
OBJETIVO 2.1

Producir especies de peces de alto valor comercial y de especies amenazadas o vulnerables. Estudiar la 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.

Conexión con las líneas de actuación del plan nacional

Líneas de actuación A2: Acuicultura sostenible, inteligente y de precisión

Actuación A2.1: Diversificación de los cultivos mediante la potenciación de líneas de investigación y producción de especies de alto valor comercial y de especies amenazadas o vulnerables, para contribuir a su preservación y a restaurar o reforzar las poblaciones naturales.

Actuación A2.2: Estudios de fisiología, patología y reproducción de peces cultivables para mejorar el conocimiento sobre procesos que afectan al desarrollo, crecimiento, calidad de las puestas y progenie, y salud y bienestar animal, así como al control rítmico de procesos fisiológicos y su modulación por factores ambientales en especies modelo y de acuicultura.

Descripción de tareas

Tarea 2.1.1 (M1-M36) - Alta temperatura y función gonadal en peces - Se estudiará *In vivo* el efecto de las altas temperaturas previstas para el Mediterráneo sobre lubinas y lenguados en las fases de cultivo en el mar (preengorde y engorde), para conocer su influencia sobre el eje reproductor y poder prevenir y mitigar efectos adversos. *In vitro* se estudiarán las bases moleculares del efecto de la temperatura sobre la esteroidogénesis.

Participantes: CSIC2, UPV4

Resultado: Un aumento de 3-4 °C de la temperatura de cultivo de juveniles de lubina (grupo HT) afectó al crecimiento de los animales (87,4% respecto al control (CT)) y provocó un incremento de la mortalidad acumulada (28% respecto al CT). Los animales del grupo HT mostraron un índice gonadosomático menor ($1,66 \pm 0,33\%$) que el de los animales CT ($2,74 \pm 0,26\%$) y un porcentaje menor de machos precoces (23% en HT vs 78% en CT). Los niveles plasmáticos de Fsh fueron también más bajos en el grupo HT. A pesar de que ciertos parámetros reproductivos se vieron afectados en los animales HT, éstos alcanzaron competencia reproductiva. El efecto de la temperatura sobre la esteroidogénesis se evaluó en células foliculares (CF) de ovario de lubina cultivadas *in vitro* a 15 °C o 25 °C y tratadas con distintos precursores. Las CF fueron capaces de producir estradiol y testosterona a 15°C y 25°C, pero se observó una disminución en la expresión de *cyp19a1* a 25°C.

Grado de consecución: 50%

Impacto: Se está determinando por primera vez la influencia de la alta temperatura sobre la pubertad de la lubina. Se han realizado 3 comunicaciones a Congresos, y se está redactando un artículo para su publicación.

Tarea 2.1.2 (M1-M36) - Estudio de los mecanismos fisiológicos subyacentes en los efectos de la temperatura y del pH sobre la calidad del esperma de peces - Identificación de los parálogos de receptores implicados en la termosensación (TRPVs y TRPA) en 4 especies: anguila europea, atún rojo, dorada y lubina (ausencia del genoma del lenguado), y se realizará un estudio de su distribución tisular. Análisis del efecto de los agonistas/antagonistas de TRPVs en la motilidad espermática de estas especies y en lenguado, y detección de su presencia por inmunohistoquímica en los espermatozoides. Determinación de la relación entre el potencial de membrana del espermatozoide y las concentraciones de iones, y su relación con su capacidad de movimiento. Mejora de la calidad del esperma *in vitro* usando un diluyente que contenga determinados iones y hormonas.

Participantes: CSIC2, UPV4. Colaboración ICRA-IEO (Murcia) & CSIC1

Resultado: Se identificaron los genes de TRPVs y TRPA en los genomas de anguila, dorada, lubina y lenguado. Se diseñaron los primers y se pusieron a punto las qPCRs de TRPVs en anguila (3 genes), dorada y lubina (4 genes/especie). Se evaluó por qPCR la distribución tisular de los distintos genes de TRPVs presentes en cada especie (dorada en proceso). Se observó una expresión de TRPVs diferente según la especie, el sexo y el gen. En general, la expresión de TRPVs parece más alta en el corazón, riñón, gónadas, cerebro, branquias y ojo.

Se evaluó el potencial efecto antagonista de 9 sustancias sobre el TRPV1, presente en el esperma de algunos peces y relacionado con la movilidad del esperma. Sólo la capsazepine y el A784168 inhibieron la activación y movilidad del esperma. Con estos dos antagonistas se realizaron pruebas dosis/respuesta y se evaluó el efecto inhibitor a diferentes tiempos en la anguila.

Grado de consecución: 50%

Impacto: Se han consolidado colaboraciones con equipos franceses y suecos para el estudio de aspectos evolutivos de los TRPVs, y con el del Dr. Enrique O'Connor (UV y Centro de Investigación Príncipe Felipe) para la aplicación de técnicas de citometría de flujo. Se ha iniciado una tesis doctoral (Fátima Fernández García) en colaboración con la Universidad de Aveiro (Portugal), vinculada al Programa de Doctorado de Ciencia y Tecnología de la Producción Animal de la UPV. Se han realizado 3 comunicaciones en congresos, y un Trabajo Fin de Grado en la Licenciatura en Biotecnología (UPV).

Tarea 2.1.3 (M1-M36) - Estudio del efecto de la temperatura y del pH en la movilidad del esperma de distintas especies de peces marinos - Estudio del efecto del pH y de la temperatura del agua de mar sobre los parámetros de motilidad del esperma por medio de sistemas CASA. Determinación de la resiliencia del esperma frente a disminuciones del pH y aumentos de la temperatura en las 5 especies de peces marinos objeto de este estudio (anguila, lubina, dorada, lenguado, atún).

Participantes: CSIC2, UPV4. Colaboración ICRA-IEO (Murcia) & CSIC1

Resultado: Se han realizado los challenge tests definidos en el proyecto en las distintas especies (a excepción del atún por falta de muestras): 1) Efecto del pH del agua de mar sobre la movilidad del esperma, 2) Efecto del pH del extender y del agua de mar en la movilidad del esperma, 3) Efecto de la temperatura del agua de mar en la movilidad del esperma, 4) Efecto combinado del pH y la temperatura del agua de mar en la movilidad del esperma. Los tests de fertilización con diferentes temperaturas y pH del agua de mar se realizarán el próximo año (lubina, dorada y lenguado). Los resultados preliminares indican que la movilidad del esperma de anguila y de dorada es sensible al pH del agua de mar, mientras en lubina y lenguado no se ve afectada por el mismo. Respecto a la temperatura, temperaturas elevadas no afectaron a la movilidad en anguila, dorada y lenguado, pero sí redujeron la movilidad del esperma de lubina.

Grado de consecución: 70%

Impacto: Se han realizado 3 comunicaciones en congresos y una colaboración en un artículo en revista indexada (Fernández-García et al., 2023).

Tarea 2.1.4 (M1-M24) - Efecto de la composición de piensos de reproductores sobre la calidad de la progenie en lubina - Valoración de diferentes dietas sobre la competencia reproductiva de lubina. Efecto sobre la calidad del huevo y del esperma, las puestas y sus progenies. Aparición de la primera maduración sexual y calidad del filete.

Participantes: CSIC2. Colaboración CSIC8

Resultado: Se evaluó la supervivencia de larvas de lubina de progenitores alimentados con dietas con niveles altos, medios o bajos de ácidos grasos esenciales (DHA/EPA/ARA) o taurina. Los animales alimentados con niveles altos de DHA/EPA/ARA y taurina tuvieron un número mayor de puestas y supervivencia larvaria, dando lugar a progenies más robustas. Por lo que estos componentes críticos para el desarrollo gonadal y la competencia reproductiva de adultos. El porcentaje de machos precoces de las progenies de animales alimentados con una relación alta y moderada de ácidos grasos esenciales no mostró diferencias significativas. En coordinación con la Tarea 3.1.3 (WP3; CSIC8) se ha analizado el perfil de ácidos grasos en músculo como indicador de la calidad del filete de animales precoces y no precoces. No se detectan diferencias asociadas al estado reproductivo en ambos sexos, pero sí un efecto acumulativo de la dieta, con diferencias entre los perfiles de ácidos grasos en peces de distinta edad.

Grado de consecución: 60%

Impacto: Consideraciones para el sector acuícola, programas de mejora y producción: a) La relación de ácidos grasos en la dieta como los niveles de taurina afectan al desarrollo gonadal y la

competencia reproductiva de lotes de reproductores de lubina. b) Las diferencias encontradas en el perfil de ácidos grasos en la lubina no está asociado al estado reproductivo de los animales, sino más bien a un efecto acumulativo de la dieta.

Tarea 2.1.5 (M1-M36) - Herramientas biotecnológicas - Se desarrollarán, validarán y testarán métodos inmunológicos no invasivos para evaluar el estado reproductivo o el sexo de especies de interés en acuicultura y/o amenazadas, y para el control endocrino de la reproducción.

Participantes: CSIC2, UPV4. Colaboración CSIC1

Resultado: ELISAS para Fsh y Lh de dorada y anguila: Se han diseñado y generado plásmidos para expresión para *Pichia pastoris* de Lh β en ambas especies. Se han obtenido analizado y seleccionado clones productores. La producción y purificación de las Lh β está en curso. Fsh β : se están diseñando nuevos plásmidos ya que los iniciales no resultaron adecuados.

Se está produciendo Amh recombinante de lubina en *P. pastoris* para ser usada como antígeno en la síntesis de un nuevo anticuerpo, ya que el disponible no es adecuado para ELISA. Se ha clonado y caracterizado el gen amh de tortuga boba. Se ha determinado el tamaño de la Amh madura de tortuga con un anticuerpo de Amh de gallo, dada su similitud. Con esta información se ha diseñado un plásmido para la producción de esta Amh de tortuga en *P. pastoris*.

Se han diseñado y producido plásmidos para Gths de cadena única (single-chain, sc, pLhsc y pFshsc) de anguila. Se han generado, seleccionado y analizado clones estables en células CHO productores de Lhsc o Fshsc de anguila. Se han realizado dos experimentos de transferencia génica somática en anguilas macho en las instalaciones del grupo UPV4. El análisis de esteroides sexuales en plasma e histología gonadal ha demostrado la efectividad de esta técnica para inducir la maduración sexual.

Grado de consecución: 35%

Impacto: Se ha realizado una comunicación en congresos. Se ha iniciado una tesis doctoral (César Cruz Castellón) en colaboración CSIC2 - UPV4, vinculada al Programa de Doctorado de Ciencia y Tecnología de la Producción Animal de la UPV.