

# REPROAQUA

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

Ana Gómez

Instituto de Acuicultura Torre de la Sal - CSIC



think in azul

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



**Ana Gómez** – IP<sub>1</sub>  
**Alicia Felip** – IP<sub>2</sub>  
**Evaristo Mañanós** - Investigador  
**Cinta Zapater** - Postdoc  
**Amparo Gil** - Técnico de apoyo  
**Sol Ibáñez** - Técnico de apoyo  
**Joan Mallol** - Técnico de apoyo  
**Xavi Beltrán** - Técnico de apoyo



**Julen Romero** – Investigador en formación  
**Alessia Mascoli** - Predoc  
**Laura Sempere** - Predoc  
**César Cruz** - Predoc (grupo UPV<sub>4</sub> en estancia en IATS)

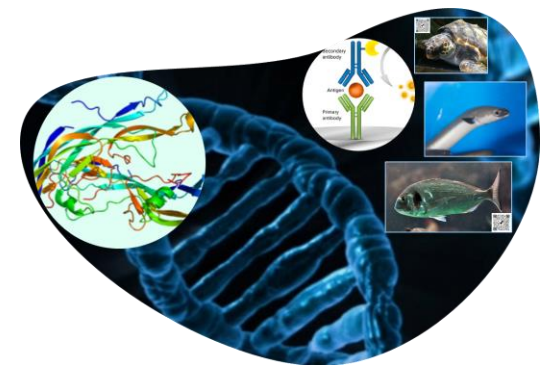
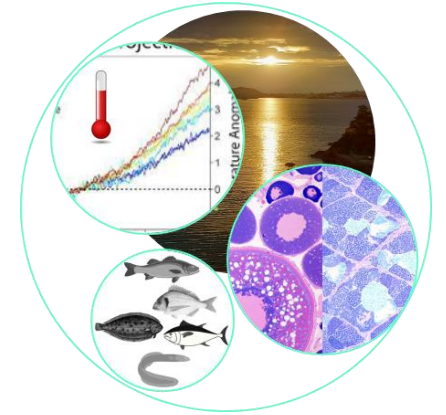


This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by *Generalitat Valenciana*



# Objetivos y tareas

- **Objetivo 2.1.** 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*



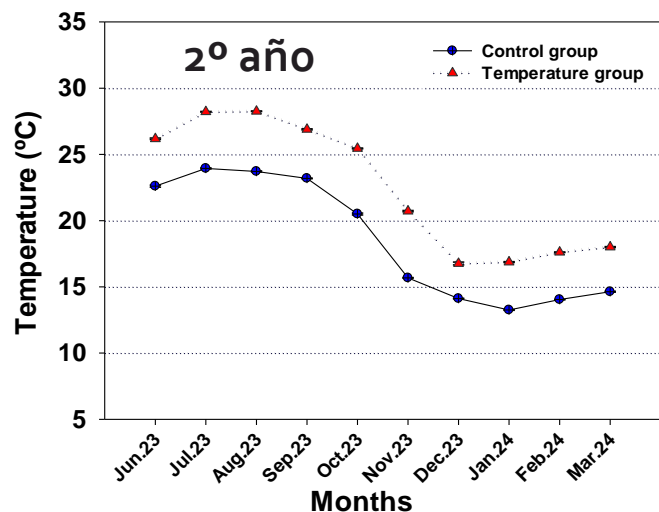
# Resultados obtenidos

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

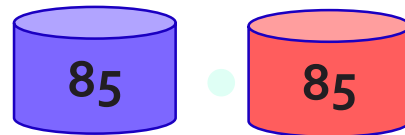
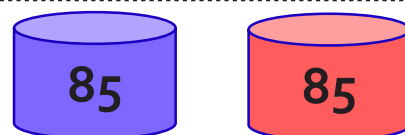
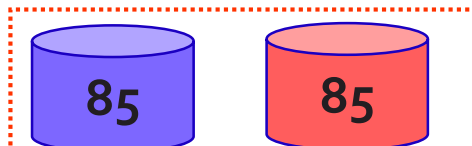
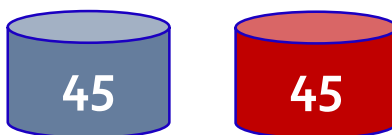


≈ 14 ± 4,1 g  
228 DPF

15% grande → ♀ 90 individuos  
85% restantes → ♂ 510 individuos



Control ↑ T° (3-4°C)



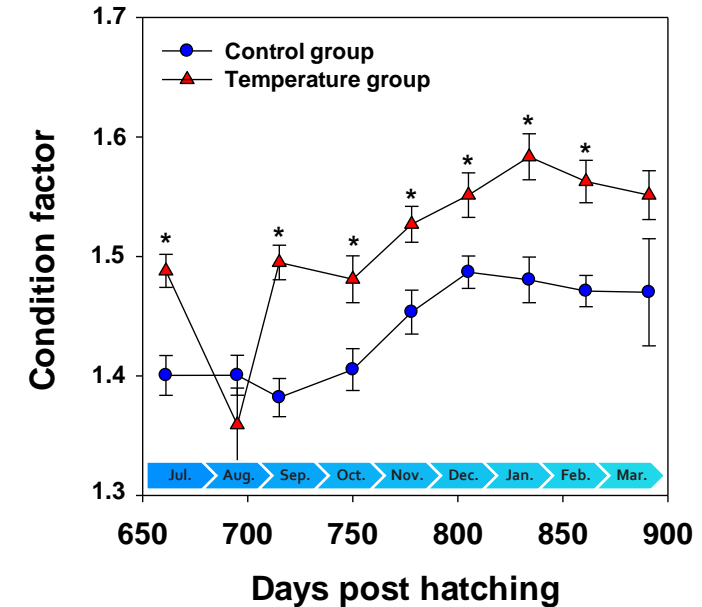
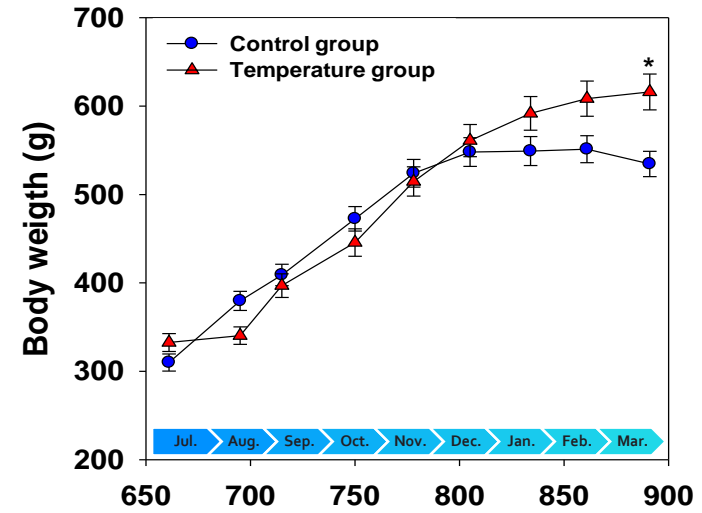
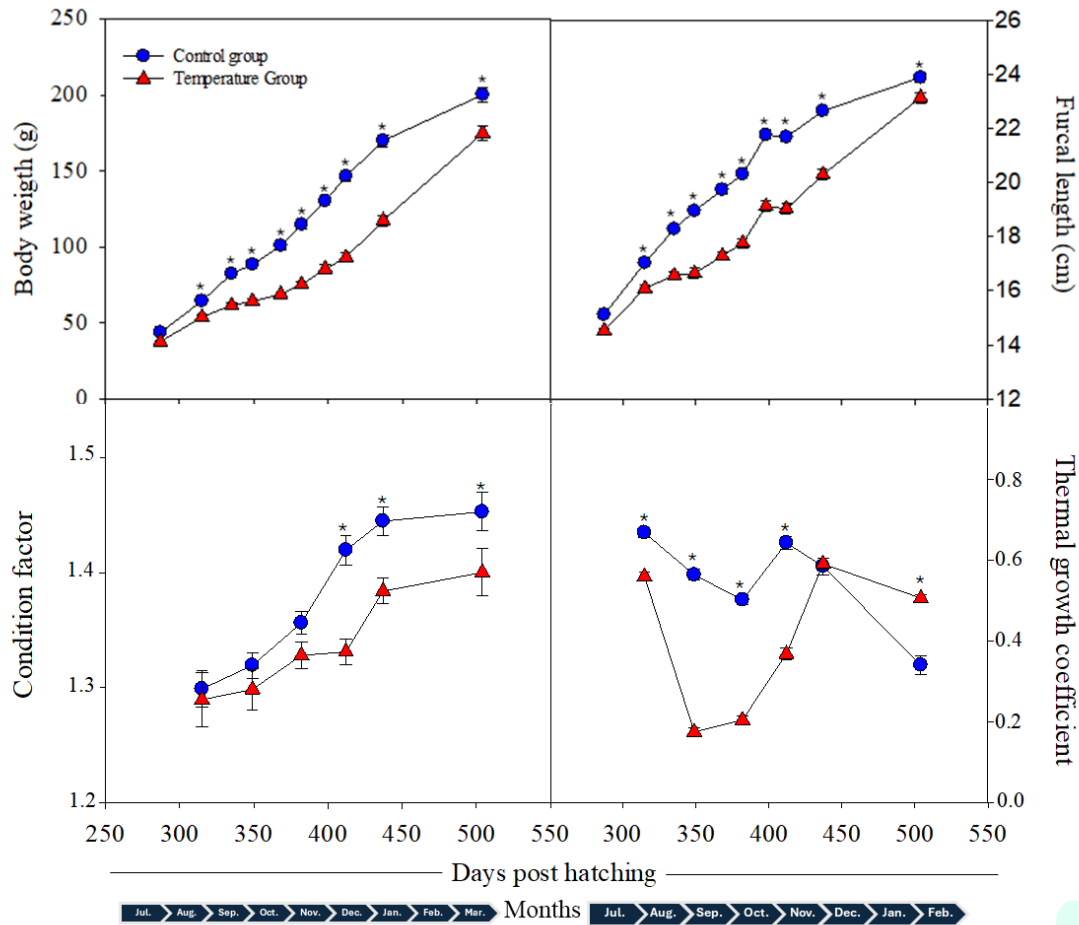
Efectos de la T° sobre la incidencia de la **PRECOCIDAD** en **HEMBRAS** (2º año)

Efectos de la T° sobre la incidencia de la **PRECOCIDAD** en **MACHOS** (1º año)

Y la **PUBERTAD** (2º año)

- Evaluación de parámetros biométricos (W, L, K)
- Índices corporales: IGS, IHS, IGTV
- Obtención de plasma para análisis hormonales (esteroides, gonadotropinas, Vtg)
- Obtención de tejidos: histología y molecular)

# Resultados obtenidos

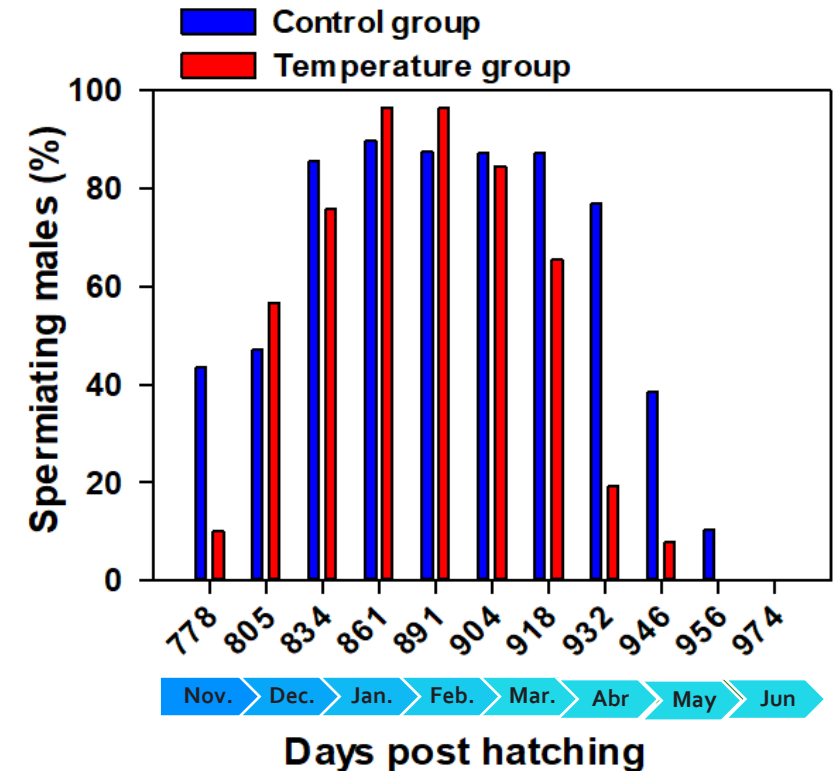
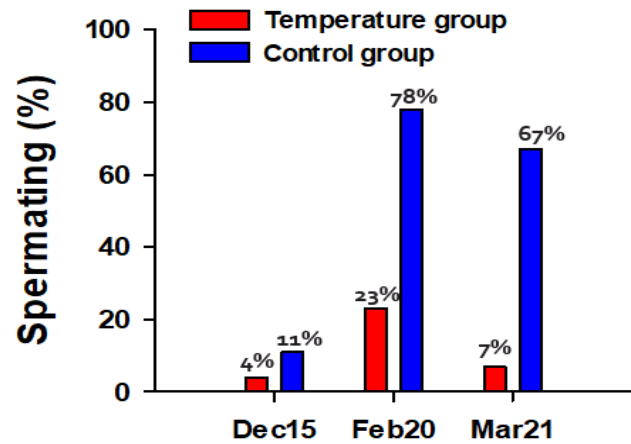
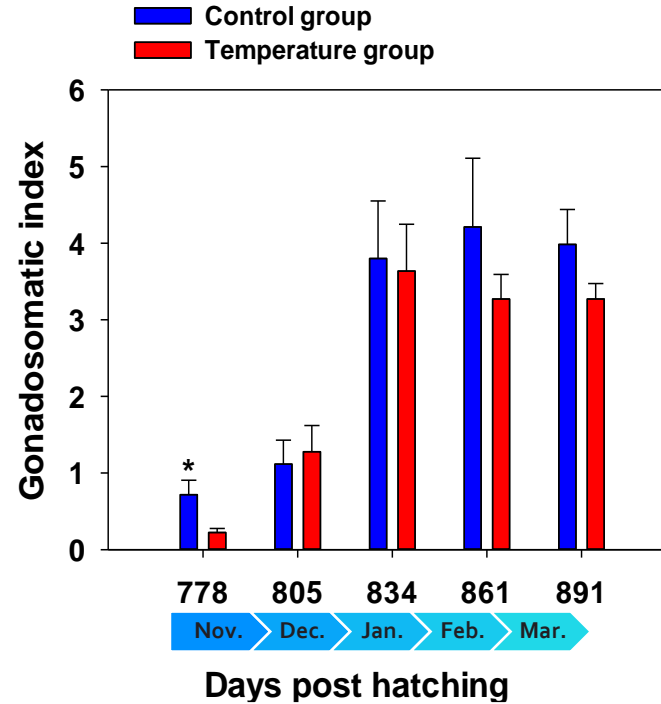
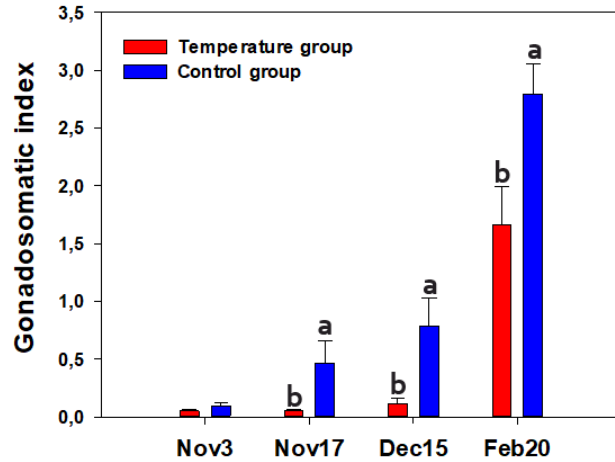


This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by Generalitat Valenciana



# Resultados obtenidos

2º año ♂



Los machos expuestos a temperaturas altas dejan antes de espermiar en su etapa juvenil y también en la adulta

1º año

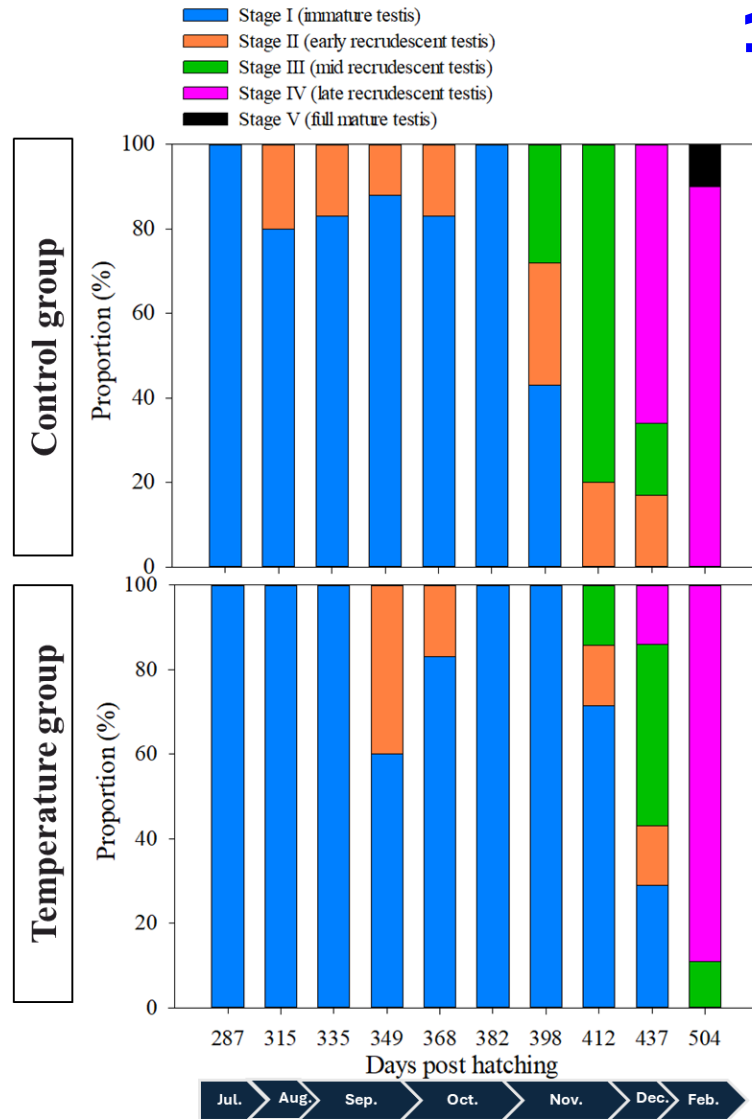


This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by Generalitat Valenciana



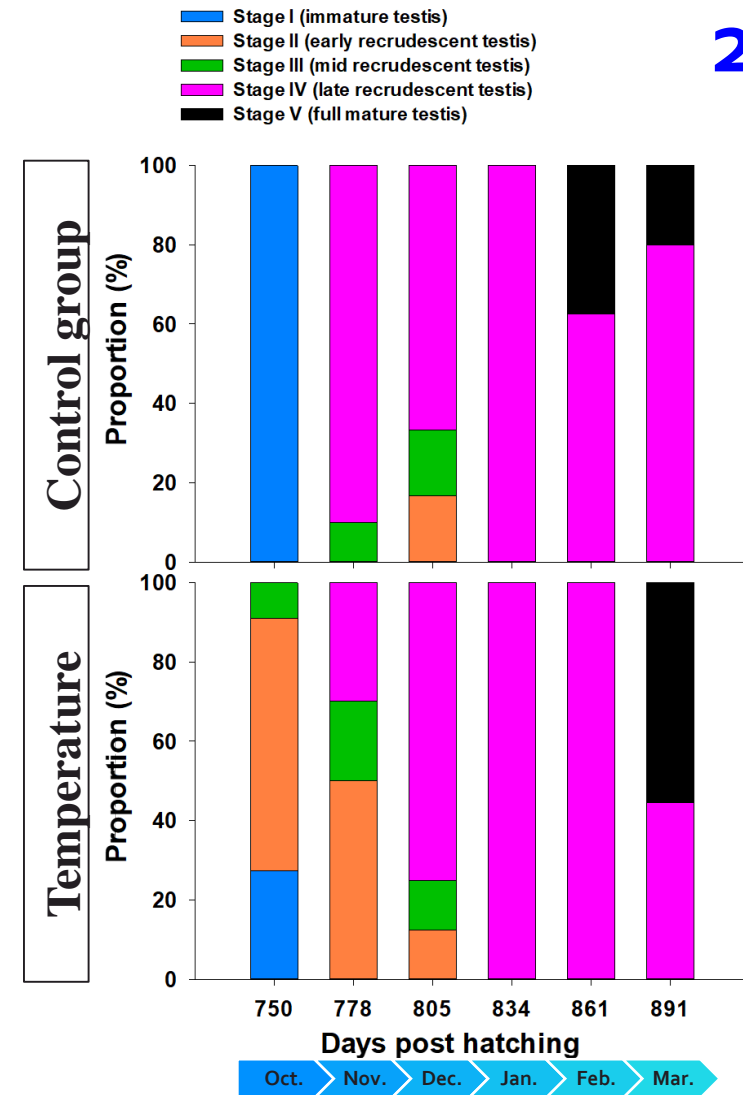


1º año



VS

2º año



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

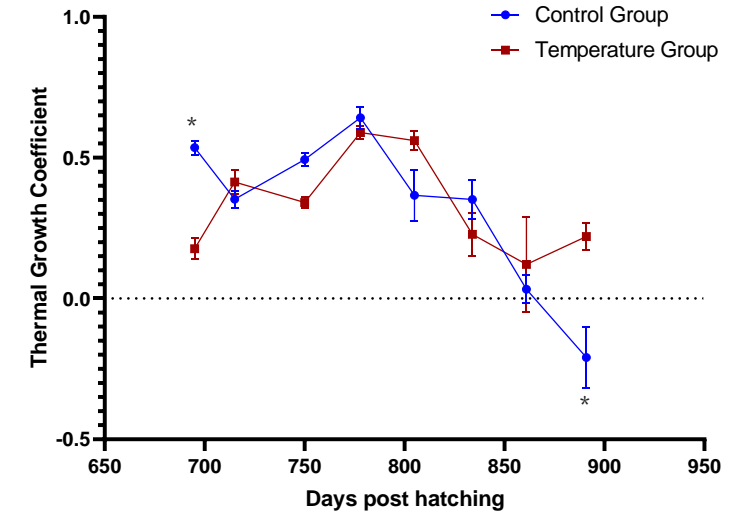
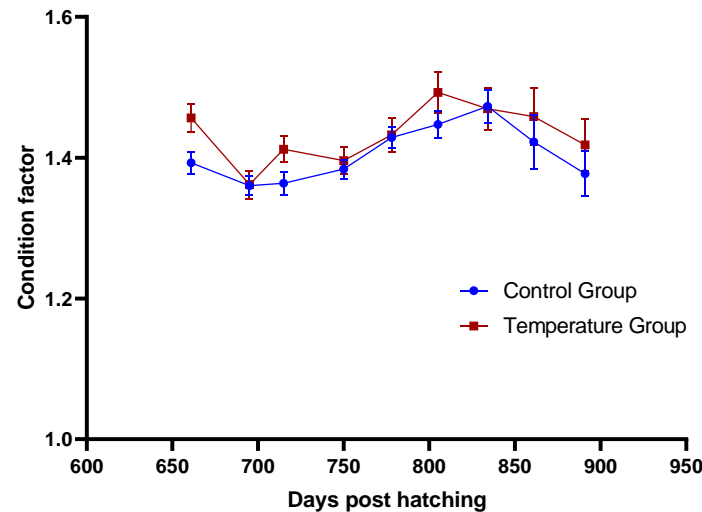
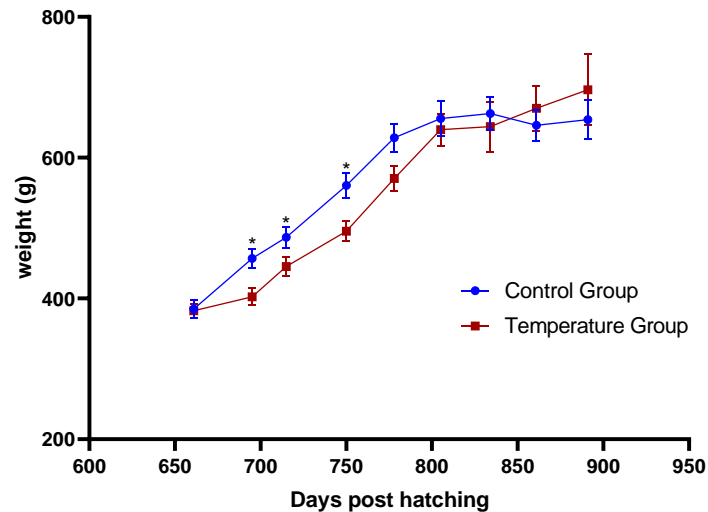


# Resultados obtenidos

2º año



Efecto a largo plazo de las **altas temperaturas** sobre **parámetros biométricos** en **hembras prepúberes** de dos años de edad



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

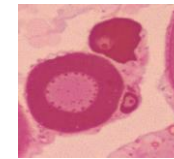
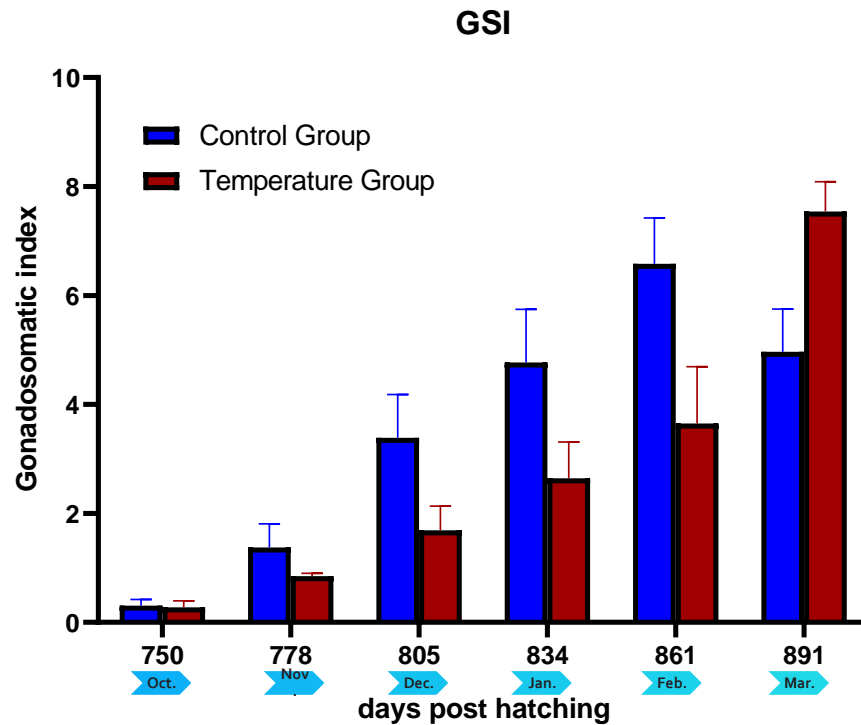




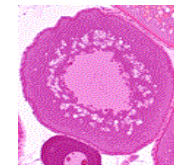
# Resultados obtenidos



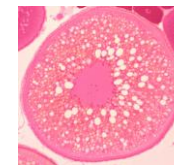
Efecto a largo plazo de las **altas temperaturas** sobre **aspectos reproductivos** de **hembras prepúberes** de dos años de edad



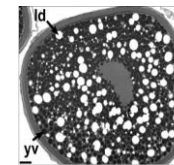
PN



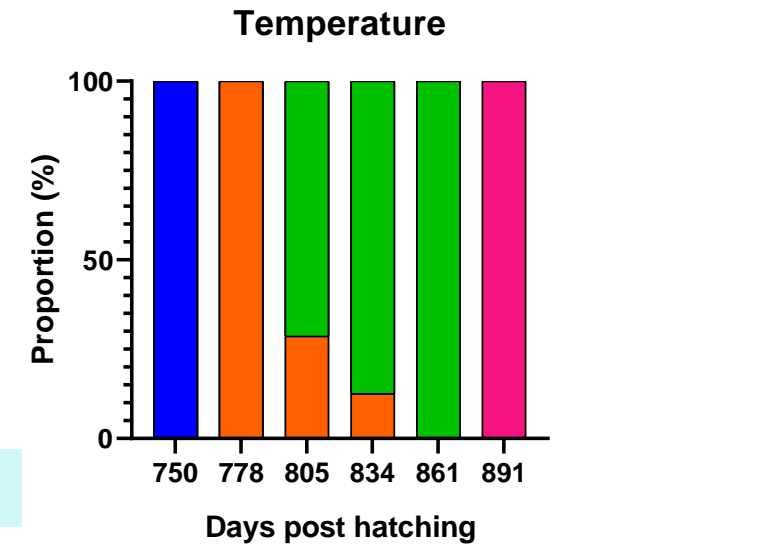
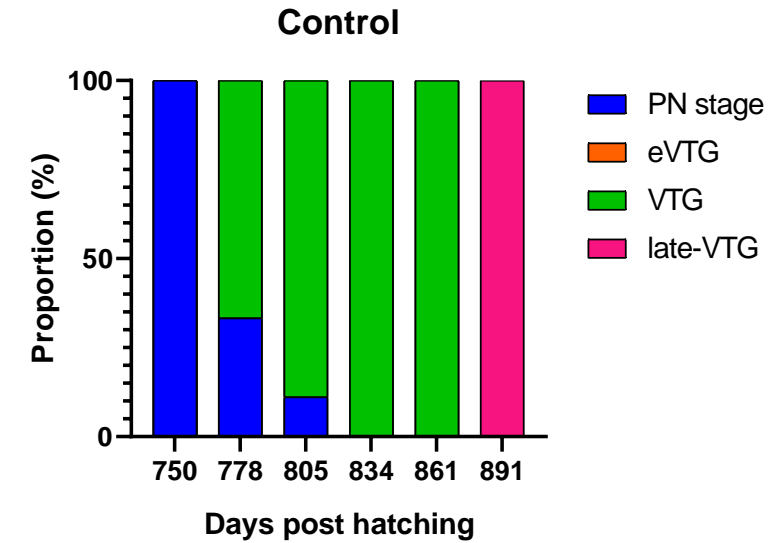
eVTG



VTG



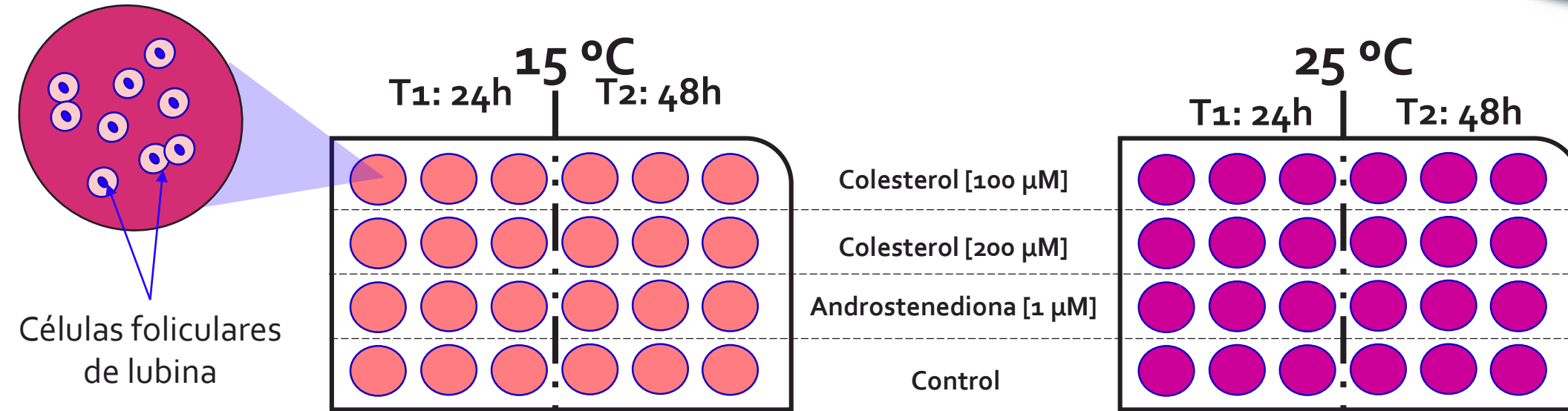
IVTG



Claros signos de vitelogénesis avanzada (precocidad) en ambos grupos

# Diseño experimental

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



Recogida de medio y células antes y después de la estimulación

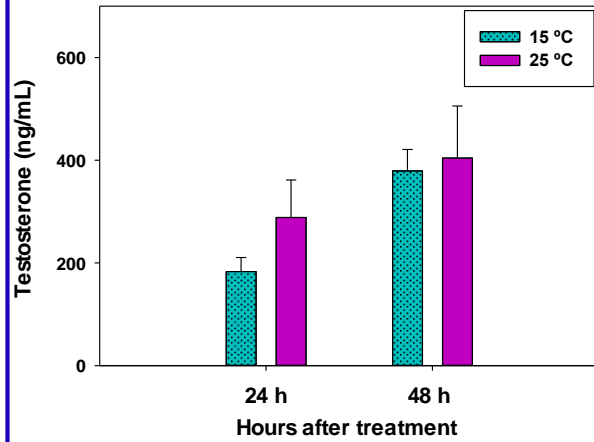
Análisis hormonal (TST Y E2)

Expresión génica (aromatasa)

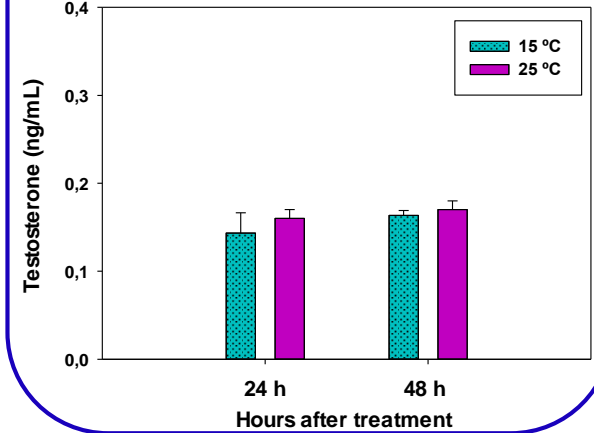
# Resultados

## Testosterona

Androstenedione [1 µM]

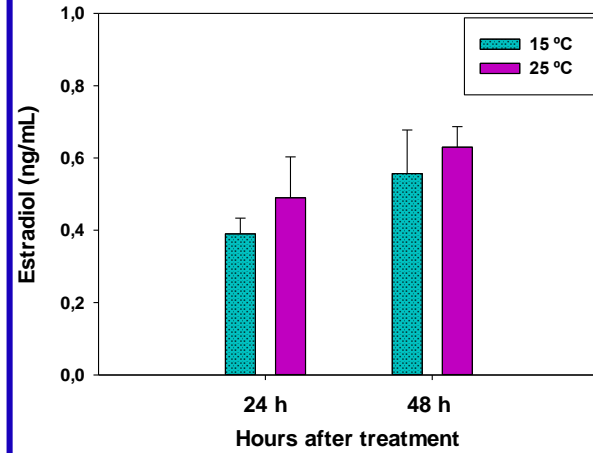


Cholesterol [100 µM]

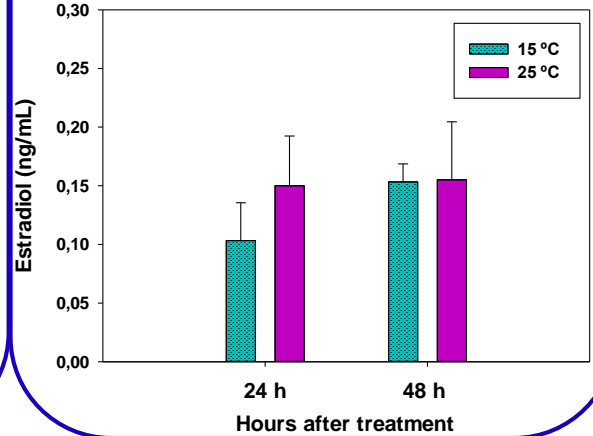


## Estradiol

Androstenedione [1 µM]

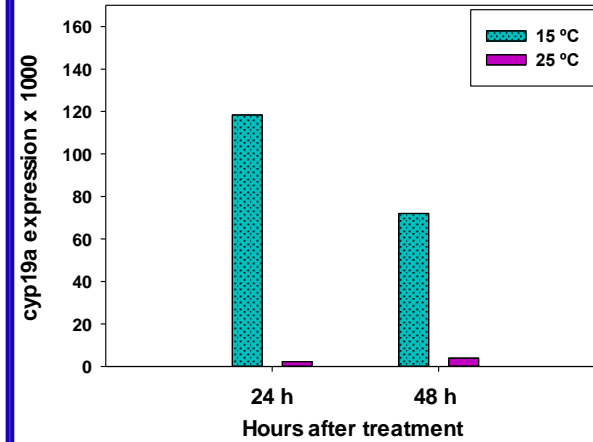


Cholesterol [100 µM]

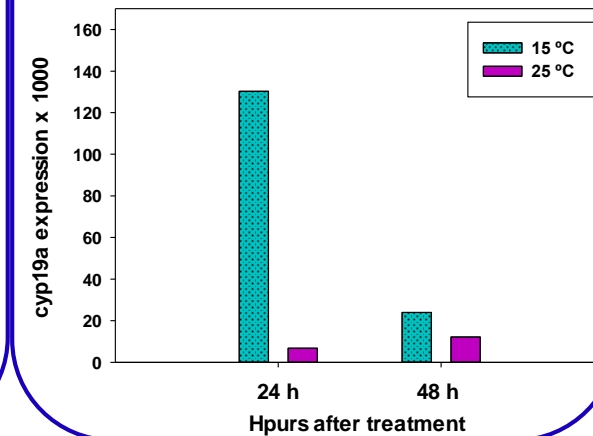


## cyp19a

Androstenedione [1 µM]



Cholesterol [100 µM]



# Grado de consecución de las tareas

Tarea 2.1.1 - Alta temperatura y función gonadal en peces



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

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

La **composición** en aminoácidos y ácidos grasos de la dieta de reproductores de lubina **compromete** su **competencia reproductiva** y **calidad de la progenie**. Su **re-evaluación** es necesaria de cara a una **mejora de la producción**.

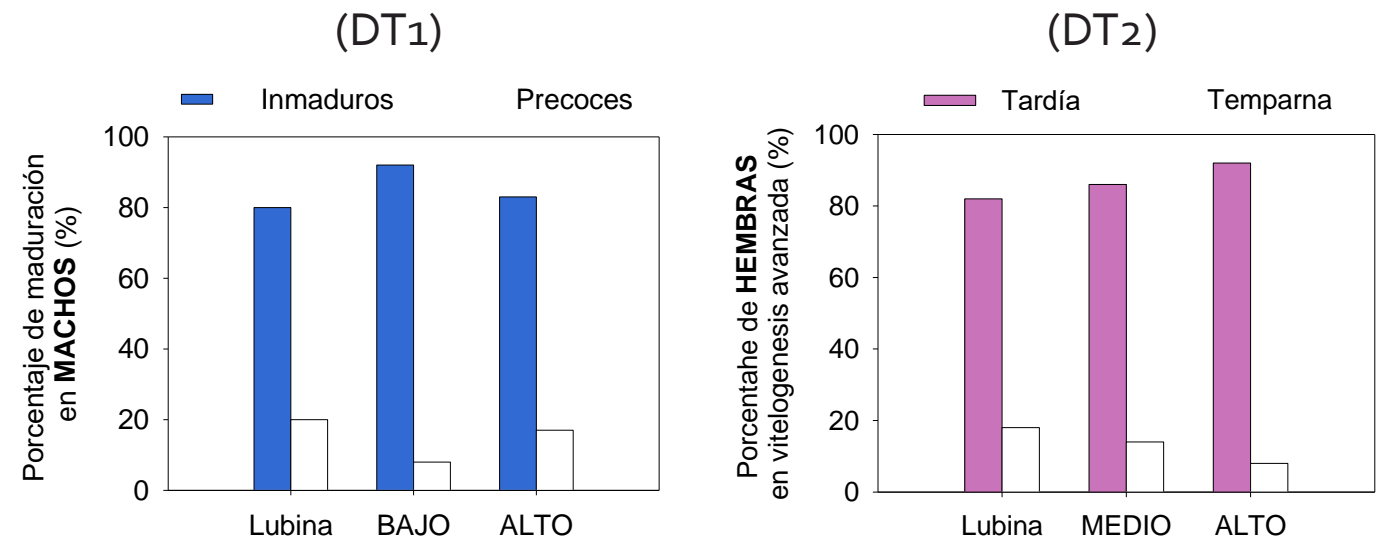


**Supervivencia larvaria**  
(días sin comer)

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

Taurina MEDIO = **ALTO** >BAJO (DT2)

- Análisis del **porcentaje de maduración** de la progenie.



Porcentaje de precocidad similares a los esperados en lubina en condiciones de cautividad

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

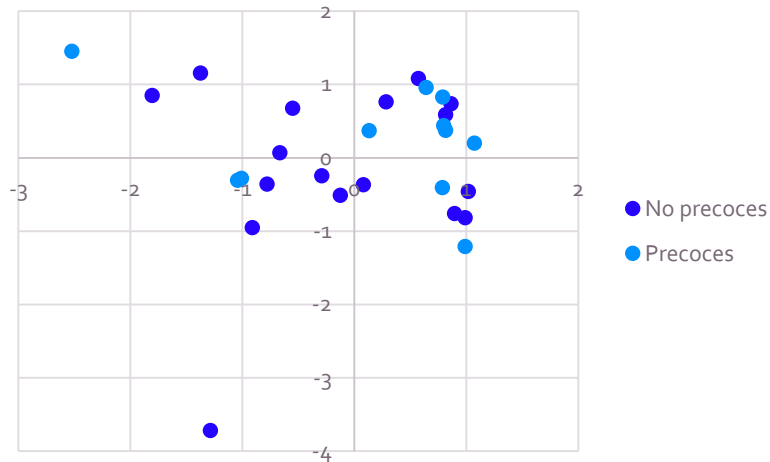
# Resultados obtenidos

CSIC<sub>2</sub> / CSIC<sub>8</sub>

Análisis del perfil de ácidos grasos en machos no precoces (inmaduros), precoces y adultos como indicador de calidad del filete

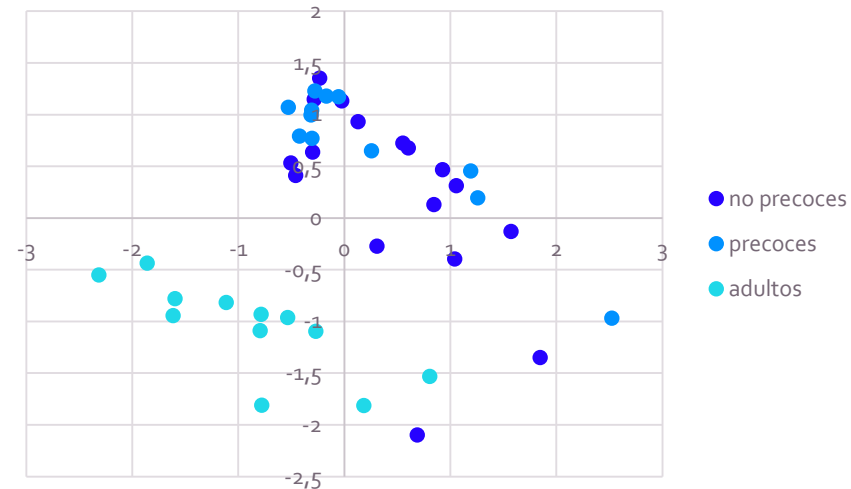


Machos de 1º año



El perfil de ácidos grasos es **similar**

Machos de 1º vs 2º año (adultos)



El perfil de ácidos grasos de machos **adultos difiere** del perfil de precoces y no precoces

No se detectan diferencias asociadas al estado reproductivo de los animales.

Existe un efecto acumulativo de la dieta que afecta al perfil de los ácidos grasos en peces de distinta edad.

# Grado de consecución de las tareas

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

80%



Tarea 2.1.4 - Efecto de la **composición de piensos** sobre la calidad de la progenie en lubina. Valoración de la maduración en la **calidad del filete**

90%



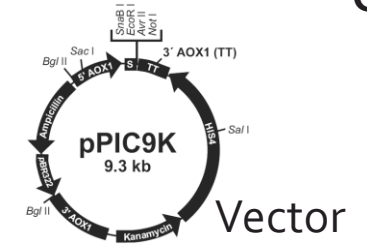
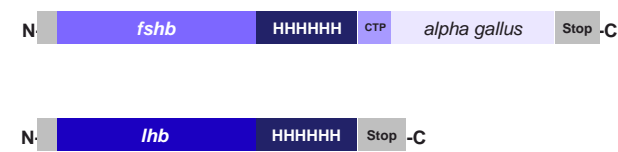
This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by *Generalitat Valenciana*



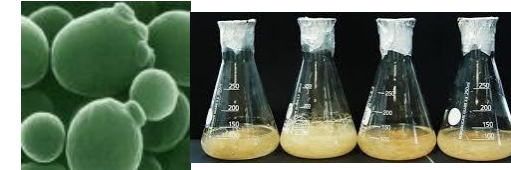
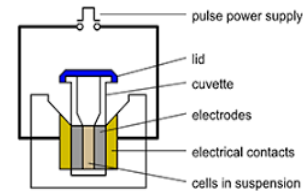
# Resultados obtenidos

- Elisas Fsh y Lh de dorada y anguila.

- Diseño de plásmidos de expresión para *Pichia pastoris*

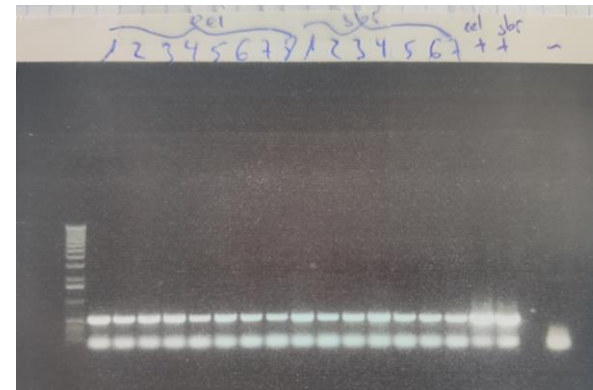


- Electroporación: Linearización de plásmidos y electroporación de *Pichia pastoris*

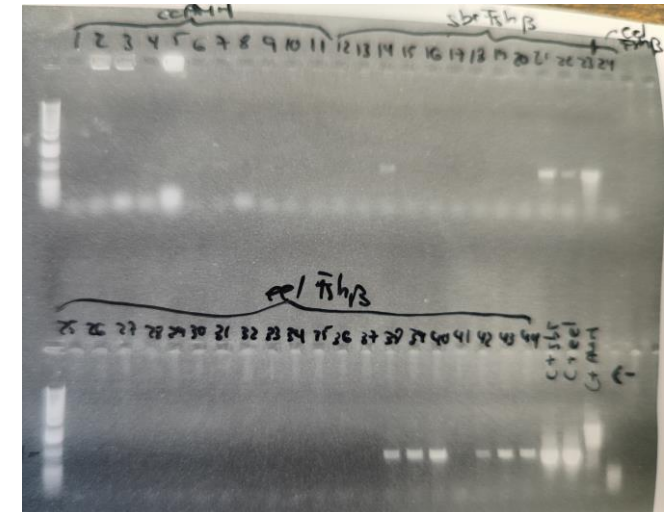


- Selección de clones.

- > selección de transformantes His+
- > rastreo de alta resistencia a G418
- > Confirmación de integración por PCR



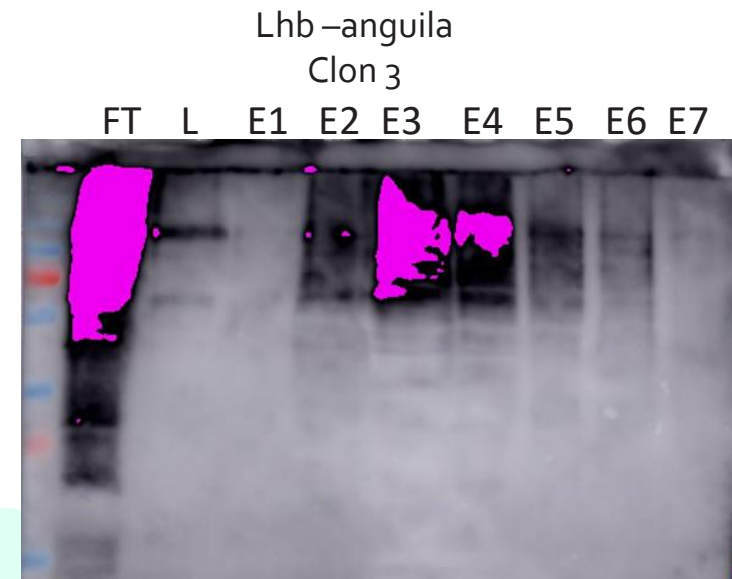
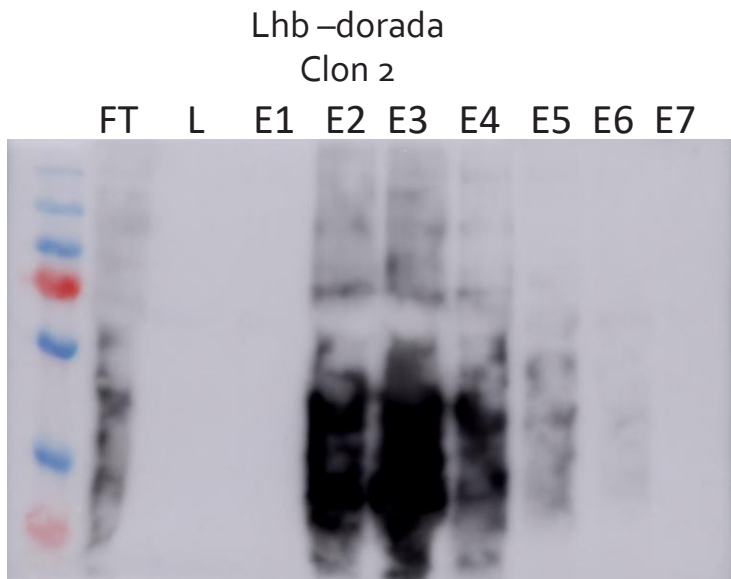
Lhb



Fshb



4. Producción a gran escala de proteína purificada. **Hecho para Lhb**
- > comprobación por Western blot de producción y secreción tras inducción con metanol
  - > selección de clon óptimo y estudio de dinámica de producción.
  - > purificación con columnas IMAC y comprobación por western blot y coomassie.
  - > cuantificación de la cantidad de proteína con Bioanalyzer. Se necesita producir 5 mg.

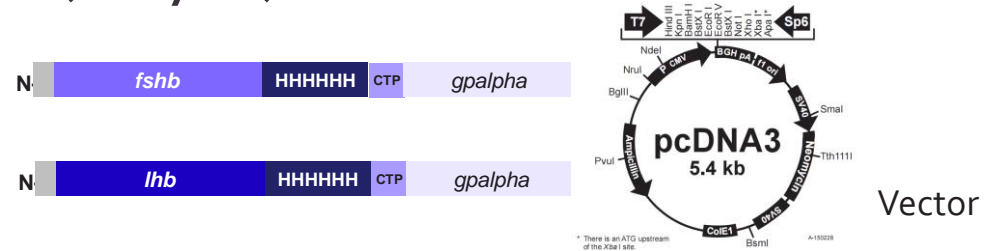


# Resultados obtenidos

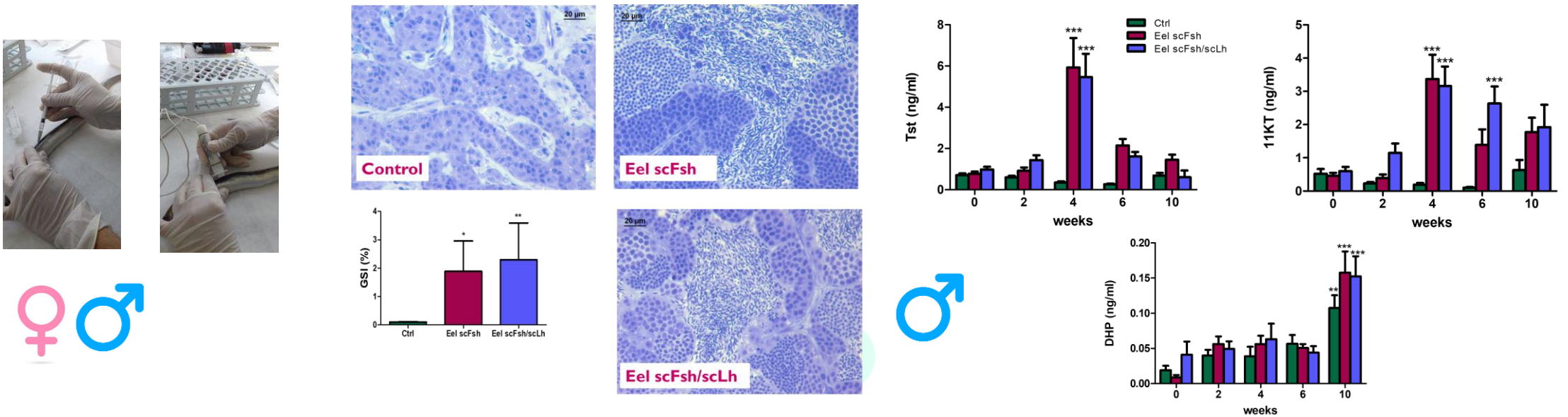
- Gonadotrofinas recombinantes de anguila (Fsh y Lh)

- Diseño construcciones de expresión.

Producción de los plásmidos.

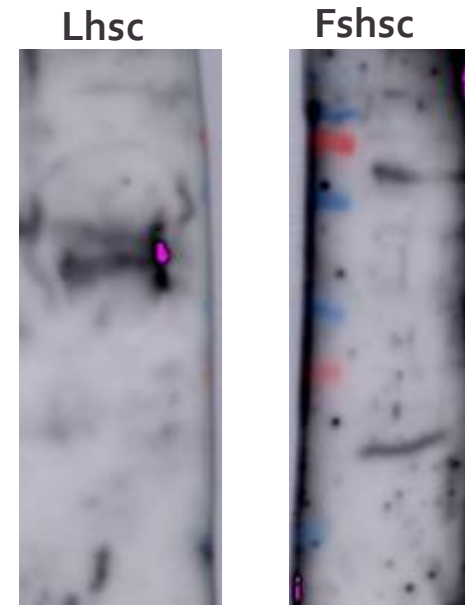


- Experimento de transferencia génica somática mediante inyección de los plásmidos en anguilas macho y hembra para estimulación de maduración gonadal. Análisis de los resultados del experimento de machos.

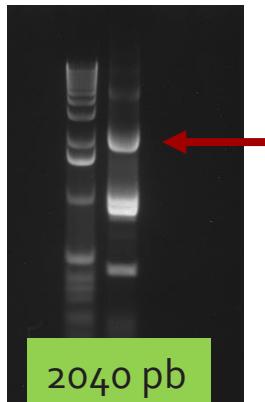


# Resultados obtenidos

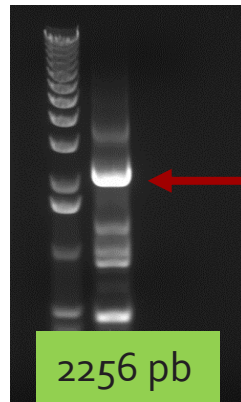
3. Producción y concentración de Fshsc y Lhsc de anguila recombinantes en células CHO.



Fshreel: Fw1-Rv1



Lhr1eel: Fw1-Rv3



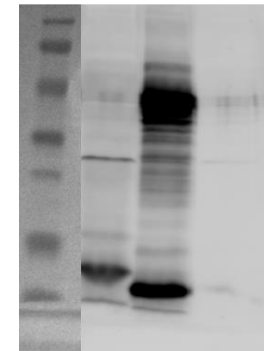
4. Clonación de 2 de los receptores de gonadotropinas de anguila (*fshreel* y *lhr1eel*) en el vector de expresión pcDNA3 para caracterizar su actividad con las gonadotropinas recombinantes producidas en CHO. *lhr2eel* en proceso

# Resultados obtenidos

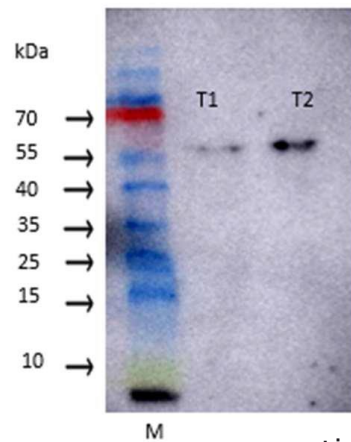
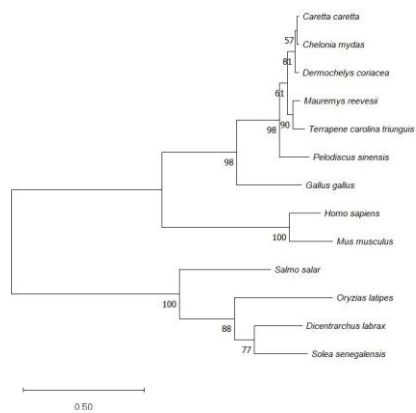
## • ELISA Amh lubina y tortuga

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 → Disponible
3. Clonación y caracterización Amh de tortuga (*Caretta caretta*)

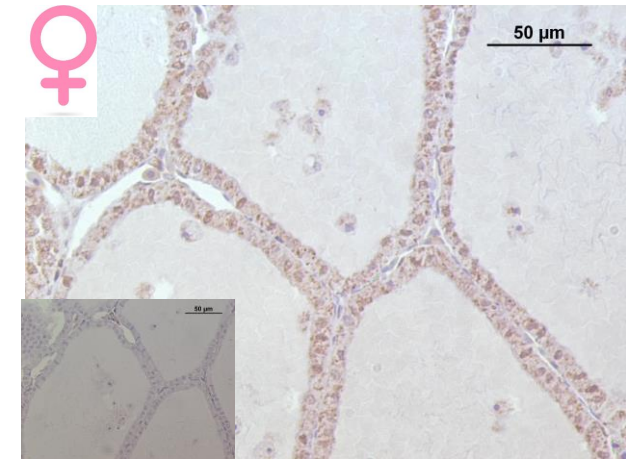
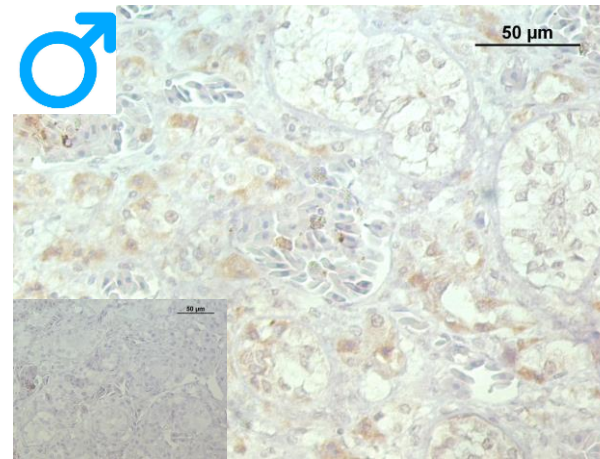
M 7 8 C'''-



Ab: anti-C amh



anticuerpo de AMH de gallo comercial



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

# Grado de consecución de las tareas

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

80%



Tarea 2.1.4 - Efecto de la **composición de piensos** sobre la calidad de la progenie en lubina. Valoración de la maduración en la **calidad del filete**

90%



Tarea 2.1.5 - **Herramientas biotecnológicas**

40%



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.

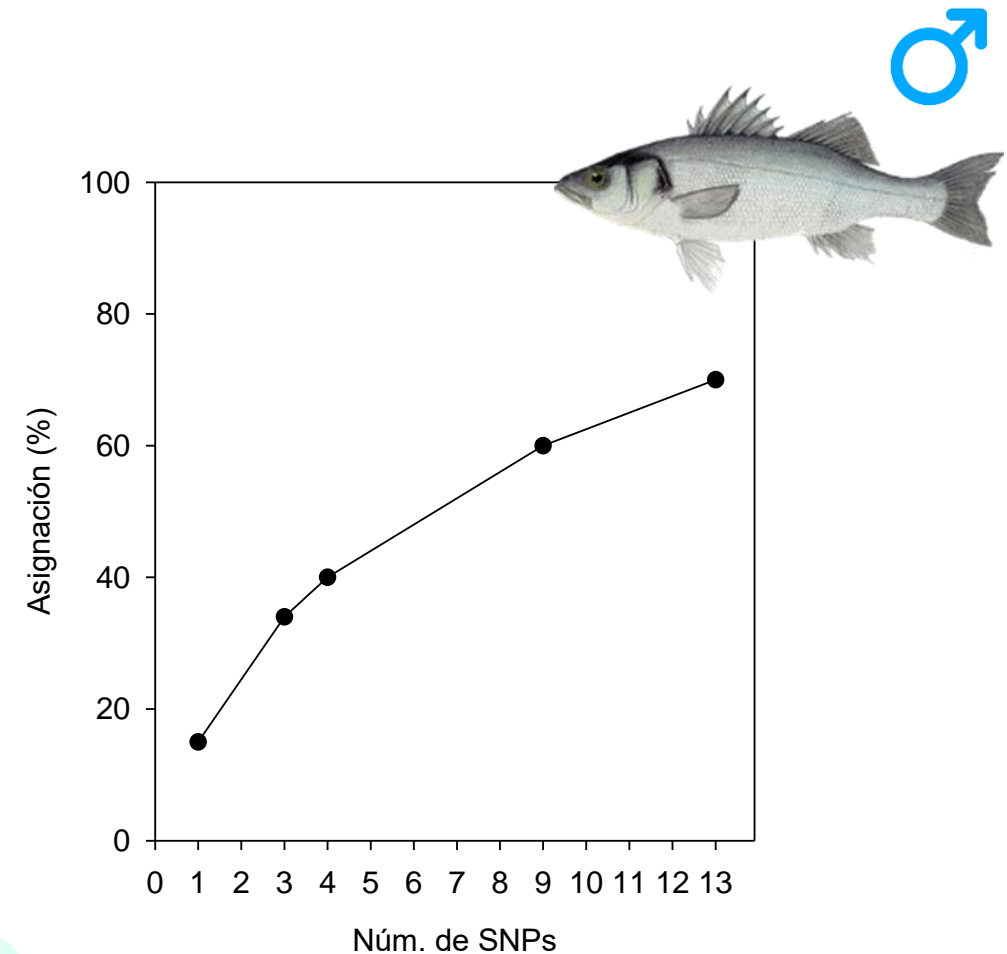


This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by *Generalitat Valenciana*



# Resultados obtenidos

- 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)



# Grado de consecución de las tareas

Tarea nº 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:

- Rediseño de las construcciones de Fshb para *Pichia pastoris* -> eliminación de sitio *BglII* interno.
- Producción de gran cantidad de proteína recombinante

- Desviaciones positivas

- Medida de la calidad de esperma en machos expuestos a temperaturas elevadas (UPV<sub>4</sub>)
- 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 con UPV<sub>4</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.
  - 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.
  - Tarea 2.1.5 (responsable CSIC<sub>2</sub>) – Desarrollo de herramientas biotecnológicas de anguila – Co-dirección de tesis doctoral de César Cruz.
- Colaboración con CSIC<sub>8</sub> en la Tarea 2.1.4 evaluando el perfil de ácidos grasos en músculo de lubina.
- Colaboración con CSIC<sub>1</sub> – análisis de estoides en plasma de dorada.
- Suministro de muestras de escamas y aletas de lubinas adultas 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

- 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.



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
- Tarea 2.3.3. Genómica de chirla y tellina.
  - Se concluirá el proceso de secuenciación de *Chamelea gallina* y de *Donax trunculus*
- Tarea 2.3.1. Identificación de SNPs asociados a caracteres productivos.
  - Se completará el estudio de polimorfismos de ADN (SNPs), y se intentará completar un mapa de ligamiento que permita determinar las regiones específicas de los cromosomas donde se encuentran asociaciones significativas a la maduración biológicamente relevantes, como la determinación del sexo, la tasa de crecimiento y la viabilidad de larva a adulto.
    - Iniciar su **validación** en **distintas poblaciones** de lubina
- Tarea 2.3.2
  - Incorporar nuevas muestras de esperma (varias spp) al criobanco.



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)



Equipo Reproducción  
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-C17.1a) and by *Generalitat Valenciana*

