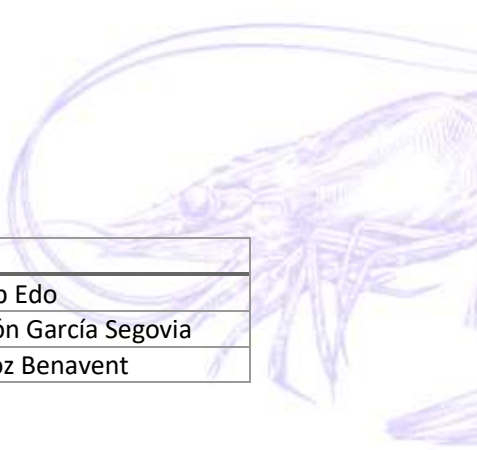


WP2. REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA (REPROGEN)

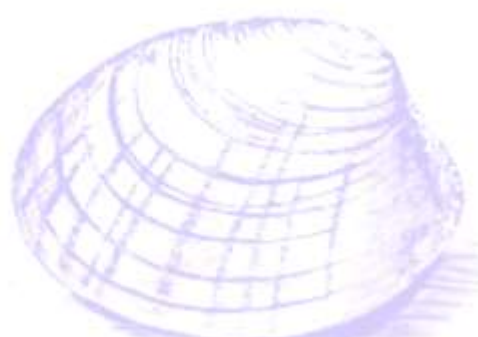
Responsables:

- Ana Gómez Peris
- Juan Francisco Asturiano

Grupos participantes:



GRUPO	IP1	IP2
CSIC2	Ana Gómez Peris	Alicia Felip Edo
UPV4	Juan Francisco Asturiano Nemesio	Purificación García Segovia
UPV10	Miguel Rodilla Alamá	Pau Muñoz Benavent



Objetivos Específicos y Conexión con las líneas de actuación del plan nacional

Objetivo 2.1 (A2.1, A2.2). 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.

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.


Objetivo 2.2 (A2.1, A2.3, A2.10). 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.

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 A2.3: Mejora del conocimiento de la biología, de las patologías, y de los aspectos fisiológicos relevantes para el cultivo de crustáceos, moluscos, equinodermos y otros grupos taxonómicos (especialmente en la fase de criadero) tanto por su aprovechamiento como alimento como por su potencial de utilización para generar bioproductos o por su papel en sistemas IMTA

Actuación A2.10: Mejora de los sistemas de cultivo de bivalvos en todas las fases del proceso productivo tanto con origen en el medio natural como en criadero mediante:

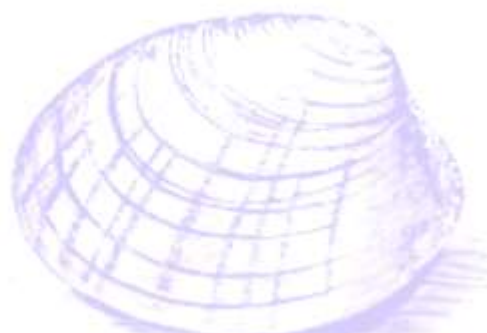
- I. El desarrollo de nuevos procesos de gestión microbiana desde un enfoque de ecología y biología de (eco)sistemas en sistemas IMTA- RAS,
- II. La combinación de nuevos materiales con tratamientos y tecnologías novedosas de higienización/ desinfección de las instalaciones
- III. La mejora genética
- IV. La 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.



Objetivo 2.3 (A2.14). Estudios de genética de peces y moluscos: identificación de secuencias y SNPs asociadas a caracteres productivos, y preservación de recursos genéticos de líneas seleccionadas.

Actuación A2.14: Estudios de genética de poblaciones de peces y moluscos, junto con el uso de técnicas de selección genética asistida, desarrollo de chips de SNPs multiespecie, genómica funcional, proteómica, y metagenómica para promover:

- I. La gestión sostenible de poblaciones naturales y en cultivo de peces, crustáceos y moluscos
- II. La selección de líneas o razas resistentes a factores de estrés ambiental y patógenos recurrentes y/o emergentes, o más eficaces en la eliminación de biotoxinas
- III. La trazabilidad a lo largo de toda la cadena de alimentaria
- IV. La conservación de la biodiversidad y variabilidad genética.



Descripción de tareas

Con indicación de Objetivos relacionados, fechas de ejecución y Grupos de Investigación que participan en la Tarea propuesta

Objetivo 2.1

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 *P. 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.

Objetivo 2.2

Tarea 2.2.1 (M12-M36) - Abundancia de poblaciones larvarias de tellina y chirla - 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). Desarrollo de técnicas moleculares (PCR y secuenciación de ADN) para identificación larvaria y para la determinación de la abundancia larvaria durante el ciclo anual mediante técnicas de DNA ambiental.

Participantes: UPV10

Resultado: Se han desarrollado los protocolos de extracción de DNA de larvas, y la amplificación mediante PCR de la región de barcoding (gen del citocromo oxidasa I mitocondrial, COI). identificación mediante PCR de larvas y postlarvas de *Donax trunculus* y *Chamelea gallina* en la columna de agua y sedimento. Se ha cuantificado la densidad de postlarvas de *Donax trunculus* en sedimento. Se ha establecido el protocolo de muestreo para 2024.

Grado de consecución: 35%

Impacto: Se está elaborando un TFG del grado de Ciencias Ambientales.

Tarea 2.2.2 (M1-M34) - Censos de poblaciones - 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. Conectar resultados de suministro larval (tarea 2.9) con los censos de juveniles y adultos de los bancos naturales.

Participantes: UPV10

Resultado: Se ha completado 1 año de censos de *Donax trunculus* (incluidos juveniles de menos de 5 mm) y 3 meses de *Chamelea Gallina*. Se han observado reducciones importantes de las tallas máximas para *Donax* respecto a los datos históricos. Se ha puesto a punto y se ha validado el uso del Biomarcador LMS y se han evaluado las respuestas basales para diferentes temperaturas y salinidades. Se ha trabajado con variación de salinidad (27-28 PSU, 32-33 PSU y 37-38 PSU —la propia del mar Mediterráneo) y temperatura (12°C, simulando el invierno; 20°C, primavera-otoño; y 28°C, verano). También se han evaluado los niveles de estrés de los organismos ensayados y se ha tenido en cuenta el índice de condición comparando los valores obtenidos con valores de referencia. Se ha observado que temperaturas entre 28 y 29 °C son letales para *Donax trunculus*, durante los próximos meses se repetirán los ensayos para establecer la LC50 para diferentes periodos de tiempo.

Grado de consecución: 50%

Impacto: Se ha iniciado el desarrollo de una tesis doctoral por parte de Paula Soms Molina en el Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología Marina y Costera. Además, se ha presentado un TFM del Máster en Evaluación y seguimiento Ambiental de Ecosistemas Marinos y Costeros y hay otro en proceso de elaboración. Se está redactando un artículo para someterlo antes de que finalice enero de 2024.

Tarea 2.2.3 (M1-M34) - Valoración de la cría en cautividad de la chirla/tellina - Acondicionamiento de adultos en criadero e inducción de puestas con dietas de microalgas adecuadas. Determinación de su efectividad, comparando el desarrollo gonadal de los animales acondicionados con los del medio natural (muestreros quincenales) mediante histología y tests de calidad gamética.

Participantes: UPV10

Resultado: Se han identificado las mejores condiciones para la maduración sexual y la respuesta a la inducción de la emisión de gametos, comprobando que la temperatura del agua es un factor crítico. Se ha podido comprobar que las temperaturas extremas del agua del mar que se han observado en los últimos años en verano están muy cercanas a las que provocan estrés reproductivo en cautividad. Se ha comprobado la viabilidad y el crecimiento larvarios a las temperaturas ambientales y se ha detectado un efecto drástico de las olas de calor sobre la supervivencia durante la metamorfosis. Existe además una enorme variabilidad en la tasa de crecimiento en la progenie.

Grado de consecución: 40%

Impacto: Se está preparando un artículo que será sometido a evaluación en breve.

Objetivo 2.3

Tarea 2.3.1 (M1-M36) - Identificación de SNPs asociados a caracteres productivos - Evaluación de la relación crecimiento-maduración en lubina. Análisis de asociación genética de SNPs a la maduración y crecimiento. Evaluación de panel SNP como método de diagnóstico molecular y su potencial aplicación multiespecie.

Participantes: CSIC2

Resultado: Partiendo de un análisis transcriptómico, se buscaron polimorfismos asociados a la

maduración gonadal de machos de lubina de 1 año, comparando testículos inmaduros y precoces, y se identificaron 1603 SNPs potenciales asociados con el carácter. Se han seleccionado un total de 42 SNPs en base a su nivel de significación y los análisis de asociación se están llevando a cabo mediante el genotipado de SNPs usando la plataforma MassArray (Sequenom). 380 individuos (285 inmaduros, 95 precoces) procedentes de 5 cohortes se han analizado para este panel de 42 SNPs. Se han genotipado y analizado mediante el programa Genepop. De momento se han observado 10 posibles SNPs candidatos que muestran una asociación potencial al carácter de la maduración. Su validez está siendo analizada en las cohortes de referencia establecidas, pero no se descarta su corroboración en otras cohortes de lubina y/o poder aumentar el número de SNPs asociados a dicho carácter.

Grado de consecución: 45%

Impacto: Consideraciones para el sector acuícola, programas de mejora: a) Identificación de 10 posibles SNPs asociados a la maduración en la lubina.

Tarea 2.3.2 (M1-M36) - Identificación de ejemplares cuyo esperma demuestre una especial resiliencia a los cambios de temperatura y de pH, y criopreservación de sus recursos genéticos -

Puesta a punto de protocolos de congelación de esperma para 5 especies de peces objeto de estudio (anguila europea, atún rojo, dorada, lubina y lenguado). Se congelarán muestras de esperma (creación de un criobanco) de aquellos ejemplares más resistentes a temperaturas altas y/o valores de pH bajos. Se realizarán experimentos específicos para el análisis periódico de la supervivencia espermática a largo plazo (meses, años) para garantizar la viabilidad de los recursos genéticos criopreservados.

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

Resultado: Se han revisado/optimizado los protocolos de congelación de esperma de las 5 especies de peces objeto de estudio. Para ello se han evaluado diferentes diluyentes, y varias concentraciones de crioprotectores. También se ha evaluado el grado de disminución a lo largo del tiempo de la calidad de esperma descongelado de anguila, dorada, lubina y lenguado, determinando el tiempo en que puede ser utilizado en cada especie sin pérdida importante de calidad.

Se comprobó la utilidad de cápsulas biodegradables, como recipientes alternativos a las pajuelas de plástico que se usan habitualmente, para congelar esperma de anguila, dorada y lubina congelado en de gelatina o hipromelosa. La creación de un criobanco de muestras de esperma resilientes a altas temperaturas y bajo pH se iniciará en la época reproductiva de cada especie a lo largo de 2024-2025, utilizando los protocolos puestos a punto.

Grado de consecución: 75%

Impacto: Se han realizado 5 comunicaciones en congresos. Los resultados se han incorporado al contenido de las clases de la asignatura Reproducción impartidas en el Máster en Acuicultura (UPV, UV, IATS-CSIC).

Tarea 2.3.3 (M12-M36) - Genómica de chirla y tellina - Obtención de secuencias del genoma de la chirla y la tellina mediante secuenciación masiva para obtener un genoma y un transcriptoma de referencia, y aplicación a un estudio de la expresión génica asociada a las diferencias de supervivencia y crecimiento en cautividad.

Participantes: UPV10

Resultado: Genómica de chirla y tellina – Obtención de secuencias del genoma de la chirla y la tellina mediante secuenciación masiva para obtener un genoma y un transcriptoma de referencia, y aplicación a un estudio de la expresión génica asociada a las diferencias de supervivencia y crecimiento en cautividad.

Grado de consecución: 15%

Impacto: Al no tener resultados no podemos hablar de impacto.

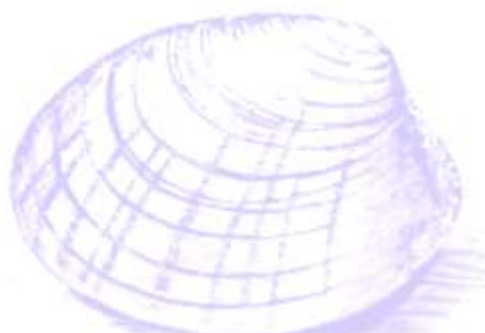
Tarea 2.3.4 (M12-M36) - Polimorfismos de DNA y QTL de chirla y tellina- Detección de SNPs a partir de las secuencias de la tarea 2.12, elaboración de mapas de ligamiento y estudio de familias para detección de QTLs de crecimiento y supervivencia.

Participantes: UPV10

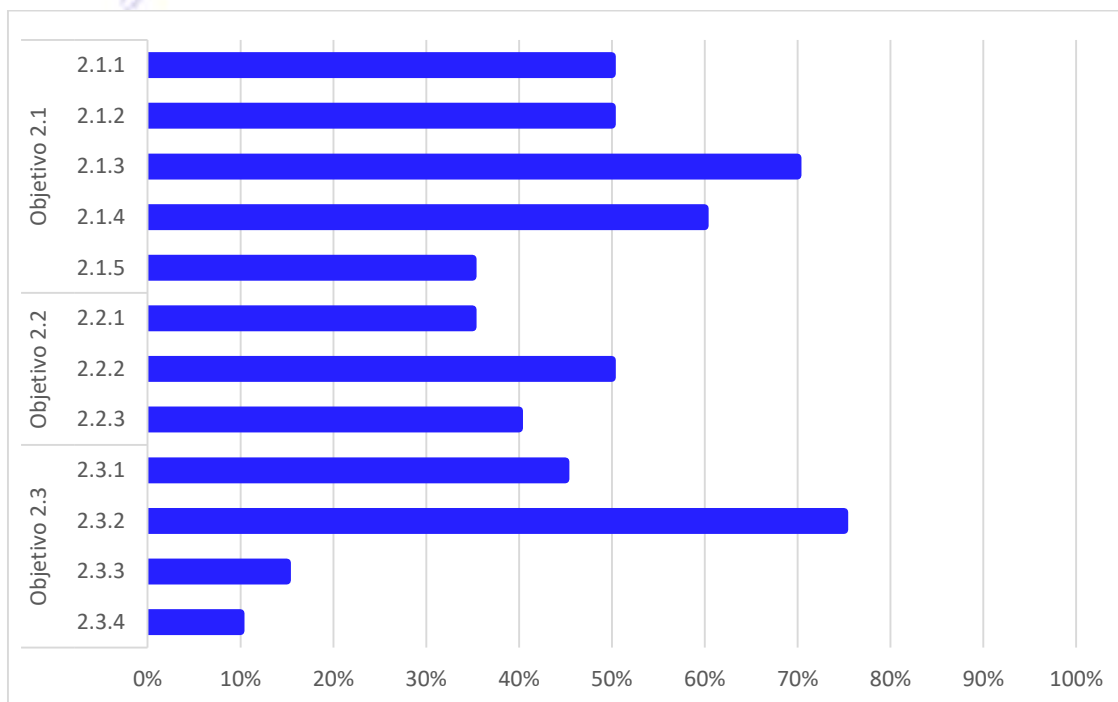
Resultado: Se ha comenzado a determinar la variabilidad genética de la progenie de chirla obtenida este verano, en comparación con la de las poblaciones naturales de las que proceden los reproductores, utilizando microsatélites y SNPs.

Grado de consecución: 10%

Impacto: Al no tener resultados todavía no podemos hablar de impacto.



Progreso de las tareas a M21



Siendo el M1 enero del 2022