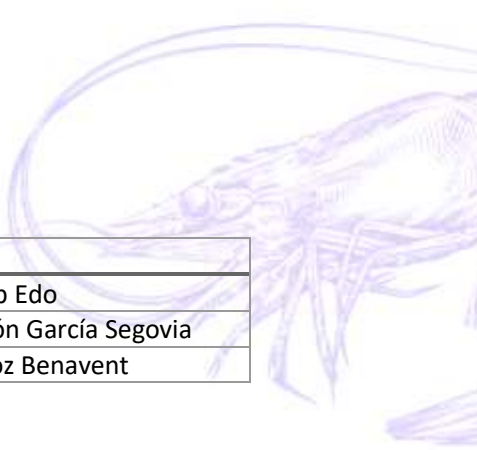


WP2. REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA (REPROGEN)

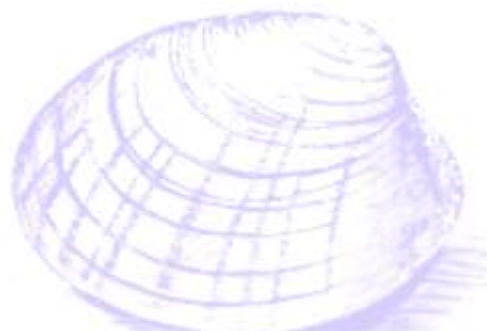
Responsables:

- 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

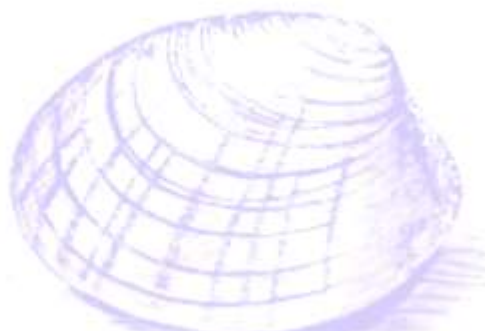
Actuación A2.10: Mejora de los sistemas de cultivo de bivalvos en todas las fases del proceso productivo tanto con origen en el medio natural como en criadero mediante:

- 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-M45) - 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: Se evaluó *in vivo* el efecto de las altas temperaturas de cultivo sobre la incidencia de la pubertad precoz (1 año de edad) y pubertad natural (2 años) en machos de lubina y la precocidad en hembras juveniles (2 años) mantenidos en condiciones naturales (grupo control, CT) y condiciones experimentales (i.e.: 3-4 °C por encima de CT) (grupo de temperatura alta, HT; 22 meses de duración). En el primer año, la temperatura afectó al crecimiento (87,4% respecto al CT), el grupo HT mostró un índice gonadosomático (GSI) menor ($1,66 \pm 0,33\%$) que el grupo 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 más bajos en el grupo HT. Durante el segundo año, el crecimiento en el grupo CT fue 89% respecto al HT, que mostraron un GSI similar al de los CT (3-4%) y un porcentaje de espermiación >80% en ambos grupos. Los niveles Fsh continuaron siendo más bajos en HT, sin afectar a la síntesis de esteroides sexuales. El porcentaje de hembras con desarrollo gonadal avanzado fue similar en ambos grupos. *In vitro* se evaluó el efecto de la temperatura sobre la esteroidogénesis en cultivos primarios de células foliculares (CF) de ovario de lubina: 15°C (baja) y 25°C (alta) y tratados con distintos precursores. Las CF fueron capaces de realizar toda la ruta esteroidogénica a 15°C y 25°C donde se observó una disminución de los niveles de expresión de *cyp19a1* pero sin afectar a su capacidad esteroidogénica.

Grado de consecución: 85%

Impacto: Se estudia por primera vez *in vivo* la influencia de la temperatura alta del agua de mar a largo plazo sobre el inicio de la pubertad y la gametogénesis en la lubina. Estudios *in vitro* han evaluado el efecto de la temperatura sobre la esteroidogénesis ovárica. Estos estudios, a nivel reproductivo y en un contexto de cambio climático, permiten evaluar potenciales repercusiones en otras especies de interés acuícola, así como implicaciones en el medio natural (biodiversidad).

Tarea 2.1.2 (M1-M42)- 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.

Colaboradores: CSIC1 & ICRA-IEO (Murcia).

Resultado: Se identificaron los genes de TRPVs y TRPA en genomas de anguila, dorada, lubina y lenguado (no en atún). Se diseñaron primers para anguila (3 genes), dorada, lubina y lenguado (4 genes). Se pusieron a punto las qPCR en anguila, dorada y lubina (pendiente en lenguado), y se usaron para determinar la

distribución tisular de los distintos genes en machos y de hembras de estas especies. Se observaron diferentes niveles de expresión de TRPVs según la especie, el sexo y el gen.

Se probó el efecto de 8 antagonistas del TRPV1 en la motilidad del esperma de anguila. Capsazepine y A784168 mostraron un fuerte efecto inhibitor (a 50 y 100 μM), que aparecía a los 30 min de incubación para el A784168 y a 15 min para el capsazepine, y que era más intenso cuando la incubación con inhibidor se hizo a temperatura ambiente en comparación con la inhibición a 4 °C.

En semen de dorada y lubina se probó el efecto inhibitor de 3 inhibidores (A784168, capsazepine, ruthenium red), y se observó inhibición con los mismos inhibidores que con anguila, A784168 y capsazepine. La mayor inhibición se produjo a los 60 min de incubación en ambos casos.

Con respecto a la estimación del potencial de membrana de los espermatozoides, en colaboración con la Universitat de València (Dr. E. O'Connor) y el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) se ha intentado poner a punto la técnica, por citometría de flujo, lo que se retomará en diciembre de 2024.

Grado de consecución: 70%

Impacto: Ha mejorado el conocimiento sobre aspectos evolutivos de los TRPVs, y sobre su papel fisiológico en el proceso reproductivo de las especies objeto de estudio. También sobre el mecanismo de activación del esperma. Se han consolidado colaboraciones con equipos franceses y suecos, de la UV y del Centro de Investigación Príncipe Felipe. Se está realizando una tesis doctoral (Fátima Fernández García, UPV) en colaboración con la Universidad de Aveiro (Portugal). Se han publicado 3 artículos.

Tarea 2.1.3 (M1-M38)- 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

Colaboradores: CSIC1 & CRA-IEO (Murcia)

Resultado: Se han realizado con esperma de las distintas especies (a excepción del atún) los challenge tests definidos en el proyecto, con el objetivo de poder llegar a identificar muestras de esperma con una especial resiliencia a los cambios ambientales previstos como consecuencia del cambio climático: aumento de la temperatura y acidificación del agua del mar. Se han analizado los efectos de la variación del pH del agua de mar, del pH del diluyente y del agua de mar, de la temperatura del agua de mar, y el efecto combinado de la variación del pH y de la temperatura del agua de mar. Este último challenge test, combinando el efecto de ambos parámetros es el que mejores resultados proporciona a la hora de discriminar muestras de esperma con distinta resiliencia a los cambios ambientales.

En resumen, los resultados indican que la movilidad del esperma de anguila y de dorada es sensible al pH del agua de mar, mientras en lubina y lenguado la movilidad espermática no se ve afectada por el mismo. Las temperaturas elevadas redujeron la movilidad espermática en lubina y lenguado.

Ha quedado pendiente la realización del test de fertilización con diferentes temperaturas y pHs del agua de mar. Se intentará abordar durante la última época de puesta de cada especie en el periodo del proyecto. Tampoco se han podido abordar los trabajos previstos con muestras de atún al no disponer de reproductores accesibles.

Grado de consecución: 85%

Impacto: Se han usado técnicas CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) para evaluar el efecto de la variación del pH y/o la temperatura del agua del mar (challenge tests) en especies de interés para la acuicultura mediterránea, y eso ha permitido valorar cuál de los challenge tests resulta más apropiado para identificar muestras/machos resilientes a esos cambios ambientales en cada especie. Estas herramientas han servido de base a los trabajos de la Tarea 2.3.2. Se han publicado 2 artículos.

Tarea 2.1.4 (M1-M45) - 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

Colaboradores: CSIC8

Resultado: Se evaluó la supervivencia (en días) sin aporte de alimento externo de larvas provenientes de dos experimentos (DT1, DT2) en los que los progenitores se habían alimentado con las siguientes dietas: DT1, relación alta, moderada y baja de ácidos grasos esenciales (DHA/EPA/ARA) y DT2, nivel de taurina alto, medio y bajo. Los resultados obtenidos mostraron que los animales alimentados con niveles altos en la relación DHA/EPA/ARA (DT1) y de taurina (DT2) tuvieron un número mayor de puestas. Además, estos animales mostraron un aumento de la supervivencia larvaria, lo que se interpretó como una mayor robustez de las progenies. Estos resultados demuestran que tanto la relación de ácidos grasos en la dieta como los niveles de taurina son factores críticos para el desarrollo gonadal y la competencia reproductiva de animales adultos. El porcentaje de machos precoces de las progenies provenientes de animales alimentados con una relación alta y moderada de ácidos grasos esenciales (DT1) no mostró diferencias significativas. En coordinación con la Tarea 3.1.3 (WP3; CSIC8) se ha analizado asimismo el perfil de ácidos grasos en músculo como indicador de la calidad del filete de animales precoces y no precoces. Los resultados obtenidos no muestran, en esta especie, diferencias de acuerdo con el estado reproductivo en ninguno de los sexos, pero sí un efecto acumulativo de la dieta, plasmado en diferencias entre los perfiles de ácidos grasos de los peces de distinta edad.

Grado de consecución: 90%

Impacto: La composición en aminoácidos y ácidos grasos de la dieta afecta a la competencia reproductiva de animales reproductores de lubina y a la calidad de su progenie. Esto supone la necesidad de re-evaluar los requerimientos de taurina y balance EPA/DHA/ARA en las dietas de reproductores. Asimismo, el perfil de ácidos grasos del filete de animales en cultivo refleja la composición de la dieta con independencia de su estado de maduración (pubertad).

Tarea 2.1.5 (M1-M45) - 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

Colaboradores: CSIC1

Resultado: 1. ELISAs para Fsh y Lh en dorada y anguila: Se diseñaron plásmidos para la expresión de Lh β y Fsh β en *Pichia pastoris*, seleccionando clones óptimos para ambas especies. La proteína Lh β recombinante de dorada y anguila está lista para enviar a una empresa que producirá los anticuerpos. Se siguen analizando los clones obtenidos de Fsh β . 2. ELISAs para Amh en lubina y tortuga boba: Se probó un anticuerpo anti-Amh en lubina ya disponible, pero no fue adecuado. Se produjo Amh recombinante de lubina en *P. pastoris* como antígeno, y está pendiente la producción de anticuerpos. Se clonó el gen amh de tortuga boba y se determinó el tamaño de su Amh madura mediante western blot. Con esta información, se diseñó un plásmido para producir Amh en *P. pastoris*, y se inició la producción y purificación a gran escala con el mejor clon. 3. Gonadotrofinas (Gths) recombinantes homólogas para maduración sexual en anguila: Se generaron plásmidos de expresión para Gths de cadena única (single-chain, sc), obteniendo clones estables en células CHO productoras de Lhsc o Fshsc de anguila. Tras producir grandes cantidades de plásmidos, se realizaron dos experimentos de transferencia génica en anguilas en las instalaciones del grupo UPV4, demostrando su efectividad para inducir maduración sexual mediante análisis hormonales e histología gonadal. Se están realizando nuevos experimentos con machos (septiembre 2024 a enero 2025) y se planea un segundo experimento con hembras.

Grado de consecución: 60%

Impacto: Los experimentos de terapia génica han mostrado resultados muy positivos en cuanto a la inducción de la maduración sexual de anguilas (machos y hembras), aunque hay que optimizar los protocolos. Los ELISAs de gonadotrofinas resultarán herramientas muy útiles a la hora de evaluar en un

futuro el efecto endocrino de cualquier tratamiento de inducción de la maduración en esta especie. Se está realizando una tesis doctoral (César Cruz Castellón, CSIC2-UPV4). Se ha publicado 1 artículo.

Objetivo 2.2

Tarea 2.2.1 (M1-M45) - 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 ha perfeccionado y validado la metodología de barcoding basada en el gen COI, tanto para la identificación de larvas individuales como para las muestras completas de plancton de tamaño mayor a las 75micras. Se ha realizado un muestreo sistemático de postlarvas y juveniles de *Donax trunculus* en el sedimento durante dos años completos y un año para postlarvas y juveniles de *Chamelea gallina* en sedimento. Además, se ha iniciado el muestreo mensual de plancton para la identificación y cuantificación de larvas de bivalvos, con énfasis en chirla y coquina. Queda pendiente completar el muestreo de plancton completo y terminar de procesar resultados para obtener las publicaciones que se asociarán a esta tarea.

Grado de consecución: 85%

Impacto: Se propondrá una metodología específica para poder identificar y cuantificar larvas de moluscos bivalvos, fundamentalmente especies de interés comercial en muestras completas de plancton mediante PCR. Se espera desarrollar dos publicaciones.

Tarea 2.2.2 (M1-M45) - 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 más de 2 año de censos de *Donax trunculus* (incluidos juveniles de menos de 5 mm) y más de un año de censos de *Chamelea Gallina*. Se ha constatado una reducción de tallas de *Donax trunculus* que comprometen la posible explotación comercial, pero además se han detectado fuertes mortalidades como consecuencia de las olas de calor marinas y al mismo tiempo el efecto de la temperatura sobre la mortalidad ha sido validado en experiencias de laboratorio. Durante 2024 se repitieron los ensayos de las respuestas basales, para diferentes temperaturas y salinidades, del biomarcador LMS en *Donax trunculus* para confirmar los efectos de la temperatura y obtener muestras para estudios de transcriptómica en relación a la adaptación/inadaptación a la temperatura. Durante esta segunda mitad de 2024 se ha iniciado el estudio de la respuesta al biomarcador LMS en las poblaciones naturales, tanto de chirla como en coquina, afectadas por diferentes niveles de estrés y se están relacionando con las condiciones ambientales y los resultados de los censos en la zona. Se ha obtenido un mapa de abundancias de ambas especies en la zona de pesca CVA-4.

Grado de consecución: 95%

Impacto: Está en desarrollo la tesis doctoral de Paula Soms Molina en el Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología Marina y Costera, que se espera finalizar en 2025. 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 ha realizado una publicación y se pretenden realizar otras tres en 2025. Además, los resultados muestran la imposibilidad de mantener el sistema de explotación pesquera

Tarea 2.2.3 (M1-M45)- 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 completado procesos de reproducción en cautividad de la chirla en el año 2023 y 2024. Se ha trabajado el acondicionamiento y crecimiento en criadero de *Donax trunculus* con buenos resultados y se está en condiciones de proponer un diseño para optimizar los crecimientos. Se han identificado las mejores condiciones para la maduración sexual y la respuesta a la inducción de la emisión de gametos. Como resultado de este estudio se ha identificado la temperatura del agua como 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, y posiblemente tengan un efecto similar en el medio natural. Se han recogido muestras de ejemplares en los bancos naturales para realizar un análisis de la influencia de la temperatura en la reproducción en el medio. Se ha estudiado 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. La cría en cautividad de la chirla durante 2024 ha permitido establecer las pautas de acondicionamiento de reproductores, inducciones de puestas, control de puestas espontáneas, y permite la comparación con resultados de 2023. Finalmente se ha podido determinar una enorme variabilidad en la tasa de crecimiento en la progenie. Se está realizando genotipado de la progenie de 2023 y de muestras de población natural con microsatélites y SNPs, para asignación parental y determinación de la variabilidad genética. Queda pendiente la publicación de los resultados.

Grado de consecución: 80%

Impacto: Se está preparando un artículo que será sometido a evaluación en breve. Se podrá ofrecer el procedimiento de selección de reproductores, acondicionamiento en criadero para Chirla y se realizará una propuesta de producción de Coquina combinando la captura de individuos no comerciales y el engorde en criadero como opción al cierre del caladero en la Comunidad Valenciana.

Objetivo 2.3

Tarea 2.3.1 (M1-M45) - 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: El objetivo de esta tarea es identificar SNPs (Polimorfismo de nucleótido único) asociados a caracteres productivos en la lubina, como la maduración y el crecimiento. Esto permitirá, localizar y caracterizar las regiones cromosómicas involucradas en el control de los mismos y, disponer de marcadores moleculares para su uso en programas de mejora y selección genética para esta especie. La búsqueda de polimorfismos asociados a la maduración ha permitido la identificación de un total de 1603 SNPs potenciales asociados con el carácter y que ahora necesitan validarse para confirmar la asociación genotipo-fenotipo. Actualmente se han seleccionado un total de 42 SNPs en base a su nivel de significación y los análisis de asociación se está llevando a cabo mediante el genotipado de SNPs usando la plataforma MassArray (Sequenom). Un total de 380 individuos procedentes de 5 cohortes se han analizado para este panel de 42 SNPs, lo que incluye un total de 285 machos inmaduros y 95 machos precoces que se han genotipado y analizado mediante el programa Genepop. De momento se han observado 13 posibles SNPs candidatos con una capacidad de asignación al carácter del 70%. Su validez está siendo analizada en las cohortes de referencia establecidas, pero no se descarta su corroboración en otras cohortes de lubina y aumentar el número de SNPs asociados al carácter.

Grado de consecución: 55%

Impacto: Se ha realizado una validación preliminar de un total de 13 marcadores SNPs seleccionados que muestran asociación al estado de maduración en la lubina (precocidad). Estudios adicionales esperan

poder confirmar esta asociación y disponer de un panel de marcadores con capacidad de asignación al carácter >95% y de aplicación en programas de selección.

Tarea 2.3.2 (M1-M38) - 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

Colaboradores: CSIC1 & ICRA-IEO (Murcia)

Resultado: Se han revisado/optimizado los protocolos de congelación de esperma de anguila, dorada, lubina y lenguado. Se han probado diferentes concentraciones de crioprotectores, y el efecto de la dilución del esperma descongelado, en diluyente inactivador. El DMSO ha proporcionado los mejores resultados, y ha resultado positivo el incluir en el protocolo la dilución del esperma descongelado.

Se evaluó la calidad de muestras de esperma descongelado de las 4 especies, diluidas o no con NAM, y mantenidas a 4 °C. Con las condiciones adecuadas, el esperma de anguila y dorada se puede utilizar sin pérdida de calidad hasta 48 h después de la descongelación. Quedan pendientes las evaluaciones postcongelación de las muestras de lubina y lenguado, que ya han sido congeladas.

Se valoró la calidad del esperma de las 4 especies congelado en cápsulas biodegradables de gelatina o hipromelosa como recipientes alternativos a las pajuelas de plástico. Las cápsulas resultaron útiles para mantener la calidad espermática.

Usando el challenge test del efecto combinado de pH y temperatura se identificaron ejemplares de dorada, lubina y lenguado que produjeron muestras de esperma resilientes a los cambios de temperatura y de pH. Se creó un criobanco de muestras de esperma resilientes a altas temperaturas y bajo pH (dorada, 50 pajuelas; lubina, 30 y lenguado, 7 pajuelas) usando los protocolos puestos a punto.

Grado de consecución: 90%

Impacto: En cada especie se ha determinado cuál de los challenge tests (tarea 2.1.3) resulta más adecuado para identificar machos resilientes a los cambios de pH y temperatura. Estas herramientas se han utilizado para seleccionar los machos resilientes, y se ha creado un criobanco de muestras seleccionadas, que se ampliará en los periodos reproductivos de cada especie en 2024-25. Se han publicado 2 artículos.

Tarea 2.3.3 (M1-M45) - 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: Secuenciación del genoma de la chirla: extracción de ADN de alto peso molecular y envío para secuenciación. Ya disponibles las secuencias obtenidas mediante Oxford Nanopore e Illumina. Se está realizando el HI-C, el ensamblaje y la anotación del genoma. Respecto a la secuenciación del genoma de *Donax* ha sido abordado por el proyecto Thinkinazul de Andalucía, RECLAM, y se colabora estrechamente con ellos en la obtención del transcriptoma y la expresión asociada a los experimentos de la Tarea 2.2.2.- (Estudio de la expresión génica mediante RNA-seq del efecto combinado de la temperatura del agua y la salinidad en la coquina (*Donax trunculus*)). Se está realizando el estudio de la expresión génica mediante RNA-seq del efecto de la temperatura del agua en la chirla.

Grado de consecución: 70%

Impacto: El hecho de tener disponibles el genoma de Chirla y Coquina es uno de los principales hitos de la tarea y abre un abanico de posibilidades de estudios para el aprovechamiento de ambas especies en el futuro. Se prepararán varias publicaciones conjuntamente con integrantes del proyecto "An integrated

multidisciplinary approach to understand bivalve fisheries collapse and recovery” del Plan Complementario I+D+I de Ciencias marinas de Andalucía.

Tarea 2.3.4 (M1-M45) - 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.

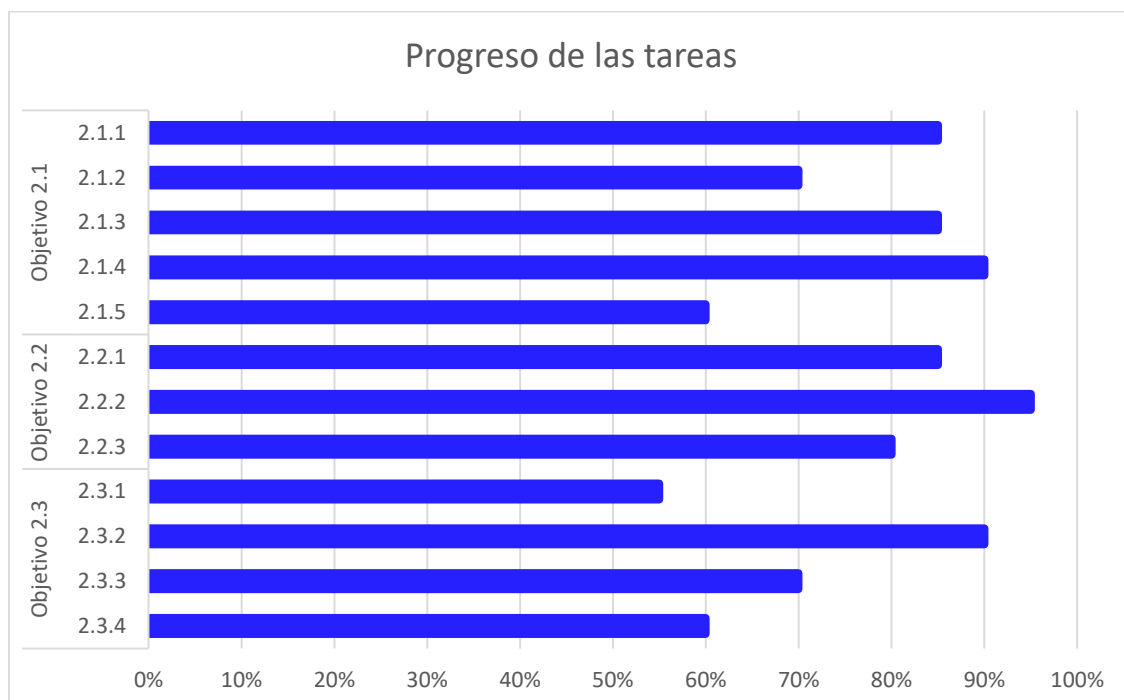
Participantes: UPV10

Resultado: Con el avance en la tarea anterior respecto del genoma de Chirla, 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 está completando el estudio de contribución de progenitores sobre 300 individuos de la progenie de 2023. Y se está analizando la progenie para polimorfismos de ADN (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. Se sigue trabajando en el genotipado de la progenie de 2023, 2024 y de muestras de población natural con microsatélites y SNPs, para asignación parental y determinación de la variabilidad genética. Quedan pendientes también la publicación de los resultados.

Grado de consecución: 60%

Impacto: Permitirá elaboración de mapas de ligamiento y estudio de familias para detección de QTLs de crecimiento y supervivencia frente a estresores como la temperatura y las olas de calor en el Mediterráneo. Se tiene prevista una publicación.

Progreso de las tareas a M33



Siendo el M1 enero del 2022