

WP2- Reproducción, Diversificación, Mejora genética

Juan F. Asturiano y Ana Gómez

Universitat Politècnica de València; Consejo Superior de Investigaciones Científicas



This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.11) and by Generalitat Valenciana



Financiado por la Unión Europea NextGenerationEU



MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN



Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia



GENERALITAT VALENCIANA
Conselleria de Innovació, Universitats, Ciència i Societat Digital



GVANEXT
Funded Next Generation in the European Union

A. Gómez



Grupo de
Fisiología
de la
Reproducción



A. Felip



E. Mañanós

Grupo de Endocrinología
de la Reproducción y
Diversificación de Peces



L. Pérez



J.F. Asturiano

Grupo de Acuicultura
y Biodiversidad



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Grupo de Biología y
Cultivo de Moluscos



C. Saavedra



M. Rodilla



S. Falcó

Laboratorio de Oceanografía Costera



This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.11) and by Generalitat Valenciana



Objetivos y tareas globales del Wp

- **Objetivo 2.1.** Producción de especies de peces de alto valor comercial y de especies amenazadas o vulnerables. Estudios de fisiología de la reproducción y calidad de los gametos y puestas de peces cultivables, para un mejor conocimiento sobre su control rítmico y su modulación por factores ambientales, en especies de acuicultura y en un contexto de cambio global.
- **Tarea 2.1.1.** Alta temperatura y función gonadal en peces.
- **Tarea 2.1.2.** Estudio de los mecanismos fisiológicos subyacentes en los efectos de la temperatura y del pH sobre la calidad del espermatozoides de peces.
- **Tarea 2.1.3.** Estudio del efecto de la temperatura y del pH en la movilidad del espermatozoides de distintas especies de peces marinos.
- **Tarea 2.1.4.** Efecto de la composición de piensos de reproductores sobre la calidad de la progenie en lubina.
- **Tarea 2.1.5.** Herramientas biotecnológicas para evaluar y controlar el estado reproductivo.



This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by *Generalitat Valenciana*



Principales resultados

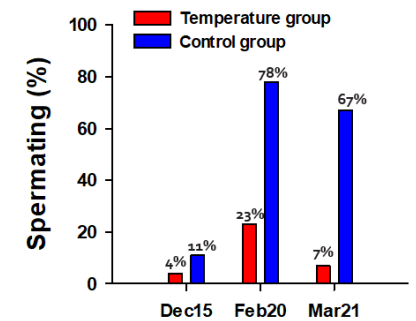
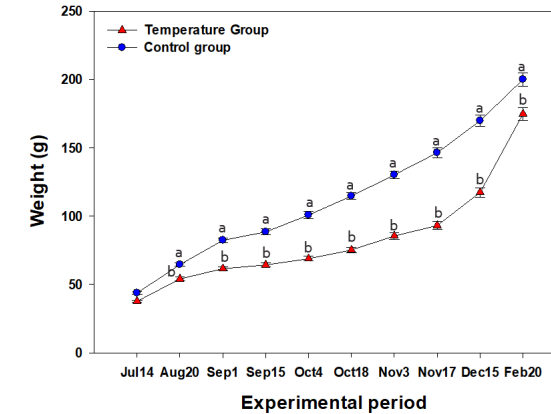
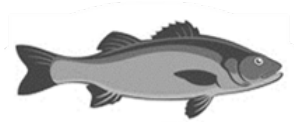
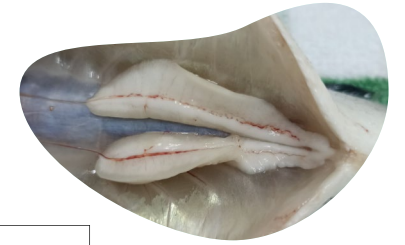
- Tarea 2.1.1. Alta temperatura y función gonadal en peces.

Estudio *in vivo* del efecto a largo plazo de altas temperaturas en lubina.

- El aumento de la temperatura **disminuye el crecimiento** y aumenta la mortalidad acumulada.
- Los animales expuestos a alta temperatura tienen:
 - **menor índice gonadosomático**
 - **menor proporción de espermiantes**
 - **menores niveles plasmáticos de Fsh durante la espermatogénesis**

Estudio *in vitro* del efecto de la temperatura en la esteroidogénesis en células foliculares de ovario de lubina.

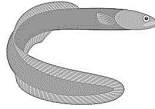
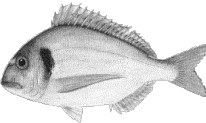
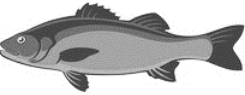
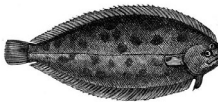

- La alta temperatura disminuye la expresión de *cyp19a1* pero no se refleja en la producción de testosterona y estradiol hasta 48 horas.
- Las células foliculares son capaces de realizar toda la ruta esteroidogénica a alta (25°C) y baja (15°C) temperatura.



Principales resultados

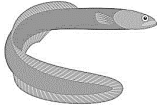
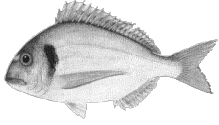
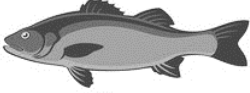
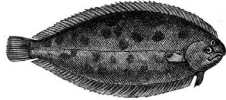
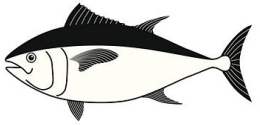
- Tarea 2.1.2.** Estudio de los mecanismos fisiológicos subyacentes en los efectos de la temperatura y del pH sobre la calidad del esperma de peces.

Identificación de parálogos de TRPVs.

					
Identificación TRPVs/TRPA	✓	✓	✓	✓	✗
Puesta a punto <i>primers</i> TRPVs	✓	En proceso	✓	✗	✗
Distribución tisular TRPVs	✓	En proceso	En proceso	✗	✗
Puesta a punto <i>primers</i> TRPA	✗	✗	✗	✗	✗
Distribución tisular TRPA	✗	✗	✗	✗	✗
Efecto de los agonistas/antagonistas de TRPVs en la motilidad espermática					
Efecto antagonistas TRPV ₁	✓	✓	✓	En proceso	✗
Efecto agonistas TRPV ₁	✗	✗	✗	✗	✗

Principales resultados

- **Tarea 2.1.3.** Estudio del efecto de la temperatura y del pH en la movilidad del espermatozoides de distintas especies de peces marinos

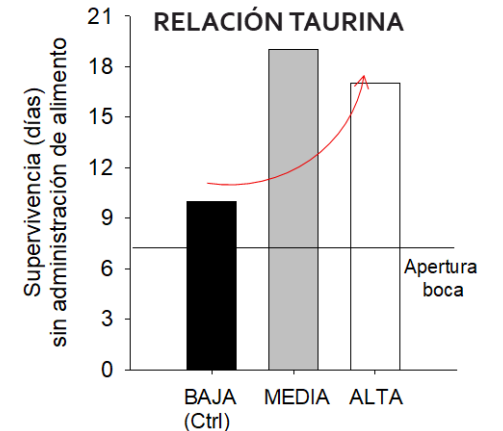
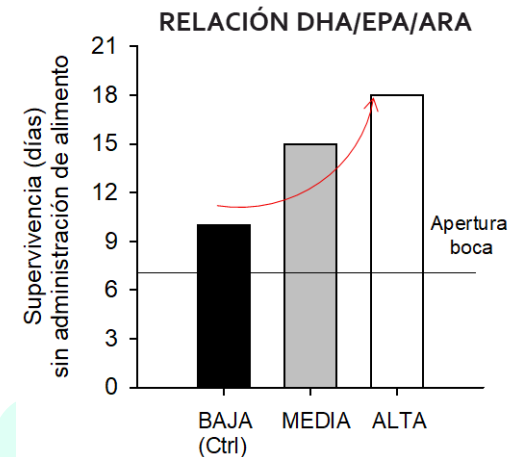
					
Efecto del pH	✓	✓	✓	✓	✗
Efecto de la temperatura	✓	✓	✓	✗	✗
Efecto combinado del pH y la temperatura	✓	✓	✓	✗	✗
Efecto combinado del pH del <i>extender</i> y del pH del agua de mar	✓	✓	✓	✗	✗
Tests de fertilización	✗	✗	✗	✗	✗

Principales resultados

- **Tarea 2.1.4.** Efecto de la composición de piensos de reproductores sobre la calidad de la progenie en lubina

La relación DHA/EPA/ARA y los niveles de taurina en el pienso de los reproductores:

- Aumenta el número de puestas
- Tasas de fertilización similares
- Aumenta la supervivencia larvaria



Principales resultados

- **Tarea 2.1.5.** Herramientas biotecnológicas para evaluar y controlar el estado reproductivo.

Elisas Fsh y Lh de dorada y anguila.

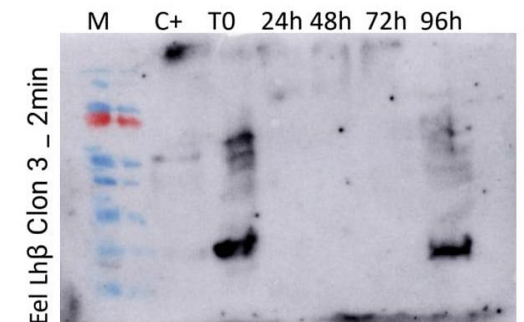
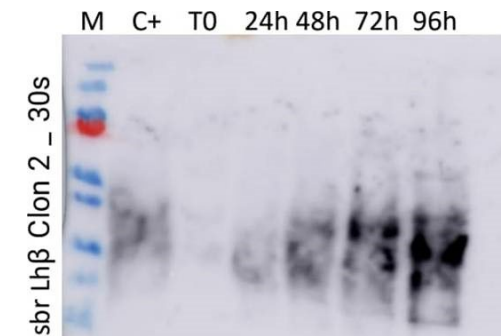
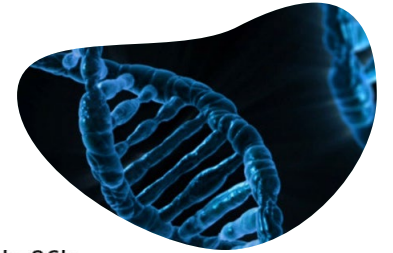
- Disponibles **plásmidos de expresión** para producción en *Pichia pastoris* de **Lh β** y **Fsh β** de dorada y anguila.
- *P. pastoris*: Generados **clones de Lh β** de dorada y anguila y seleccionados 2 clones óptimos y su cinética de producción/secreción de Lh β .

ELISA Amh lubina y tortuga.

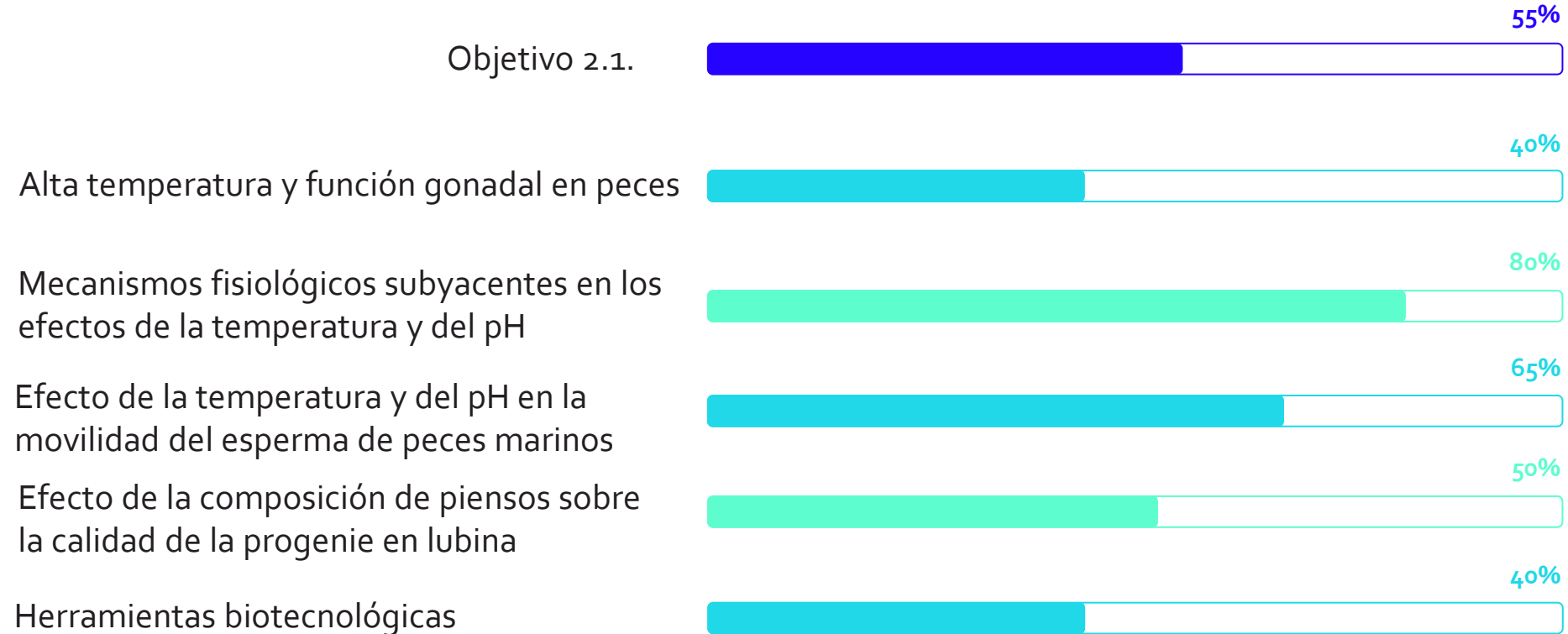
- **Lubina**: Realizada **producción de Amh recombinante** de lubina en *Pichia pastoris* para su uso como antígeno.
- **Tortuga**: Se ha **clonado el cDNA de *amh*** como base para la producción de Amh recombinante.

Fsh y Lh recombinantes de anguila.

- Disponibles **plásmidos de expresión** para producción de **Fsh y Lh de anguila**.
- Iniciado **experimentos de transferencia génica somática** para estimulación gonadal en anguila.



Grado de consecución de los objetivos/tareas



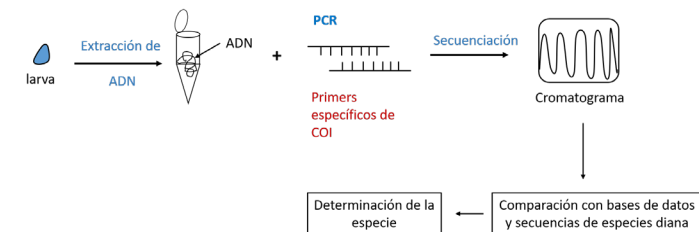
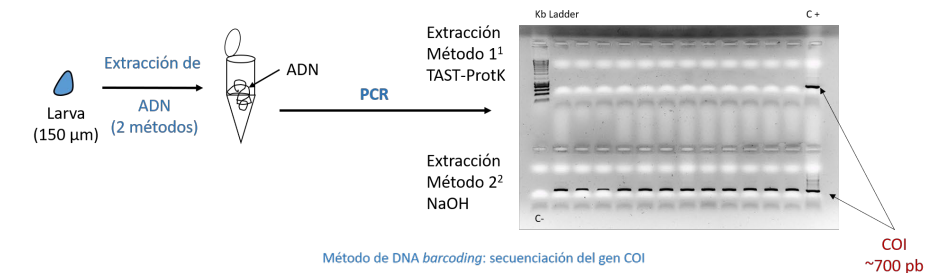
Objetivos y tareas globales del Wp

- **Objetivo 2.2.** Producción de especies de moluscos amenazadas o vulnerables. Mejora del conocimiento de la biología y de los aspectos fisiológicos relevantes para su cultivo. Mejora de los sistemas de cultivo de bivalvos en todas las fases del proceso productivo con origen en el medio natural: implementación de sistemas de monitorización poblacional y de reclutamiento larvario de especies de interés comercial para garantizar el abastecimiento de semilla para una producción acuícola y marisquera sostenibles.
- **Tarea 2.2.1.** Detección, identificación y cuantificación de larvas en la columna de agua, y de postlarvas en el fondo, a lo largo de un ciclo anual, en especies de bivalvos de interés marisquero con poblaciones sobreexplotadas (tellina y chirla).
- **Tarea 2.2.2.** Censos de las poblaciones adultas de tellina y chirla, caracterización ambiental y uso del biomarcador LMS (*lysosomal membrane stability*) para la evaluación del estado de las diferentes zonas.
- **Tarea 2.2.3.** Valoración de la cría en cautividad de la chirla/tellina.



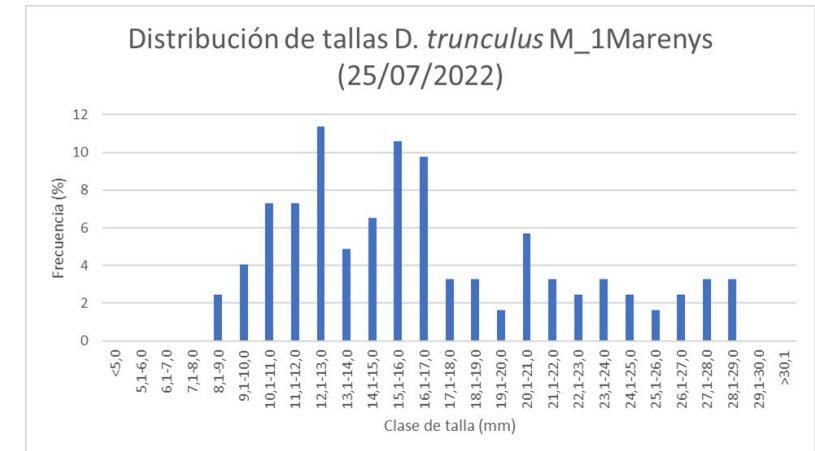
Principales resultados

- **Tarea 2.2.1.** Detección, identificación y cuantificación de larvas en la columna de agua, y de postlarvas en el fondo, a lo largo de un ciclo anual, en especies de bivalvos de interés marisquero con poblaciones sobreexplotadas (tellina y chirla).
- 1) Muestreo y aislamiento de larvas y postlarvas del medio acuático para la extracción de ADN de forma individualizada
- 2) Extracción del ADN propiamente dicho.
- 3) PCR del ADN anterior para amplificar la región génica que se utiliza habitualmente en los sistemas de *barcoding* en animales: citocromo oxidasa I mitocondrial (COI).
- 4) Secuenciar los productos de PCR y comparar estas secuencias con las existentes en las bases de datos de ADN para las especies diana y otras especies potencialmente presentes en el hábitat muestreado en ese momento, para poder **identificar la larvas de especies diana y calcular su abundancia (proporción)** respecto a otras.



Principales resultados

- **Tarea 2.2.2.** Censos de las poblaciones adultas de tellina y chirla, caracterización ambiental y uso del biomarcador LMS (*lysosomal membrane stability*) para la evaluación del estado de las diferentes zonas.
- Se han obtenido 9 meses de densidades , tanto de *Donax* como de *Chamelea*, distribución de tallas mayores de 5 mm.
- Se ha preparado un conjunto de organismos sometidos a temperaturas de 12, 22 y 29°C para establecer el nivel basal de retención de rojo neutro (LMS)



Principales resultados

- **Tarea 2.2.3.** Valoración de la cría en cautividad de la chirla/tellina.
 - **Chirla:** Acondicionamiento de reproductores e inducción de puestas – previsto para mayo-agosto de 2023
 - **Tellina:** ídem 2024
 - Experimentos previos- viabilidad de la chirla en cautividad – con sustrato arenoso y sin sustrato arenoso
 - **Supervivencia** de septiembre 2022-abril2023
 - Sustrato arena 85%
 - Sustrato nylon 100%

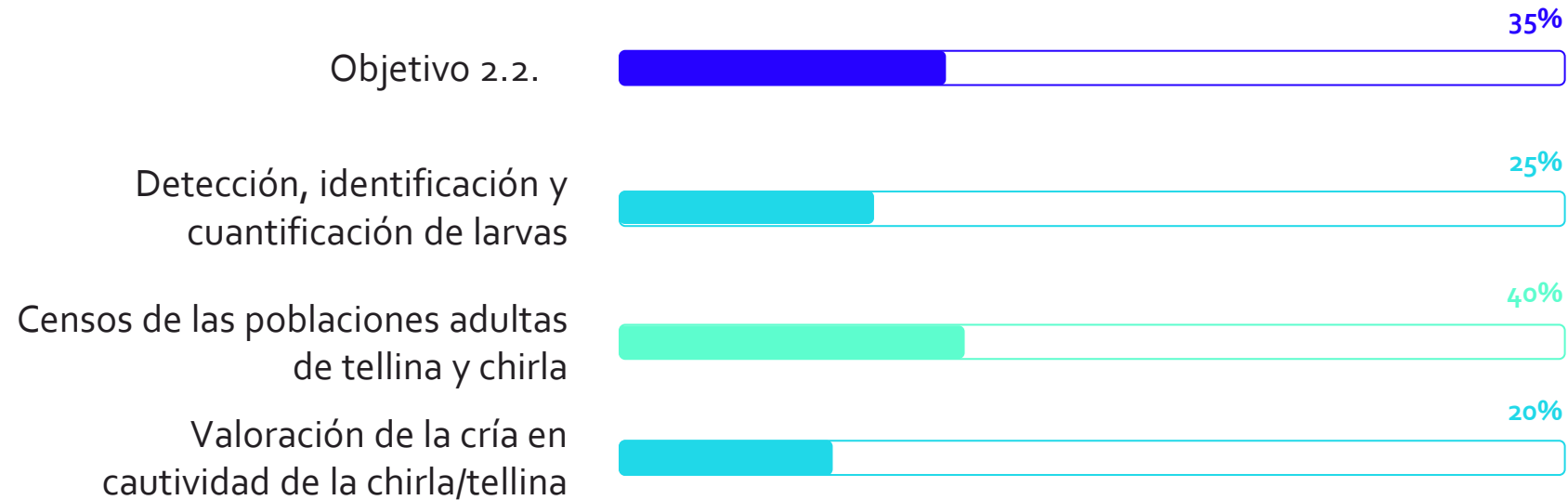


Sustrato: arena



Sustrato: malla de nylon

Grado de consecución de los objetivos/tareas

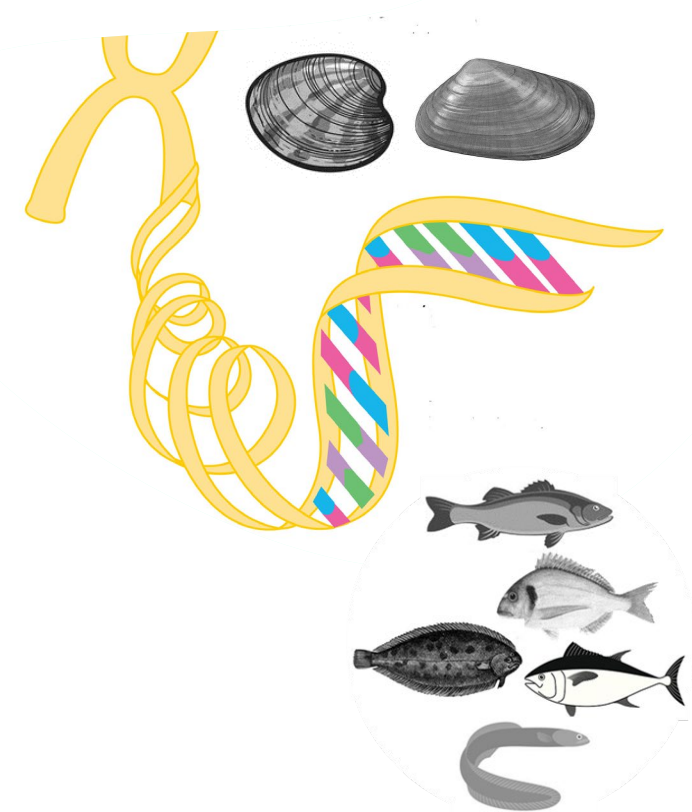


This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by *Generalitat Valenciana*



Objetivos y tareas globales del Wp

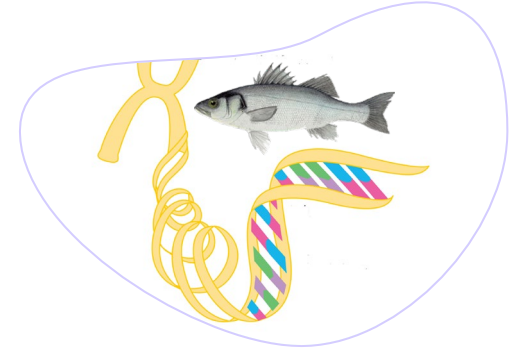
- **Objetivo 2.3.** Estudios de genética de peces y moluscos: identificación de secuencias y SNPs asociadas a caracteres productivos, y preservación de recursos genéticos de líneas seleccionadas.
- **Tarea 2.3.1.** Identificación de SNPs asociados a caracteres productivos.
- **Tarea 2.3.2.** Identificación de ejemplares cuyo esperma demuestre una especial resiliencia a los cambios de temperatura y de pH, y criopreservación de sus recursos genéticos.
- **Tarea 2.3.3.** Genómica de chirla y tellina.
- **Tarea 2.3.4.** Polimorfismos de DNA y QTL de chirla y tellina.



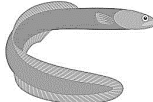
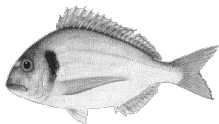
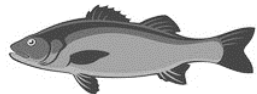
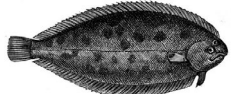

Principales resultados

- **Tarea 2.3.1.** Identificación de SNPs asociados a caracteres productivos

Identificados en lubina **3-4 SNPs con asociación significativa a la maduración gonadal** pendientes de validar.



- **Tarea 2.3.2.** Identificación de ejemplares cuyo espermatozoides demuestre una especial resiliencia a los cambios de temperatura y de pH, y criopreservación de sus recursos genéticos.

					
Puesta a punto de protocolos de criopreservación de espermatozoides	✓	✓	✓	✓	✗
Creación de un criobanco de espermatozoides	✗	✗	✗	✗	✗
Análisis de supervivencia espermática a largo plazo	✗	✗	✗	✗	✗

Principales resultados

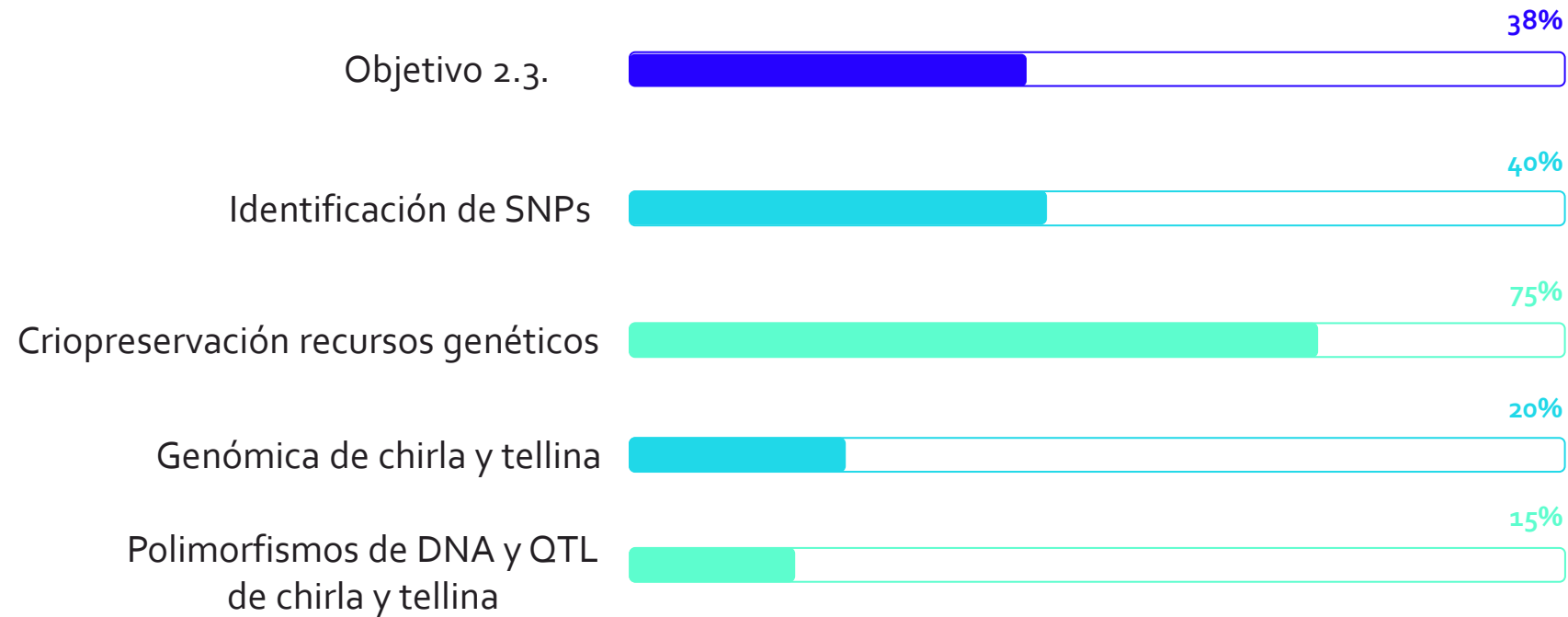
- Tarea 2.3.3. Genómica de chirla y tellina.
- Tarea 2.3.4. Polimorfismos de DNA y QTL de chirla y tellina.
- Se ha preparado el sistema de extracción de ADN de muy alto peso molecular necesario para el sistema ONT.



This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by *Generalitat Valenciana*



Grado de consecución de los objetivos/tareas



This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by *Generalitat Valenciana*



Desviaciones del programa inicial

- Imposibilidad de obtener **muestras de atún** (tejidos, esperma).
- Limitación en muestras de **esperma de lenguado** (número y volumen).
- Imposibilidad de obtener **ejemplares juveniles de lenguado**. Alternativa: búsqueda de otra especie mediterránea.
- Falta de **estudiantes predoctorales** (participación en varias convocatorias).

- Incorporación de dos postdoctorales “Margarita Salas” de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y la Universitat Autònoma de Barcelona. Y dos postdoctorales contratados con cargo al Proyecto.
- Genoma del lenguado ahora accesible en bases de datos (NCBI).
- Colaboración con la Uppsala University (Suecia) y el MNHN (Francia): estudio de la historia evolutiva de los miembros de la familia TRP.
- Colaboración con el IATS: efecto de las temperaturas altas sobre la expresión de TRPs en reproductores de lubina.
- Colaboración con el IATS: experimentos transferencia somática (gonadotropinas) en anguila.
- Colaboración con el Centro de Investigación Príncipe Felipe: estudios del potencial de membrana de espermatozoides por citometría de flujo.
- Colaboración con el ICMAN-CSIC en Cádiz, para completar la secuenciación de *Donax trunculus*.
- Tres tesis doctorales en cotutela con universidades brasileñas: experimento criopreservación esperma en cápsulas vegetales, y experimento de dilución post-congelación (varias especies) .



This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by Generalitat Valenciana



Hoja de ruta 6 próximos meses

- **Tarea 2.1.1.**
 - Análisis de los niveles plasmáticos de gonadotrofinas y hormonas esteroideas. Análisis de expresión de genes claves en la pubertad precoz de machos de lubina.
 - Seguir con el estudio *in vitro* del efecto de altas temperaturas en células foliculares de lubina.
 - Inicio de segunda parte de experimentación *in vivo*.
 - Redacción de trabajos: *Efecto de las altas temperaturas en la maduración de los machos de lubina.*
- **Tarea 2.1.2.**
 - Distribución tisular de los TRPVs en dorada y lenguado.
 - Estudios con los TRPA (varias especies).
 - Evaluación de agonistas de la motilidad espermática.
 - Redacción de trabajos: *Estudio de la expresión de TRPVs con cambios de salinidad/temperatura durante la maduración sexual de la anguila.*
- **Tarea 2.1.3.**
 - Estudio efectos pH/temperatura en espermatozoides de lenguado (y atún).
 - Tests de fertilización (varias especies).
 - Medida del potencial de membrana en espermatozoides (de anguila) en distintas condiciones iónicas.
 - Redacción de trabajos: *Efecto del pH y la temperatura en la motilidad del espermatozoides de anguila.*
- **Tarea 2.1.4.**
 - Análisis del porcentaje de maduración de la progenie.
 - Finalizar análisis del contenido lipídico en músculo asociado a la maduración.
- **Tarea 2.1.5**
 - Producción de Lh β y Fsh β recombinantes de anguila y dorada para producción anticuerpos para ELISA.
 - Generación de anticuerpos contra las proteínas recombinantes producidas: Fsh β y Lh β dorada y anguila, Amh de lubina.
 - Análisis del experimento de transferencia génica de Fsh y Lh en anguila (esteroides sexuales, expresión génica, desarrollo gonadal).



This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by *Generalitat Valenciana*



Hoja de ruta 6 próximos meses

- **Tarea 2.2.1**
 - Se habrá completado el primer ciclo anual de estudio de las poblaciones de adultos y los primeros meses de larvas planctónicas.
 - Se completará el estudio de postlarvas del sedimento.
 - **Tarea 2.2.2.**
 - Se iniciará el proceso de evaluación de zonas.
 - Redacción de trabajos: Integridad de la membrana lisosomal en células sanguíneas de *Donax trunculus* y *Chamelea gallina* en función de la temperatura.
 - **Tarea 2.2.3.**
 - Se completará el proceso de desove, producción larvaria y fijación de larvas al sedimento.
-
- **Tarea 2.3.1**
 - Validar 3-4 SNPs con asociación significativa a la maduración.
 - Genotipar 20 SNPs: Análisis de asociación y validación.
 - **Tarea 2.3.2.**
 - Selección de muestras de esperma y generación del criobanco.
 - Redacción de trabajos: *Comparativa de varios aspectos de la criopreservación de esperma de varias especies.*
 - **Tarea 2.3.3.**
 - Se iniciará el proceso de secuenciación de *Chamelea gallina* y de *Donax trunculus*.
 - **Tarea 2.3.4.**
 - Se estará trabajando en la detección de SNP de Chirla.



This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by Generalitat Valenciana



We're thinking in azul

Thanks | Gràcies

Project Coordinators

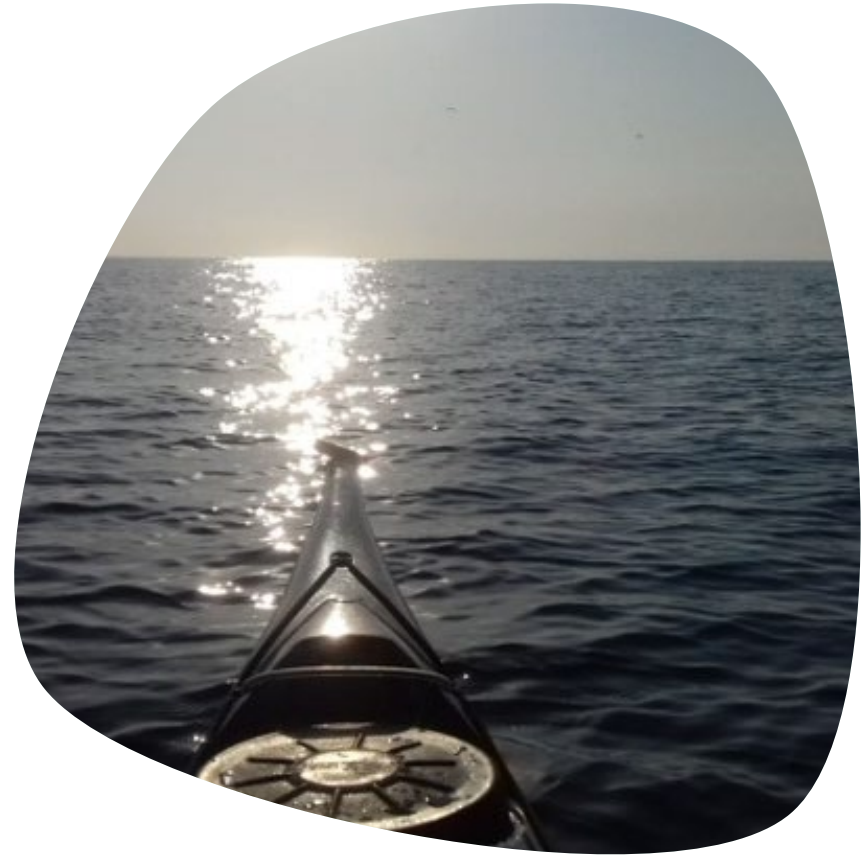
Jaume Pérez-Sánchez
jaime.perez.sanchez@csic.es
Carlos Valle Pérez
carlos.valle@ua.es

Project Manager

Leyre Rivero Álvarez
leyre.rivero@csic.es



This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.11) and by *Generalitat Valenciana*



Juan F. Asturiano

Grupo de Acuicultura y Biodiversidad. Universitat Politècnica de València



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

