

# WP2- Reproducción y Genética - REPROGEN

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.I1) and by *Generalitat Valenciana*



# IPs



Grupo de Acuicultura y Biodiversidad

IP: J.F. Asturiano

UPV4

IP: M. Rodilla

UPV10

Laboratorio de Oceanografía Costera

IP1: A. Gómez

Grupo de Fisiología de la Reproducción de Peces

IP2: A. Felip

CSIC2



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA



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 2.1.** 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 esperma de peces.
- **Tarea 2.1.3.** Estudio del efecto de la **temperatura** y del **pH** en la **movilidad del esperma** 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*



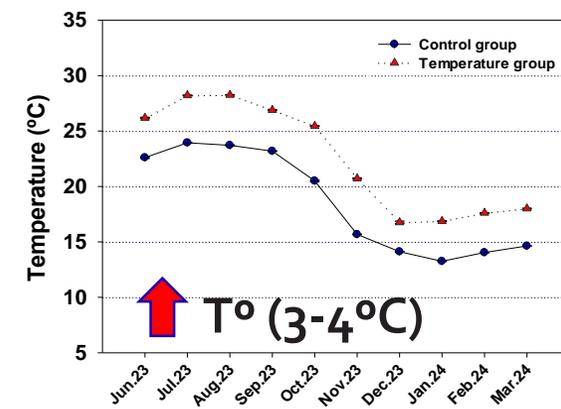
# Resultados obtenidos

CSIC2 / UPV4



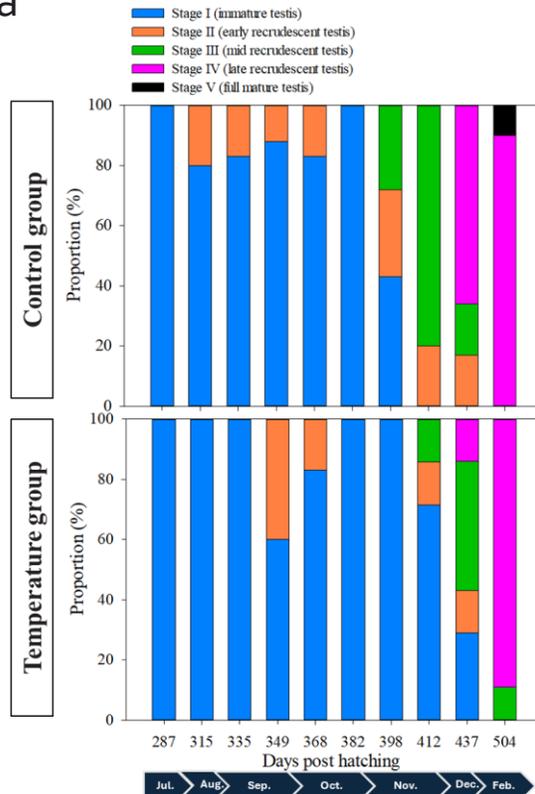
## Objetivo 2.1

Tarea 2.1.1. Alta temperatura y función gonadal en peces.

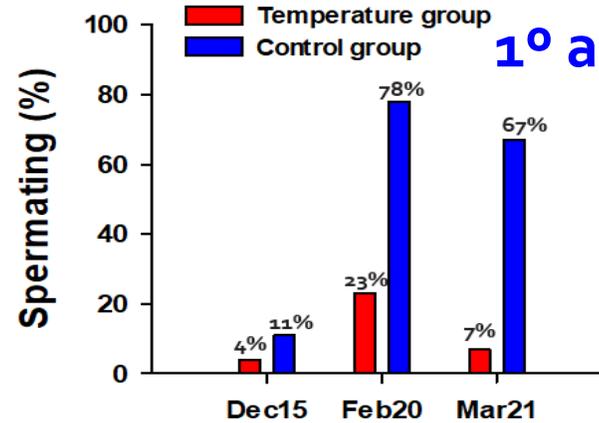


El porcentaje de machos con maduración precoz el primer año de vida **no varía** con la temperatura

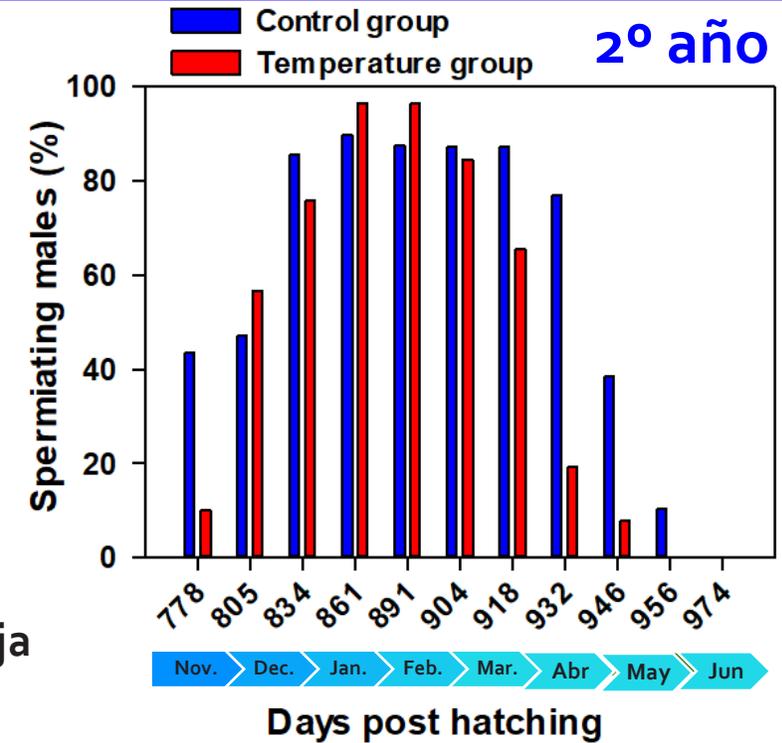
1º año



1º año



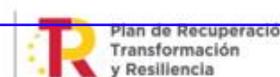
2º año



Los machos expuestos a temperaturas altas tienen una **franja de espermiación mas corta** en su etapa juvenil y también en la adulta



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

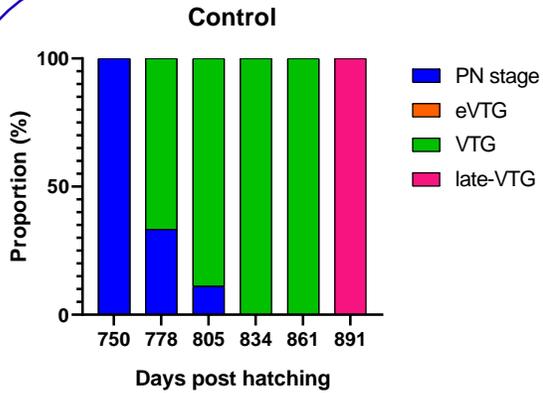
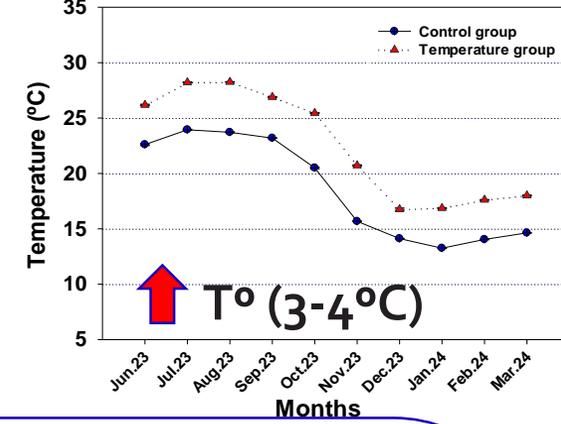


# Resultados obtenidos

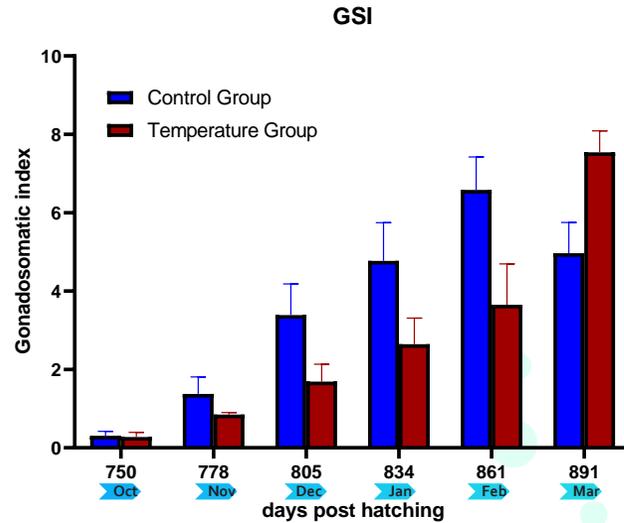
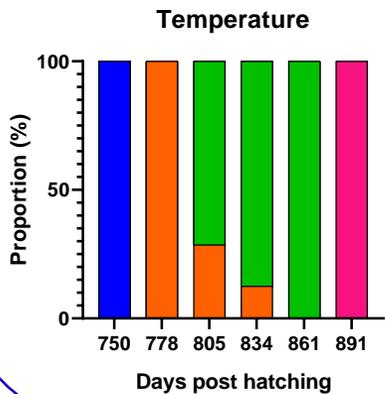
## Objetivo 2.1

Tarea 2.1.1. Alta temperatura y función gonadal en peces.

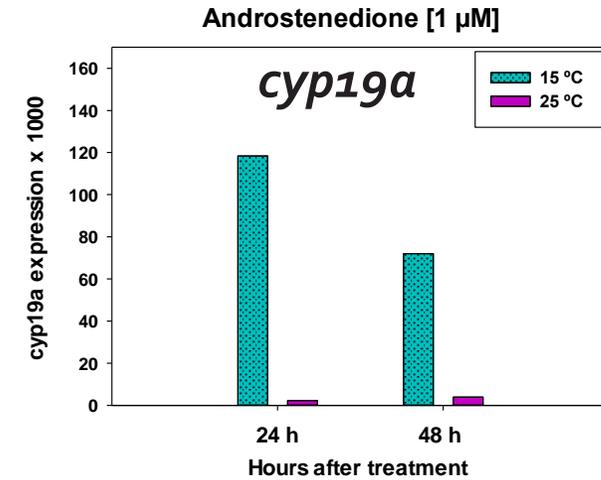
CSIC2



Igual incidencia de precocidad en los grupos control y alta T<sup>a</sup>  
La vitelogénesis se inicia antes y es más rápida en el grupo control



Cultivo *in vitro* de células foliculares de lubina 25°C vs. 15°C



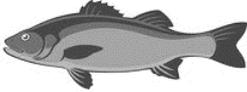
Disminución de la expresión del gen de aromatasa a alta T<sup>a</sup>  
No afecta la producción de esteroides

# Resultados obtenidos

**Objetivo 2.1** Tarea 2.1.2. Estudio de los mecanismos fisiológicos subyacentes en los efectos de la temperatura y del pH sobre la calidad del espermato de peces

## Identificación de parálogos de receptores implicados en la termosensación (TRPVs y TRPA)

UPV4/CSIC1, CSIC2

						
Identificación TRPVs/TRPA	✓	✓	✓	✓	✗	✓
Puesta a punto <i>primers</i> TRPVs	✓	✓	✓	✗	✗	En proceso
Distribución tisular TRPVs	✓	✓	✓	✗	✗	En proceso
Puesta a punto <i>primers</i> TRPA	✗	✗	✗	✗	✗	✗
Distribución tisular TRPA	✗	✗	✗	✗	✗	✗
Efecto temperatura en TRPVs	✗	✗	✓	✗	✗	En proceso



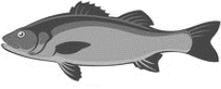
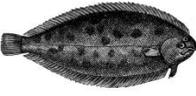
This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by Generalitat Valenciana



# Resultados obtenidos

**Objetivo 2.1** Tarea 2.1.2. Estudio de los mecanismos fisiológicos subyacentes en los efectos de la temperatura y del pH sobre la calidad del espermatozoide de peces

UPV4/CSIC1, CSIC2

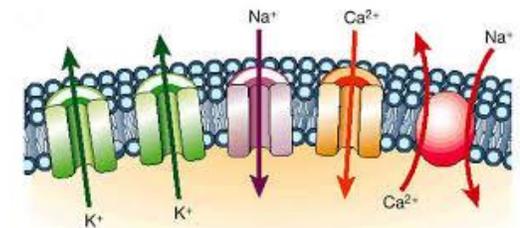
				
Antagonistas TRPV1	✓	✓	✓	En proceso
Agonistas TRPV1	✗	✗	✗	✗

Efecto de los agonistas/antagonistas de TRPVs en la motilidad espermática

Determinación de la relación entre el potencial de membrana del espermatozoide y las concentraciones de iones, y su relación con su capacidad de movimiento

UPV4

- Los resultados preliminares indican que los espermatozoides se hiperpolarizan tras la activación con agua de mar
- El potencial de membrana tiene un papel en la activación del movimiento del espermatozoide



# Resultados obtenidos

**Objetivo 2.1** Tarea 2.1.3. Estudio del efecto de la temperatura y del pH en la movilidad del esperma de distintas especies de peces marinos.

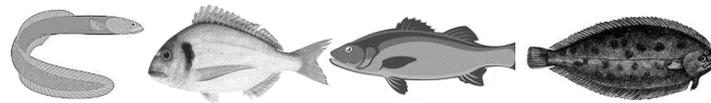
UPV4/ CSIC1, CSIC2,



## Challenge tests

1. Rango de pHs
2. Rango de temperaturas
3. Efecto pH x temperatura

## Estudio del efecto de la temperatura y del pH en la movilidad del esperma de distintas especies de peces marinos

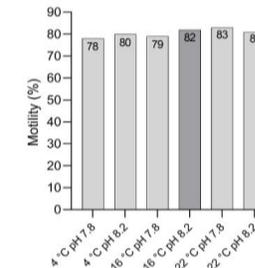


Efecto del pH	✓	✓	✓	✓
Efecto de la temperatura	✓	✓	✓	✓
Efecto combinado pH y T <sup>a</sup>	✓	✓	✓	✓
Efecto combinado pH <i>extender</i> / pH agua de mar	✓	✓	✓	✓
Tests de fertilización	✗	✗	En proceso	✗

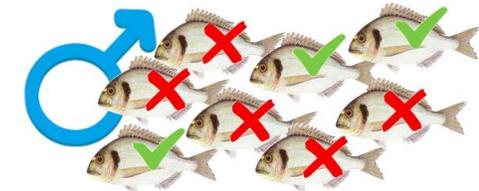
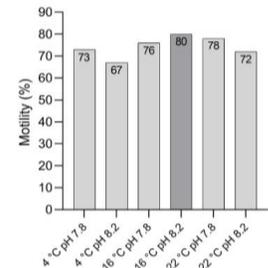
## Determinación de la resiliencia del esperma frente a disminuciones del pH y aumentos de la temperatura



Macho 1 ✓



Macho 2 ✗



# Resultados obtenidos

**Objetivo 2.1** Tarea 2.1.4. Efecto de la composición de piensos de reproductores sobre la calidad de la progenie en lubina.

CSIC<sub>2</sub>

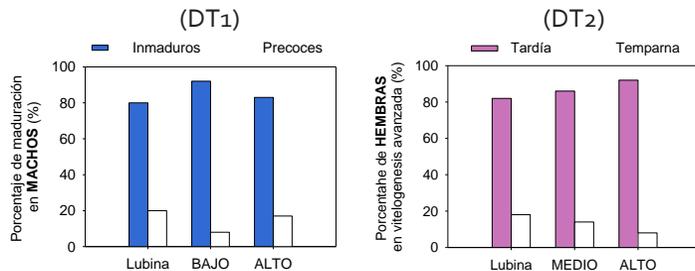
Re-evaluación de los requerimientos de **taurina** y del **balance DHA/EPA/ARA** en dietas de reproductores



**Supervivencia larvaria**  
(días sin comer)

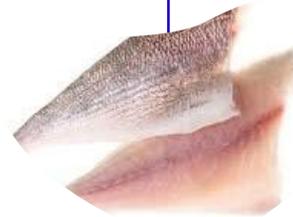
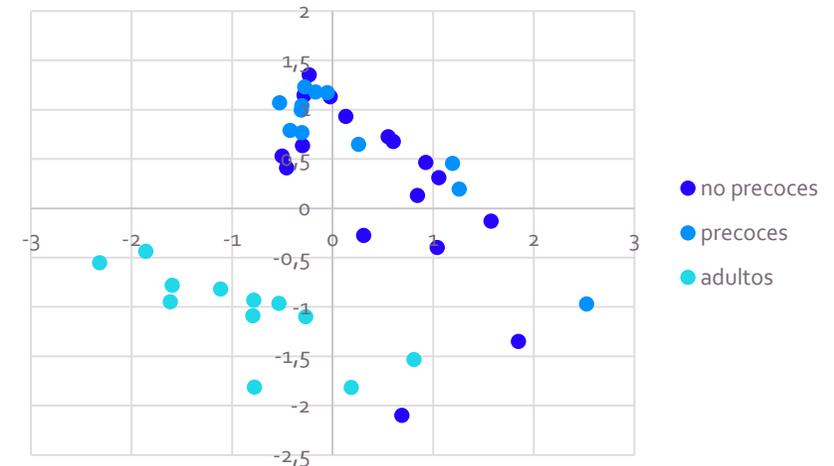
DHA/EPA/ARA MEDIO = ALTO >BAJO (DT1)

Taurina MEDIO = ALTO >BAJO (DT2)



Efecto de la maduración en la **calidad del filete**CSIC<sub>2</sub> / CSIC<sub>8</sub>

Análisis del **perfil de ácidos grasos** en machos no precoces (inmaduros), precoces y adultos



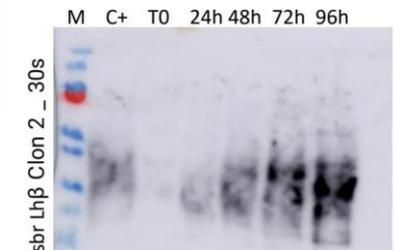
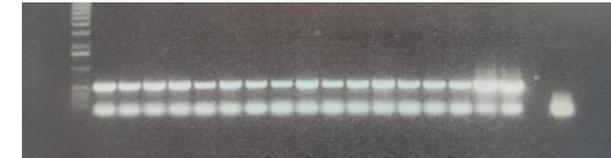
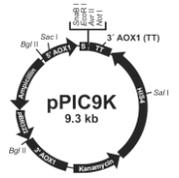
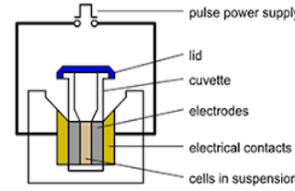
No diferencias asociadas al estado reproductivo

Efecto acumulativo de la dieta que afecta al perfil de los ácidos grasos

# Resultados obtenidos

## Objetivo 2.1 Tarea 2.1.5. Herramientas biotecnológicas para evaluar y controlar el estado reproductivo. CSIC2

- Lhb ✓
- Fshb ✓
- **ELISAs Fsh y Lh de dorada y anguila.**
- Diseño y producción de **plásmidos** de expresión para *Pichia pastoris*
- Electroporación** de *Pichia pastoris*
- Selección de clones** His<sup>+</sup> / G<sub>418</sub> -R
- Confirmación de integración por PCR
- Producción a pequeña escala de clones seleccionados
- Comprobación de secreción** de la proteína
- Selección de clon óptimo y **estudio de dinámica de producción**
- Producción a gran escala** – inducción con metanol
- Concentración del medio – **Purificación** con columnas IMAC
- Comprobación** de producción (Western) y **pureza** (Coomassie)
- Cuantificación** de la cantidad de proteína con Bioanalyzer. Se necesita producir 5 mg.
- Producción de **anticuerpo** policlonal
- Puesta a punto** ensayo ELISA



FT L E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7



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

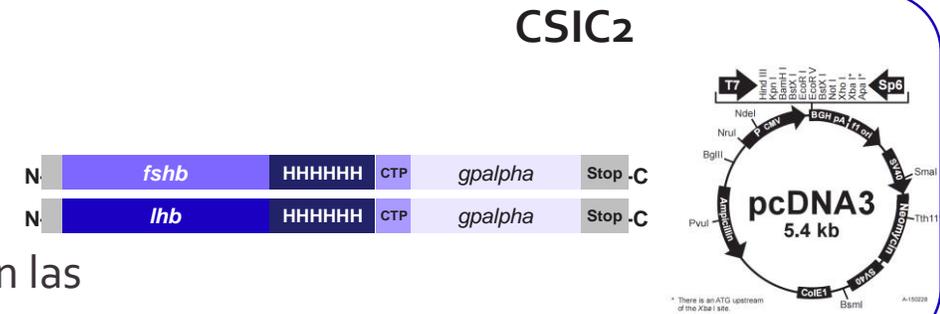


# Resultados obtenidos

## Objetivo 2.1 Tarea 2.1.5. Herramientas biotecnológicas para evaluar y controlar el estado reproductivo.

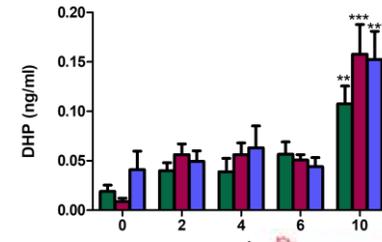
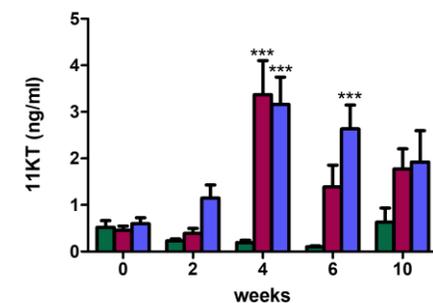
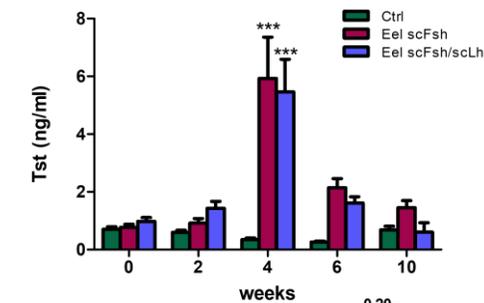
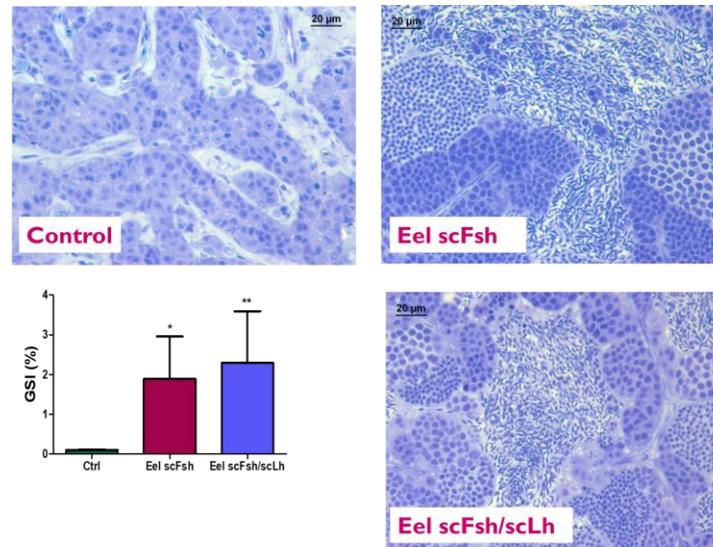
### Gonadotrofinas recombinantes de anguila (Fsh y Lh)

1. Diseño construcciones de expresión.
2. Producción y concentración de Fshsc y Lhsc de anguila recombinantes en células CHO.
3. Clonación de 2 de los receptores de gonadotrofinas de anguila (*fshreel* y *lhreel*) en el vector de expresión pcDNA3 para caracterizar su actividad con las gonadotrofinas recombinantes producidas en CHO. *lhreel* en proceso



## Experimento de transferencia génica somática mediante inyección de los plásmidos en anguilas macho y hembra para estimulación de maduración gonadal. Análisis de los resultados del experimento de machos.

### CSIC2 / UPV4



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



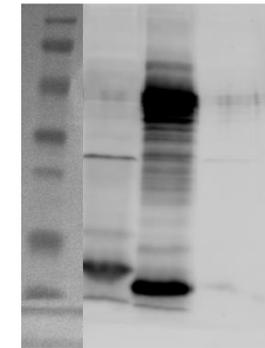
# Resultados obtenidos

**Objetivo 2.1** Tarea 2.1.5. Herramientas biotecnológicas para evaluar y controlar el estado reproductivo.

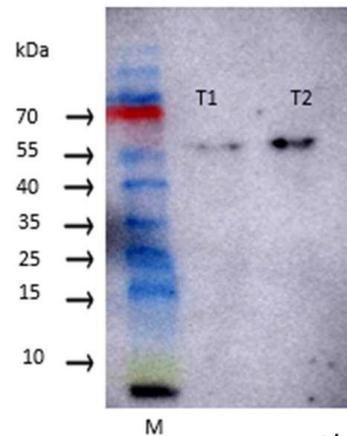
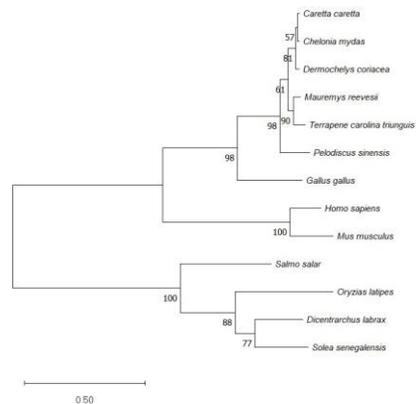
## ELISA Amh lubina y tortuga

- ✗ Prueba ELISA para la Amh de lubina con el anticuerpo disponible en nuestro laboratorio → NO FUNCIONA
- ✓ Producción de **Amh recombinante de lubina en *Pichia pastoris*** para purificación y uso como antígeno → Disponible
- ✓ Clonación y caracterización **Amh de tortuga (*Caretta caretta*)**

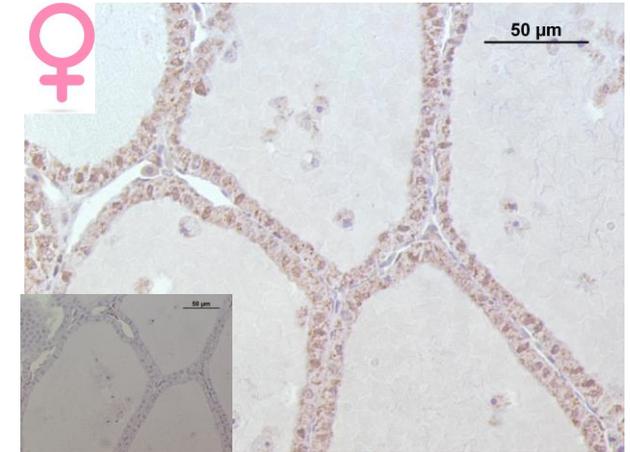
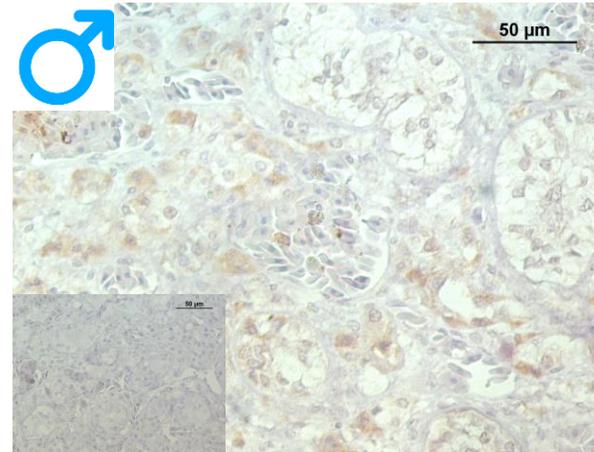
M 7 8 C'''-



Ab: anti-C amh



anticuerpo de AMH de gallo comercial



- ✓ Diseño plásmido para *Pichia pastoris*, electroporación y selección de clones.

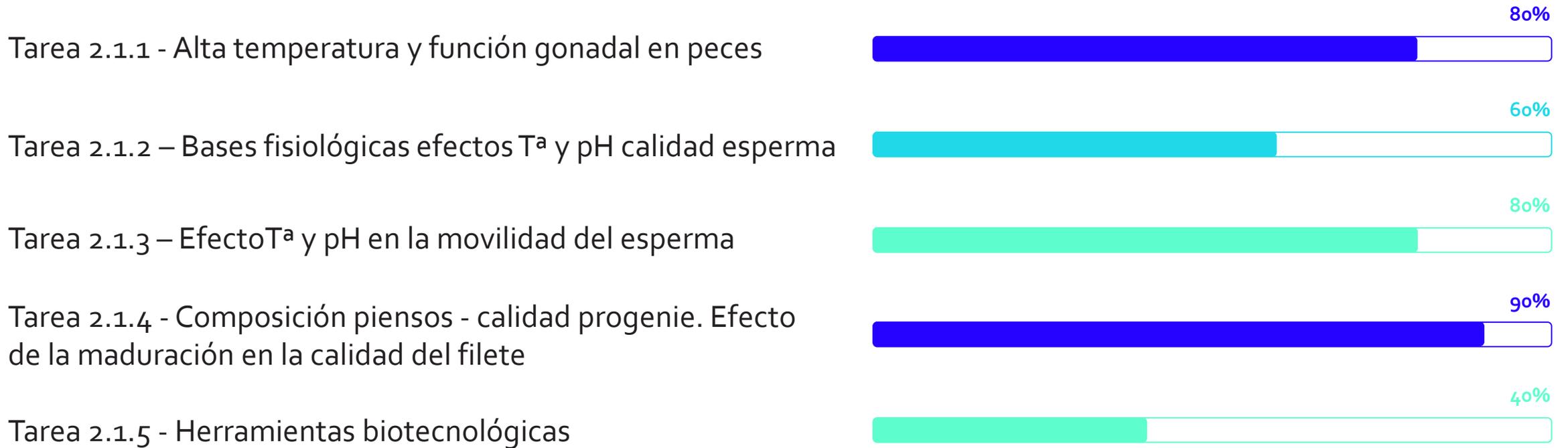


This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by Generalitat Valenciana



# Grado de consecución de las tareas

## Objetivo 2.1



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 2.2. 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.**



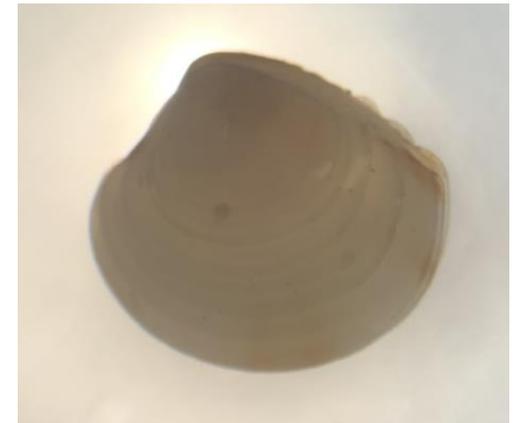
# Resultados obtenidos

**Objetivo 2.3** 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 tellina y chirla.

UPV<sub>10</sub>

Se ha **completado el primer ciclo anual de estudio de larvas, postlarvas y juveniles** en sedimento y columna de agua.

Se han **identificado el 50% de los ejemplares** y se han confirmado mediante técnicas PCR y se trabaja en la identificación del resto y en el tratamiento de las muestras completas de plancton.



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 obtenidos

**Objetivo 2.3** 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.

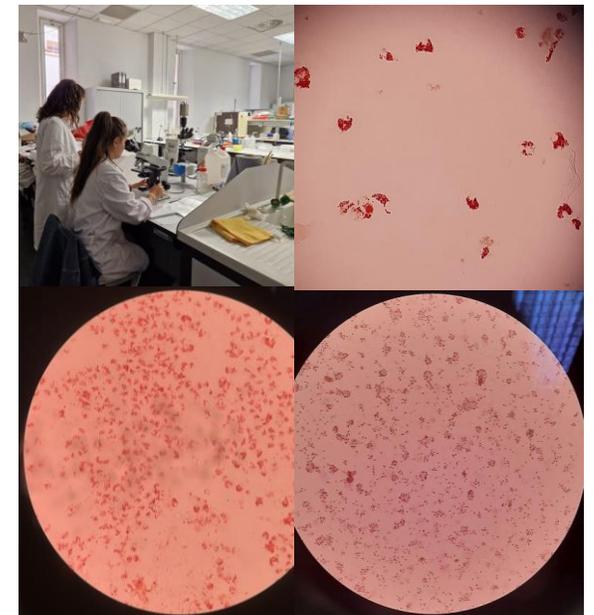
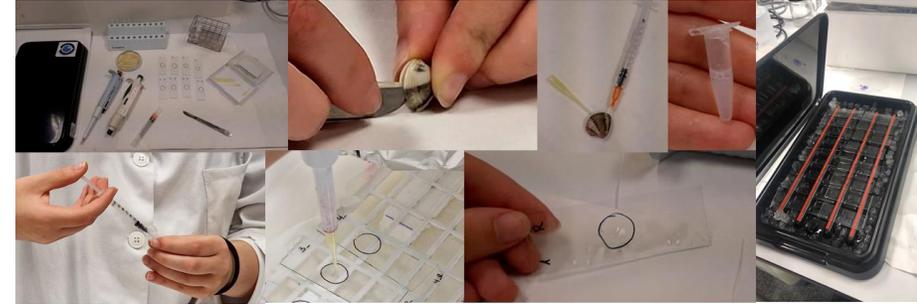
## UPV10

Se han obtenido **20 meses de densidades**, tanto de *Donax* como de *Chamelea*, distribución de tallas mayores de 5 mm.

Ambas especies pueden tolerar cambios en la salinidad del agua de mar o en las condiciones de temperatura.

El rango de tolerancia es más estrecho para *D. trunculus*, mostrando una **citotoxicidad significativa** (NRRT < 50 min) a **temperaturas superiores a 27,5 °C** y **salinidades superiores a 32**, y provocando hasta el **100% mortalidad** a 27,5 °C y bajas salinidades (27–28).

Se ha contribuido a consolidar los hallazgos ya obtenidos de otras especies de bivalvos sobre que **los cambios climáticos pueden afectar la funcionalidad de los hemocitos**, que está directamente relacionada con las capacidades de defensa inmune de los bivalvos.



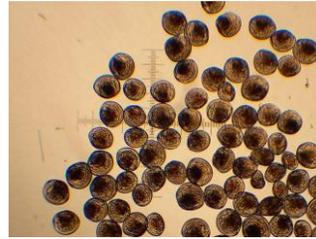
This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by Generalitat Valenciana



# Resultados obtenidos

## Objetivo 2.3 Tarea 2.2.3. Valoración de la cría en cautividad de la chirla/tellina.

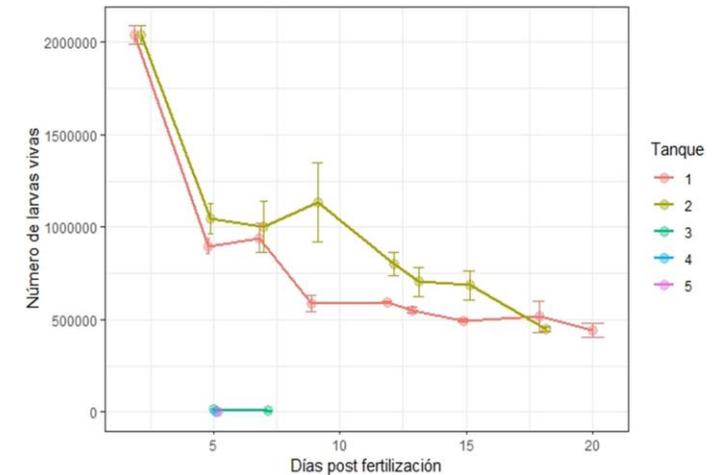
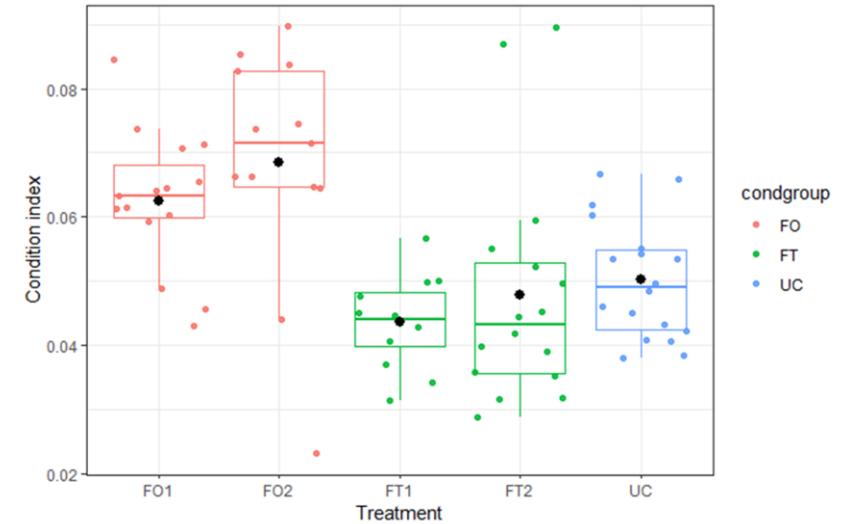
UPV10



Se ha observado que el acondicionamiento de **4 semanas con dieta** del 2% del peso seco de carne (FO= food only) **permite una maduración** respecto a individuos recién capturados en el banco natural, sin acondicionar (UC =unconditioned) y **empeora la maduración por el efecto de temperatura (FT)**, subida de 2°C.

Gráfica de la supervivencia larvaria hasta la metamorfosis, muestra que los tanques 1 y 2 con **condiciones de cultivo estándar** dieron buena **supervivencia** mientras que el resto de alternativas, los tanques 3-5 no dieron resultados.

Las fertilizaciones realizadas a partir de las puestas masivas obtenidas a 29 °C dieron lugar a un número muy pequeño de larvas (17.500-29.500), que murieron en un período de cinco días.



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

## Objetivo 2.2



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.**

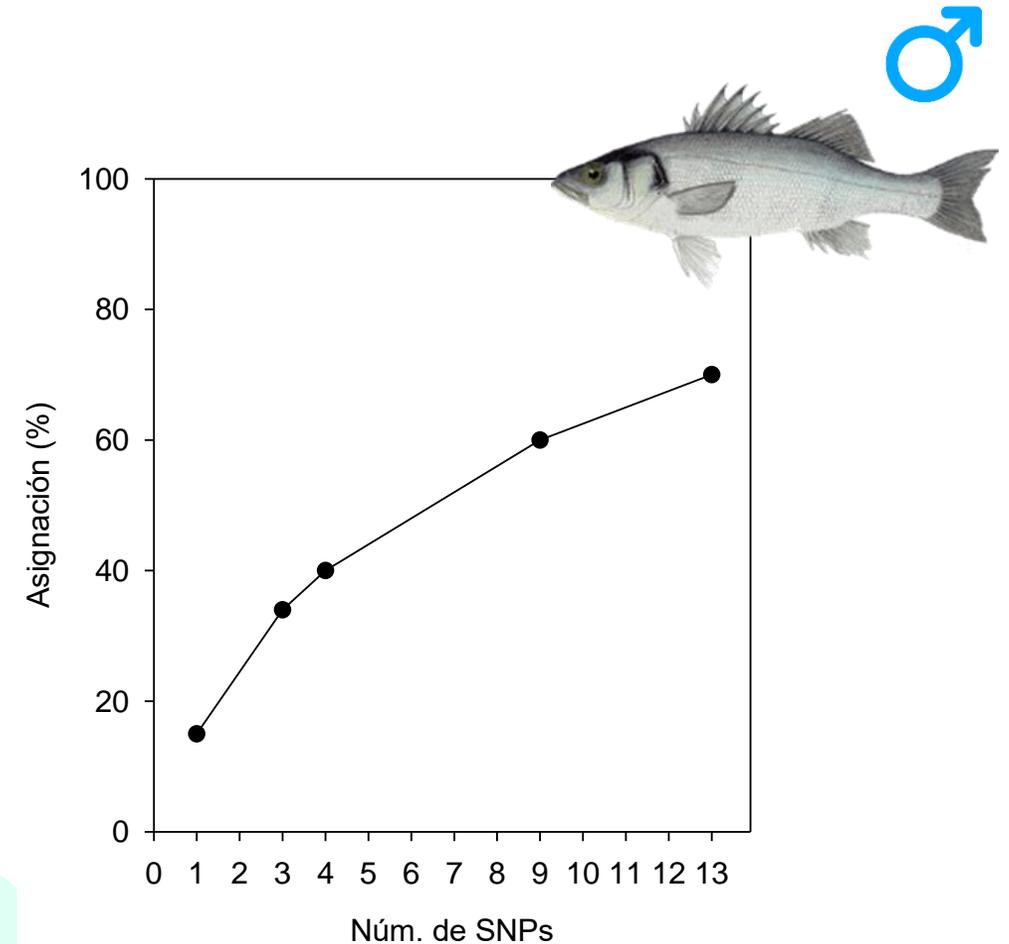


# Resultados obtenidos

## Objetivo 2.3 Tarea 2.3.1. Identificación de SNPs asociados a caracteres productivos en lubina.

CSIC<sub>2</sub>

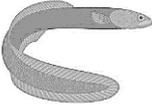
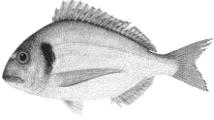
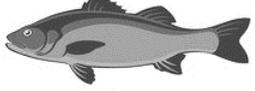
- 40 SNPs identificados y genotipados en machos de lubina precoces y no precoces
- **13 SNPs con asociación significativa a la maduración** en 384 animales procedentes de 6 lotes de lubina
- Construcción de **panel SNPs** con capacidad de **asignación al carácter aprox. 70%** (en progreso)



# Resultados obtenidos

**Objetivo 2.3** 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.

UPV<sub>4</sub>/CSIC<sub>1</sub>, CSIC<sub>2</sub>

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



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 obtenidos

## Objetivo 2.3 Tarea 2.3.3. Genómica de chirla y tellina.

UPV<sub>10</sub>

Se ha **extraído el DNA de muy alto peso molecular** necesario para el sistema ONT, tanto para *Chamelea gallina* como para *Donax trunculus*.

**Secuenciación del genoma** de ambas especies - se ha enviado al DNA a la empresa de secuenciación y se espera tener los resultados en septiembre próximo.



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*



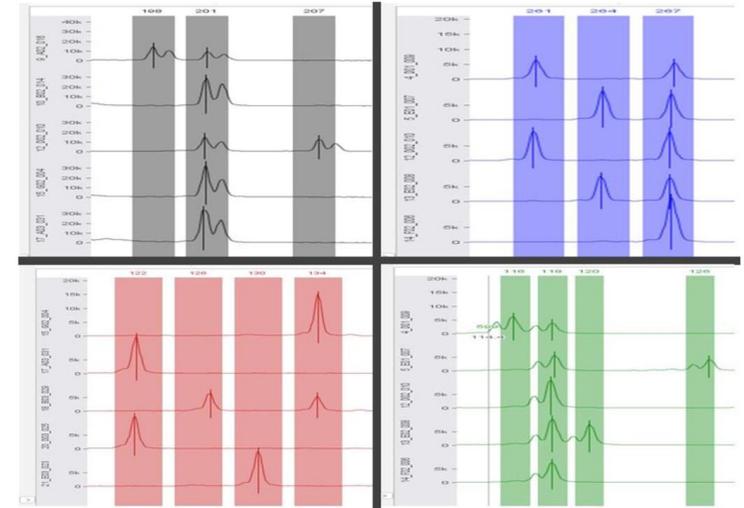
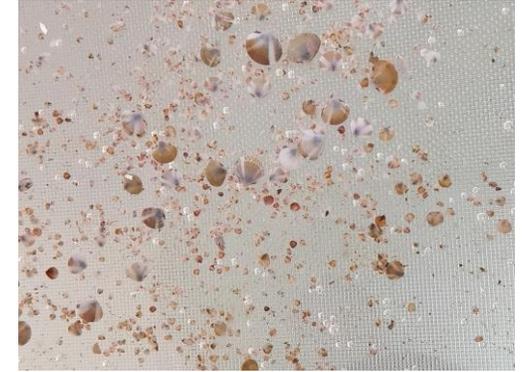
# Resultados obtenidos

## Objetivo 2.3 Tarea 2.3.4. Polimorfismos de DNA y QTL de chirla y tellina.

UPV10

**Genética de la semilla de chirla** obtenida en 2023 en el IATS. Se ha estudiado la estructura familiar de la progenie (**tests de paternidad**) usando **microsatélites**. Además se esta completando el estudio de contribución de progenitores sobre 300 individuos de la progenie de 2023.

Se está analizando la progenie para polimorfismos de DNA (**SNPs**), e intentar realizar un **mapa de ligamiento** que permita determinar las regiones específicas del genoma, o QTLs, relacionadas con la variabilidad entre individuos para caracteres biológicamente relevantes, como la determinación del sexo, la tasa de crecimiento y la viabilidad de larva a adulto.



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

## Objetivo 2.3

Tarea nº 2.3.1 Identificación de **SNPs**



Tarea nº 2.3.2. Criopreservación esperma



Tarea nº 2.3.3 Genómica de chirla y tellina



Tarea nº 2.3.4 SNPs y QTL chirla y tellina



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:
  - Imposibilidad de obtener muestras de atún (tejidos, esperma)
  - Limitación en muestras de esperma de lenguado (número y volumen)
  - Dificultad y retraso en el tiempo en la puesta a punto de la medida del potencial de membrana del espermatozoide por citometría de flujo y los experimentos asociados
  - No se han realizado fecundaciones de dorada, ni lenguado. Las puestas de lubina este año fueron de mala calidad y se realizaron sólo pequeñas pruebas del efecto del pH y la temperatura en la fecundación de huevos.
  - Rediseño de las construcciones de Fshb para *Pichia pastoris* -> eliminación de sitio *BglII* interno.
  - Necesidad de producir de gran cantidad de proteína recombinante como antígeno.
- Desviaciones positivas
  - Medida de la calidad de esperma en machos expuestos a temperaturas elevadas (UPV4)
  - Genoma del lenguado ahora accesible en bases de datos (NCBI)
  - Inclusión de trabajos con ostra: efectos de contaminantes emergentes (combinados con la temperatura)
  - Inicio de experimentos de transferencia génica somática mediante inyección de los plásmidos en anguila para estimulación de maduración gonadal.
  - Aislamiento de los receptores de gonadotrofinas de anguila para su caracterización funcional con gonadotrofinas recombinantes.
  - Caracterización de la Amh de tortuga *Caretta caretta*.



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



# Colaboraciones con grupos GVA-ThinkInAzul

- Colaboración UPV<sub>4</sub> – CSIC<sub>2</sub>
  - Tarea 2.1.1 (responsable CSIC<sub>2</sub>) – muestras de animales sometidos a distintas temperaturas para estudios de expresión de TRPVs. Evaluación de calidad del esperma en machos de lubina de dos años sometidos a alta temperatura. Tesis doctoral Fátima Fernández
  - Tarea 2.1.2 (responsable UPV<sub>4</sub>) – Muestras de esperma de lubina para estudios de motilidad espermática, challenge tests, protocolos de congelación de esperma. (lubina y lenguado)
  - Tarea 2.1.5 (responsable CSIC<sub>2</sub>) – Desarrollo de herramientas biotecnológicas de anguila – Co-dirección de tesis doctoral de César Cruz.
- Colaboración UPV<sub>4</sub> - CSIC<sub>1</sub>. Tarea 2.1.2 (responsable UPV<sub>4</sub>) - estudios TRPVs, motilidad espermática y establecimiento de challenge tests, revision de protocolos de congelación de esperma (dorada)
- Colaboración CSIC<sub>2</sub> - CSIC<sub>8</sub>. Tarea 2.1.4 evaluación del perfil de ácidos grasos en músculo de lubina.
- Colaboración CSIC<sub>2</sub> - CSIC<sub>1</sub> – análisis de esteroides en plasma de dorada.
- Suministro de muestras de escamas y aletas de lubinas adultas de CSIC<sub>2</sub> a CSIC<sub>7</sub>



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*



# Colaboraciones con grupos ThinkInAzul Nacionales

- CSIC<sub>2</sub>
  - Murcia - IEO Mazarrón – Aurelio Ortega, Fernando de la Gandara- Aspectos reproductivos en nuevas especies.
  - Galicia – USC / Campus Lugo – Paulino Martinez – Desarrollo de chip de SNPs multiespecie.
- UPV<sub>10</sub>
  - Se ha establecido colaboración con el proyecto titulado “An integrated multidisciplinary approach to understand bivalve fisheries collapse and recovery” del Plan Complementario I+D+I de Ciencias marinas de Andalucía, cuyo IP es Ciro Rico Lameli del INSTITUTO DE CIENCIAS MARINAS DE ANDALUCÍA (CSIC-ICMAN).
  - Se evaluará el estado de las poblaciones adultas con metodologías comparables.
  - Se estudiarán las diferencias en el ciclo reproductivo en las dos áreas de evaluación de los dos proyectos.
  - Se estudiará la respuesta del biomarcador LMS en las poblaciones del Golfo de Cadiz y del Golfo de Valencia respecto de las variaciones de salinidad y temperatura.
  - Se compartirán los trabajos de secuenciación del genoma de *Chamelea gallina* y *Donax trunculus*.
  - Se ha establecido colaboración con el ICMAN-CSIC en Cádiz ICMAN-CSIC en Cádiz



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
  - Machos y hembras de 2º año: evaluación de los **niveles circulantes de hormonas** reproductivas (gonadotrofinas, esteroides sexuales)
- **Tarea 2.1.2** – TRPVs , potencial de membrana
  - Medida del **potencial de membrana en esperma** (de anguila) en distintas condiciones iónicas.
  - Puesta a punto *primers* TRPVs y estudio de la distribución tisular de los **TRPVs en lenguado**.
  - Estudios con los TRPA: acabar trabajos *in silico*, diseño de *primers*, distribución tisular.
- **Tarea 2.1.4** - Valoración de la maduración en la calidad del filete
  - Finalizar análisis del **contenido lipídico en músculo** asociado a la maduración en hembras
- **Tarea 2.1.5** - Herramientas biotecnológicas.
  - Producción a gran escala y purificación de **Fsh $\beta$  de anguila y dorada en *Pichia pastoris***.
  - Generación de **anticuerpos para ELISA de Lh $\beta$  recombinantes de anguila y dorada** . Comprobar funcionalidad de los anticuerpos mediante western blot.
  - Generación de **anticuerpos para ELISA de Amh recombinante de lubina** .
  - Producción a gran escala y purificación de **Amh de tortuga en *Pichia pastoris***
  - Análisis de las muestras obtenidas del experimento de **transferencia génica de Fsh y Lh en hembras de anguila** (EIAs de esteroides, qPCR e histología)
  - Caracterización funcional de los **receptores de GTHs de anguila**.



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.** 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).
  - Se **finalizarán los estudios de identificación larvaria individual** de larvas planctónicas y postlarvas de sedimento
- **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 **concluirá la de evaluación de zonas.**
  - Se iniciará un **estudio de transcriptómica** de organismos de *Donax* en situaciones de estrés por salinidad y temperatura
- **Tarea 2.2.3.** Valoración de la cría en cautividad de la chirla/tellina.
  - Se completará el **segundo ciclo 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*



# Hoja de ruta 6 próximos meses

- **Tarea 2.3.1** Identificación de **SNPs** asociados a caracteres productivos.
  - **Completar panel SNPs** con aprox. **20 marcadores** con asociación significativa a la maduración
  - Iniciar su **validación** en **distintas poblaciones** de lubina
- Tarea 2.3.2 – Animales resilientes y criopreservación de esperma
  - Incorporar **nuevas muestras de esperma** (varias spp) al **criobanco**.
- **Tarea 2.3.3.** Genómica de chirla y tellina.
  - Se concluirá el proceso de **secuenciación de *Chamelea gallina* y de *Donax trunculus***
- **Tarea 2.3.4.** Polimorfismos de DNA y QTL de chirla y tellina.
  - Se completará el estudio de polimorfismos de DNA (SNPs), y se intentará **completar un mapa de ligamiento** que permita determinar las regiones específicas del genoma, o QTLs, relacionadas con la variabilidad entre individuos para caracteres biológicamente relevantes, como la determinación del sexo, la tasa de crecimiento y la viabilidad de larva a adulto.



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

Gracias | Gràcies

## Project Coordinators

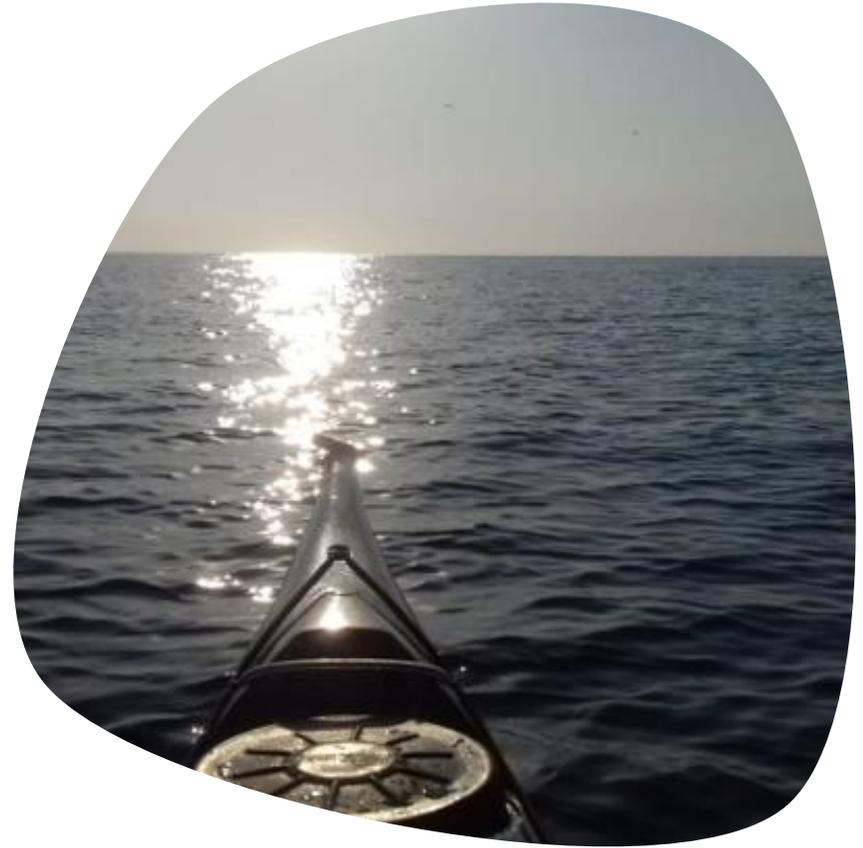
Jaume Pérez-Sánchez  
[jaime.perez.sanchez@csic.es](mailto:jaime.perez.sanchez@csic.es)  
Carlos Valle Pérez  
[carlos.valle@ua.es](mailto:carlos.valle@ua.es)

## Project Manager

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



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*



Ana Gómez

Instituto de Acuicultura Torre de la Sal - CSIC



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

