

# REPROAQUA

Biología reproductiva de organismos marinos en un marco de cambio global y producción acuícola sostenible

Ana Gómez, Alicia Felip, Samira Sarih, Cinta Zapater  
Instituto de Acuicultura Torre de la Sal - CSIC



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*



# Descripción del Grupo de Trabajo



Evaristo Mañanós

Grupo de Endocrinología de la Reproducción y Diversificación de Peces



Cinta Zapater  
Postdoc Thinkin Azul



Ana Gómez

Grupo de Fisiología de la Reproducción



Alicia Felip



Samira Sarih  
Postdoc Margarita Salas



Amparo Gil



Sol Ibañez

Técnicas de apoyo



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



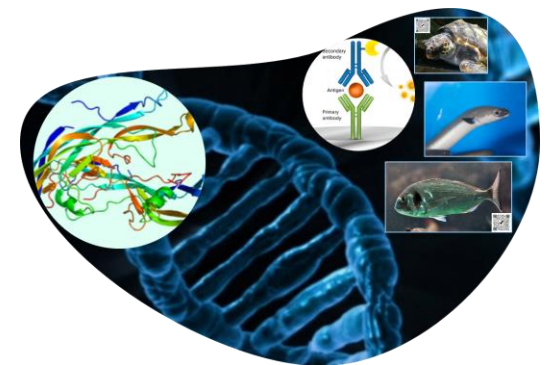
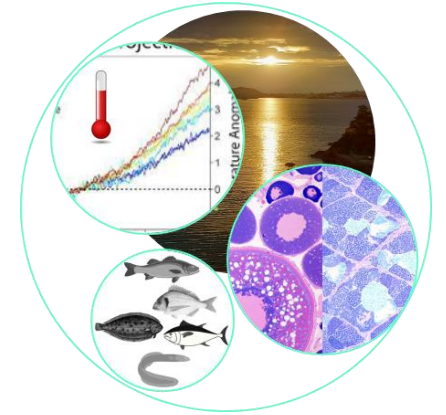
GENERALITAT VALENCIANA  
Conselleria de Innovació, Universitats, Ciència i Societat Digital



GVA NEXT  
Programa Next Generation en la Comunidad Valenciana

# Objetivos y tareas

- **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 2.1.4.** 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.

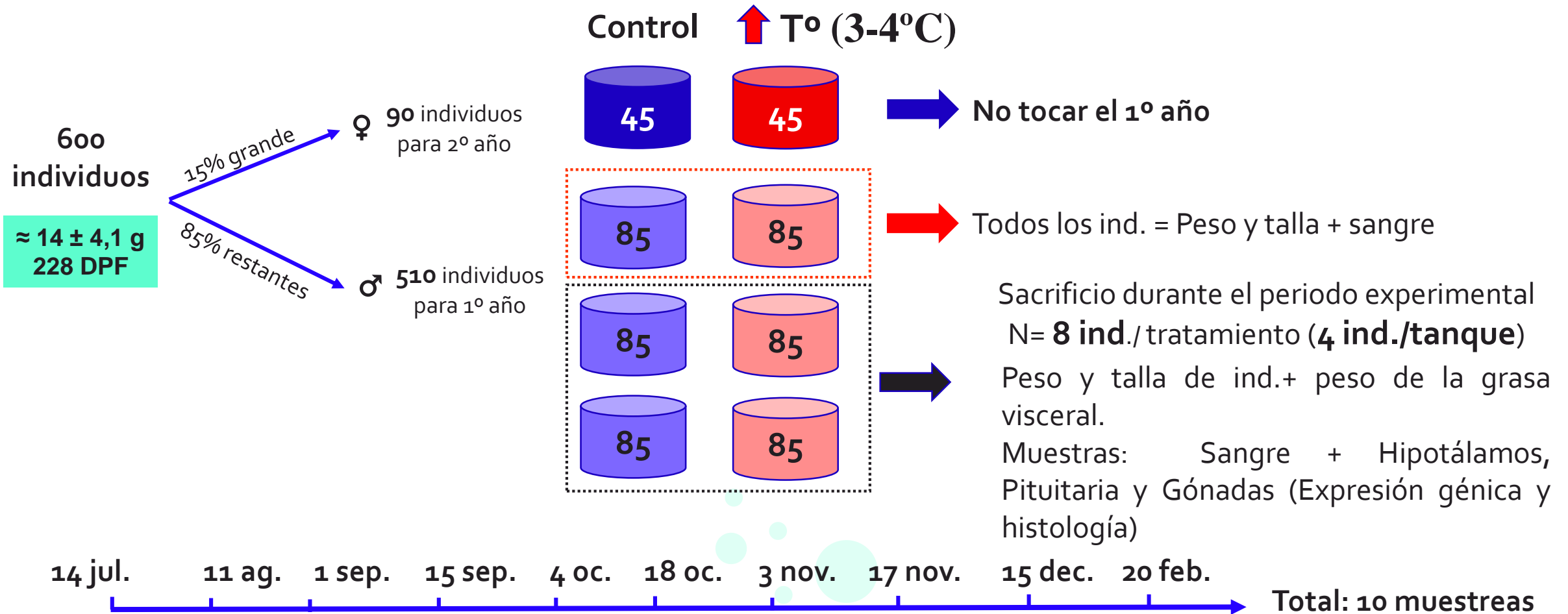


This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by *Generalitat Valenciana*



# Diseño experimental

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

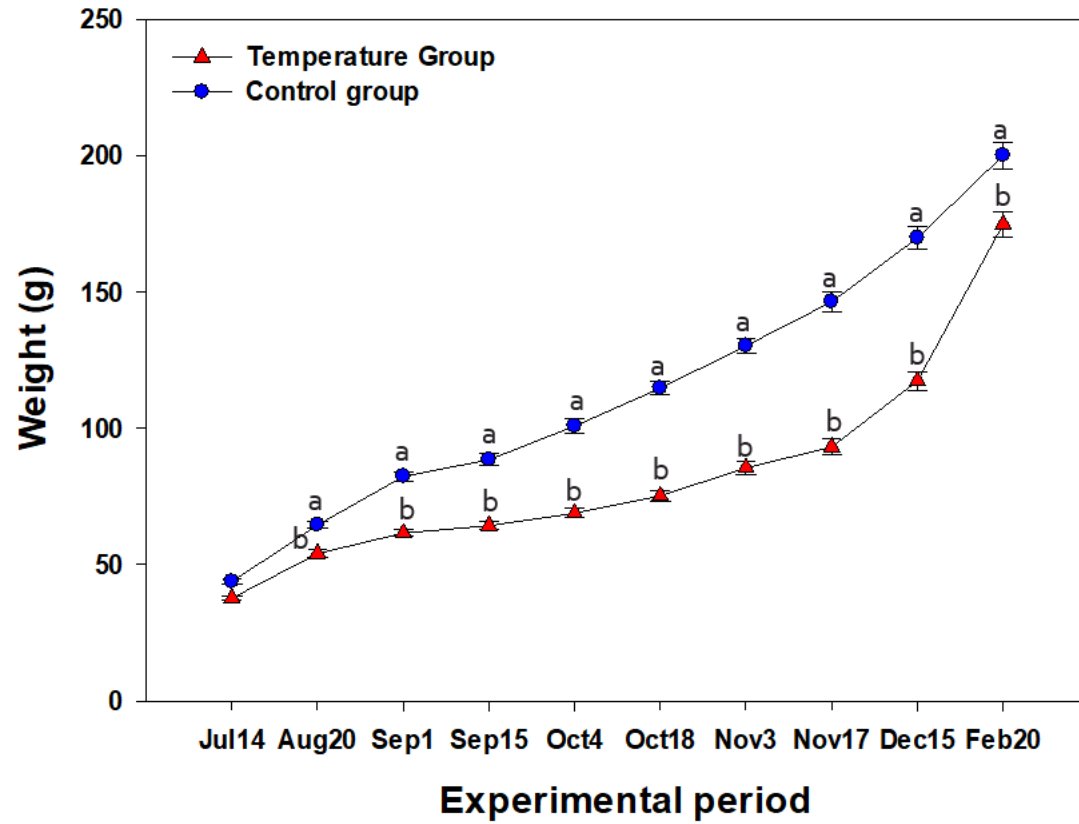


This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by Generalitat Valenciana

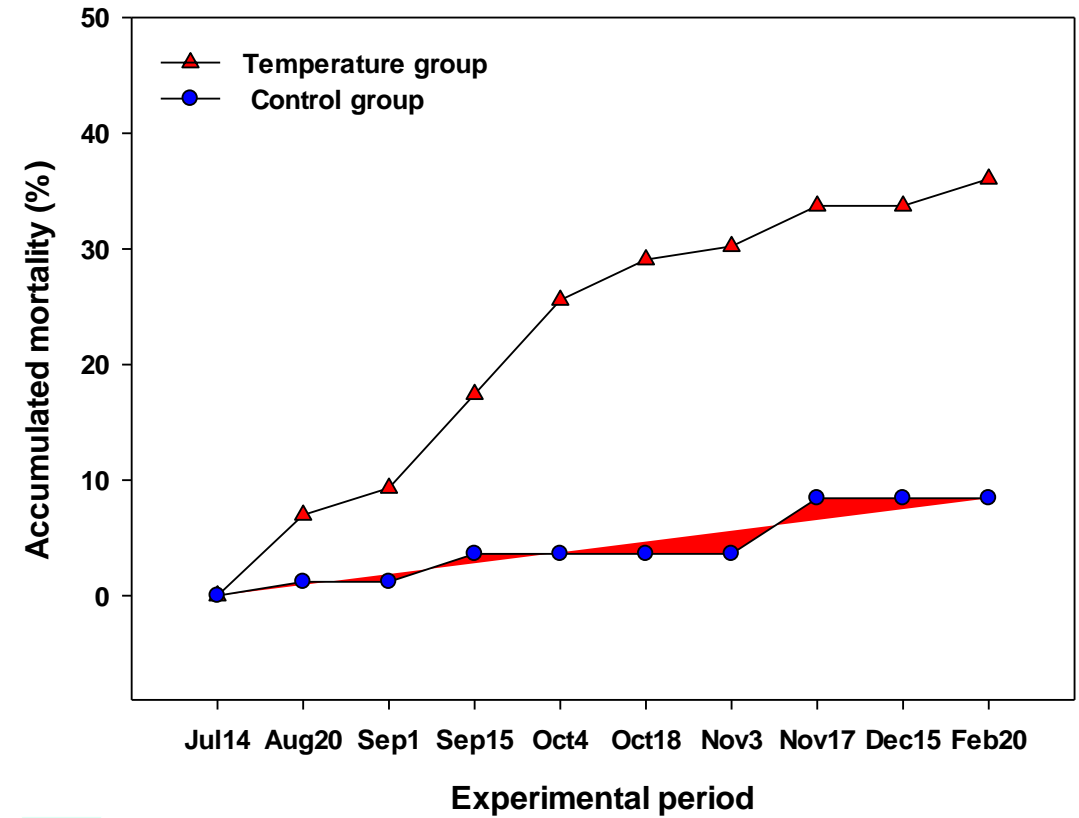


# Resultados

## Crecimiento



## Mortalidad acumulada





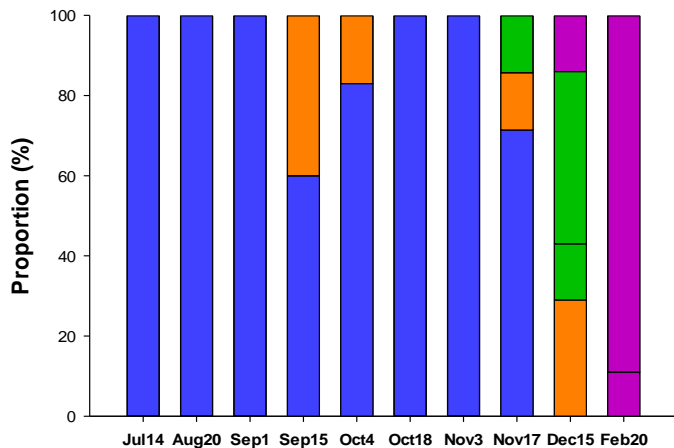
# Desarrollo gonadal

# Resultados

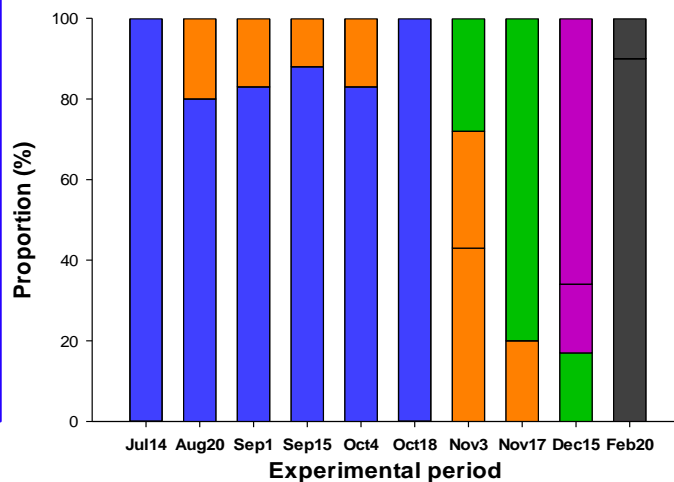
Tarea 2.1.1. Alta temperatura y función gonadal en peces.

- Stage I (Immature)
- Stage II (Early proliferative)
- Stage III (Early meiotic)
- Stage IV (Early spermiogenic)
- Stage V (Spermiogenic)

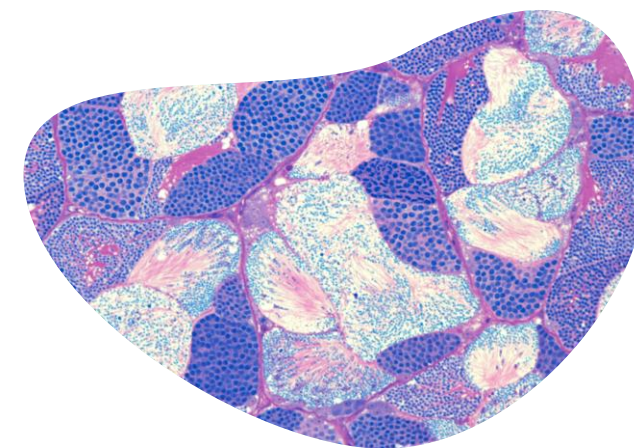
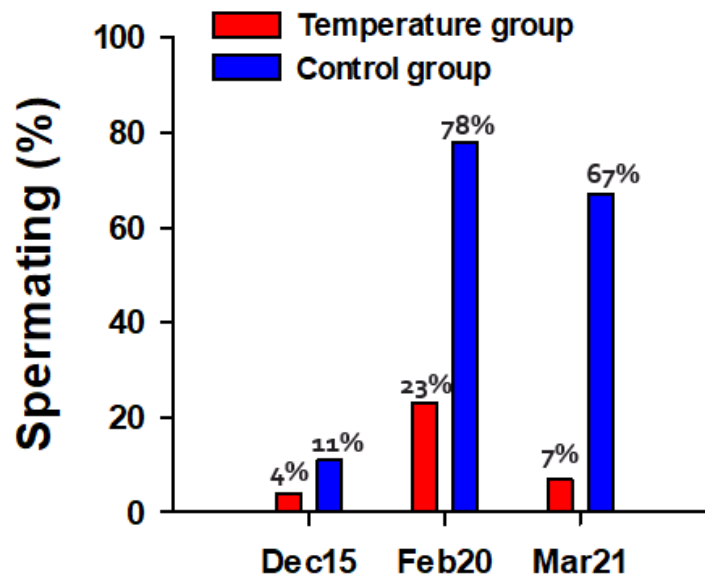
Temperature group



Control group



## Espermiación

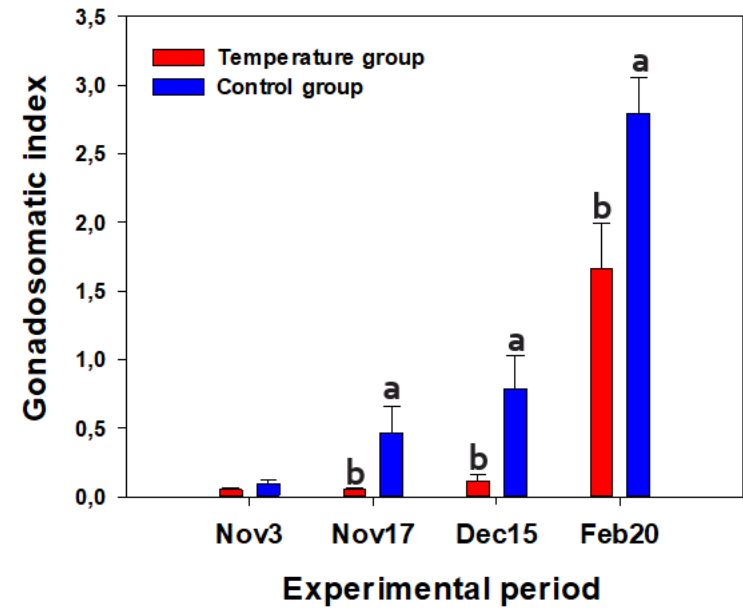


This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.1.1) and by Generalitat Valenciana

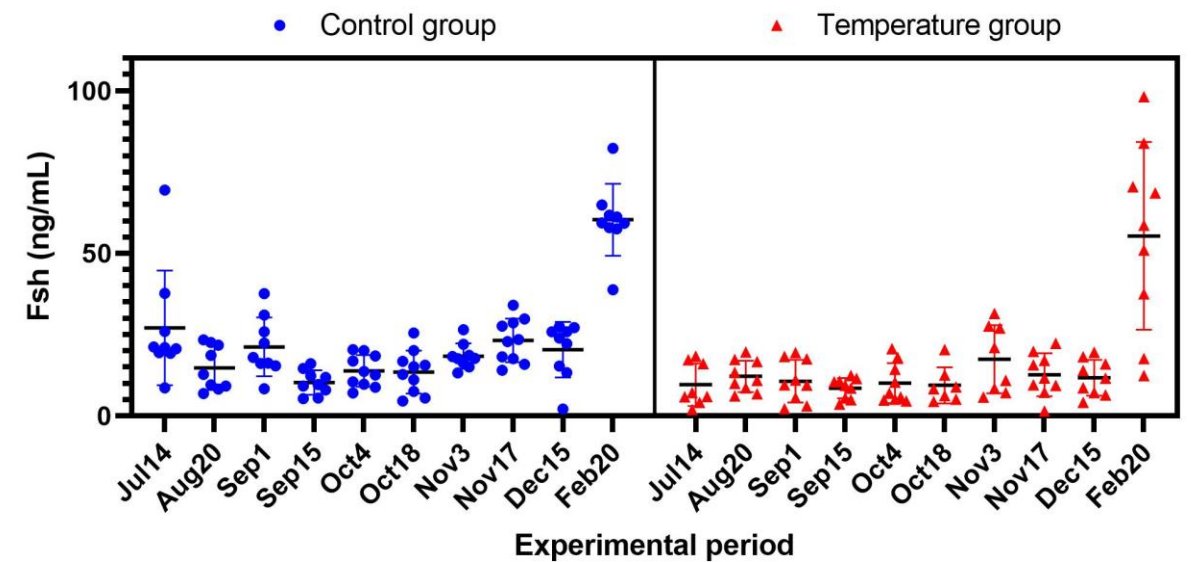
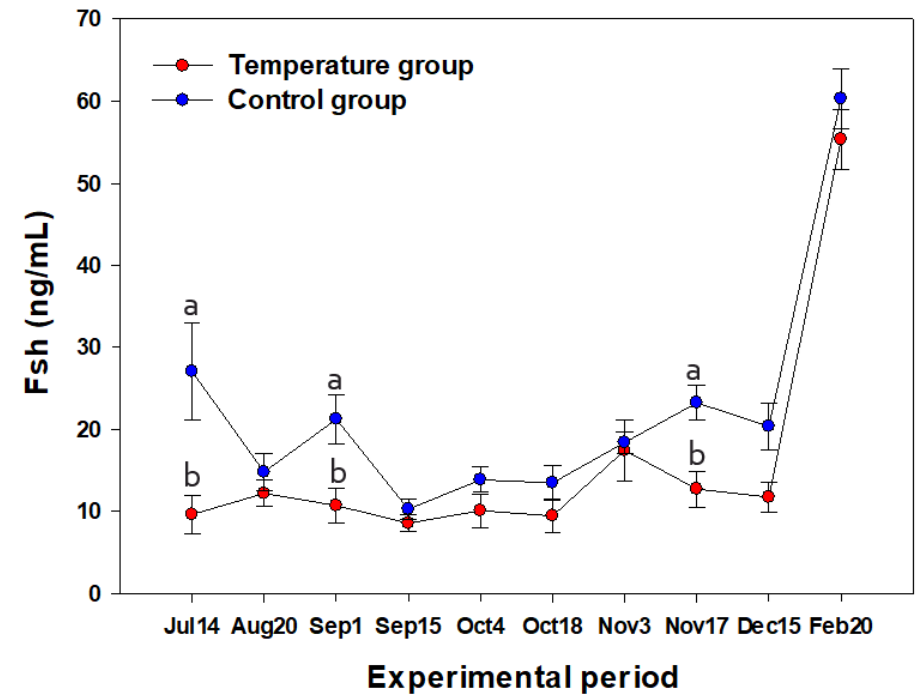


# Resultados

## Índice gonadosomático



## Fsh plasmática

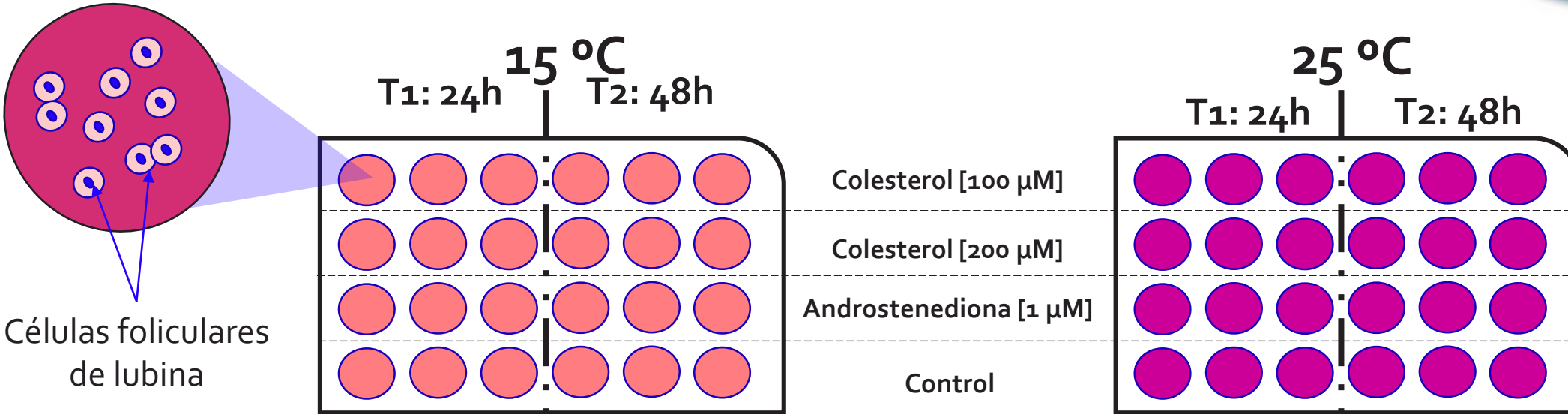


This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by Generalitat Valenciana



# Diseño experimental

Estudio *in vitro* del efecto de altas temperaturas en lubina



Recogida de medio y células antes y después de la estimulación

Análisis hormonal (TST  
Y E2)

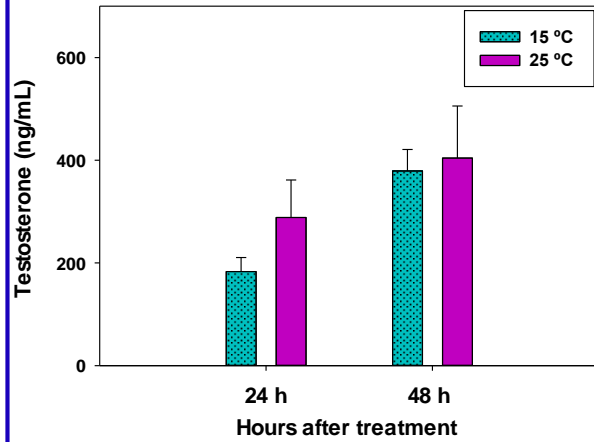
Expresión génica  
(aromatasa)



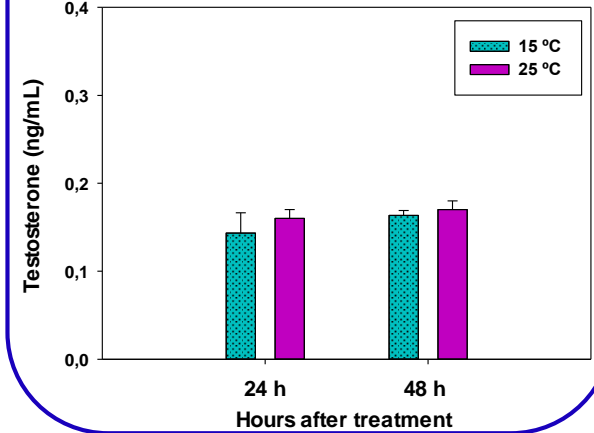
# Resultados

## Testosterona

Androstenedione [1  $\mu$ M]

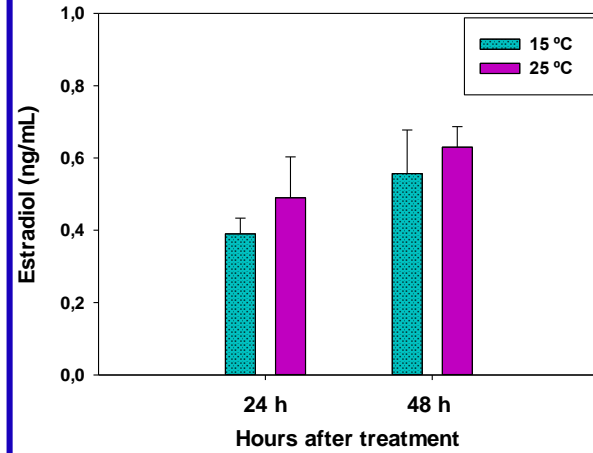


Cholesterol [100  $\mu$ M]

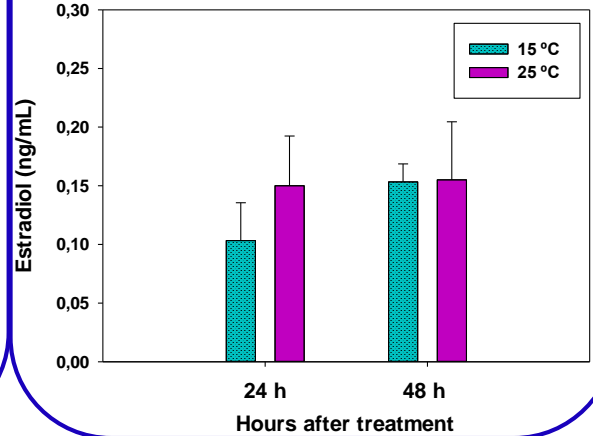


## Estradiol

Androstenedione [1  $\mu$ M]

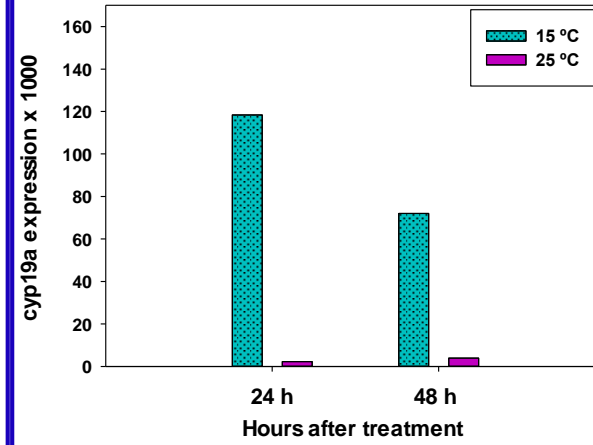


Cholesterol [100  $\mu$ M]

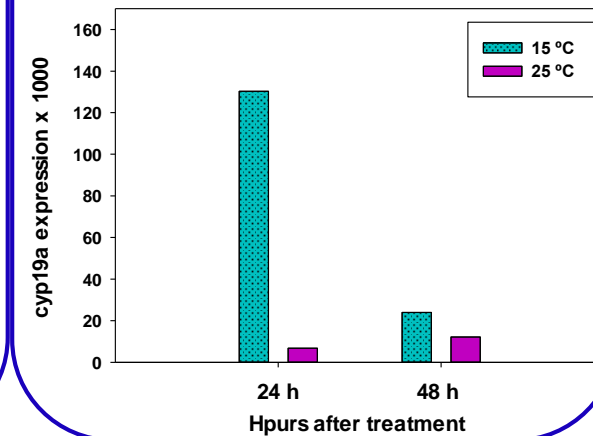


## cyp19a

Androstenedione [1  $\mu$ M]



Cholesterol [100  $\mu$ M]



# Grado de consecución de las tareas



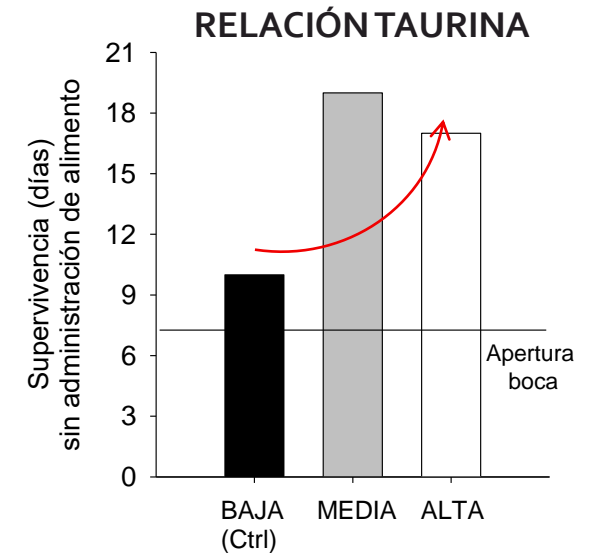
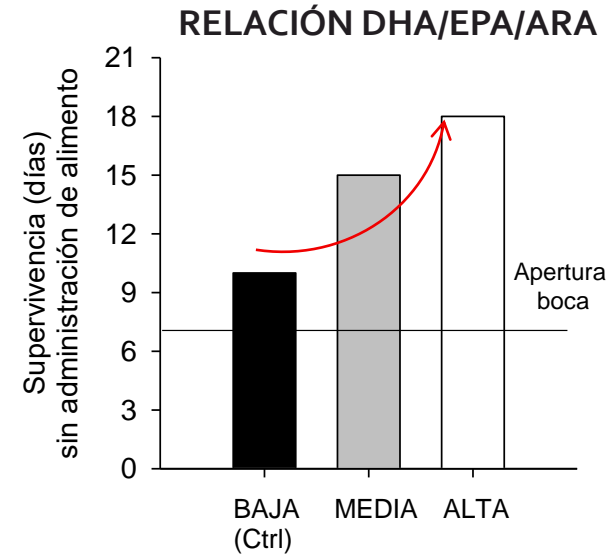
This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by *Generalitat Valenciana*



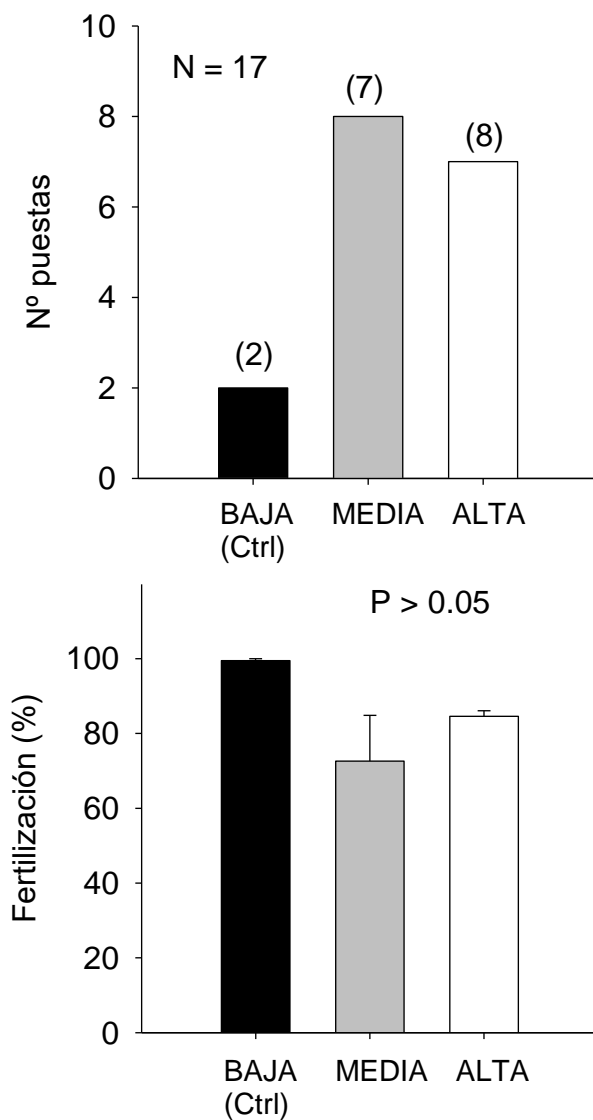
# Resultados

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

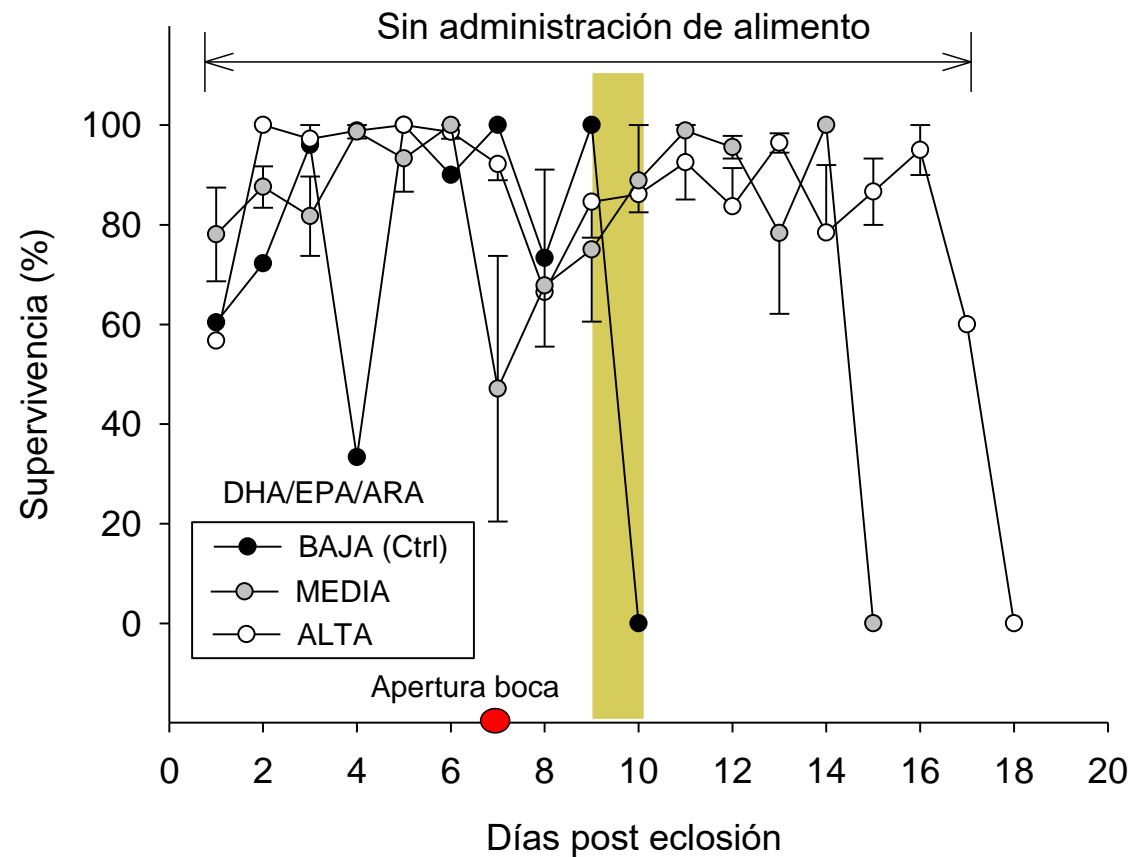
- Relación DHA/EPA/ARA
- Niveles de taurina
- N° puestas, Fertilización (%), Supervivencia larvaria (días) sin aporte de alimento externo
  - Aumento n° puestas
  - Tasas de fertilización similares
  - **Aumento de la supervivencia larvaria**



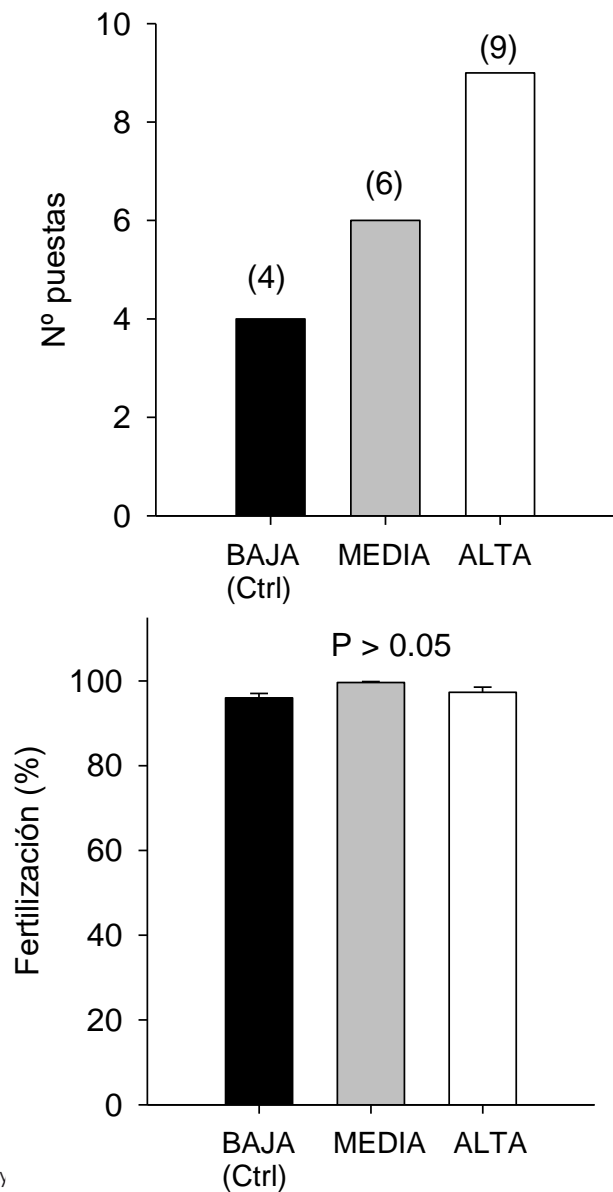
# Resultados



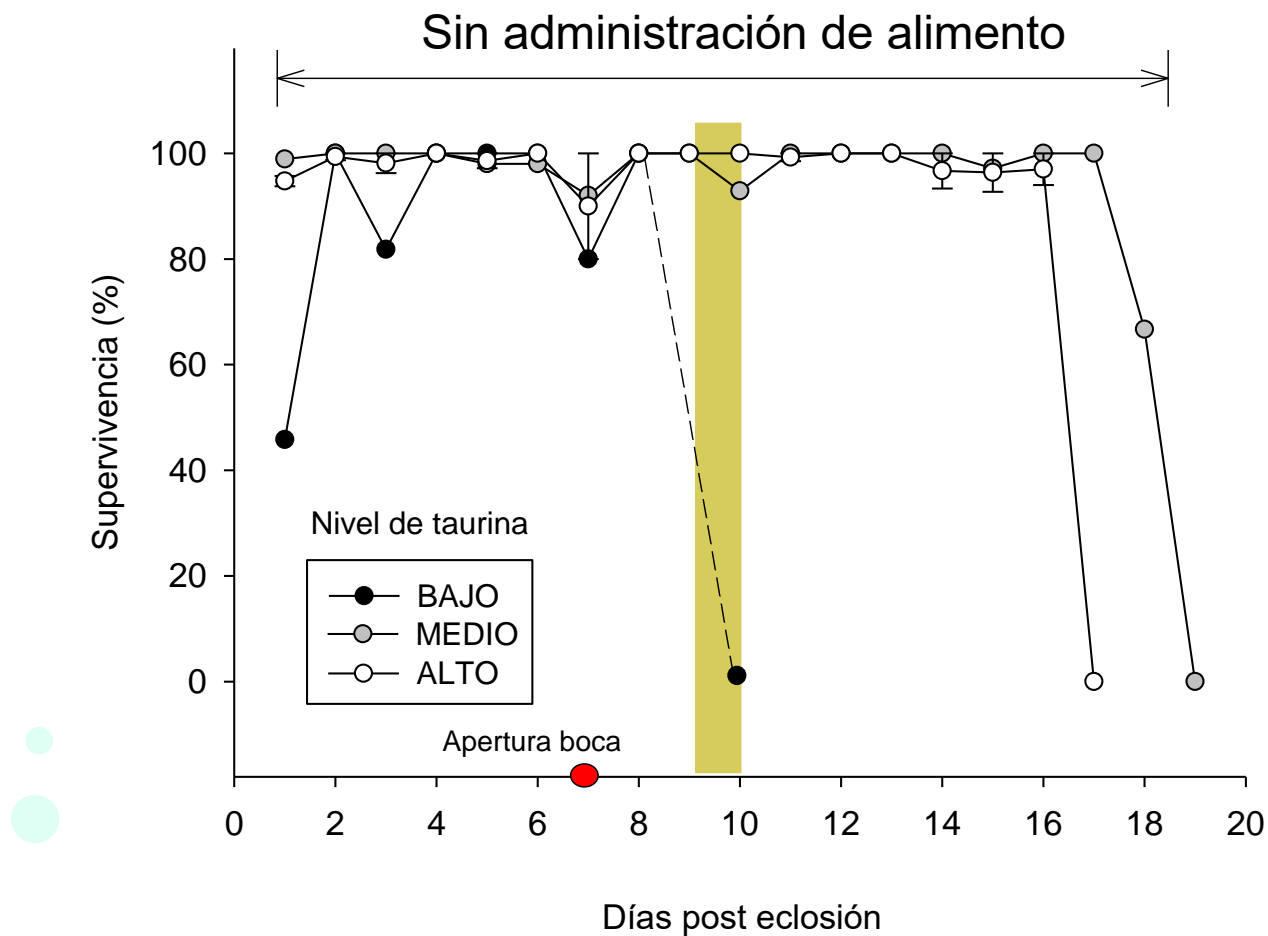
## RELACIÓN DHA/EPA/ARA



# Resultados



## RELACIÓN TAURINA





# Grado de consecución de las tareas

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



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



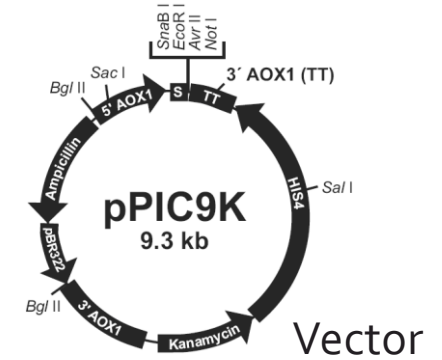
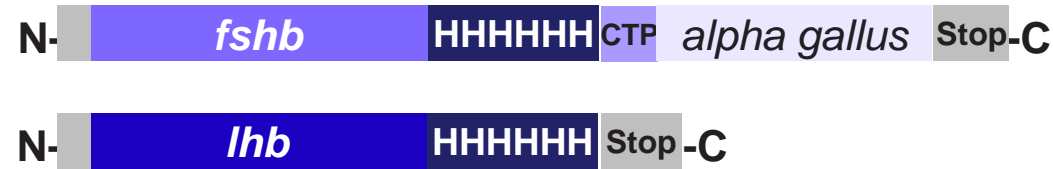
This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by *Generalitat Valenciana*



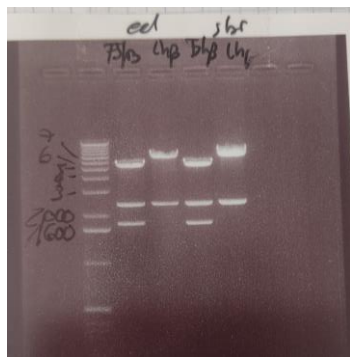
# Resultados

- Elisas Fsh y Lh de dorada y anguila.

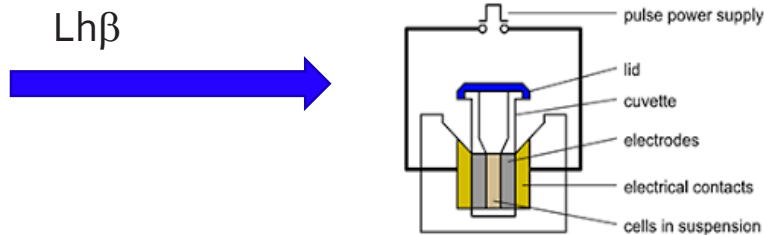
- Diseño de plásmidos de expresión para *Pichia pastoris*



- Electroporación: Linearizamos los plásmidos con *Bgl*III



Fshβ  
 Los plásmidos de Fshβ no se han linearizado correctamente



Buscamos sitio de restricción alternativo -> *Dra*I

Electroporación *Pichia pastoris*



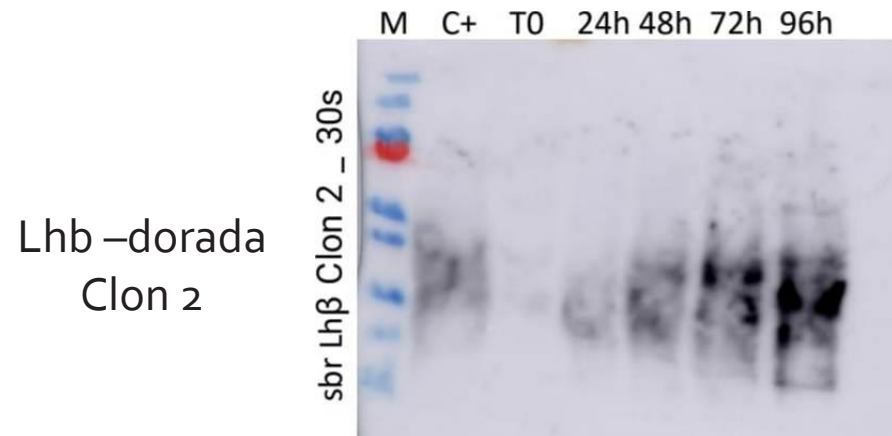
# Resultados

- **Elisas Fsh y Lh de dorada y anguila.**

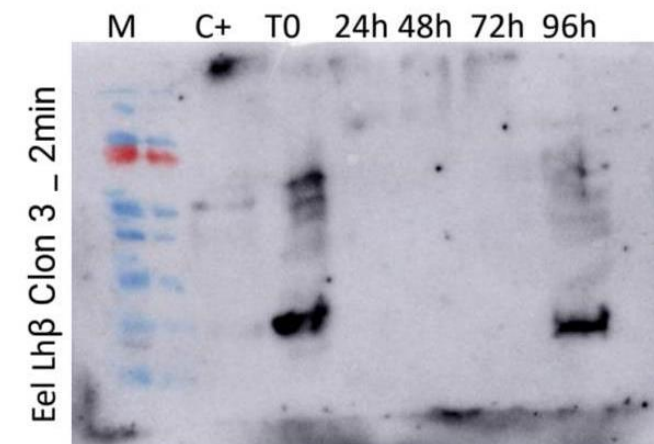
3. Selección de clones y producción a gran escala de Lh $\beta$  para obtención de proteína purificada a usar como antígeno en la producción de anticuerpos específicos

Tras electroporación:

- > selección de transformantes His+
- > rastreo de alta resistencia a G<sub>418</sub>
- > Confirmación de integración por PCR
- > comprobación por Western blot de producción y secreción tras inducción con metanol
- > selección de clon óptimo y estudio de dinámica de producción.



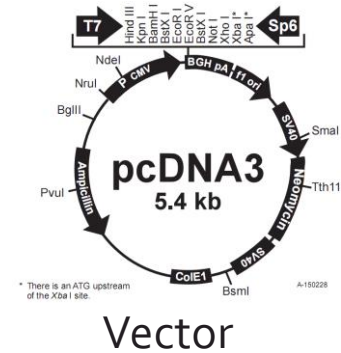
Lhb –anguila  
Clon 3



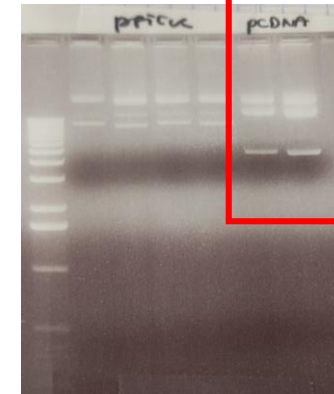
# Resultados

## Gonadotrofinas recombinantes de anguila (Fsh y Lh)

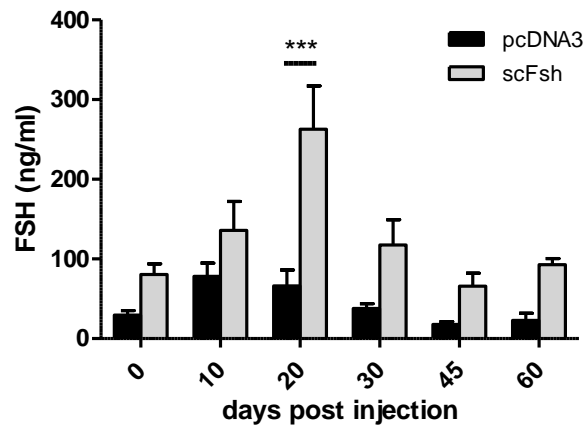
### 1. Diseño construcciones de expresión.



### Maxipreps y comprobación de la calidad.



### 2. Experimento de transferencia génica somática mediante inyección de los plásmidos en anguila para estimulación de maduración gonadal.



Se comprobó con anterioridad que la transferencia génica funcionaba en anguila mediante la inyección del plásmido de Fshsc de lubina y posterior análisis plásmatico de la hormona.



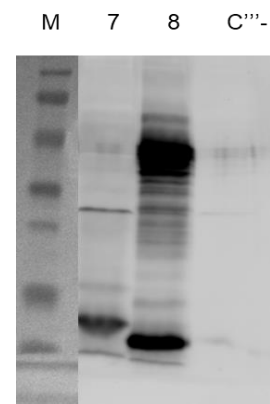
# Resultados

- **ELISA Amh lubina y tortuga**

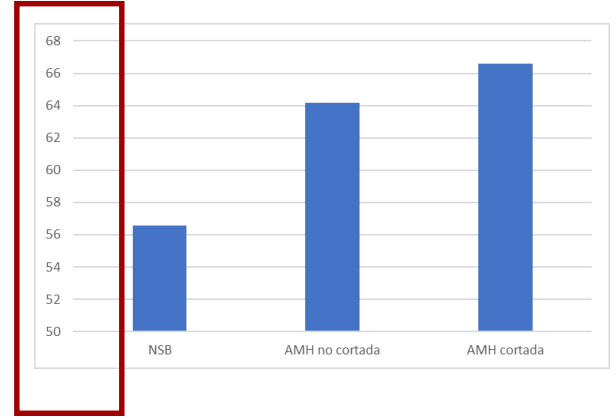
1. Prueba ELISA para la Amh de lubina con el anticuerpo disponible en nuestro laboratorio → NO FUNCIONA

2. Producción de Amh recombinante de lubina en *Pichia pastoris* para purificación y uso como antígeno.

3. Clonación *amh* de tortuga (*Caretta caretta*)



Ab: anti-C amh

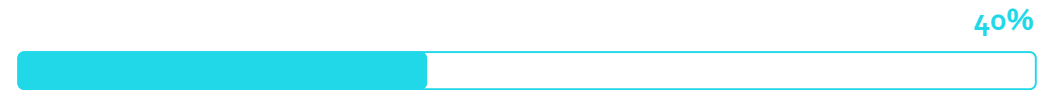


```
>XP_048686929.1 muellerian-inhibiting factor [Caretta caretta]
MRPVLGAALLCLLLLPSAALPREGGVGGGLSPVEDLEITFSKELGLGEEQREKEDEHVYEGAEPNLMAL
TSKATAATHLLKSDKPGDDAKGAKCRQLIPEEAVFVPLGSDSSLPWPMMGGLEGVPCVMKMGRRHGLGQS
HLEVVGVLTSYESDFLKVVRRSSWDQGGQLETFGICPAEETHSALLSLKHI SAHLADPGENRFLVLHLEEV
KWDAETKLRFKLAFQEDVGRSLGELQSALLVFPYPGSRERKSKAREKLLAAGEGLHQKQALCLSRDTRYL
LLGASVMSAIRSHRQLSFDVSLAIRRPGDRGSLLPLEAQQLLFGADEKCFTRMTPALLLLVKPRCEEDA
PSPSSFLSVGGVLETPYPQPSSPTGGKAEEPASNAAGQADASSPAPGNHDQFLGSLTRFVSRVLSPSG
EPPAASGLHHWLDFTMETLPHQLNLNLSQAALERLVQSDPELVLLFPQNSQALLEQQFGHWQLEGRLLQ
LLEKFQAVIQELREIPAFQANTDLFQHLLAFICYPLGSGSSDPRELPRGHRKLTLLLLKALQTVRAHW
QEKRKVSQRNRSAGPQACCRLQELTVDLHYEKFIIVPKRYIANNCEGPCRFPLSTRIPDYSSHTVLLMGM
QERGAPLRRSPCCVPVKYSDEKIIIRITTEGIQVTMFPNMVAEECGCR
```



# Grado de consecución de las tareas

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



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



Tarea 2.1.5 - **Herramientas biotecnológicas**



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

- **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.



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*



# Resultados



- Identificación de SNPs asociados a caracteres productivos
  - 40 SNPs identificados entre lubinas inmaduras y maduras
  - 20 SNPs genotipados en 384 animales procedentes de 6 lotes de lubina
  - **3-4 SNPs con asociación significativa a la maduración (validar)**



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 las tareas

Tarea 2.3.1 - Identificación de **SNPs**



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

- Desviaciones negativas:

- Problemas para conseguir ejemplares juveniles de lenguado para Tarea 2.1.1. Posible alternativa: Uso de otra especie mediterránea.
- Rediseño de las construcciones de Fshb para *Pichia pastoris* -> eliminación de sitio *BglIII* interno.

- Desviaciones positivas

- Inicio de experimentos de transferencia génica somática mediante inyección de los plásmidos en anguila para estimulación de maduración 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 2.1.1. Alta temperatura y función gonadal en peces.

 Congreso ISRPF  
15-19 mayo

 Congreso AIEC  
11-13 septiembre

Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
Análisis de los niveles de gonadotrofinas y esteroides					
Análisis de la expresión génica de los tejidos					
	Estudio in vitro del efecto de la temperatura sobre las células foliculares				
		Inicio de la segunda parte del experimento in vivo			



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 2.1.4** Efecto de la **composición de piensos de reproductores** sobre la calidad de la progenie en lubina.
  - Análisis del **porcentaje de maduración** de la progenie.
  - Finalizar análisis del **contenido lipídico en músculo** asociado a la maduración
- **Tarea 2.1.5 Herramientas biotecnológicas.**
  - Generación de **clones de Fsh $\beta$  de anguila y dorada en *Pichia pastoris*** y producción de **hormonas a gran escala**.
  - Producción y **purificación de Lh $\beta$  recombinantes de anguila y dorada** y generación de **anticuerpos para ELISA**. Comprobar funcionalidad de los anticuerpos mediante western blot.
  - Producción y **purificación de Amh recombinante de lubina** y generación de **anticuerpos para ELISA**.
  - Diseño y síntesis de plásmidos de expresión de **Amh de tortuga** para *Pichia pastoris* y **generación de clones** productores de hormona.
  - Completar experimento de **transferencia génica de Fsh y Lh en anguila** y análisis de las muestras obtenidas (EIAs de esteroides, qPCR e histología)
- **Tarea 2.3.1** Identificación de **SNPs** asociados a caracteres productivos.
  - **Validar 3-4 SNPs** con asociación significativa a la maduración
  - **Genotipar 20 SNPs**: Análisis de asociación y validación



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](mailto:jaime.perez.sanchez@csic.es)  
Carlos Valle Pérez  
[carlos.valle@ua.es](mailto:carlos.valle@ua.es)

## Project Manager

Leyre Rivero Álvarez  
[leyre.rivero@csic.es](mailto:leyre.rivero@csic.es)



Ana Gómez, Alicia Felip,  
Samira Sarih, Cinta Zapater  
Instituto de Acuicultura Torre de la Sal - CSIC



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*

