της 8ήμερης και 3ήμερης εκπαίδευσης, τα άτομα διακρίθηκαν ανάλογα με την ικανότητα μάθησης σε τρεις κατηγορίες: άτομα που δεν μαθαίνουν (ΔΜ), άτομα που μαθαίνουν (Μ) και άτομα με ασαφή αποτελέσματα (ΑΜ). Μετά την ολοκλήρωση της εκπαίδευσης 7 ΔΜ και Μ άτομα για την 8ήμερη και 5 ΔΜ και Μ άτομα για την 3ήμερη εκπαίδευση θανατώθηκαν ακαριαία με ευθανασία (2-φαινοξυαιθανόλη, 4ml/L) και πραγματοποιήθηκε λήψη του εγκεφάλου. Ο εγκέφαλος διαχωρίστηκε σε τρία τμήματα: τελεγκέφαλος (Τ), υποθάλαμος/υπόφυση (ΥΥ) και λοιπός εγκέφαλος (ΛΕ). Τα δείγματα καταψύχθηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκαν στους -80 °C έως την ανάλυση των γονιδίων. Η έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων στα δείγματα του εγκεφάλου προσδιορίστηκε με τη χρήση της Real Time PCR (αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου). Για το λόγο αυτό κατασκευάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές για τα γονίδια *egr-1*, *c-fos* και *beta actin* (ενδογενές γονίδιο) με βάση τις ήδη δημοσιευμένες αλληλουχίες των γονιδίων στην GenBank. Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων πραγματοποιήθηκε με βάση την μέθοδο του Pfaffl (2001). Η σύγκριση της έκφρασης των γονιδίων μεταξύ των ΔΜ και Μ ατόμων και για κάθε εκπαιδευτική διάρκεια χωριστά πραγματοποιήθηκε με μονοπαραγοντική ανάλυση παραλλακτικότητας. Στο κείμενο και την εικόνα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα

3. Αποτελέσματα

8ήμερη εκπαίδευση: Από τους 44 ιχθύς που εξετάστηκαν, εντοπίστηκαν 17 (38,6%) ΔΜ και 7 (15,9%) Μ. Τα γονίδια *egr-1* και *c-fos* έδειξαν γενικά μεγαλύτερη έκφραση στα Μ συγκριτικά με τα ΔΜ

άτομα σε όλα τα τμήματα του εγκεφάλου, αλλά οι διαφορές ήταν στατιστικά σημαντικές μόνο στον ΥΥ για το *egr-1* και στον Τ για το *c-fos*. **3ήμερη εκπαίδευση:** Από τους 48 ιχθύς που εξετάστηκαν, εντοπίστηκαν 20 (41,7%) ΔΜ και 5 (10,4%) Μ. Ο μέσος χρόνος μάθησης ήταν 986 ± 102 sec και ο μέσος όρος των καλύτερων χρόνων ήταν 372 ± 102 sec. Η έκφραση των *egr-1* και *c-fos* στον τελεγκέφαλο (Τ) ήταν στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη στους Μ συγκριτικά με τους ΔΜ.



Εικ. 1. Σχετική έκφραση των *egr-1* και *c-fos* στον τελεγκέφαλο (Τ), υποθάλαμο/υπόφυση (ΥΥ) και στο λοιπό τμήμα εγκεφάλου (ΛΕ) σε άτομα που μαθαίνουν (Μ) και δεν μαθαίνουν (ΔΜ) μετά από την 8ήμερη και 3ήμερη εκπαίδευση.

4. Συμπεράσματα/Συζήτηση

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αρχικά υποδεικνύουν ότι το λαβράκι έχει ικανοποιητικού επιπέδου ικανότητα μάθησης. Ο χρόνος που απαιτήθηκε για να εκπαιδευτεί δείχνει φαινομενικά μεγάλος συγκριτικά με άλλα είδη ιχθύων ή και με τις εργασίες που έχουν πραγματοποιηθεί στο λαβράκι (Benhaim et al., 2013a, 2013b). Ωστόσο, ο λαβύρινθος των Benhaim et al. (2013a, 2013b) ήταν τύπου Τ και ουσιαστικά απλούστερος από αυτόν που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Επίσης, φαίνεται ότι 3 ημέρες είναι αρκετές για να εκπαιδευτεί το λαβράκι, ενώ η 8ήμερη εκπαίδευση ενέχει τον κίνδυνο της συνήθειας και του εγκλιματισμού. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός ότι η ικανότητα μάθησης του λαβρακιού συνδυάστηκε με αυξημένη έκφραση των *egr-1* και *c-fos*, κυρίως στον τελεγκέφαλο. Ωστόσο, στην 3ήμερη εκπαίδευση και τα δύο γονίδια παρουσίασαν διαφοροποίηση μεταξύ των ΔΜ και Μ ατόμων. Τα γονίδια αυτά συνδέονται με τον σχηματισμό της μνήμης, και συνεπώς είναι αναμενόμενο να εντοπιστεί αυξημένη έκφραση την περίοδο του σχηματισμού της μνήμης και όχι αργότερα, όπως υποδεικνύεται να συμβαίνει με την 8ήμερη εκπαίδευση για το *egr-1*. Τέλος, το γεγονός ότι η αυξημένη έκφραση των γονιδίων *egr-1* και *c-fos* εμφανίστηκε στον τελεγκέφαλο, ενισχύει τις απόψεις περί εμπλοκής του συγκεκριμένου τμήματος του εγκεφάλου στην υποστήριξη των γνωστικών ικανοτήτων των ιχθύων, αλλά και την παρουσία γνωστικών ικανοτήτων αυτή καθεαυτή. Η ικανότητα της μάθησης/μνήμης καθορίζει την συμπεριφορά και, στη φύση, είναι βασική προϋπόθεση για να αυξηθούν οι πιθανότητες επιβίωσης. Τα παρόντα αποτελέσματα ενισχύουν την υπόθεση ότι η ικανότητα της μάθησης/μνήμης είναι ένα κοινό φυλλογεννητικά χαρακτηριστικό.

6. Βιβλιογραφία

- Benhaïm, D., Bégout, M.L., Lucas, G. and Chatain, B. 2013a. First Insight into Exploration and Cognition in Wild Caught and Domesticated Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) in a Maze. *PLoS ONE*, 8 (6), e65872.
- Benhaïm, D., Bégout, M.L., Péan, S., Manca, M., Prunet, P. *et al.* 2013b. Impact of a plant-based diet on behavioural and physiological traits in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Living Resources*, 26, 121-131.
- Brown, C., Laland, K. and Krause, J. (eds). 2011. *Fish Cognition and Behavior*. Wiley Online Library, Pondicherry, India, 450 pp.
- Bullitt, E. 1990. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 296, 517-530.
- Cottee, Y.S. 2012. Are fish the victims of 'speciesism'? A discussion about fear, pain and animal consciousness. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38, 5-15.
- EFSA (European Food Safety Authority) 2009. General approach to fish welfare and to the concept of sentience in fish-Scientific opinion of the panel on animal health and welfare. *The EFSA Journal*, 954, 1-27.
- Emmanuel Rajan, K., Ganesh, A., Dharaneedharan, S. and Radhakrishnan, K. 2011. Spatial learning-induced *egr-1* expression in telencephalon of gold fish *Carassius auratus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37, 153-159.
- Harvey-Girard, E., Tweedle, J., Ironstone, J., Cuddy, M., Ellis, W. *et al.* 2010. Long-term recognition memory of individual conspecifics is associated with telencephalic expression of *Egr-1* in the electric fish *Apteronotus leptorhynchus*. *The Journal of Comparative Neurology*, 518, 2666-2692.
- Pagel, J.-I. and Deindl, E. 2011. Early-growth response 1 – A transcription factor in the crossfire of signal transduction cascades. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 48, 226-235.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 2002-2007.
- Salas, C., Broglio, C., Durán, E., Gómez, A., Ocaña, F.O. *et al.* 2006. Neuropsychology of learning and memory in Teleost fish. *Zebrafish*, 3, 157-171.
- Wood, L.S., Desjardins, J.K. and Fernald, R.D. 2011. Effects of stress and motivation on performing a spatial task. *Neurobiology of Learning and Memory*, 95, 277-285.