

ocimer+

SEA URCHIN RESEARCH PROJECT

Enfoque holístico para el cultivo y conservación
de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

Criopreservación de estados larvarios complejos

Alba Lago

Estudiante de Doctorado

Con la colaboración de la Fundación Biodiversidad, del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, a través del Programa Pleamar cofinanciado por el FEMP



Unión Europea

Fondo Europeo Marítimo y
de Pesca (FEMP)

Centro de Investigación Mariña

Universidade de Vigo

Entidad colaboradora en la Jornada:



CRIOGENIZACIÓN DE INVERTEBRADOS MARINOS

■ **Actualmente años 70**

■ **Desde 1990**

- **Equinodermos → Embriones y larvas**
 - Multitud de protocolos de criogenización:
- *Paredes y Bellas, 2009* → **Embriones de *P. lividus***
 - Diversas especies marinas
- **NO existe ninguno para larvas pluetus**
 - Tipos celulares



■ **Protocolo exitoso:**

- Importantes avances en su cultivo
- Aplicaciones en bioensayos
- Repoblación de poblaciones sobreexplotadas

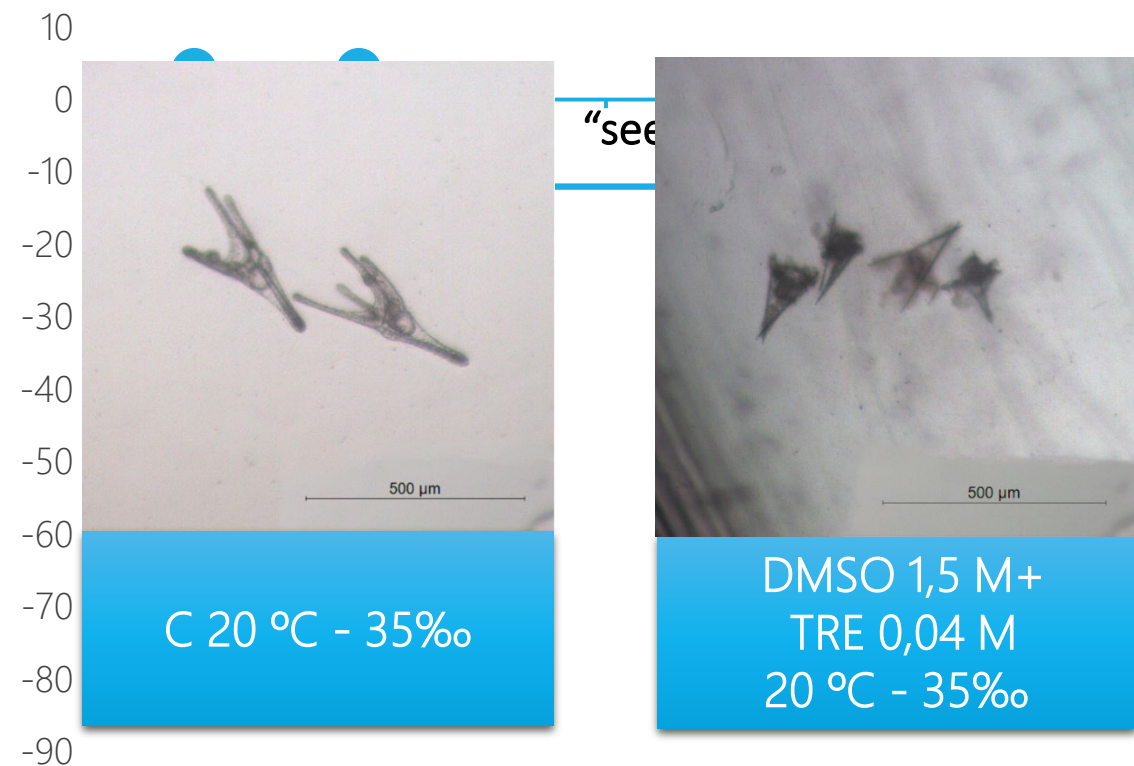
Con la colaboración de la Fundación Biodiversidad, del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, a través del Programa Pleamar cofinanciado por el FEMP

CRIOGENIZACIÓN INICIAL

PROTOCOLO → (Paredes y Bellas, 2009)

Crioprotectores

- Me₂SO 1,5 M + Trehalose 0,04 M
- 15 pasos de 0,1 M/min
- Velocidad de congelación:
 - 1 °C/min hasta -80 °C
- Descongelación a 18 °C – 3 min aprox



Con la colaboración de la Fundación Biodiversidad, del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, a través del Programa Pleamar cofinanciado por el FEMP

HIPÓTESIS

¿Es posible modular factores de estrés como la **salinidad** y la **temperatura**, para conseguir un protocolo exitoso de criogenización para larvas pluteus de *P. lividus*?

Con la colaboración de la Fundación Biodiversidad, del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, a través del Programa Pleamar cofinanciado por el FEMP



Unión Europea
Fondo Europeo Marítimo y de Pesca (FEMP)

Centro de Investigación Mariña
Universidade de Vigo

Entidad colaboradora en la Jornada:



BIENSAYOS

Salinidad

3,5 ‰ 39 ‰



20 salinidades

30,5-39 ‰

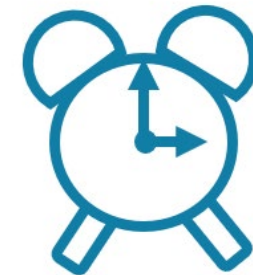
Temperatura

15 °C 30 °C



7 Temperaturas

18-20 °C



48 h

Longitud (µm)

% Normalidad

Con la colaboración de la Fundación Biodiversidad, del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, a través del Programa Pleamar cofinanciado por el FEMP



Centro de Investigación Mariña
Universidade de Vigo

Entidad colaboradora en la Jornada:

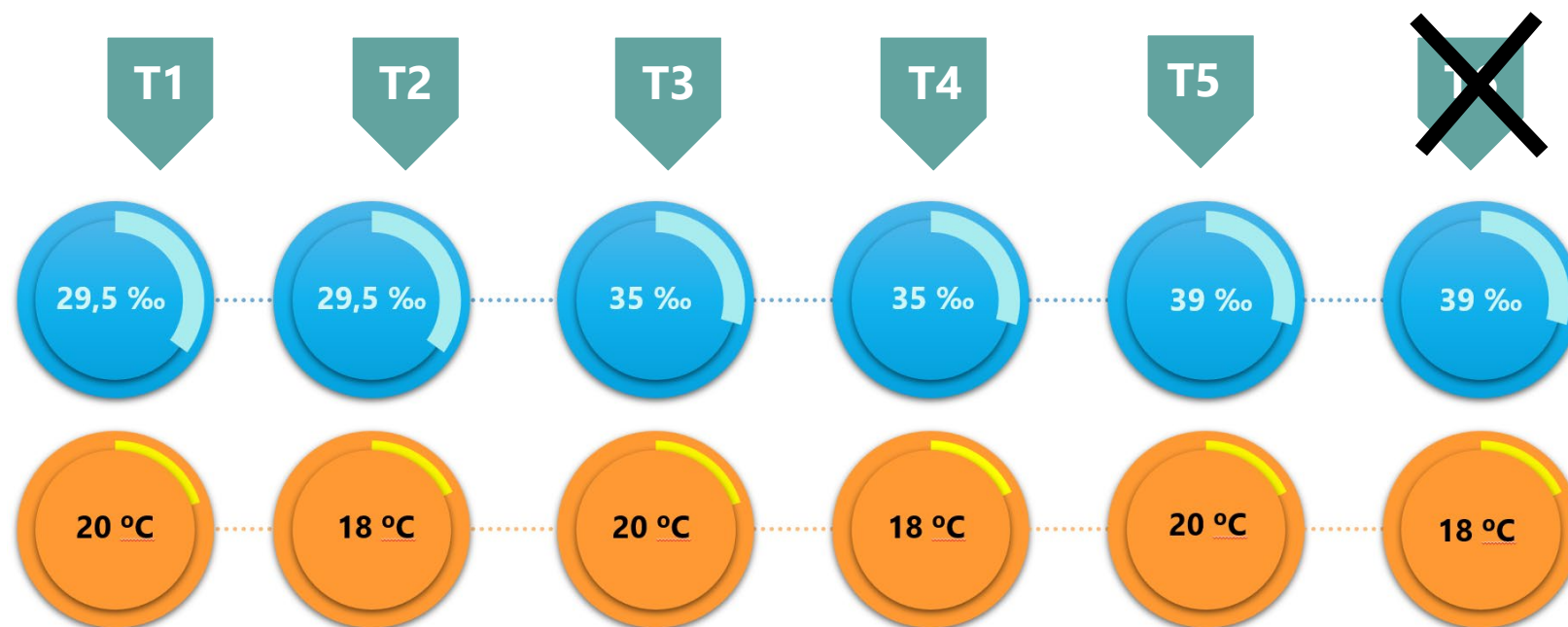


TRATAMIENTOS PRE-CONGELACIÓN



48 h

Salinidad →



Temperatura →

CONTROL

Con la colaboración de la Fundación Biodiversidad, del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, a través del Programa Pleamar cofinanciado por el FEMP



Centro de Investigación Mariña
Universidade de Vigo

Entidad colaboradora en la Jornada:

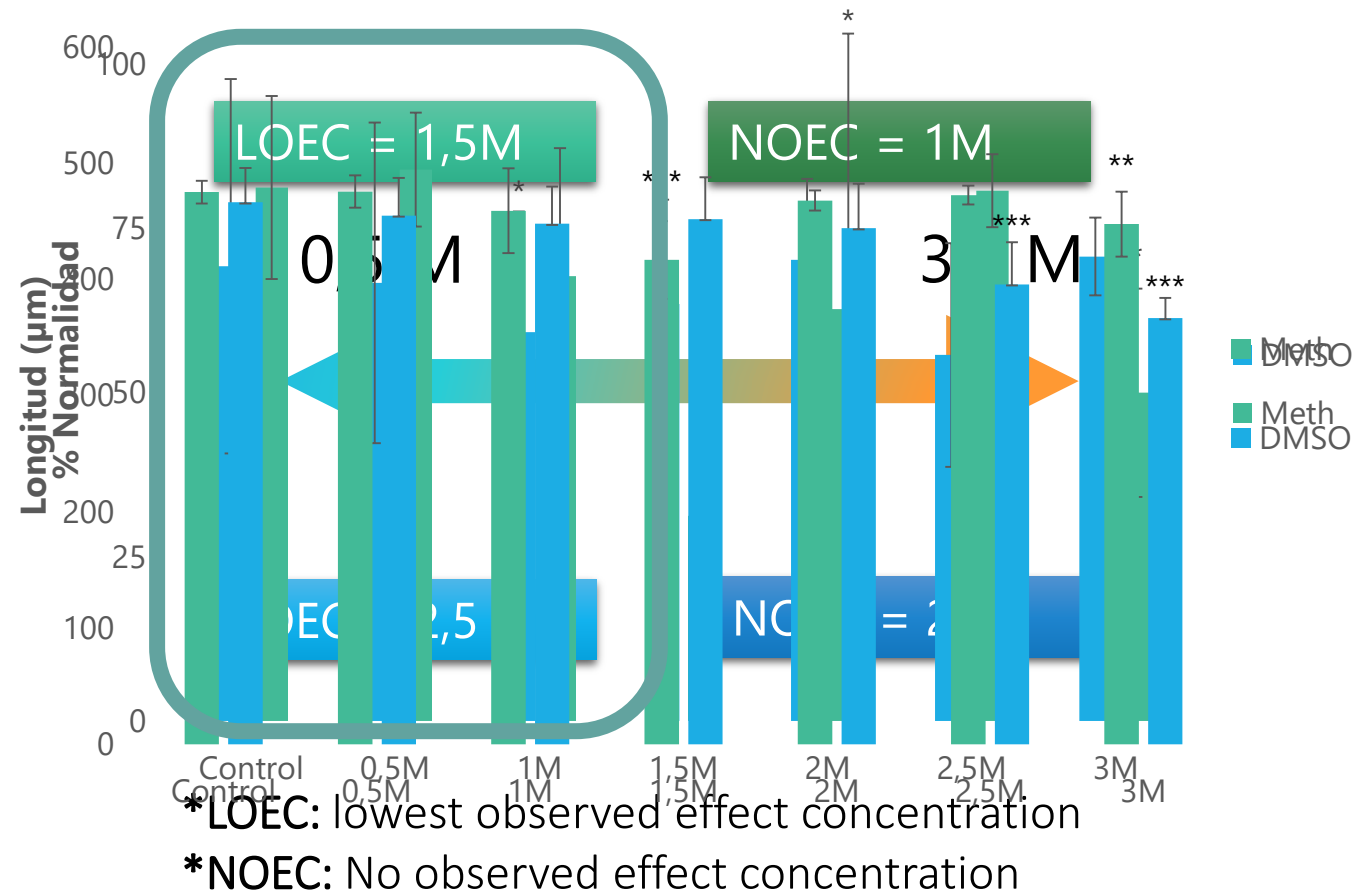




TEST DE TOXICIDAD

Crioprotectores

- Metanol (METH)
- Etilenglicol (EG)
- Propilenglicol (PG)
- Dimetilsulfóxido (Me₂SO)
- Glicerol (GLY)



Con la colaboración de la Fundación Biodiversidad, del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, a través del Programa Pleamar cofinanciado por el FEMP



Entidad colaboradora en la Jornada:

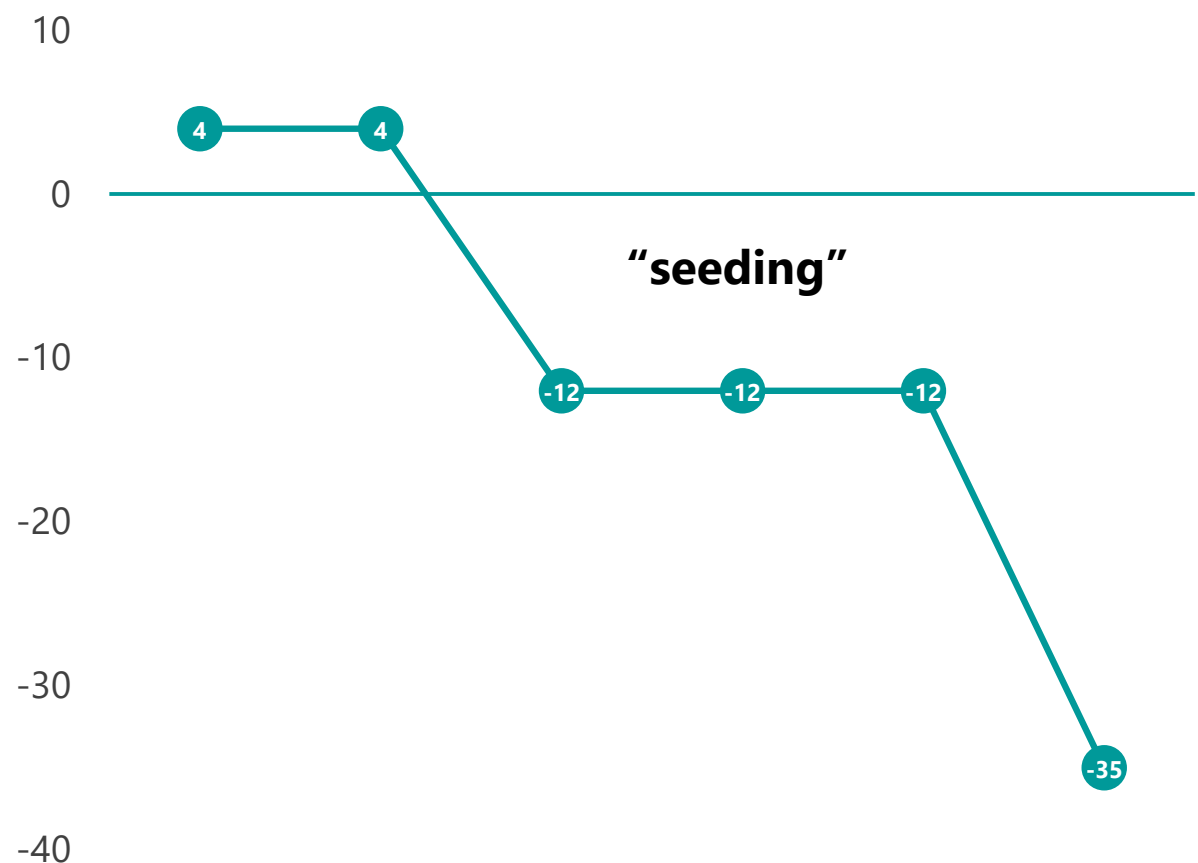


CRIOPRESERVATION PRE-TREATMENTS PRIOR-FREEZING

PROTOCOLO → (Heres *et al.*, 2021)

Crioprotectores

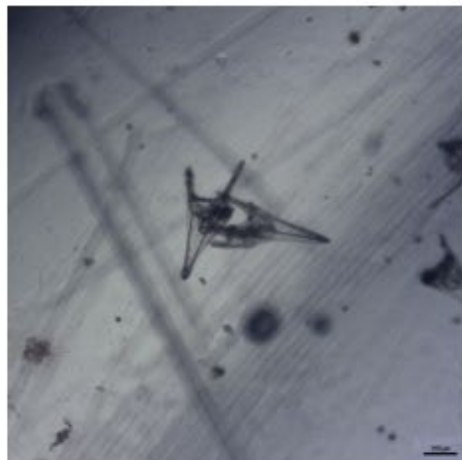
- Me₂SO 2,5 M + Trehalose 0,04 M
- METH 1,5 M + Trehalose 0,04 M
- 15 pasos de 0,1 M/min
- Velocidad de congelación:
 - 1 °C/min hasta -35 °C
- Descongelación a 35 °C – 6 s aprox



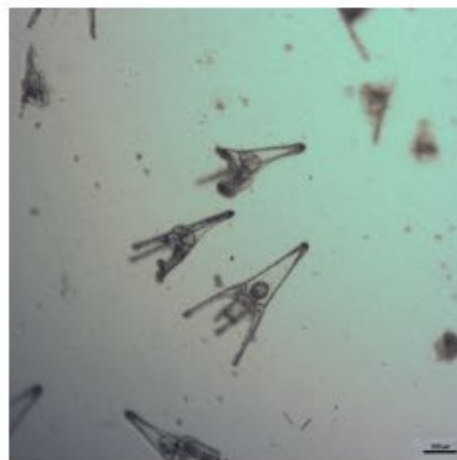
Con la colaboración de la Fundación Biodiversidad, del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, a través del Programa Pleamar cofinanciado por el FEMP



Control 20 °C 35‰



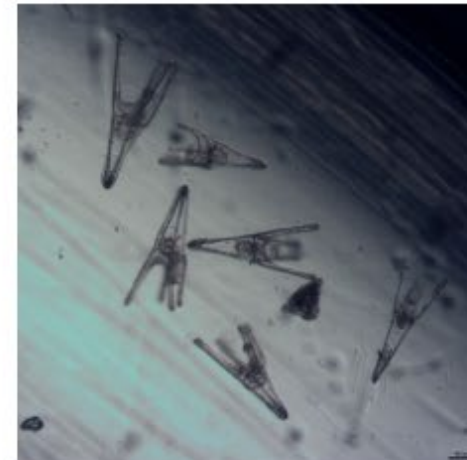
Control 18 °C 35‰



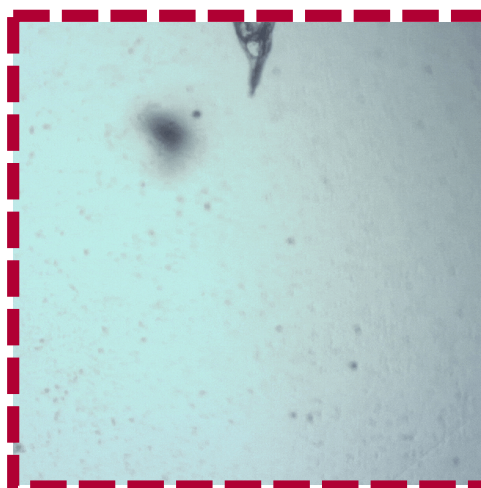
Control 20 °C 29,5‰



Control 18 °C 29,5‰



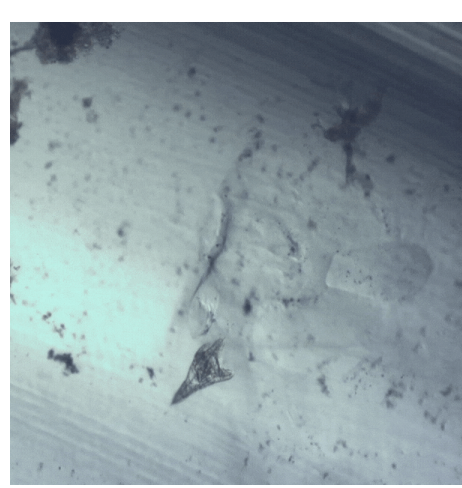
Control 20 °C 39‰



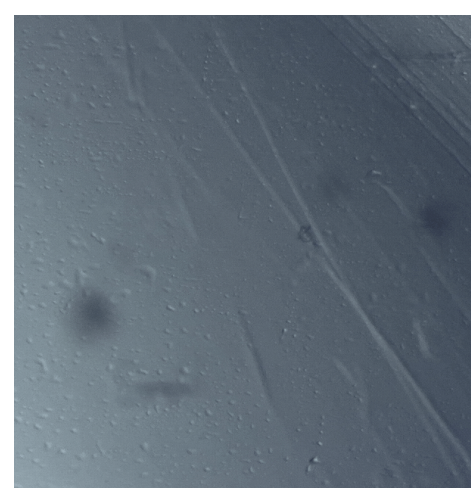
DMSO+TRE 20 °C 35‰



DMSO+TRE 18 °C 35‰



DMSO+TRE 20 °C 29,5‰



DMSO+TRE 18 °C 29,5‰



DMSO+TRE 20 °C 39‰

Con la colaboración de la Fundación Biodiversidad, del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, a través del Programa Pleamar cofinanciado por el FEMP



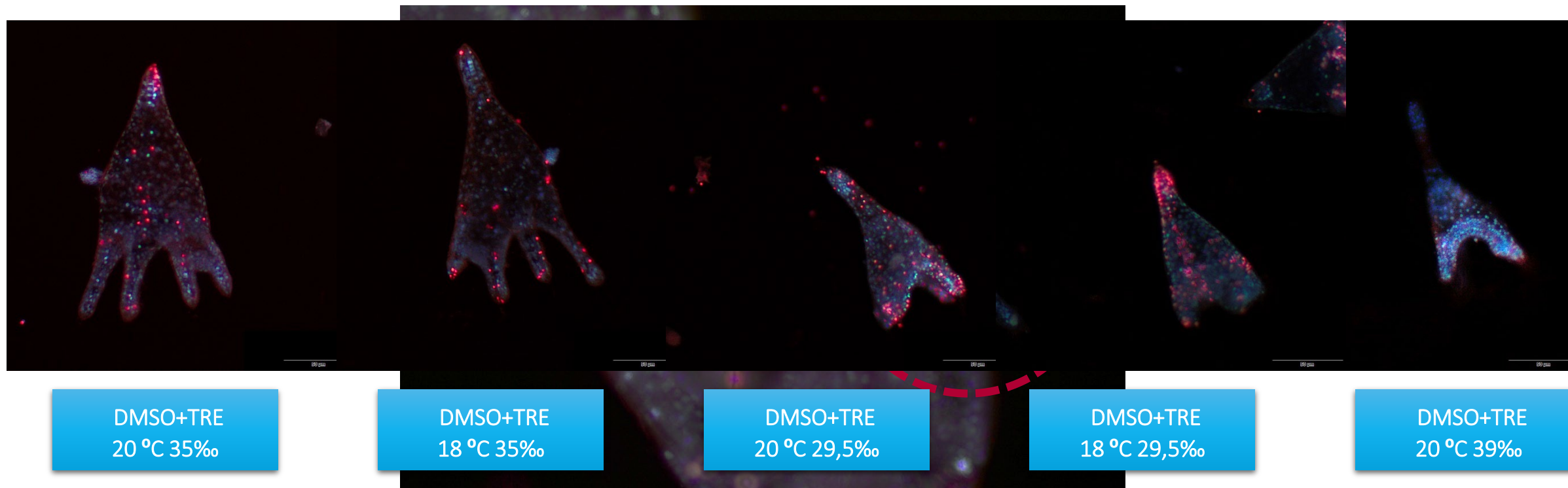
Unión Europea
Fondo Europeo Marítimo y de Pesca (FEMP)

Centro de Investigación Mariña
Universidade de Vigo

Entidad colaboradora en la Jornada:



YODURO DE PROPIDIO Y HOECHST



- Células muertas
- ADN células vivas

Con la colaboración de la Fundación Biodiversidad, del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, a través del Programa Pleamar cofinanciado por el FEMP



Centro de Investigación Mariña
Universidade de Vigo

Entidad colaboradora en la Jornada:



CONCLUSIÓN

- **Salinidad** → 30,5-39 ‰
- **Temperatura** → 18-20 °C
- NOEC y LOEC para **DMSO**, **METH**, EG, PG, y GLY

Salinidad y temperatura → EFECTO CRIOGENIZACIÓN →

35-39 ‰-20 °C

Tratamientos pre-congelación + **DMSO** a 2,5 M y **TRE** 0,04 M




1ª CRIOGENIZACIÓN
pluteus *P. lividus*

Con la colaboración de la Fundación Biodiversidad, del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, a través del Programa Pleamar cofinanciado por el FEMP



ocimer+
SEA URCHIN RESEARCH PROJECT



Alba Lago
alba.lago@uvigo.es
 **@ocimerplus**

Con la colaboración de la Fundación Biodiversidad, del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, a través del Programa Pleamar cofinanciado por el FEMP



Unión Europea
Fondo Europeo Marítimo y
de Pesca (FEMP)

Centro de Investigación Mariña
Universidade de Vigo

Entidad colaboradora en la Jornada:





Universidade de Vigo



Programa Operativo FEDER Galicia 2014 – 2020

"Promover o desenvolvemento tecnolóxico, a innovación e unha investigación de calidade"

"Unha maneira de facer Europa"

www.cim.uvigo.gal

