CENTRO DE INVESTIGACIÓNS MARIÑAS (CIMA)

**CONSELLERÍA DO MAR**

Memoria 2018

XUNTA DE GALICIA

Edita: Xunta de Galicia

Coordinación: Carlos Gabín Sánchez

Maquetación e traducción.

Ana Cruzado Estévez
Mª Adelaida Vilar Varela
Carlos Gabín Sánchez

Ano de publicación: 2020

# CENTRO DE INVESTIGACIÓNS MARIÑAS (CIMA)

# **CONSELLERÍA DO MAR**

Memoria 2018

XUNTA DE GALICIA

1. Presentación
2. Estrutura e funcións
3. Persoal
4. Servizos
5. Accións de investigación

5.1. Acuicultura

- Procedementos de cultivo intensivo de especies de interese marisqueiro. PESCIM.
- Indución da fixación e a metamorfose en ameixa fina, babosa e xaponesa. METARMORFOSE.
- Criadeiro de bivalvos: Análise integrado de datos de cultivo (biolóxicos-microbiolóxicos) e busca de indicadores prácticos (éxito-fracaso). CRIBAIN.
- Indución á viteloxénese, maduración ovocitaria, ovulación e espermatoxénese en cherna (*Polyprion americanus*). CHERNA.
- Xestión integral do ourizo de mar (*Paracentrotus lividus*, Lanmark, 1816). GINOUMAR.
- Engorda en batea de semente de berberecho producida en criadeiro. Mellora da metodoloxía de cultivo. CROQUEDOUS.

5.2. Patoloxía

- Estudo da eliminación de virus entéricos patóxenos en ostra mediante procesos de reinstalación e depuración.
- Estudo epidemiolóxico da ameixa rubia (*Venerupis rhomboides*) en Galicia afectada por colonias procariotas intracelulares (CPI). Identificación das CPI. Seguimento da estrutura de tallas de poboacións de ameixa rubia de 4 bancos da ría de Vigo.
- Determinación da posible resistencia á marteiliose dunha cohorte de berberecho *Cerastoderma edule* detectada no banco do Ariño (Vilanova de Arousa).
- Avaliación do incremento de supervivencia na engorda de ostra rizada *Crassostrea gigas* polo uso de semente descendente de superviventes á exposición prolongada ao virus herpes de ostreidos tipo 1. Identificación de marcadores moleculares de resistencia para a súa aplicación nun programa de selección de estirpes resistentes ao virus. SECOHERPES

5.3. Procesos oceanográficos costeiros

- Mellora analítica da detección de toxinas en moluscos bivalvos para maximizar o fluxo de traballo en sistemas de control. MADeTox.

5.4. Recursos mariños

- Estudo das especies exóticas *Rapana venosa*, *Stramonita hemastoma* e *Callinectes sapidus*: bioloxía, distribución e abundancia, repercusións ambientais e socioeconómicas, e medidas de prevención e protección.
- Incidencia da depredación por cangrexos, con especial referencia ao seu desenvolvemento xuvenil, sobre as primeiras fases do recrutamento de ameixa e berberechos no medio natural. CANGREXOS.
- Estudo da bioloxía, status poboacional e diversidade xenética da holoturia (*Holothuria forskali*) na ría de Vigo. HOLOTURIA.
- Estudo da variabilidade espacial do ciclo reprodutivo da navalla na ría de Vigo e a súa aplicación á xestión pesqueira. NAVALLA.
- Seguimento científico-técnico da explotación nos bancos de libre marisqueo do litoral de Galicia. Estratexia mariña integrada. BLM – EMI.

- Determinación das causas da diminución dos bancos de cadelucha. Condicionantes naturais e antropoxénicos. CADELUCHA.

6. Proxectos de investigación externos

   6.1. Proxectos de investigación nos que o Investigador Principal non é persoal investigador do CIMA

   - Exploring the biological and socio-economic potential of new/emerging candidate fish species for the expansión of the European aquaculture industry. DIVERSIFY.
   - Poboacións bacterianas en criadeiros de bivalvos. Procesos de patoxénese. BAPOHATCH II.
   - Poboacións microbianas e control de patóxenos en criadeiro de bivalvos. Cara ao criadeiro do futuro. BAPOLABinHATCH.
   - Contribución xenética para a recuperación dos bancos naturais de cadelucha (*Donax* spp.) en Galicia
   - Co-operation for restoring cockle shellfisheries and its ecosystem-services in the Atlantic Area (AA). COCKLES

7. Asesoramento á administración e ao sector
8. Actividades científicas e formativas do persoal

   8.1. Organización, presidencia de sesións e participación en foros científicos

   8.2. Formación de bolseiros/as

   8.3. Prácticas de Máster. Traballos fin de Máster (TFM) presentados

   8.4. Dirección de Teses Doutorais. Presentación de Teses Doutorais

   8.5. Participación en tribunais de Teses

   8.6. Cursos impartidos

   8.7. Edición de publicacións científicas

   8.8. Revisión de artigos en publicacións científicas

   8.9. Conferencias

9. Formación do persoal do CIMA

   9.1. Asistencia a cursos

10. Convenios de colaboración
11. Publicacións

    11.1. Artigos en revistas incluídas no SCI

    11.2. Artigos en revistas non incluídas no SCI

    11.3. Contribucións en libros

12. Outra información non contemplada nos apartados anteriores
13. Gastos
14. Fontes de financiamento

# 1 PRESENTACIÓN

O Centro de Investigacións Mariñas (CIMA) depende da Consellería do Mar, está constituído polo Centro de Investigacións Mariñas de Corón, en Vilanova de Arousa (Pontevedra), e o Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo (Lugo). A función básica destes centros é o desenvolvemento de investigacións encamiñadas a conseguir unha xestión racional e eficiente dos recursos mariños renovables no ámbito xeográfico de competencia da Administración autonómica de Galicia.

O CIMA actúa como organismo asesor da Administración pesqueira galega nas cuestións da súa competencia que demandan os diferentes sectores produtivos a través das direccións xerais e oficinas territoriais da Consellería do Mar. Tamén, mediante bolsas, ocúpase da formación de novos investigadores (con titorías e dirección de teses doutorais) e de técnicos de laboratorio.

A difusión da investigación realízase a través da asistencia e participación en reunións científicas de diverso carácter (congresos, seminarios, foros, workshops, etc.) e en numerosas publicacións científicas de diferentes ámbitos.

Durante 2018 o Centro de Investigacións Mariñas (CIMA) continuou o seu labor de investigación científica e tecnolóxica en temas mariños, orientada principalmente á acuicultura de moluscos e peces, patoloxía de moluscos bivalvos, bioacumulación e eliminación de toxinas fitoplanctónicas e a dinámica de poboacións de invertebrados mariños con interese comercial. Un traballo cuxos resultados se mostran resumidos na presente Memoria Anual de Actividades (número 20 da serie iniciada en 1999)

# CENTRO DE INVESTIGACIÓNS MARIÑAS - CIMA

**CENTRO DE INVESTIGACIÓNS MARIÑAS - CORÓN**


Dirección postal:

Pedras de Corón s/n

36620 Vilanova de Arousa

Pontevedra

Apartado de Correos nº 13

Teléfono: +34 886 20 63 64

Fax: +34 886 20 63 72

Correo electrónico: cima@xunta.gal


**CENTRO DE CULTIVOS MARIÑOS - RIBADEO**


Dirección postal:

Peirao de Porcillán s/n

27700 Ribadeo

Lugo

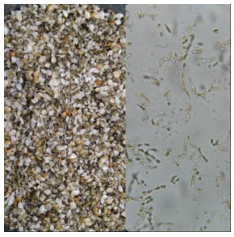
Teléfono: +34 982 88 94 03

Fax: +34 982 88 94 19

Correo electrónico: cecumar.cima@xunta.gal

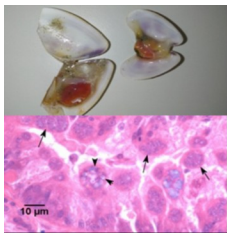
# 2 ESTRUTURA E FUNCIÓNS

A actividade científica do CIMA repártese en catro áreas de investigación:



### Área de Acuicultura

O seu obxectivo é desenvolver e mellorar os procedementos de cultivo das especies mariñas consideradas de interese comercial. O ámbito de investigación abarca dúas grandes liñas: cultivo de moluscos e cultivo de peixes




### Área de Patoloxía

O seu obxectivo é estudar as alteracións patolóxicas que afectan aos moluscos bivalvos con interese comercial, para establecer estratexias eficaces de loita que permitan minimizar os efectos patoxénicos.

### Área de Procesos Oceanográficos Costeiros

O obxectivo da área é o coñecemento dos aspectos da oceanografía relacionados coa produción dos recursos pesqueiros e marisqueiros de Galicia. As liñas de investigación relaciónanse principalmente cos episodios de toxicidade orixinados polo fitoplancto

### Área de Recursos Mariños

O obxectivo é coñecer a bioloxía, ecoloxía e dinámica de poboación das especies mariñas con interese comercial para mellorar a xestión sustentable dos recursos mariños vivos

# 3 PERSOAL

**Dirección**: D. Gabín Sánchez, Carlos

director.cima@xunta.gal

**Xerencia**: D. Villanueva Domínguez, Rafael

xerencia.cima@xunta.gal

**CENTRO DE INVESTIGACIÓNS MARIÑAS – CORÓN (Vilanova de Arousa)**

**Investigadores/as**

Dr. Blanco Pérez, Juan Carlos
juan.carlos.blanco.perez@xunta.gal

Dra. Cao Hermida, Asunción
asunción.cao.hermida@xunta.gal

Dra. Carballal Durán, Mª Jesús
maria.jesus.carballal.duran@xunta.gal

D. de Coo Martín, Alberto
alberto.decoo.martin@xunta.gal

D. Cuiñas Olmedo, Pedro
pedro.cuinas.olmedo@xunta.gal

D. Febrero Mayor, Fernando
fernando.febrero.mayor@xunta.gal

Dr. Fuentes González, José Miguel
jose.miguel.fuentes.gonzalez@xunta.gal

D. García Fernández, Antonio
antonio.garcia.fernandez@xunta.gal

Dr. Iglesias Estepa, David
david.iglesias.estepa@xunta.gal

Dna. Linares Cuerpo, Fátima
fatima.linares.cuerpo@xunta.gal

Dra. López Gómez, Mª del Carmen
carmen.lopez.gomez@xunta.gal

Dr. Montes Pérez, Jaime
jaime.montes.perez@xunta.gal

Dna. Pérez Acosta, Carmen
maria.carmen.perez.acosta@xunta.gal

Dr. Villalba García, Antonio
antonio.villalba.garcia@xunta.gal

Dra. Alonso Martínez, Ana María
ana.alonso.martinez@xunta.gal

Dra. Lorenzo Abalde, Silvia (proxecto COCKLES)
silvia.lorenzo.abalde@xunta.gal

**Analistas de laboratorio**

Dna. Fernández  Besada, Mercedes

D. Giráldez Rivero, Ramón

Dna. Solla Vicente, Mª del Carmen

(contrato de substitución)

Dna. González Fontela, Ana Isabel

Dna. Gregorio Chenlo, Mª Victoria

Dna. Mariño Cadarso, Mª Carmen

Dna. Martín Sánchez, Helena

Dna. Martínez Verde, Gemma

Dna. Méndez Pérez, Belén

**Auxiliares de laboratorio**

Dna. Brianes Beiras, Mª José

Dna. Campaña Ferro, Emilia

Dna. Cores González, Mª José

Dna. Camino Saco, Mª de los Angeles

(contrato de substitución)

Dna. Rosana Penín Búa

(contrato de substitución)

Dna. Meléndez Ramos, Isabel

Dna. Rúa Santervas, Patricia Margarita

(contrato de sustitución)

Dna. Penas Pampín, Elena

**Contratados/as por accións de investigación**

D. Fernández Abuín, Isidro

Dna. Pazos Sieira, Gema

**Sistemas de información**

D. Carballal Fortes, Félix Manuel

informatica.cima@xunta.gal

**Encargado de mantemento**

D. López Ares, Hermes

**Bolseiros/as**

Dna.Fernández González, Jenifer

D. Grande Ocampo, Oscar

Dna. Pena Thomas, Guadalupe

Dna. Viturro García, Raquel

D. Araújo Sandín, Alexis

Dna. Fuentes Villar, Noelia

Dna. Díaz Carballal, Sonia

D. Sánchez Prego, Juan José

Dna. Ameal Romero, Alba

Dna. Díaz Cedillo, Patricia

Dna. Pérez Caamaño, Alba

Dna. López Maneiro, Irene

**Xefa de negociado administrativo**

Dna. Fernández Sanmartin, Inmaculada, C.

inmaculada.fernandez.sanmartin@xunta.gal

**Biblioteca**

Dna. Álvarez Francisco, Mª Esther

biblioteca.cima@xunta.gal

**Auxiliares administrativos**

D. Martínez Paz, Angel Rubén

angel.ruben.martinez.paz@xunta.gal

**Subalternos-ordenanzas**

D. Cubiella Granda, Rubén

D. Martínez Crespo, José Manuel

**Limpador**

D. García Gamallo, Luis

**CENTRO DE CULTIVOS MARIÑOS (Ribadeo)**

**Responsable de planta**

Dra. Martínez Patiño, Dorotea
dorotea.martinez.patino@xunta.gal

**Investigadoras**

Dna. Fernández Álvarez, Aurora
aurora.fernandez.alvarez@xunta.gal
Dra. Nóvoa Vázquez, Susana
susana.novoa.vazquez@xunta.gal
Dra. Ojea Martínez, Justa
justa.ojea.martinez@xunta.gal

**Analista de laboratorio**

Dna. Bouzamayor Yáñez, Mª Victoria

**Auxiliares de laboratorio**

Dna. Cotarelo Jardón, Mª José
D. Páez Pérez, Francisco Javier
Dna. Ruíz Misioné, Mercedes
Dna. Rodríguez Alvarez, Beatriz
(contrato de sustitución)

**Bolseiros/as**

Dna. Castilla del Río, Sonia
D. Granjel Piñeiro, Eduardo
Dna. Fontán Valdivia, Nerea
Dna. Viñas Camiña, Bibiana

**Contratados por accións de investigación**

D. González Cid, Emilio Jesús
Dna. Couso da Costa, Myriam Séfora

**Oficial 1ª de mantemento**

D. Fernández Escudero, Antonio

**Oficial administrativa**

Dna. Neira Páez, Concepción
concepcion.neira.paez@xunta.gal
Dna. Vilar Varela, Adelaida (contrato de sustitución)
adelaida.vilar.varela@xunta.gal

**Administrativa**

Dna. Cruzado Estévez, Ana
ana.cruzado.estevez@xunta.gal

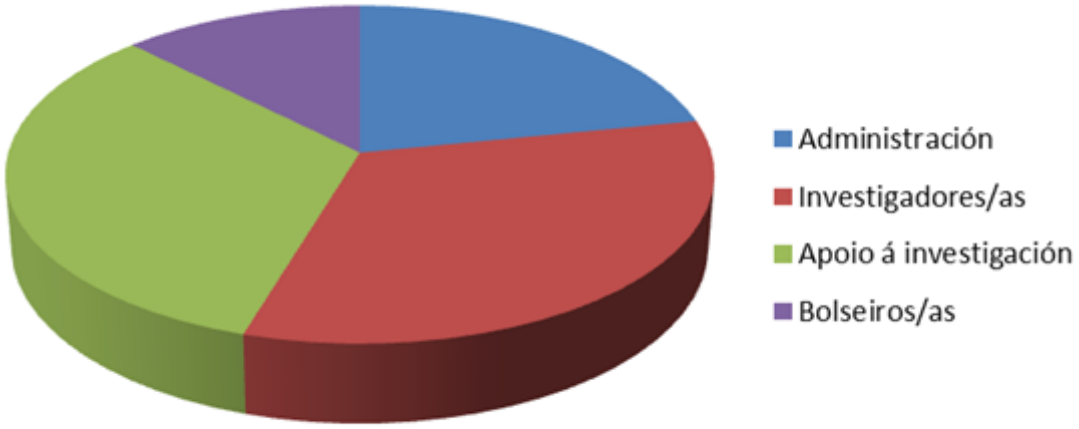
**Subalterno**

D. Pérez Alvarez, Carlos (desde 09/07/18)

**Limpadora**

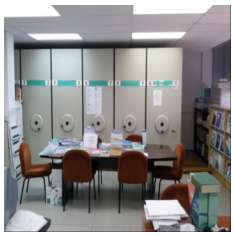
Dna. Fernández Goás, Carmen

| CIMA | Corón | Ribadeo | Total |
|---|---|---|---|
| Administración | 9 | 5 | 14 |
| Investigadores/as | 16 | 4 | 20 |
| Con cargo a proxectos | 1 | | 1 |
| Apoio á investigación | 13 | 4 | 17 |
| Con cargo a proxectos | 2 | 2 | 4 |
| Bolseiros/as | 6 | 2 | 8 |



# 4 SERVIZOS

## BIBLIOTECA



A Biblioteca do CIMA é unha biblioteca especializada en información científica sobre recursos mariños, oceanografía, acuicultura,… que atende as necesidades de información do persoal do Centro de Investigacións Mariñas de Corón (CIMA) e do Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo (CECUMAR) , así como consultas puntuais doutro persoal da Consellería. O acceso para outros usuarios é público pero de carácter restrinxido (previa autorización).

### Instalacións da biblioteca

No Centro de Investigacións Mariñas de Corón, a Biblioteca atópase situada na segunda planta, nunha sala única que cumpre a tripla función de despacho, depósito e espazo de consulta/lectura. A biblioteca pon a disposición dos usuarios un par de mesas de traballo individual/en grupo e un ordenador de consulta.

No Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo, atópase situada na terceira planta, nunha sala dedicada a depósito, consulta e lectura.

**Horario**: de luns a venres de 9 a 14 horas.

**Contacto**:

CIMA-Corón: Telf.: 886 20 63 60 Correo electrónico: biblioteca.cima@xunta.gal

CIMA-Ribadeo: Telf.: 982 88 94 02

**Colección**:

- Fondo bibliográfico: está composto por aproximadamente 1.500 volumes en Corón e 700 en Ribadeo. Actualmente a Biblioteca iniciou un proceso de catalogación destes fondos, co obxectivo de poñer a disposición dos posibles interesados un catálogo de consulta aberta accesible online que posibilite:

  - A consulta conxunta dos fondos existentes en ámbalas localizacións e dispoñibilidade (condicións de consulta, prestado ata…).
  - A localización e información sobre acceso aos fondos de interese (enlazado e información sobre dereitos).
  - A xestión online das interaccións habituais entre calquera biblioteca e os seus usuarios: desideratas, préstamos, renovacións, reservas, ...
  - A interacción dos usuarios coa súa bibliografía de interese: listas personalizadas, descarga de rexistros ao xestor bibliográfico, puntuación e comentarios/apuntas en relación aos documentos,…

- Publicacións periódicas: no 2015 o CIMA e o Consorcio de Bibliotecas Universitarias de Galicia (CBUG), asinan un convenio de colaboración que posibilita o acceso consorciado a tres coleccións de grandes editores (Elsevier, Springer e Wiley), sumando un total que rolda os 5.000 títulos de revistas científicas accesibles.

- Bases de Datos: na actualidade, o CIMA conta con acceso á Web of Science (WoS) da empresa Thomson Scientific, grazas á licenza contratada polo Ministerio de Educación y Ciencia e xestionada pola FECyT, co fin de dar acceso a estes recursos de información científica ás institucións públicas de investigación.

- A maiores dos recursos dispoñibles mediante adquisición/contratación, dende a biblioteca faise un labor de localización e clasificación de fontes de información en acceso aberto, tratando de visibilizar as súas posibilidades de uso á vez que se complementa a colección de base.

### Servizos da biblioteca

- Sala de lectura.

- Información sobre os recursos dispoñibles e acceso aos mesmos http://www.netvibes.com/bibliotecacima.

- Préstamo interno.

- Servizo de obtención de documentos.

- Asesoramento no planeamento de procuras e consulta de fontes de información secundarias.

- Orientación no uso de ferramentas de xestión de información.

- Formación no uso de xestores bibliográficos (EndNote Desktop/Web, Mendeley, Zotero).

- Atención a usuarios/sesións de formación mediante videochamadas (Skype/Hangouts).

O CIMA mantén a maiores subscrición directa a un reducido número de títulos especializados que non forman parte dos paquetes consorciados.

### SALÓN DE CONFERENCIAS

O Centro de Investigacións Mariñas de Corón conta cun salón de conferencias con capacidade para 84 persoas.

O acceso é público pero de carácter restrinxido (presta servizo a usuarios internos e a usuarios externos autorizados).

### SALAS DE XUNTAS

O CIMA-Corón conta con dúas salas de xuntas, unha con capacidade para 10 persoas e unha con capacidade para 15 persoas.

O Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo dispón dunha sala con capacidade para 15 persoas.

# 5 ACCIÓNS DE INVESTIGACIÓN CIMA

## 5.1 Accións de investigación en ACUICULTURA

| **Título da Acción de investigación – Acrónimo – Código CIMA** | |
|---|---|
| **Procedementos de cultivo intensivo de especies de interese marisqueiro**. PESCIM. CIMA 17/02. | |
| **Investigador/a Principal** | |
| Dorotea Martínez Patiño | |
| **Outros/as investigadores/as participantes** | |
| CIMA: Susana Nóvoa Vázquez; Justa Ojea Martínez; Jaime Montes Pérez. | IGAFA: Miguel Ángel Lastres Couto; María del Carmen Andrés Rivas<br>USC: Juan Luis Barja Pérez; Susana Prado Plana |
| **Técnicos/as** | **Bolseiros/as** |
| Victoria Bouzamayor Yáñez; Mª Josefa Cotarelo Jardón; Francisco Javier Páez Pérez; Beatriz Rodríguez Álvarez; Mercedes Ruíz Misioné; María José Brianes Beiras; Elena Penas Pampín; Patricia Margarita Rúa Santervas; Isabel Meléndez Ramos. | Sonia Castilla del Río, Sonia; Eduardo Granjel Piñeiro; Nerea Fontán Valdivia; Bibiana Viñas Camiña |
| **Entidade que financia**: Consellería do Mar - Xunta de Galicia | |
| **Data de inicio**: Marzo de 2017 | **Data de finalización**: Decembro de 2018 |


**RESUMO**

O aproveitamento da produtividade natural nos bancos marisqueiros está limitado polos procesos naturais que se desenvolven con diferentes resultados nas zonas explotadas polas confrarías. Cando se trata de aumentar os ingresos por mariscador/a, é necesario aplicar técnicas de acuicultura para profundar na profesionalización deste sector, e permitir mellorar os resultados de explotación.

Un aspecto de interese, que debe terse en conta, é a necesidade de diversificar as especies para reducir os riscos asociados cos monocultivos, e chegar a tantos mercados como sexa posible nun contexto de globalización.

Un aspecto de interese, que convén ter en conta, sitúase na necesidade da diversificación de especies para minorar os riscos asociados aos monocultivos, e para chegar á maior cantidade posible de mercados nun contexto de globalización.

Diferentes accións de investigación, desenvoltas principalmente no CIMA de Ribadeo, permitiron diferentes protocolos e procedementos para o cultivo intensivo dalgunhas das principais especies de mariscos como a ameixa fina (*Ruditapes decussatus*); ameixa babosa (*Venerupis corrugata*); ameixa rubia (*Polititapes rhomboides*) e ameixa xaponesa (*Ruditapes philippinarum*); cadelucha (*Donax trunculus*), navalla (*Ensis magnus*) e longueirón (*Ensis siliqua*).

A unión dos novos coñecementos adquiridos cos estudos citados, e a aplicación destes métodos de instalacións de custo relativamente baixo, como as dos minicriadeiros situados no Instituto Galego de Acuicultura (IGAFA), permite obter resultados de produción que serían aplicables nas confrarías que estiveran dispostas a realizar un investimento como este, encamiñado a incrementar a produtividade dos seus bancos.

Desde un punto de vista microbiolóxico, un criadeiro de bivalvos debe considerarse como un todo, cun fluxo continuo de microorganismos entre os diversos compartimentos.

En moitos casos, esta microbiota é inofensiva ou mesmo beneficiosa/necesaria para o desenvolvemento axeitado dos cultivos, pero tamén existe o risco de proliferación de patóxenos oportunistas que limitan a produción.

Estes son, na súa maioría, bacterias do xénero Vibrio. Aínda que este xénero é compoñente habitual da microbiota mariña, e só algunhas especies son capaces de causar

mortaldades nos cultivos larvarios, os protocolos de control baseados na presenza de vibrios resultan de utilidade.

Os dous compartimentos transversais nun criadeiro son a auga de mar e o fitoplancto, cos seus circuítos de distribución. O control microbiolóxico mediante protocolos específicos para cada instalación é imprescindible para avaliar a calidade da auga e o alimento, a idoneidade dos circuítos e a efectividade dos tratamentos empregados.

En conxunto, aportan información imprescindible do risco de entrada de potenciais patóxenos.

Por outra banda, as novas tecnoloxías e os avances experimentados nos sistemas de preengorde de semente (obtida previamente en criadeiro), tentan solucionar os problemas que dificultan pasar de uns poucos milímetros a un tamaño que poida ser sementada directamente nos bancos naturais.

O percorrido que ata o de agora realizou a Consellería do Mar na formación de técnicos en acuicultura no IGAFA, coas diferentes promocións de bolseiros que completaron as súas capacidades profesionais en instalacións tipo minicriadeiros, permitiu contar con técnicos cualificados para levar a cabo as tarefas de cultivo. Necesarias para producir semente de moluscos bivalvos e tamén para poder desenvolver labores de asistencia técnica nas confrarías.

O obxectivo principal desta Acción é desenvolver coñecementos científicos e aplicar os protocolos deseñados no CIMA-Ribadeo para o cultivo de novas especies de interese marisqueiro, para mellorar a transferencia de procedementos para a produción de moluscos bivalvos, e poñer ao dispor do sector técnicos formados especificamente nestas técnicas.

Para iso abordáronse os seguintes obxectivos e tarefas:

- continuouse afondando nos protocolos de manexo das especies de moluscos bivalvos coas que xa se traballou en accións anteriores.
- abordáronse procedementos de cultivo para aquelas de máis recente incorporación como ameixa rubia.
- definiuse o ciclo reprodutivo da ameixa bicuda e do berberecho ao longo do ano para poder precisar con maior exactitude as mellores épocas para obter as desovas en criadeiro.
- probáronse diferentes sistemas para o preengorde de semente, avaliando o seu rendemento e rendibilidade para diferentes especies; controlouse o crecemento no medio natural das diferentes especies, desde que son trasladadas aos parques de cultivo cun tamaño comprendido entre 10-15 mm ata que conseguen o tamaño comercial, ou polo menos durante o tempo de duración da Acción de investigación.
- formouse a técnicos de acuicultura en novos procedementos e/ou cultivo de novas especies, ampliando as súas competencias profesionais durante o período formativo como bolseiros en réxime de empresa tutelada no IGAFA.
- transferíronse ao sector acuícola técnicas e/ou sistemas mellorados para a produción de semente, o seu preengorde, e a engorda no medio natural.
- abordouse en profundidade o estudo microbiolóxico e histopatolóxico nas instalacións do IGAFA conseguindo deseñar un protocolo de control e asesorando e formando aos bolseiros que traballaron nestas instalacións.

**RESULTADOS**

**1) Protocolos para o manexo de especies de moluscos bivalvos**

Os protocolos de cultivo das ameixas, babosa, fina, xaponesa e bicuda foron descritos na Acción anterior: “Cultivo intensivo de especies de interese marisqueiro abordando a produción rendible de semente” (PGIDIT-CIMA 14/06).

Nesta nova Acción continúase co cultivo destas especies seguindo ditos protocolos, concretándose certos aspectos que optimizaron o cultivo da navalla e rematouse de configurar o protocolo da ameixa rubia.

Cultivo de ameixa babosa (*Venerupis corrugata*)

Os reprodutores de ameixa babosa estabúlanse no criadeiro en outono e inverno, e as desovas son tamén nesta época.

Cultivo de ameixa fina (*Ruditapes decussatus*)

Os proxenitores estabúlanse no criadeiro entre maio e xullo aproveitando a época de madurez no medio natural. As desovas obtéñense entre os meses de maio e agosto.

Cultivo de ameixa xaponesa (*Ruditapes philippinarum*)

No criadeiro estabúlanse os proxenitores dende maio a agosto e as desovas obtéñense durante o verán (entre maio e setembro)

Cultivo de ameixa bicuda (*Venerupis aurea*)

Estabuláronse reprodutores de ameixa bicuda procedentes de Cangas do Morrazo para a obtención de desovas e posterior cultivo larvario. Os traslados foron cunha periodicidade mensual porque se usaron tamén para facer o estudo do ciclo gametoxénico.

Cultivo de ameixa rubia (*Polititapes rhomboides*)

Os reprodutores empregados para a obtención de larvas estabuláronse no criadeiro entre os meses de novembro e abril. Os tanques de estabulación son rectangulares de fibra de vidro de 100 L de capacidade, e se estabulan uns 3 kg

aproximadamente por tanque. Os tanques teñen unha achega continua de auga de mar a temperatura ambiente cun fluxo de 30-40 L/h e aireación constante.

A alimentación adminístrase diariamente cunha dieta mixta de microalgas: T*etraselmis suecica, Isochrysis galbana, Diacronema lutheri, Chaetoceros calcitrans* e *Skeletonema costatum.*

Cultivo de navalla (*Ensis magnus*)

Levouse a cabo no inverno-primavera. Traballouse con reprodutores subministrados polas confrarías de Cangas do Morrazo e Moaña, xa que estas confrarías están interesadas en facer repoboacións con esta especie nos seus bancos naturais. Estes reprodutores se estabulan no criadeiro entre os meses de xaneiro a abril e obtéñense desovas durante este período.

Ensaiáronse diferentes sistemas (botellas, cilindros colgados en tanques e contedores con peneiras de luz de malla 1 mm colocados no fondo de tanques).

**2) Definir o ciclo reprodutivo da ameixa bicuda e do berberecho**.

Un dos obxectivos foi definir o ciclo reprodutivo da ameixa bicuda e do berberecho ao longo do ano para poder precisar con maior exactitude as mellores épocas para obter as desovas en criadeiro. Para poder completar este obxectivo requirirase obter individuos mensualmente, coa colaboración das confrarías con este recurso, para poder dispoñer das mostras necesarias.

Durante o ano 2017 recolléronse mostras de individuos adultos de ameixa bicuda e de berberecho cunha periodicidade mensual (aínda que por problemas na recollida faltaron mostraxes en ambas especies). Cando os individuos chegan ó criadeiro, estes son estabulados en tanques con auga de mar filtrada durante polo menos 24 horas para que depuren as areas que despois poden interferir na preparación dos cortes histolóxicos. Seguindo os métodos de histoloxía clásicos, coa observación das preparacións marcando unha escala xa utilizada para as outras especies, púidose concretar que a ameixa bicuda presenta bastante asincronía no desenvolvemento gonadal podendo solaparse en cada mostraxe individuos en varias fases. Ten un período de repouso gonadal que comezaría en agosto e continuaría ata febreiro. En marzo e abril unha porcentaxe importante de individuos estarían xa en fases avanzadas da gametoxénese e a época de madurez e desovas centraríase nos meses entre abril e agosto.

O berberecho presenta a maioría da poboación en fase de madurez dende o mes de abril ata o mes de setembro e na fase de repouso gonadal dende setembro a decembro.

**3) Ensaiar diferentes sistemas para o preengorde de semente**.

No CIMA de Ribadeo só se fixo o preengorde nun sistema de batea ou estrutura flotante situada no pantalán do Porto Pesqueiro de Ribadeo.

Trátase dun sistema destinado ao preengorde experimental de semente de bivalvos dende tamaños de 3-5 mm ata conseguir tamaños preto dos 15 mm,optimizar as supervivencias cando se sementa nos bancos naturais. Con el conséguese abaratar custes de mantemento, enerxía e produción de microalgas.

Basease na entrada de auga mediante fluxo forzado invertido (de abaixo a arriba), sendo o aire o elemento dinamizador da auga. Coa entrada de auga de abaixo a arriba, a semente depositada no fondo dos contedores (cubos de 50 L de volume) aproveita todo o fitoplancto que existe no medio natural.

O aire que provoca o fluxo invertido é impulsado mediante un sóprante eléctrico. O abastecemento de enerxía eléctrica procede dunha toma de Portos de Galicia sita no peirao, preto do pantalán.

As dimensións da estrutura flotante son: eslora 6,50 m; manga 6,30 m e puntal 0,60 m. A súa capacidade de carga é de aproximadamente 4,5 Tm.

A plataforma está formada polos seguintes compoñentes: 8 flotadores fabricados de polietileno e recheos de polietileno expandido; estrutura de tubos de aceiro galvanizado unidos con abrazadeiras; cuberta de pranchas de PRVF antideslizante e grúa de elevación de 2,8 m de altura e 3,75 m de alcance, cunha capacidade máxima de elevación de 500 kg.

Conta con 3 corredores lonxitudinais e 4 transversais, entre os que hai 4 espazos onde se situarán os cubos de cultivo. Cada oco ten unha superficie de cultivo de 2,7 m2 o que proporciona unha superficie útil de 16,2 m2.

Este sistema para preengorde de batea resulta efectivo para todas as especies de ameixas aínda que os resultados de crecemento son peores nos meses de inverno. Destaca a negativa influencia das baixadas de salinidades detectadas neste período do ano que afectan á ameixa babosa e bicuda, provocándolles altas mortaldades.

A ameixa xaponesa e fina son especies que resisten mais esas condicións e teñen mellores resultados na batea neste mesmo período.

Nas instalacións do IGAFA fixéronse ensaios con diferentes sistemas de preengorde: sacos en gaiolas, lanternas e upwellings. Colocados na batea que ten o IGAFA no polígono preto do centro.

Os bidóns con air-lift colocáronse nunha estrutura que se fixo nun pantalán semellando a plataforma que se sitúa en Ribadeo.

Os resultados tras case catro meses permitiron concluír que nas condicións empregadas, o nivel inferior do upwelling (bidóns con air-lift) ten resultados de crecemento 4 veces

maiores que en saco e 3 veces superiores aos das lanternas. A supervivencia non é un factor decisivo para escoller calquera dos tres sistemas xa que se comportan de forma similar.

**4) Finalizar o control de crecemento no medio natural das diferentes especies**

Ao longo do tempo que durou esta Acción, entregouse semente a distintas confrarías de tódalas especies de moluscos bivalvos coas que traballamos no criadeiro:

ameixa babosa (*Venerupis corrugata*); ameixa fina (*Ruditapes decussatus*); ameixa xaponesa (*Ruditapes philippinarum*); ameixa bicuda (*Venerupis aurea*); ameixa rubia (*Venerupis romboides*) e navalla (*Ensis magnus*). O tamaño medio da semente entregada foi para as ameixas de 10 mm e para as navallas de 18 mm.

Púidose comprobar mediante o seguimento por vídeo o bo resultado das sementeiras de navalla e ameixa bicuda no medio natural, concretamente na zona submareal. No caso das outras especies sementadas no medio natural, compre rematar que a recompilación de datos do seu seguimento, foi levado a cabo polas asistencias técnicas das confrarías ás que se lles achegou a semente.

Estase a seguir coas entregas de semente ás Confrarías xa que o crecemento de todas estas especies é uniforme, polo que quedan aínda individuos en fase de preengorde.

Do seguimento no medio natural, encargaríanse as asistencias técnicas das correspondentes confrarías. Da navalla e da ameixa bicuda non se obtiveron datos dado que foron sementadas no submareal e é complexo o seu seguimento.

Ata o momento conseguíronse datos das seguintes especies:

Ameixa babosa (*Venerupis corrugata*)

En agosto trasládase semente de ameixa babosa á ría do Burgo na Coruña. A semente vai separada en tres lotes segundo o tamaño da peneira usada:

- Ameixas retidas en peneira de 5 e 6 (T5-6): tamaño medio11,83 mm. Colócase en dous panteras con oito cuarteirón colgados dunha boia na entrada da ría do Burgo.
- Ameixas retidas en peneira de 4 e 4,5 (T4-4,5): tamaño medio 8,88 mm. Colócase nunha lanterna de seis pisos colgada dunha boia no mesmo sitio que o lote anterior.
- Ameixas retidas en peneira de 3 e 3,5 (T3-3,5): tamaño medio 6,5 mm. Esta ameixa colócase en bolsas ancoradas en mesas nun cultivo sobreelevado que se sitúa no parque do Estado na ría do Burgo.

Ameixa fina (*Ruditapes decussatus*)

No mes de outubro trasládase un lote de ameixa fina a Baldaio para facer o seguimento do crecemento no medio natural. A semente separouse por tamaños en dous lotes: un de peneira 5 (T5) cun tamaño medio de 10,36 mm e o outro de peneira 4 (T4) con tamaño medio de 7,8 mm. Controláronse estes dous lotes por separado. Ao principio a semente colócase en bolsas nun cultivo en mesas sobreelevadas na zona intermareal.

Ameixa xaponesa (*Ruditapes philippinarum*)

En outubro, despois dun preengorde en batea de 5 meses trasládase un lote de semente dun tamaño medio de 10 mm para sementar no medio natural. A sementeira faise nunha zona coñecida como banco da Vilavella (Ribadeo). Prepárase un parque de cultivo e protéxese a semente de depredadores cunha rede. Fanse controis periódicos de crecemento e a semente mantense neste parque ata que alcanza o tamaño mínimo legal de venta.

No mes de marzo trasládase ao medio natural (Baldaio) outro lote para facer o seguimento do seu crecemento. É un lote que pertence á semente cunha unha talla media de 8,34 mm, e cando se leva ao medio natural colócase nun sistema de bolsas en mesas sobreelevadas na zona intermareal. Mensualmente faise control do crecemento e desdobre da semente nas bolsas ata o mes de xullo. Despois desta data a semente quítase das bolsas e seméntase directamente na zona de cultivo.

| | Ameixa babosa | | Ameixa bicuda | | Ameixa xaponesa | | A. fina | A. rubia | Navalla |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | IGAFA | RIBADEO | IGAFA | RIBADEO | IGAFA | RIBADEO | RIBADEO | RIBADEO | RIBADEO |
| **Nº Indiv.** | 1.027.563 | 824.400 | 203.404 | 423.800 | 308.696 | 572.410 | 404.000 | 7.200 | 71.500 |

**5) Formar a técnicos de acuicultura en novos procedementos e/ou cultivo de novas especies**

O persoal técnico aprendeu a desempeñar os traballos necesarios para levar adiante as actividades nun criadeiro de moluscos bivalvos, nunhas instalacións tipo minicriadeiros que o IGAFA ten próximas ás propias instalacións da escola.

Foron catro técnicos: Sabela Abilleira Simes, José Carlos Méndez Montenegro, Gregorio Rivadeneira Torres e Juan José Sánchez Prego.

Contaron coa axuda dunha persoa contratada como coordinador en produción (Emilio Cid González) e co seguimento por parte dos titores e profesores no IGAFA: María del Carmen Andrés Rivas e Miguel Ángel Lastres Couto.

Todo o traballo desenvolvido por este persoal nos minicriadeiros quedou reflectido na Memoria final que presentaron os bolseiros.

**6) Transferir ao sector acuícola técnicas e/ou sistemas mellorados**

Ao sector acuícola non só se lle transferiu semente procedente de Ribadeo e dos minicriadeiros do IGAFA se non, tamén, se lle asesorou sobre o seu manexo no medio natural informándoselles, dos momentos da sementeira mais adecuada para obter resultados óptimos e de como obter a maior cantidade de datos de seguimento desta semente aportada.

Os protocolos e tódalas actividades realizadas no criadeiro de Ribadeo e nos minicriadeiros permiten a transferencia de técnicas e procedementos ao sector produtivo, principalmente para a produción de especies de alto valor comercial nas confrarías, organizacións de produtores, cooperativas, empresas, etc.

Os ensaios para mellorar a rendibilidade dos procesos produtivos ata a sementeira de semente poden permitir que as confrarías aborden o autosubministro equipándose con instalacións versátiles e de relativo baixo custo como as do IGAFA.

Este aspecto é de vital importancia xa que, no momento actual, en Galicia só se atopa unha empresa dedicada á comercialización de semente de bivalvos.

**7) Deseño dun protocolo de control microbiolóxico das instalacións**

No tempo transcorrido do proxecto, adestrouse aos bolseiros na recollida e procesado “in situ” de mostras para análises bacteriolóxicas e virolóxicas, xunto coas prácticas de manexo de mostras e material en condicións axeitadas.

Supervisouse a execución práctica dos coñecementos adquiridos e os resultados da realización dos labores requiridos.

Deseñouse un protocolo de control microbiolóxico das instalacións, centrándose nos dous compartimentos transversais: a auga de mar e os cultivos de fitoplancto utilizados como alimento. En primeiro lugar, identificáronse os circuítos de subministro de auga e de alimentación, cos distintos tramos de condución e tratamentos empregados neles.

Unha vez completado o deseño do protocolo, procedeuse á súa aplicación práctica por parte dos bolseiros, baixo supervisión.

Durante este período foron exercitando a súa capacitación para os traballos relacionados coa microbioloxía, ao tempo que se poñía a punto a aplicación do protocolo, solucionando os problemas que sempre xorden durante este proceso.

Despois das etapas iniciais de axustes, os resultados obtidos permitiron aportar información para a mellora da instalación en si e dos protocolos de manexo. O obxectivo en todo caso é a avaliación continua dos circuítos, que garanta o seu correcto funcionamento. Dado que a meirande parte dos tratamentos utilizados en criadeiros de bivalvos están enfocados a un control da microbiota, é imprescindible comprobar a súa eficacia, para evitar gastos

inútiles e efectos non desexados, ademais de asegurar a sostibilidade. A información obtida resulta tamén de utilidade para a comprobación interna dos protocolos de limpeza de tanta importancia nestas instalacións. Ademais, alerta dos riscos de problemas de produción vencellados a potenciais patóxenos bacterianos.

Avanzando un paso máis, unha vez en marcha o protocolo de control dos circuítos de auga e microalgas, comezouse cos controis microbiolóxicos das desovas obtidas nas instalacións.

Os resultados obtidos poñen en evidencia os riscos dos transvases de larvas entre tanques. Esta práctica, habitual nos criadeiros, ha de ser sometida a unha revisión. Tamén sería recomendable valorar o descarte rápido das "colas" do cultivo para evitar a reintrodución de posibles patóxenos que así poidan elevar a súa concentración. Non hai que esquecer que os vibrios responsables de mortaldades larvarias de bivalvos son oportunistas, é dicir, forman parte da microbiota normal e só causan problemas cando proliferan por riba duns niveis. As estratexias deberían orientarse entón a manter as súas poboacións controladas, por baixo dun limiar de risco.

**8) Controis histopatolóxicos dos reprodutores no minicriadeiro do IGAFA**

Realizáronse controis histopatolóxicos de diversos lotes de ameixa babosa, ameixa fina e ameixa xaponesa utilizados como reprodutores no minicriadeiro do IGAFA.

Os controis efectuáronse sobre un total de 9 lotes, todos eles procedentes de diversas zonas da ría de Arousa, dos que 7 lotes son de ameixa babosa (5 destes lotes da zona de “O Bohido”, 1 lote da zona de “O Terrón” e 1 lote da zona de “O Naval”), 1 lote é de ameixa xaponesa da zona de “O Carreirón”, e un lote de ameixa fina da zona de “O Bohido”.

En canto ao número total de ameixas procesadas foi de 247 exemplares. Este procesado da mostra, comporta as medicións e pesos correspondentes. A continuación tras ser abertas co bisturí, retírase de cada unha das ameixas un fragmento de vianda que conteña manto, gónada, masa visceral, branquia e pé.

Este fragmento fíxase con solución Davidson, deshidrátase en alcohois de gradación crecente, aclárase con xileno e realízase a impregnación e inclusión en parafina. Os cortes de micrótomo de 5 micras tínguense con hematoxilina de Harris e eosina. As preparacións histolóxicas examínase en microscopio óptico, para determinar a posible presenza de organismos parasitos e alteracións patolóxicas.

Os resultados dos controis histopatolóxicos realizados aos proxenitores utilizados no minicriadeiro do IGAFA (ameixa babosa, fina e xaponesa), mostran que a principal patoloxía detectada é debida á presencia do G. Perkinsus, con prevalencias nalgúns casos que alcanza o 40% pero sendo en xeral de intensidade de infestación baixa, polo que non debería presentar problema algún no seu uso como proxenitores.

| Título da Acción de investigación – Acrónimo – Código CIMA | |
|---|---|
| **Indución da fixación e a metamorfose en ameixa fina, babosa e xaponesa**. METAMORFOSE. - CIMA 16/05 | |
| **Investigador/a Principal** | |
| Susana Nóvoa Vázquez | |
| **Outros/as investigadores/as participantes** | |
| CIMA: Dorotea Martínez Patiño; Justa Ojea Martínez | IA (USC): Mª de la Luz Pérez-Parallé Mera; José Luis Sánchez López; Antonio Juan Pazos Castelos; Gustavo Adolfo Hernández Córdova |
| **Técnicos/as** | **Bolseiros/as** |
| Victoria Bouzamayor Yáñez.; Mª Josefa Cotarelo Jardón; Francisco Javier Páez Pérez.; Beatriz Rodríguez Álvarez; Mercedes Ruíz Misioné | Sonia Castilla del Río, Sonia; Eduardo Granjel Piñeiro; Nerea Fontán Valdivia; Bibiana Viñas Camiña |
| **Entidade que financia**: Consellería do Mar - Xunta de Galicia | |
| **Data de inicio**: Marzo de 2016 | **Data de finalización**: Decembro de 2018 |


**RESUMO**

As especies de ameixa predominantes no cultivo son por orde de abundancia: a ameixa xaponesa *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850), a ameixa babosa *Venerupis corrugata* (Gmelin, 1791) e a ameixa fina *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758). Actualmente e con cálculos conservadores, estímase que as necesidades anuais de semente das tres especies superan os 200.000.000 de unidades dun tamaño entre 1,5 e 2 cm. Os criadeiros poderían satisfacer as demandas do mercado desenrolando protocolos robustos nas diferentes fases de cultivo ata a obtención da semente.

No criadeiro do CIMA de Ribadeo tense optimizado o protocolo de cultivo nas distintas etapas ata a obtención de semente das especies de ameixa (xaponesa, babosa e fina), e doutras como a ameixa rubia, navalla e cadelucha.

Pero a produción de semente de ameixa en criadeiro leva a superar unha serie de fases no seu cultivo. Entre elas, a superación das etapas de fixación e metamorfose supón sen dúbida, un dos colos de botella máis importantes, procesos nos que son habituais elevadas mortaldades.

Os mecanismos moleculares que levan á adquisición da competencia larvaria e a indución da fixación e a metamorfose nos moluscos bivalvos non son ben coñecidos. Pénsase que os estímulos primarios que inician a fixación destes invertebrados mariños son sinais químicas asociadas co substrato. Estes procesos non só están condicionados por características propias da especie e da propia larva, senón que tamén están afectados polas características físicas do medio e por diferentes indutores. Estudos preliminares no laboratorio indican que as superficies de preferencia para o asentamento son horizontais, rugosas e previamente colonizadas por adultos da mesma especie. O asentamento tamén está favorecido por luz e comida abundante e densidade larvaria media ou alta.

Algúns factores ambientais, como a natureza do substrato ou "biofilms" que o colonizan, foron descritos como potenciais indutores da fixación en diferentes especies de ostra. As larvas competentes de moluscos poden ser inducidas a fixarse e empezar a metamorfose mediante análogos destes indutores naturais.

As larvas de distintas especies poden mellorar estas fases con sustancias indutoras de natureza diferente, cuxa actuación parece estar mediada por receptores.

Unha grande variedade de sustancias naturais e químicas mostráronse capaces de inducir fixación e metamorfose en larvas de diferentes especies de moluscos. Moitos compostos químicos como GABA, L-DOPA, epinefrina, norepinefrina, colina, KCl, ácido aminovalérico e glutamato monosódico mostráronse como indutores efectivos da metamorfose e fixación en bivalvos e outros moluscos, en ocasións con resultados discordantes.

O equipo do Instituto de Acuicultura (USC) xa estivera traballando con diferentes especies de moluscos para optimizar a súa etapa de fixación e metamorfose, avaliando algunhas destas sustancias indutoras.

No momento actual, a pesar de que diferentes indutores da fixación e a metamorfose foron identificados no laboratorio, non se obtiveron resultados consistentes que permitan propoñer un protocolo para a produción dunha ampla poboación de semente en criadeiros industriais.

Con este traballo de investigación pretendeuse afondar no estudo da fixación e a metamorfose nas tres especies máis importantes de ameixas cultivadas en Galicia. O obxectivo foi establecer un método rutineiro, efectivo e de baixo custo para a indución destes procesos das larvas de ameixa. Desta forma poderíase mellorar a produción en criadeiro industrial durante todo o ano, algo imprescindible para o desenvolvemento e a subsistencia deste sector produtivo. Para conseguir este obxectivo global planeáronse varios obxectivos parciais: avaliar o efecto de ións e compostos neuroactivos sobre a fixación e metamorfose de larvas de ameixa; estudar o efecto de "biofilms" naturais sobre a fixación e metamorfose de larvas de ameixa e analizar o efecto de diferentes substratos sobre a fixación e a metamorfose das larvas.

Co fin de lograr estes obxectivos realizáronse unha serie de tarefas como: o acondicionamento de proxenitores e cultivos larvarios no CIMA de Ribadeo das especies a estudar; experimentos con ameixa xaponesa e fina analizando "biofilms" naturais no Instituto de Acuicultura (USC); probas de laboratorio do CIMA de Ribadeo con cloruro cálcico (CaCl2.2H2O) e con diferentes substratos avaliando o seu efecto na fixación e metamorfose de ameixa xaponesa; experiencias no laboratorio do IA (USC) con ameixa fina e babosa tratadas con 7 compostos neuroactivos: o ácido γ-amino-n-butírico (GABA), as catecolaminas epinefrina, norepinefrina e L-DOPA, así como con IBMX, serotonina e acetilcolina e para rematar, realizáronse experiencias de criadeiro no CIMA de Ribadeo cun dos compostos mais efectivos (GABA) sobre a fixación e metamorfose de ameixa babosa e ameixa xaponesa.

Con todos os resultados obtidos nesta Acción púidose concluír que ningún dos "biofilms" utilizados produce un cambio significativo na porcentaxe de metamorfose, tanto na ameixa xaponesa como na ameixa fina. O poliestireno é o peor material como substrato para a realización do proceso de fixación das ameixas mentres que con vidro e as mallas de nailon observáronse efectos positivos na fixación da ameixa xaponesa polo que é un substrato adecuado. O ión cloruro cálcico non ten moita influencia positiva na fixación da ameixa xaponesa pero, nas 48 horas que duraron os experimentos, non afecta á súa supervivencia.

Por outra banda GABA, epinefrina, IBMX, acetilcolina e serotonina incrementaron de forma significativa a porcentaxe de metamorfose das larvas de ameixa xaponesa e ademais non teñen efecto tóxico aparente despois dun tratamento de 72 horas, a escala de laboratorio. GABA (10-5 M) e epinefrina (10-5 M) incrementan, de forma significativa, a porcentaxe de metamorfose das larvas de ameixa babosa a escala de laboratorio, cando a porcentaxe de metamorfose de forma natural se sitúa entre 30-50% e tampouco se observa ningún efecto tóxico.

Pero nesta especie, se a porcentaxe natural de superación da metamorfose é alta, algo habitual, é innecesario o uso de ningún composto. Acetilcolina e serotonina (10-4 M e 10-5 M) melloran de forma significativa a porcentaxe de superación da metamorfose na ameixa fina tras 48 h de tratamento.

E por último, nos experimentos no criadeiro con GABA chégase á conclusión de que é un composto neuroactivo cunha efectividade negativa cando se aplica en condicións de ambiente frío (4ºC), non ten efecto tóxico nas larvas de ameixa babosa e xaponesa ó inicio dos experimentos nin ó final dun cultivo largo, polo tanto non sería tóxico nun cultivo industrial e ademais, ten un efecto positivo no crecemento das dúas especies en cultivo, xa que se incrementou de forma significativa aínda que en diferentes momentos.

## RESULTADOS

### Acondicionamento de proxenitores e cultivos larvarios

Nas instalacións do CIMA de Ribadeo realizouse o cultivo larvario das tres especies de ameixa: xaponesa, babosa e fina ata que as larvas eran competentes para a fixación, é dicir, ata que se poñía de manifesto a aparición do pé na maioría das larvas e nese momento, iniciábanse os ensaios. Os cultivos seguiron os protocolos descritos por Cerviño-Otero et al. (2010), da Costa et al. (2012) e Aranda et al. (2014).

Conseguiuse optimizar un método de transporte co que as larvas chegaron ao laboratorio do IA, en perfecto estado ás 12 ou ata 24 horas, podendo iniciar de forma inmediata os ensaios.

As larvas foron transportadas nunha pequena peneira de malla de 140 µm dentro dunha placa Petri de vidro. Ían lixeiramente humedecidas mediante unha gasa mollada en auga salgada e conservaron a humidade e temperatura ao ir embaladas hermeticamente nunha pequena caixa de poliespán (poliestireno expandido, EPS) con arrefriadores de xeo.

### Efecto de biofilms naturais sobre a fixación e metamorfose de larvas de ameixa

Os resultados obtidos nas dúas especies sometidas ós tres "biofilms" bacterianos (fig. 1) mostran que as porcentaxes da súa metamorfose non se ven afectadas e son similares ás obtidas coas larvas control.

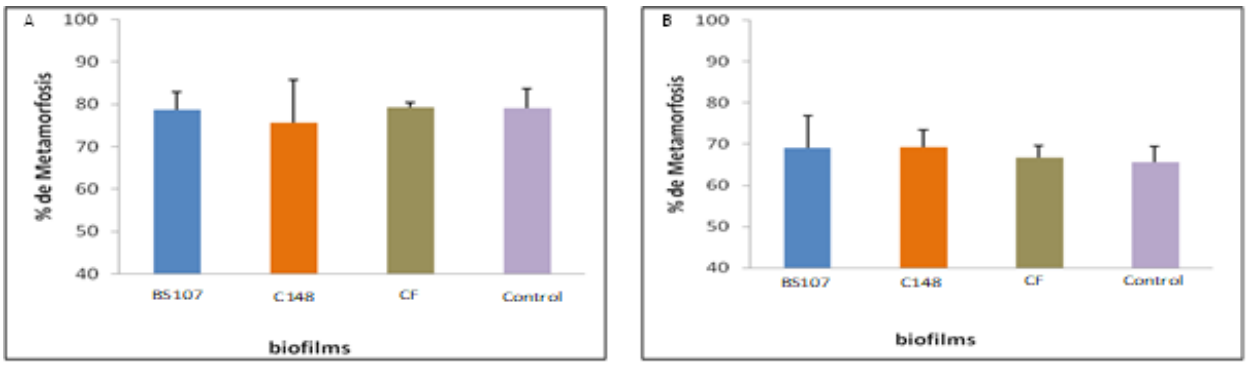



**Figura 1**. Efecto de "biofilms" bacterianos sobre a metamorfose de larvas de:A/ ameixa xaponesa, *R. philippinarum;* B/ ameixa fina, *R. Decussatus*

**Experiencias de laboratorio con cloruro cálcico (CaCl2.2H2O) e con diferentes substratos.**

Coa ameixa xaponesa empregáronse tres concentracións de cloruro cálcico (30, 20 e 10 mM) e estudouse o efecto que teñen estas concentracións unido á distinta natureza de tres substratos avaliados (poliestireno, vidro e peneiras con malla de nailon de 140 µm).

Na figura 2 obsérvase o efecto das tres concentracións do ión cloruro cálcico sobre as larvas pedivelixer de *Ruditapes philippinarum*, nos tres substratos estudados.

A fixación da ameixa xaponesa nas placas de poliestireno, como xa sucedera en experimentos anteriores, presentou moi malos resultados polo que, tampouco se puido avaliar o seu comportamento ó engadir as distintas concentracións de cloruro cálcico. Entre os distintos substratos existen diferenzas significativas e os resultados mellores de fixación foron os obtidos cando a ameixa expúxose ó vidro e ás peneiras con malla de nailon. Non obstante, non existen diferenzas significativas ($p<0,05$) entre as concentracións de cloruro cálcico e polos datos, a súa influencia na fixación desta especie non existe. Nesta especie ás 48 horas, o cloruro cálcico non provoca mortalidades

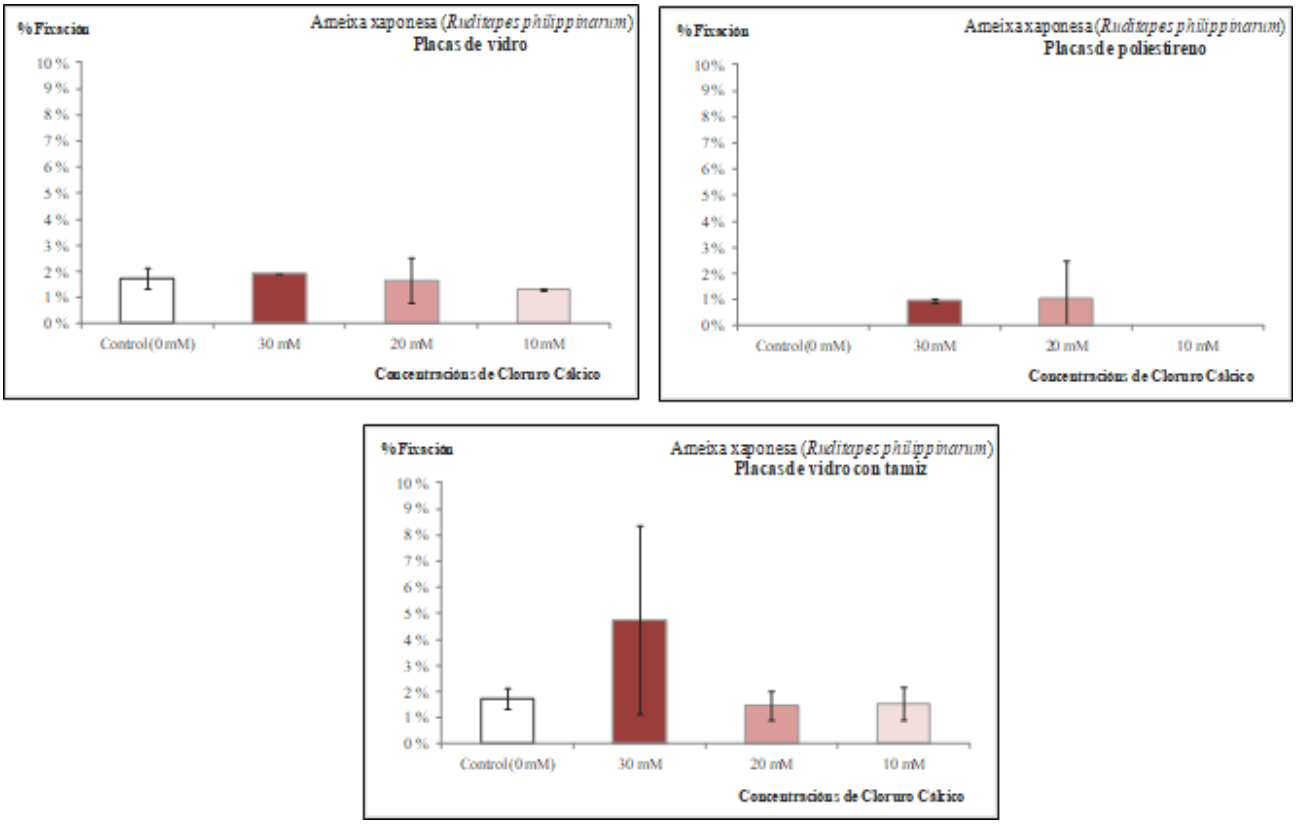



**Figura 2**. Porcentaxes de fixación de larvas de Ruditapes philippinarum despois de ser expostas durante 48 horas a concentracións de 30, 20 e 10 mM de cloruro cálcico, tendo como substrato placas Petri de vidro, de poliestireno e con peneira con malla de nailon.

**Experiencias de laboratorio con compostos neuroactivos**

Debe destacarse que en dous experimentos realizados con ameixa xaponesa atopouse que a proporción de larvas que superaron con éxito a metamorfose no control, en ausencia de indutores, foi moi elevado, estivo en torno ó 80%.

Incluso nestas condicións pódese observar (Fig. 3) como a acetilcolina e serotonina nas tres concentracións ensaiadas, son indutores efectivos da metamorfose na ameixa xaponesa, incrementando a porcentaxe de metamorfose ata valores entre 60-80%. Nos casos de L-DOPA e norepinefrina non se observaron efectos positivos, mais ben ó contrario, na súa presenza a porcentaxe de éxito baixa e aumenta a mortalidade durante os experimentos

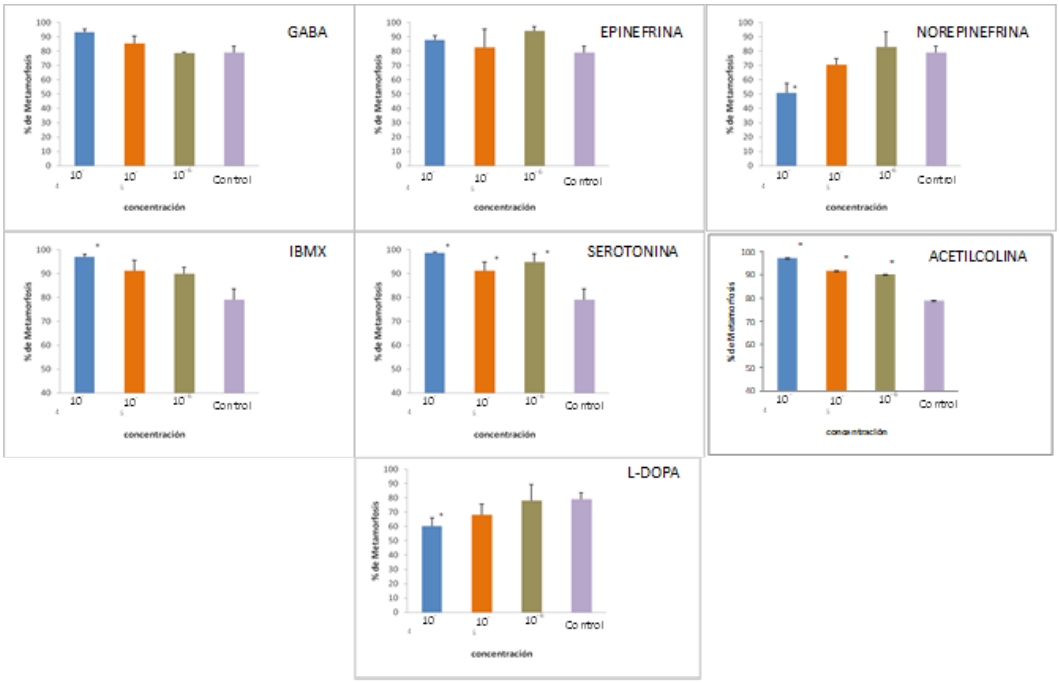



**Figura 3**. Porcentaxe de metamorfose de larvas de Ruditapes philippinarum tras ser expostas 72 h ás concentracións 10-4, 10-5 e 10-6 M de: acetilcolina, serotonina, IBMX, norepinefrina, epinefrina, GABA e L-DOPA.
Os asteriscos indican diferenzas significativas (*p<0,05) có control, que carece da presenza de moléculas indutoras

Cando as larvas pedivelixeras de ameixa babosa presentan unha porcentaxe de metamorfose dun 70% (Fig. 4) observouse como todos os indutores (dependendo da concentración utilizada), tiveron un comportamento positivo aumentando un 15% a porcentaxe de metamorfose inda que sen significación estatística, o cal é lóxico dado os elevados niveis de metamorfose que se producen en todos os casos. Pero cando o nivel da porcentaxe de metamorfose foi mais elevado, 87% de media, non se puido observar ningún efecto positivo polo emprego de indutores. Nos ensaios de indución da metamorfose en larvas de ameixa babosa, con niveis baixos de superación da metamorfose de forma natural, GABA e epinefrina comportáronse como potentes indutores da metamorfose nas tres concentracións ensaiadas. Nin GABA nin epinefrina resultaron tóxicos para as larvas.

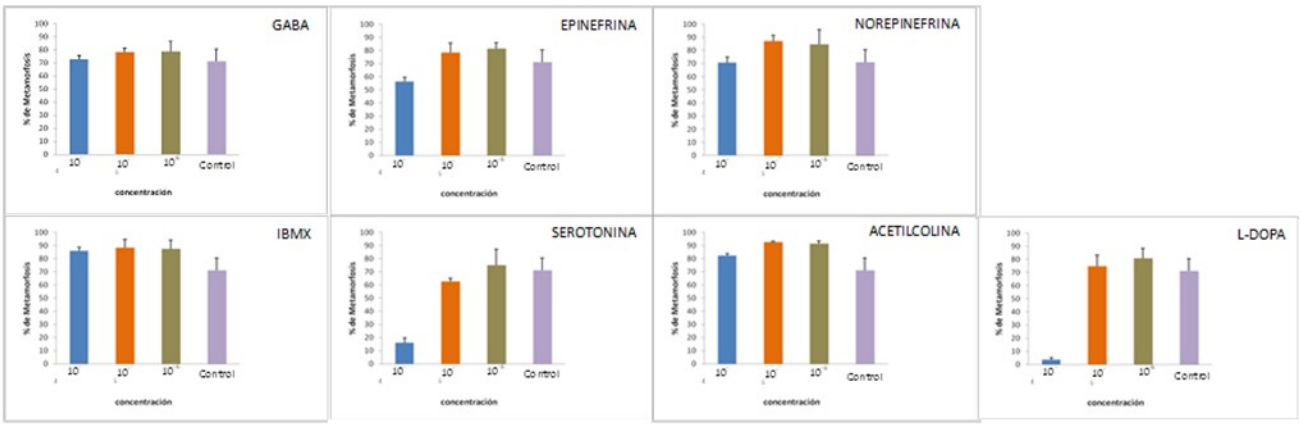



**Figura 4**. Porcentaxe de metamorfose de larvas expostas 72 h ás concentracións 10-4, 10-5 e 10-6 M de: acetilcolina, serotonina, IBMX, norepinefrina, epinefrina, GABA e L-DOPA de Venerupis corrugata.
Os asteriscos indican diferenzas significativas (*p<0,05) có control, que carece da presenza de moléculas indutoras.

Coa ameixa fina utilizáronse larvas cun nivel de superación da metamorfose no control, en ausencia de indutores, que foi de aproximadamente o 60% (Fig. 5). A acetilcolina e serotonina tanto a concentración de 10-4 M como a unha concentración dez veces inferior 10-5 M, melloraron de forma significativa a porcentaxe de larvas que superaron a metamorfose. O resto de indutores ensaiados non mostraron ningún efecto, independentemente da concentración utilizada. Non se observaron efectos tóxicos sobre as larvas para ningún dos indutores empregados neste experimento.

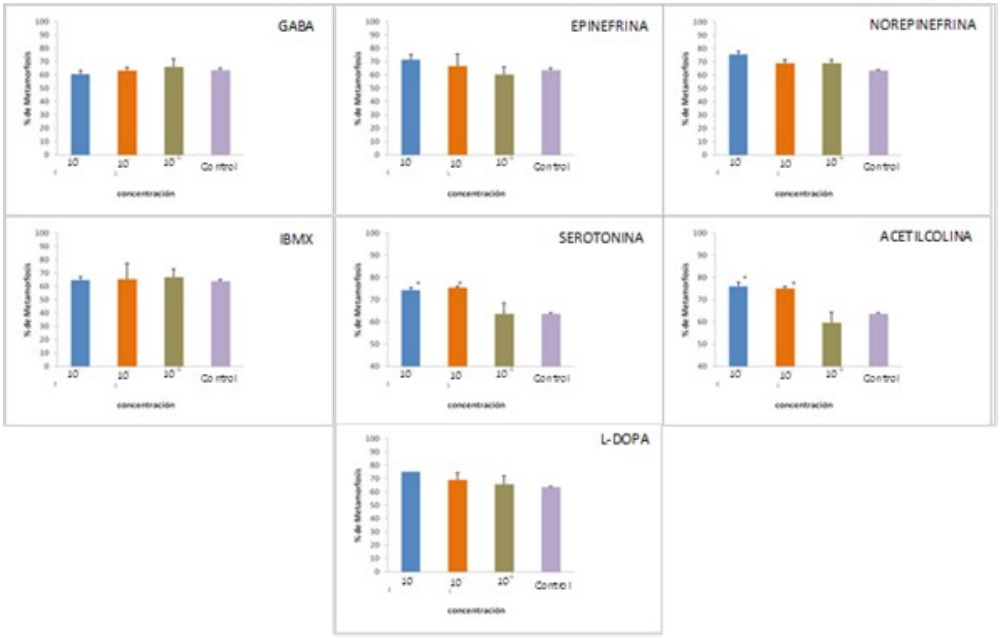



**Figura 5**. Porcentaxe de metamorfose de larvas de Ruditapes decussatus tras ser expostas 72 h ás concentracións 10-4, 10-5 e 10-6 M de: acetilcolina, serotonina, IBMX, norepinefrina, epinefrina, GABA e L-DOPA

**Experiencias no criadeiro co composto neuroactivo: ácido γ-amino-n-butírico (GABA)**

Na figura 6 móstranse as evolucións dos crecementos en largo e ancho da ameixa babosa cando non é sometida a ningún tratamento (CONTROL, C) e os dous tratamentos con GABA (a temperatura ambiente, GABA A e a 4ºC, GABA F). Non existen diferenzas significativas nos crecementos ata que se realiza o primeiro peneirado (ós 15 días dende o inicio da proba) para contabilizar os individuos que quedan retidos en peneiras de 200-300 µm. En todos os casos chegan a tamaños de 440 µm. A partir deste momento, e ata os 20 días que finaliza o experimento, os individuos que estiveron 4 horas en presenza do GABA a temperatura ambiente, presentan un maior crecemento cun tamaño de 553,62 µm fronte a 515,53 µm dos individuos control e a 447,46 µm dos que estiveron 4 horas con GABA a temperatura de 4ºC. Estas diferenzas son altamente significativas.

Os datos obtidos indican que, ós 20 días dende o inicio do experimento, a maior proporción de individuos máis grandes (os que quedan retidos en peneiras de 400 e 500 µm, con tamaños de 553,6±198.5 µm) atópase entre os tratados con GABA A que supoñen o 28,6% fronte os 23,4% dos individuos CONTROL e os 8,6% dos tratados con GABA F. En todos os casos, as maiores proporcións corresponden aínda a individuos que quedan retidos en peneiras de 200 e 300 µm (con tamaños de 440 µm). As mortalidades maiores aparecen nos individuos GABA F (36 %), seguidos dos de CONTROL (11%) e as menores corresponden ós individuos tratados con GABA A (5%) pero estas diferenzas non se atoparon que foran significativas.

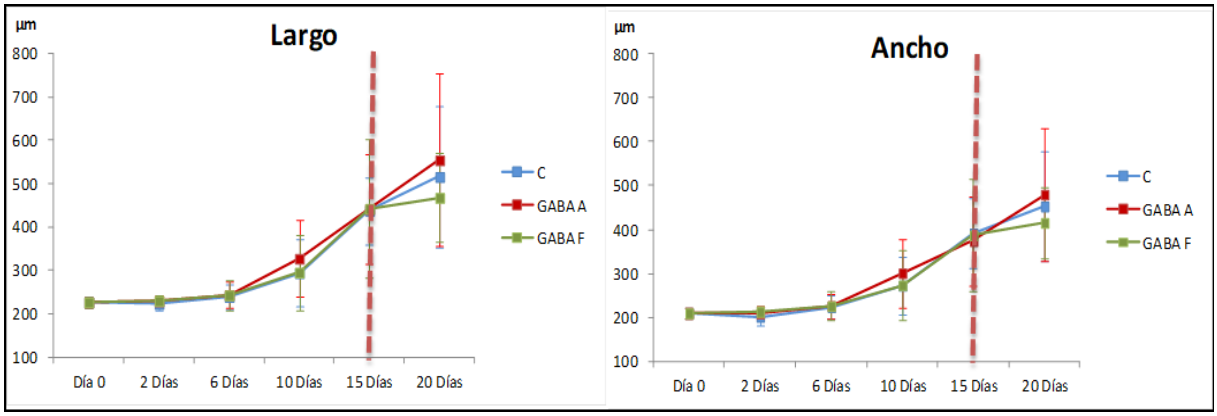



**Figura 6.** Evolución do crecemento de Venerupis corrugata ao longo do experimento (20 días). Datos en micras do largo e ancho dos individuos CONTROL e dos sometidos ós dous tratamentos co composto neuroactivo GABA: durante 4 horas á temperatura ambiente (GABA A) e durante 4 horas á temperatura de 4ºC (GABA F).

As evolucións dos crecementos en largo e ancho da ameixa xaponesa cando non é sometida a ningún tratamento (CONTROL, C) e cando é sometida ó tratamento con GABA durante 4 horas a temperatura ambiente (GABA A),

móstrase na figura 7. Existen diferenzas significativas nos crecementos os 12 días dende o inicio da proba (momento no que se realiza o primeiro peneirado, para contabilizar os individuos que quedan retidos en peneiras de 200-300 µm). Os crecementos dos individuos tratados con GABA A son maiores, chegando a 308,38 µm fronte ós 291,47 µm dos individuos CONTROL. Dende estes 12 días e ata os 33 días que finaliza o experimento, os crecementos son moi baixos e iguálanse alcanzando o tamaño de 430 µm e non existindo diferenzas significativas.

Aos 15 días dende o inicio da proba, a proporción maior de individuos quedan retidos na peneira de 300 µm con tamaño de 430±85,9 µm. Non se atopan individuos que queden retidos na peneira de 400 e 500 µm como sucedeu na proba con ameixa babosa.

Polo tanto, nesta proba a ameixa xaponesa ten un crecemento lento en xeral e sen ter en conta os tratamentos. Nas proporcións atopadas nos distintos tamaños, case non existen diferenzas entre o CONTROL e o grupo tratado con GABA, no CONTROL quedan retidos na peneira de malla de 300 µm o 65,3% do total e nos individuos GABA A son un 59,7%. Nas mortalidades non existen diferenzas estatisticamente significativas xa que no CONTROL é dun 10% e nos individuos tratados con GABA é dun 11%.

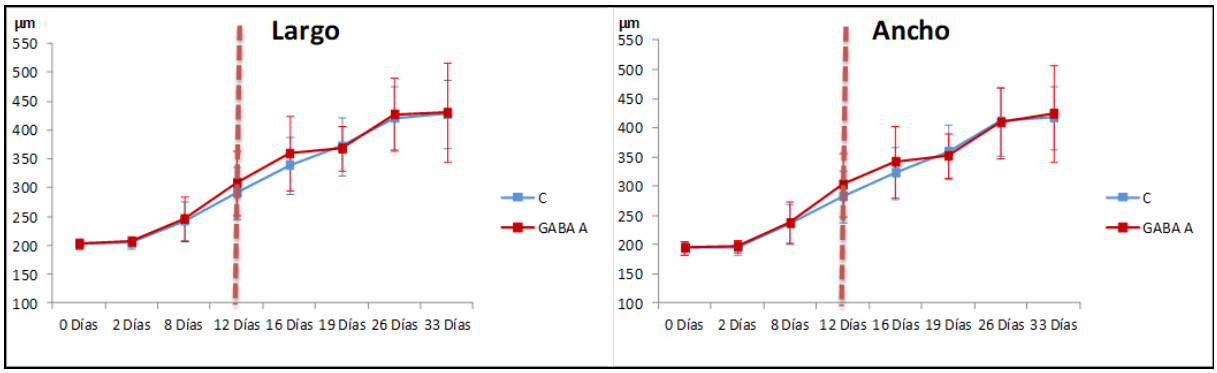



**Figura 7**. Evolución do crecemento de *Ruditapes philippinarum* ao longo do experimento (33 días). Datos en micras do largo e ancho dos individuos CONTROL e dos sometidos ó composto neuroactivo GABA durante 4 horas a temperatura ambiente (GABA A).

| Título da Acción de investigación – Acrónimo – Código CIMA | |
|---|---|
| **Criadeiro de bivalvos: Análise integrado de datos de cultivo (biolóxicos-microbiolóxicos) e busca de indicadores prácticos (éxito-fracaso)**. CRIBAIN. CIMA 18/01 | |
| **Investigador/a Principal** | |
| Dorotea Martínez Patiño | |
| **Outros/as investigadores/as participantes** | |
| CIMA: Susana Nóvoa Vázquez; Justa Ojea Martínez | USC: Juan Luís Barja Pérez; Susana Prado Plana; Sergio Rodríguez Rodríguez; Gabriel Arcos Vilanova |
| **Técnicos/as** | **Bolseiros/as** |
| Victoria Bouzamayor Yáñez.; Mª Josefa Cotarelo Jardón; Francisco Javier Páez Pérez.; Beatriz Rodríguez Álvarez; Mercedes Ruíz Misioné | Sonia Castilla del Río, Sonia; Eduardo Granjel Piñeiro; Nerea Fontán Valdivia; Bibiana Viñas Camiña |
| **Entidade que financia**: Consellería do Mar - Xunta de Galicia | |
| **Data de inicio**: Xuño de 2018 | **Data de finalización**: Decembro de 2020 |


**RESUMO**

O obxectivo principal da Acción é mellorar a produción de semente competente en criadeiros de bivalvos como base para o avance cara a unha acuicultura sostible dos bancos marisqueiros galegos. Para acadar este obxectivo, propuxéronse obxectivos específicos que engloben os diferentes enfoques deseñados: recompilar, elaborar e analizar conxuntamente os datos dispoñibles, biolóxicos e microbiolóxicos, de reprodutores e cultivos larvarios de diferentes especies de bivalvos en criadeiro; buscar posibles indicadores que permitan predicir o éxito/fracaso dos cultivos larvarios en criadeiro e propoñer prácticas de xestión e manexo para a incorporación dos coñecementos resultantes no criadeiro.

Na anualidade 2018 arrancaron os traballos das dúas tarefas principais da Acción, segundo o establecido no cronograma. Estas tarefas foron: metaanálise dos datos de cultivo e microbiolóxicos de diferentes especies de moluscos bivalvos e procura de indicadores para predicir o éxito/fracaso do cultivo larvario en criadeiro de bivalvos.

Comezáronse a reunir e organizar os datos de cultivos de diferentes especies de bivalvos no CIMA de Ribadeo, facendo unha revisión exhaustiva da información e organizándoa para facilitar a súa posterior análise conxunta coa información microbiolóxica. Este labor arrancou na última tempada de postas, e irase remontando a anos anteriores durante o proxecto para obter a serie ampla e longa no tempo que se precisa. Esta primeira achega aos datos será a base para establecer tamén as pautas na recollida de información a partir de agora.

O equipo CIMA-USC desenvolveu un protocolo de control para avaliar a calidade microbiolóxica tanto da auga de mar, cos seus tratamentos e circuítos, coma do fitoplancto utilizado como alimento, nos diferentes cultivos e na distribución. Este protocolo busca controlar a entrada por estas vías de patóxenos que poidan afectar á produción, pero tamén aportar información sobre o funcionamento do conxunto da planta. Neste ano abordouse unha revisión en profundidade de tódolos puntos de control establecidos, as frecuencias de toma de mostras e as rutinas de procesado, para actualizalo en base aos datos que se viñeron obtendo.

Baseándose na revisión do apartado anterior, estanse a realizar axustes do protocolo, coa incorporación de novos puntos da mostraxe e revisión de protocolo de procesado de mostras, para optimizar a obtención de información e facilitar a incorporación á rutina da instalación.

Partindo da información recompilada en apartados anteriores, iniciouse a análise dos datos previos obtidos para tratar de discernir as mellores vías de achega que permitan identificar candidatos para ser utilizados como indicadores do éxito/fracaso do cultivo larvario. O obxectivo é atopar preditores que eviten o mantemento de cultivos que vaian fracasar, o que se podería traducir nunha optimización do uso dos recursos dispoñibles. Tamén axudarían a controlar a proliferación e establecemento de patóxenos na instalación, e o consecuente risco da súa posterior reemerxencia, frecuente en criadeiros. Estanse a analizar os datos das desovas obtidas na última tempada, especialmente os dos controis microbiolóxicos iniciais, relacionándoos coa evolución do cultivo para determinar a importancia da carga bacteriana de partida.

O inicio dos acondicionamentos de diferentes especies de bivalvos no criadeiro do CIMA de Ribadeo, é a actividade de partida imprescindible para a obtención de desovas aptas, e o primeiro punto de recollida de datos para a análise final. Avaliarase o éxito reprodutivo dos diferentes lotes dentro de cada especie, baseándose nos tempos de acondicionamento, a supervivencia no criadeiro e as postas que se obteñan.

Neste primeiro ano da Acción, para o deseño do protocolo de seguimento dos cultivos larvarios, os primeiros labores estanse a enfocar na etapa inicial, ovocito-larva trocófora. É preciso establecer claramente como se van a realizar os controis, para obter información comparable e suficiente para identificar os puntos críticos desta fase. Isto permitirá, máis adiante no proxecto, a procura de indicadores. Ademais, abrirá as vías de posibles alternativas de

intervención para mellorar os resultados de produción. Estase a probar un protocolo de toma de mostras dobre ao inicio dos cultivos, e frecuencia semanal durante o larvario. En resposta a calquera alteración da evolución normal dun cultivo, engadiranse novas mostras. Todo o protocolo estará sometido a revisión continua, segundo se vaian recollendo resultados e reaxustes en base a estes.

**RESULTADOS**

Analizando o protocolo, deseñado hai anos, para o control microbiolóxico do criadeiro de Ribadeo no que existían 15 puntos (Táboa I), atopáronse algúns problemas que era necesario solucionar para poder continuar, de bo xeito, coas próximas tarefas previstas nesta Acción de investigación. Na Táboa II, expóñense os medios microbiolóxicos utilizados e as condicións para o procesado das mostras que se seguirán a utilizar no protocolo revisado. Para solucionar os problemas atopados no protocolo inicial aumentáronse os seguintes puntos:

- No cultivo de fitoplancto da cámara isoterma, incluíndo coma nova mostra a auga dun reactor despois de ser esterilizado na autoclave (punto 9).
- No cultivo de fitoplancto continuo. Dado que se atoparon datos de proliferacións bacterianas na auga pasteurizada do sistema de cultivo, incluíronse dous puntos máis de control no protocolo: na tubaxe de distribución da auga pasteurizada conforme sae do pasteurizador e, na mesma tubaxe, pero cando chega as bolsas (puntos 17 e 18).

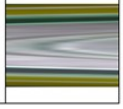
Por outra banda, a revisión efectuada xunto cos novos puntos establecidos, revelaron erros de manipulación na esterilización por autoclavado da auga dos reactores utilizados no cultivo de fitoplancto da cámara isoterma, que resultaban en contaminacións microbiolóxicas. Este problema estase a resolver grazas á instalación dun sistema automático de autoclavado, ademais da posta a punto da propia autoclave.

Tamén como resultado da revisión do protocolo e dos datos obtidos, detectáronse problemas no circuíto de fitoplancto, por contaminacións ao longo da tubaxe de distribución da auga pasteurizada. Para mellorar este apartado vaise substituír o circuíto por unha nova estrutura de vidro, minimizando ademais as posibles zonas de acumulación de materia que poidan actuar como puntos de proliferación de bacterias non desexadas.

**Táboa I**. Puntos de control do deseño inicial de control microbiolóxico do criadeiro (fondo branco) e puntos incorporados (fondo gris) tras a revisión do protocolo. Inclúese a descrición de cada punto e a sección de destino. Na actualidade son un total de 18 puntos, de auga (azul) e fitoplancto (verde) distribuídos nas instalacións do criadeiro e do invernadoiro

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1 | CRIADEIRO | Auga fría | Semente |
| 2 | | Auga quente | Semente |
| 3 | | Auga larvario | Larvas |
| 4 | | Retorno (1) da tubaxe de distribución de fitoplancto de cultivo continuo | Larvas |
| 5 | | Retorno (2) da tubaxe de distribución de fitoplancto de cultivo continuo | Proxenitores<br>Semente |
| 6 | | Tanque de distribución fitoplancto de cultivo continuo | |
| 7 | | Circuíto auga quente | Proxenitores (2) |
| 8 | | Circuíto auga fría | Proxenitores (2) |
| 9 | | Auga reactor esterilizado autoclave | |
| 10 | INVERNADOIRO | Auga bolsas de 40 L de fitoplancto filtrada | |
| 11 | | Auga filtrada | Semente |
| 12 | | Auga crúa | Semente |
| 13 | | Tubaxe de distribución de fitoplancto | Semente |
| 14 | | Mestura de bolsas de fitoplancto 40 L | |
| 15 | | Tanque de distribución da colleita de fitoplancto de cultivo continuo | |
| 16 | | Tubaxe de colleita de fitoplancto de cultivo continuo | |
| 17 | | Pasteurizador – tubaxe bolsas de fitoplancto continuo | |
| 18 | | Pasteurizador-directo | |

**Táboa II**. Medios microbiolóxicos utilizados para o procesado das mostras tomadas segundo o protocolo de control

| Medio | Tipo de medio | Mostras | Temperatura incubación | Período de lectura | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Agar Mariño (AM)** | Xeneralista para bacterias heterótrofas mariñas | Auga | 25°C | 7-10 días | |
| **Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS)** | Selectivo para vibrios | Auga Fitoplancto | 25°C | 24-48 h |  |

| Título da Acción de investigación – Acrónimo – Código CIMA | |
|---|---|
| **Indución á viteloxénese, maduración ovocitaria, ovulación e espermatoxénese en cherna (*Polyprion americanus*)**. CHERNA. CIMA 16/04 | |
| **Investigador/a Principal** | |
| Fátima Linares Cuerpo | |
| **Outros/as investigadores/as participantes** | |
| | IGAFA: Rodríguez Villanueva, J.L.<br>IEO: Álvarez Blázquez, B.; Pérez Rial, E.<br>RARA AVIS. BIOTEC S.L.; Giménez Nebot, I. |
| **Técnicos/as** | **Bolseiros/as** |
| Méndez Pérez, B.; Pazos Sieira, G.; Cores González, M.J; Camino Saco, A; Penín Búa, R | Alexis Araujo Sendín, Noelia Fuentes Villar<br>Sonia Díaz Carballal, Juan José Sánchez Prego |
| **Entidade que financia**: Consellería do Mar - Xunta de Galicia | |
| **Data de inicio**: Marzo de 2016 | **Data de finalización**: Decembro de 2018 |


**RESUMO**

Esta Acción de investigación propúxose no ano 2016 como un importante complemento do proxecto "Diversify" para o desenvolvemento do cultivo da cherna (*Polyprion americanus*) especialmente no ámbito do control da reprodución, un dos aspectos máis importantes, xunto coa obtención de larvas e xuvenís, identificados previamente nesta especie e cuxa resolución, xunto con outros factores como a nutrición, é determinante para o éxito do cultivo da cherna en catividade.


Existen tres métodos de obtención de postas en catividade das femias de cherna (Fig. 1):

1. postas espontáneas naturais
2. postas inducidas por métodos hormonais e posta espontánea
3. postas inducidas seguidas de fertilización in vitro

**Figura 1**. Métodos de obtención de postas de cherna en catividade

Por primeira vez empregarase en cherna o método de indución á viteloxénese gonadal con FSH e LH para posibilitar o completo desenvolvemento ovocitario en femias que non conseguen completar a viteloxénese en catividade, existindo ademais a posibilidade de obter maduración gonadal completa tamén en exemplares xuvenís, e polo tanto inmaturos, que pola súa idade e tamaño non entrarían en ciclo reprodutivo de forma espontánea.

A definición dun protocolo de maduración gonadal en cherna mediante a administración de FSH e LH recombinantes e o logro de postas de maneira regular en catividade é o obxectivo fundamental desta Acción de investigación.

Para a consecución deste obxectivo requírese:

• Realizar unha valoración da viabilidade da utilización da hormona FSH nos exemplares de cherna.

• Determinar a dose adecuada en cherna (µg FSH/Kg de peixe) probando diferentes doses utilizadas noutras especies.

• Comprobar a influencia da administración de FSH e LH na evolución do desenvolvemento reprodutivo das femias de cherna.

Previo ó inicio dos experimentos os peixes mantivéronse en xaxún durante dous días. Antes da indución os peixes son anestesiados para evitar o estrés. As biopsias de ovario para a avaliación do desenvolvemento dos ovocitos realizáronse inxerindo un catéter de plástico ou cánula (Pipelle de Cornier, Laboratorio CCD, Francia) polo oviducto e aplicando unha aspiración suave. Os ovocitos mídense mediante un analizador de imaxe.

**Figura 2.** Inxección con FSH/LH.

**Figura 3.** Biopsia ovárica..

**Figura 4.** Extracción de sangue.

*Experimentos de indución con FSH/LH*

A metodoloxía xeral de indución con FSH/LH é a seguinte:

- Selecciónanse individuos en estado de inmadurez gonadal cun peso mínimo de 5-6 kg. Nos individuos adultos poderíase realizar a indución tanto en época reprodutiva como fóra dela.

- Para o control dos exemplares, e previamente á inxección con FSH, procédese a súa anestesia con 2-fenoxietanol (0,4 mg/litro).

- Inxéctase semanalmente FSH/LH por vía intramuscular, que se reparte en tres puntos de inxección: lombo superior anterior, medio e posterior. (Fig. 2).

- Realízase biopsia ovárica mediante canulación das femias e valoración ovocitaria (diámetro de ovocitos) cada 2-3 semanas (Fig. 3), para o que se fixan con formaldehído-glutaraldehído 4:1 e mídense en analizador de imaxe para valorar o estadio de desenvolvemento.

- Extracción de sangue con agulla hipodérmica no arco branquial para determinación de estradiol e 11-ketotestosterona cada dúas semanas (Fig. 4).

A indución iniciouse durante o inverno (13/02/2018) para evitar os problemas orixinados durante o ano 2017 pola subida das temperaturas. Previamente á indución, pesáronse os exemplares, extraeuse sangue e realizouse biopsia ovárica para identificar o estado inicial de maduración gonadal do exemplar identificado como femia.

En todo os experimentos tomáronse mostras de sangue para análise de hormonas esteroideas: estradiol (E2), ketotestosterona (KT) e testosterona (T) que se realizou no IEO de Murcia.

Para a cuantificación de T, E2, 11-KT e 17, 20β-P no plasma usouse o método ELISA con algunhas modificacións. Para a extracción de esteroides, 200 µl de plasma foi extraído dúas veces con 2 ml de éter dietílico. A extracción lévase a cabo con axitación vigorosa (Vibramax 110, Heidolph, Alemania) durante 3 min. Logo de decantar a fase orgánica, o secado do sobrenadante realizouse baixo unha corrente de nitróxeno (Reacti-vap III, Pierce, EE. UU.). As mostras foron reconstituídas en 250 µl de buffer de reacción para a análise (ELISA).

## RESULTADOS

*Experimentos de indución con FSH/LH*

O tamaño medio inicial dos ovocitos no exemplar identificado como femia foi de 0,120±0,3 mm, o que indicaba que era unha femia inmatura. Durante as mostraxes correspondentes ás semanas 9 e 10, obtívose esperma por presión abdominal do exemplar 9775, polo que se determinou que era un macho. Medíronse os ovocitos na semana 12 de tratamento(140±0,005 µm). O macho 9775 deixa de ser fluinte, polo que se lle forneceu hormona LH (11 µg/Kg de peso) ó tratamento con FSH.

Na semana 14 aumentouse a dose de FSH a 24 µg/kg de peso para a femia (0040), deixouse de administrar hormona ó macho (9775) e mantívose a dose para o exemplar indeterminado (8521). Non se obtivo ningunha resposta á semana 16, na que finalizou o experimento, confirmada por biopsia de ovocitos, onde o diámetro destes foi de 0,124 mm±0,011, e tampouco en canto a espermioxénese do macho nin gametoxénese do exemplar indeterminado, xa que non se conseguiu obter esperma por masaxe abdominal.

No que se refire á análise de hormonas esteroideas, os resultados de niveis de estradiol, testosterona e 11-ketotestosterona móstranse nas Figs. 5a, b, c onde se pode apreciar que non houbo evolución na maduración gonadal da femia, tampouco estimulación gonadal no exemplar de sexo indeterminado, aínda que si resposta na síntese de testosterona e 11-ktestosterona (Figs. 5b e 5c) e tamén resposta temporal na espermioxénese do macho, que se relaciona cun incremento nos niveis de testosterona durante a espermiación nas semanas 9 e 10 de tratamento (Fig 5b). Isto significa que existe unha a falta de resposta á indución hormonal con FSH e LH nas doses utilizadas durante o tratamento, manténdose estables tanto os niveis de estradiol (ng/ml) como os de testosterona (ng/ml).

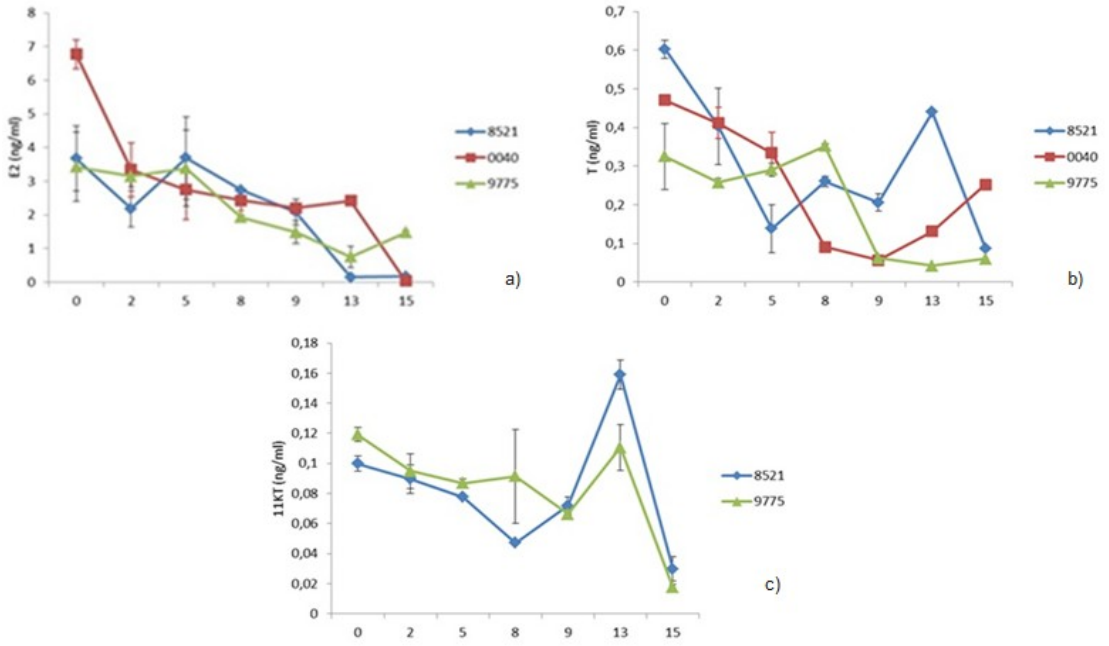



**Figura 5**. Evolución dos niveis de hormonas esteroideas no sangue durante o tratamento de tres exemplares de cherna con hormonas recombinantes FSH e LH. 5a estradiol (ng / ml); 5b testosterona (ng / ml) e 5c 11-Ketotestosterona (ng/ml)

En resumo, os resultados dos experimentos realizados con FSH/LH ó longo da Acción de investigación, indican o seguinte:

- Das tres chernas identificadas con seguridade como femias (presencia de ovocitos na biopsia), só nunha delas chegouse á maduración final ovocitaria e á ovulación tras 15 semanas de tratamento.
- Nun dos exemplares cuxo sexo non foi anteriormente identificado obtívose una mostra de esperma durante as semanas 9 e 10 de tratamento.
- Nos casos anteriores, o aumento das concentracións plasmáticas de hormonas esteroideas coincidiu co crecemento ovocitario (estradiol) e a espermatoxénese / espermioxénese (testosterona e 11-Ketotestosterona), respectivamente.
- Só nun dos peixes de sexo non determinado, tras a administración de FSH/LH, observouse un aumento nas concentracións plasmáticas de testosterona e 11-Ketotestosterona durante as semanas 9-13. Neste individuo non se obtivo mostra de esperma nin de ovocitos.
- No resto dos exemplares non se observou crecemento de ovocitos, espermatoxénese ou aumento de esteroides plasmáticos como resultado do tratamento con gonadotropinas.
- Os períodos de tratamento máis longos, de ata 16 semanas (8 semanas era o previsto inicialmente) non foron eficaces na indución de maduración gonadal.

***Discusión e conclusións dos experimentos de indución con FSH/LH realizados ó longo da Acción de investigación***.

Aínda que os primeiros resultados suxiren que o uso de gonadotropinas recombinantes de robaliza (rFSH) e rLH) en cherna parecía xerar un bo efecto impulsor do desenvolvemento gonadal partindo de ovocitos na viteloxénese inicial (480µm), a administración de FSH e LH específicas da robaliza ás doses habituais empregadas nesta especie non induciu a maduración gonadal nin resposta esteroidoxénica na maioría dos exemplares de cherna tratados.

Entre as causas desta ausencia de resposta, suscitáronse as seguintes hipóteses:

*1. Especificidade*

As secuencias específicas das subunidades α e β das gonadotropinas de cherna eran descoñecidas ó comezo da presente Acción. Dada a similitude entre outras secuencias aminoacídicas tanto en cherna como en robaliza (*Dicentrarchus labrax*), rodopsina, citocromo b, L 61 do receptor de proteína asociada, decidiuse utilizar gonadotropinas recombinantes específicas de robaliza como substituto das gonadotropinas de cherna. A ausencia de resposta observada pode ser debida a non especificidade de ambas hormonas, o que resultaría nunha menor capacidade de unión e activación do receptor específico (FSHR e LHR). Noutras especies foron usadas hormonas específicas.

*2. Doses*

Malia que na robaliza a dose de 8 µg/Kg resultou efectiva, doses de 8-12 µg/kg non tiveron o efecto esperado en cherna. Dada a ausencia de especificidade, un incremento da dose poría reverter a menor eficacia destas hormonas. No caso da anguía, a maduración gonadal está amplamente descrita mediante extractos hipofisarios de carpa e salmón (non específicos de anguía). Con todo, as doses utilizadas nestes casos atópanse na orde de mg/kg. Quizais un incremento substancial das doses de dlrFSH e dlrLH podería inducir unha resposta adecuada en cherna. Valoramos que este incremento na dose, en peixes de elevado peso como os utilizados nos ensaios da presente Acción, faría inviable economicamente o desenvolvemento da mesma.

*3. Inmadurez sexual*

A indución de maduración gonadal en robaliza, anguía, linguado e muxo levouse a cabo en xuvenís sen un desenvolvemento gonadal previo. Nos experimentos desta Acción, o tratamento administrouse tanto en individuos con tecido ovárico en regresión total (ovocitos con diámetro de 120-150 µm previteloxénico) como en individuos en proceso viteloxénico (200-240 µm). Dado que a viteloxénese depende da resposta da FSH das células foliculares e da síntese de viteloxenina a nivel hepático inducida polo estradiol, considerouse que as células foliculares dos individuos tratados no estado viteloxénico deberían expresar os receptores para FSH e terían a capacidade esteroidoxénica suficiente.

Pese a iso, nestes animais tamén houbo ausencia de resposta ó tratamento.

4. *Duración do tratamento*

Aínda que na formulación inicial dos experimentos estableceuse una duración dos tratamentos de ao redor de 8 semanas (tempo da viteloxénese en robaliza despois do tratamento gonadotrópico), o tratamento prolongouse ata 11 (2017) e 16 semanas (2018). Dado que en vertebrados a FSH induce a expresión dos seus propios receptores nas células foliculares, adoptouse esta estratexia de prolongación ante a posibilidade de inducir a expresión dos receptores específicos e obter posterior resposta en crecemento de ovocitos e esteroidoxénese.

5. *Temperatura*

A temperatura do medio é un factor transcendente na maduración gonadal en teleósteos. Durante o ano 2017, o tratamento aplicouse baixo un réxime de alta temperatura (maio-xullo), mentres que en 2018 administrouse con temperaturas sensiblemente inferiores (febreiro-maio). Non se apreciaron diferenzas na resposta ó tratamento.

**En definitiva, como hipótese máis probable, consideramos que a ausencia de especificidade destas hormonas é a causa da ausencia do desenvolvemento gonadal esperado (ás doses utilizadas nos experimentos descritos)**

| Título da Acción de investigación – Acrónimo – Código CIMA | |
|---|---|
| **Xestión integral do ourizo de mar (*Parencentrotus* lividus, Lanmark, 1816)**. GINOUMAR. CIMA 18/03 | |
| **Investigador/a Principal** | |
| Justa Ojea Martínez | |
| **Outros/as investigadores/as participantes** | |
| CIMA: Nóvoa Vázquez, Susana; Martínez Patiño, Dorotea; Cuiñas Olmedo, Pedro; Febrero Mayor, Fernando | Xefatura Territorial da Coruña CM: Catoira Gómez, José Luís ; Fernández Márquez, Diana.<br>Confraría de A Coruña (asistencia técnica)<br>Confraría de Fisterra (asistencia técnica) |
| **Técnicos/as** | **Bolseiros/as** |
| Victoria Bouzamayor Yáñez.; Mª Josefa Cotarelo Jardón; Francisco Javier Páez Pérez.; Beatriz Rodríguez Álvarez; Mercedes Ruíz Misioné | Nerea Fontán Valdivia; Bibiana Viñas Camiña |
| **Entidade que financia**: Consellería do Mar - Xunta de Galicia | |
| **Data de inicio**: Xuño de 2018 | **Data de finalización**: Decembro de 2020 |


**RESUMO**

Esta acción estará estruturada en dous subproxectos, un deles "Proxecto de cultivo e repoboación do ourizo de mar", que abordará o cultivo do ourizo en criadeiro para obter xuvenís con fins de repoboación, así como o seguimento destes xuvenís no medio natural. Como resultado da produción obtida levarán a cabo as operacións de repoboación en diferentes zonas. As zonas elixidas corresponden ó ámbito das confrarías da Coruña (Millenium e Illas de San Pedro); Fisterra (Pardas e Sardiñeiro ) e Lira (Reserva Mariña de Interese Pesqueiro, RMIP) dos Miñarzos.

O outro subproxecto "Estudo das poboacións naturais de ourizo na RMIP, Os Miñarzos, e seguimento das operacións de repoboación" centrarase en ampliar o coñecemento dalgúns aspectos da dinámica de poboacións do recurso, que resulten relevantes para a súa xestión pesqueira.


**Subproxecto 1: Cultivo e repoboación do ourizo de mar**

A produción de xuvenís de ourizo realizarase no CIMA de Ribadeo. Non se puido empezar este ano porque aínda non foi posible contratar o persoal técnico necesario, pero estivéronse a realizar no Centro de Cultivos os traballos necesarios para adecuar as instalacións do Centro ás necesidades específicas para o cultivo desta especie.

Neste primeiro ano, a asistencia técnica da Coruña procedeu á selección da zona produtiva máis adecuada para a repoboación e da cal obteranse os individuos reprodutores. A zona elixida, para a realización do presente proxecto, comprende o sublitoral rochoso nas Illas de San Pedro pertencente ao Sector A (CF 028), localizadas dende Pt Langosteira ao dique de Abrigo. A superficie de actuación deste proxecto forma parte dun dos sectores de extracción que están sendo explotados por medio dun plan de explotación conxunto, entre as Confrarías de Pescadores da Coruña e Barallobre.

Unha vez seleccionada a zona, realizouse unha primeira avaliación sobre o seu estado, para verificar cal é a máis adecuada para o desenvolvemento do proxecto. Para esta avaliación realizáronse varias mostraxes nas que participaron, ademais da asistencia técnica da confraría de pescadores, varios mergulladores (tripulantes do plan conxunto) e tamén tívose que contratar o servizo dunha embarcación.

A asistencia técnica de Fisterra, fixo o propio nesta zona, facendo unha selección que comprende o sublitoral rochoso próximo á localidade de Sardiñeiro, zona esta xestionada polo plan conxunto de explotación de ourizo da zona V dende o ano 2002, ano no que nace o plan conxunto e no que participan os mergulladores-mariscadores das confrarías de pescadores de Lira, Corcubión e Fisterra. Tamén fixo unha primeira avaliación con varios mostraxes.

**Subproxecto 2: Estudo das poboacións naturais de ourizo na RMIP-Os Miñarzos. Seguimento das operacións de repoboación**.

Para abordar este subproxecto, neste primeiro ano, fíxose unha mostraxe submareal e outra intermareal na RMIP "Os Miñarzos" (Lira).

O lugar de realización da mostraxe submareal e o seu deseño experimental, veu determinada por unha mostraxe previa levada a cabo por técnicos do CIMA en xullo do 2016 á solicitude do OXESCO da RMIP. Realizouse dende unha embarcación, mediante censos visuais e extractivos utilizando técnicas de mergullo. Consistiu no reconto e recolección de individuos ao longo de dous transeptos lineais de 100 metros de lonxitude, trazados no fondo mariño rochoso ata unha profundidade máxima de 15 metros. Os cabos estaban sinalizados con etiquetas numeradas cada 5 metros, que delimitaron un total de 20 tramos por transepto. Os extremos dos cabos fondeados foron lastrados con pezas de chumbo e sinalados con boias, para facilitar o rexistro dos puntos inicial e final de cada transepto mediante un GPS manual de marca GARMIN 72 H. Os individuos recollidos foron medidos con

calibres dixitais a bordo da embarcación e devoltos ao mar na mesma zona de extracción.

zona intermareal rochosa de Ximprón, dentro RMIP "Os Miñarzos", mediante a recolección de individuos presentes nas unidades da mostraxe, que consistiron en 11 transectos de 5 x 1 metros e 31 calicatas de 1 x 1 metro. As coordenadas dos puntos da mostraxe foron rexistradas mediante GPS. A mostraxe levouse a cabo mediante recolección a pé dos individuos, utilizando traxes de neopreno, vadeadores, gafas de mergullo, forquita e capachos. A totalidade dos ourizos recolleitos foron medidos e parte deles foron tamén pesados e despois devoltos ao mar.

**Resultados obtidos**

**Mostraxe submareal na RMIP-Os Miñarzos**

O obxectivo desta mostraxe era a comparación do estado poboacional do recurso entre o ano 2016 e o ano 2018, espazo de tempo durante o cal houbo unha veda nesa zona que empezou en xaneiro do 2017.

A imposibilidade de completar a mostraxe, fixo que soamente se teñan resultados parciais, sobre todo tendo en conta que as zonas que faltan son precisamente onde se atopan as principais agregacións de individuos.

Polo tanto preséntanse resultados que corresponden aos transeptos comúns realizados no ano 2016 e 2018 (Táboa I). Son 16 transeptos que corresponden a zona onde existe baixa densidade de ourizos, que é a menos relevante xa que precisamente esa baixa densidade fai que non sexa rendible a súa explotación.

Pódese apreciar que aumenta o número de individuos total e especialmente o número de individuos de tamaño comercial, aínda que o test t de comparación de medias non dá significativo para ningún grupo (tamaño no comercial, comercial e total) entre os dous anos observados (para α=0,05).

| | Ano 2016 (Transeptos que coinciden con 2018) | | | Ano 2018 (Resultados parciais) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Densidade | | | Densidade | | |
| | Individuos/m$^2$ | Lim +/ - (0,05) | Porcent (%) | Individuos/m$^2$ | Lim +/ - (0,05) | Porcent (%) |
| **Non Comercial** | 0,19 | 0,20<br>0,17 | 69,3 | 0,08 | 0,09<br>0,07 | 18,14 |
| **Comercial** | 0,08 | 0,09<br>0,08 | 30,7 | 0,35 | 0,44<br>0,28 | 81,86 |
| **Total** | 0,27 | 0,30<br>0,24 | | 0,43 | 0,55<br>0,34 | |

**Táboa I**. Media da densidade (individuos/m2) dos transeptos submareais realizados ata agora (ano 2018) na RMIP "Os Miñarzos".

O gráfico de densidades por tamaños (Fig. 1 e 2) amosa que entre os anos 2016 e 2018 producese un desprazamento dos individuos (cohorte) cara a tamaños superiores unido a un incremento na densidade, aínda como xa comentamos, non significativo.

Tamén pode apreciarse a escasa densidade que presentan os individuos de tamaños pequeno e intermedios. Para o caso dos tamaños máis pequenos, é probable que exista unha infraevaluación metodolóxica debida a súa escasa detectabilidade, pero no caso dos tamaños intermedios (30 a 50 mm) parece que existe unha falla no recrutamento durante un ou varios anos. Como estamos falando da zona de baixa densidade onde a explotación do ourizo non é rendible, haberá que esperar contar cos datos das zonas de alta densidade para comprobar si a falla de recrutamento está xeneralizada, sobre todo tendo en conta que o ourizo é unha especie densodependente, o que fai que a fixación dos xuvenís poida ser moi diferente nas zonas de alta e baixa densidade de adultos.

**Figura 1**. Densidades (Ind/m2) de ourizo por clases de tamaño (clases de 5 mm). Resultados para os transeptos do 2016 que coinciden cos realizados ata agora no 2018, na RMIP "Os Miñarzos"

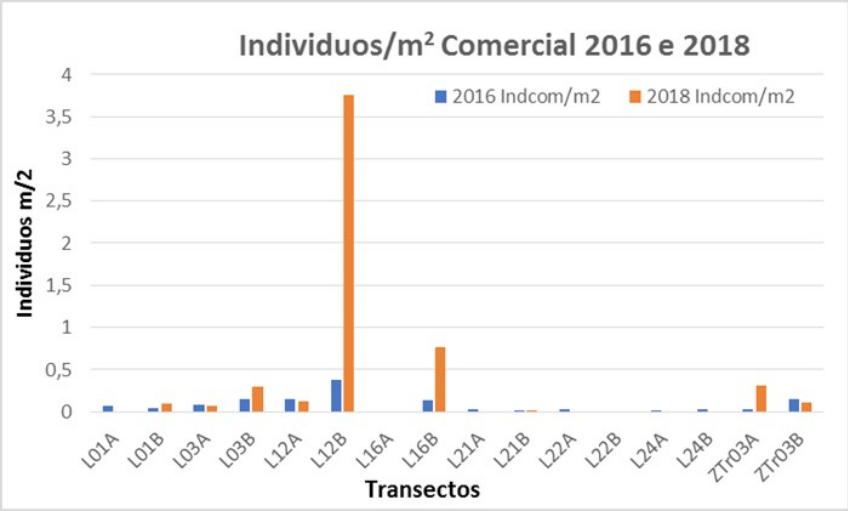



**Figura 2**. Densidades (Ind/m2) obtidas nos diferentes transeptos os anos 2016 e 2018, na RMIP "Os Miñarzos".

**Mostraxe intermareal na RMIP-Os Miñarzos**

No caso do intermareal non existen mostraxes previas nesta zona, polo que o obxectivo foi avaliar o estado inicial do recurso antes do inicio da campaña de extracción en outubro.

A idea inicial foi, ao igual que no caso submareal, utilizar o transepto como unidade da mostraxe, pero non resultou operativo debido á natureza do fondo rochoso presente na zona. A grande cantidade de pedras soltas que atopamos fixo necesario realizar unha mostraxe moi minuciosa, con volteo das pedras para atopar os ourizos xuvenís que se encontran nas caras laterais e inferior das mesmas. Isto fixo que fose necesario reducir a superficie da mostraxe e incrementar o número de puntos, polo que se pasou a utilizar calicatas de 1 x 1 metro de lado.

A distinta superficie das unidades da lugar á distinta variabilidade entre as de maior (transeptos) e menor superficie (calicatas). Debido a isto para o tratamento dos datos dividiuse a zona en dous estratos, un deles para a zona onde se utilizaron transeptos e outra para as calicatas e con estes estratos se fixo unha análise conxunta (Táboa II).

Os resultados desta mostraxe inicial, revelan unha distribución de tamaños onde se atopan individuos de pequeno tamaño (10 a 30 mm) e de tamaño grande (> 50 mm) aínda que fallan os tamaños intermedios (30 a 50 mm) (Fig. 3).

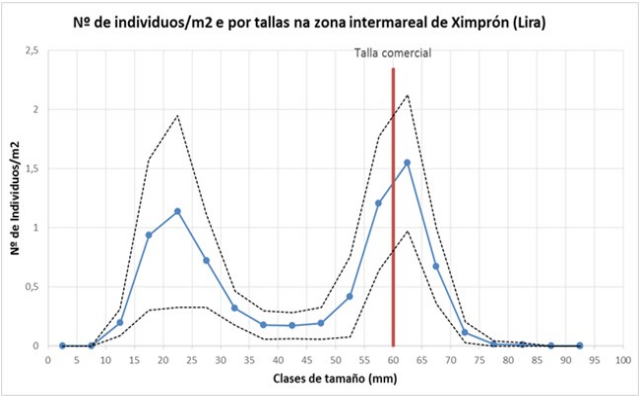



**Figura 3**. Distribución de tamaños (RMIP "Os Miñarzos").

| | Densidade | | | Media | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Individuos / m²** | +/- t(0,05) | Porcent(%) | **g/m²** | +/- t(0,05) |
| **Non Comercial** | 5,49 | 8,29<br>2,69 | 69,84 | 142,75 | 212,3<br>73,2 |
| **Comercial** | 2,37 | 3,23<br>1,51 | 30,16 | 235,97 | 321,0<br>150,9 |
| **Total** | 7,86 | 11,08<br>4,64 | | 378,72 | 506,6<br>250,9 |

**Táboa II**. Mostraxe no intermareal (Ximprón RMIP "Os Miñarzos").

Esta falta de individuos de tamaño intermedio pode ser debida a unha falta de éxito na fixación das larvas, nalgúns anos, ou dunha distribución espacial distinta para eses tamaños.

Nas mostraxes parciais da zona submareal non se atopan tampouco individuos intermedios (30 a 50 mm), e bastante pouca cantidade dos máis pequenos (10 a 30 mm), que pode ser debido, polo menos en grande parte á dificultade da súa detección. O feito de que aínda así se teñan encontrado máis individuos entre os tamaños 10 a 30 mm que entre os tamaños de 30 a 50 mm en ámbalas dúas mostraxes, parece confirmar a falla deses tamaños o cal pode resultar nunha escaseza de ourizo nos vindeiros anos. As mostraxes que fallan nas zonas de alta densidade de ourizo na zona submareal, que nalgúns casos están preto das zonas avaliadas no intermareal, servirán para contrastar estes resultados preliminares.

| **Título da Acción de investigación – Acrónimo – Código CIMA** | |
|---|---|
| **Engorde en batea de semente de berberecho producida en criadeiro. Mellora da metodoloxía de cultivo.** CROQUEDOUS. CIMA 16/10 | |
| **Investigador/a Principal** | |
| José Miguel Fuentes González | |
| **Outros/as investigadores/as participantes** | |
| CIMA: María Asunción Cao Hermida; David Iglesias Estepa | Confraría de Cambados (asistencia técnica) |
| **Técnicos/as** | **Bolseiros/as** |
| María Victoria Gregorio Chenlo; Ramón Giráldez Rivero; Isidro Fernández Abuín; María del Carmen Solla Vicente | |
| **Entidade que financia**: Consellería do Mar - Xunta de Galicia | |
| **Data de inicio**: Outubro de 2016 | **Data de finalización**: Decembro de 2018 |


**RESUMO**

A explotación das poboacións naturais dos berberechos do xénero *Cerastoderma* nas costas de Galicia é unha actividade económica importante. A cantidade da biomasa extraída variou nos últimos dez anos entre un mínimo de 1.268 toneladas no ano 2014 e un máximo de 5.024 toneladas no ano 2008 (www.pescadegalicia.com). A facturación do recurso extraído en toda Galicia acadou no ano 2018 máis de 15 millóns de euros correspondentes ás 2.476 toneladas extraídas. A extracción deste recurso realízase ao longo de toda a costa galega, dende a Mariña lucense ata a ría de Vigo, aínda que máis do 70% da produción ten lugar na ría de Muros e Noia. Estas poboacións naturais de berberecho están tradicionalmente suxeitas a episodios recorrentes de mortalidade, asociados nalgúns casos á fortes baixadas da salinidade e noutros casos á diversos procesos patolóxicos (Carballal et al., 2001; Villalba et al., 2001). Así e todo, e debido á estratexia reprodutiva propia deste xénero, estas poboacións recuperáronse sempre axiña dos episodios de mortalidade. Pola contra, e á diferenza do acontecido tradicionalmente, as poboacións de berberecho das rías de Arousa, Pontevedra e Vigo sufriron, a partir do ano 2012, fortes mortalidades que decimaron os bancos explotados desta especie. As causas destas fortes e recentes mortalidades foron atribuídas a presenza dunha nova especie parasita do xénero Marteilia que non fora previamente detectada nas costas de Galicia (Villalba et al., 2014). Probas moleculares indicaron que este novo parasito corresponde á especie Marteilia cochillia, especie que xa foi asociada a intensas mortalidades do berberecho no delta do río Ebro (Carrasco el al., 2011, 2012, 2013).

Como no caso doutras marteilioses, este parasito ocupa grandes áreas do epitelio dos túbulos dixestivos dos berberechos, o cal ten como consecuencia a imposibilidade de absorber o alimento inxerido e, finalmente, a morte do individuo por inanición. As formas directas de loita contra este tipo de enfermidades son complexas. O uso de axentes terapéuticos non é doado xa que as poboacións naturais de berberecho atópanse en espazos non confinados. Por outra banda, a erradicación completa das poboacións afectadas pode resultar non efectiva xa que non coñecemos con detalle o ciclo completo da enfermidade. Neste senso, non se desbota a existencia dun ou máis hóspedes intermedios deste parasito, como xa ten acontecido no caso do parasito do mexillón, *Marteilia refringens*, quen tamén apareceu no ovario dunha especie de copépodo (Audemard et al., 2002).

Unha forma diferente de loita contra este tipo de pandemias é a obtención de estirpes resistentes ou tolerantes á enfermidade mediante programas de selección xenética.

Esta selección pódese levar a cabo mediante programas de cría selectiva, como xa se fixo nos casos da loita contra varias enfermidades da ostra *Crassostrea virginica*, a causada polo protozoo *Haplosporidium nelsoni* (Ford e Haskin, 1987), a enfermidade xuvenil da ostra (JOD; Davis e Barber, 1999) e a enfermidade causada polo parasito *Perkinsus marinus* (Ragone Calvo et al., 2003), e tamén na loita contra a bonamiose que afecta a ostra plana europea, *Ostrea edulis* (Baud et al., 1997; Naciri-Graven et al., 1998, 1999; Culloty et al., 2001 e da Silva 2005; Fuentes e Villalba, 2007). Outra maneira de levar a cabo o programa de mellora xenética é a través de técnicas de hibridación, intra ou inter-específica. Esta segunda aproximación é especialmente interesante no caso da *Marteilia cochillia* xa que hai evidencias de que a outra especie de berberecho que comparte área xeográfica co *C. edule*, o berberecho birollo, *C. glaucum*, non está afectada por este parasito. Para a obtención destas estirpes resistentes mediante programas de mellora xenética é imprescindible utilizar técnicas de cultivo en criadeiro. As técnicas de cultivo de moluscos bivalvos en criadeiro foron desenvolvidas e utilizadas con éxito durante as últimas catro décadas para a produción experimental e comercial de diversas especies en todo o mundo.

No caso do berberecho, estas técnicas están aínda pouco desenvolvidas xa que historicamente a súa comercialización baseouse exclusivamente na extracción de bancos naturais. Recentemente, estas técnicas foron postas a punto nos Países Baixos para dar responsa á carencia de produción natural de berberecho, como consecuencia da entrada en vigor de normativas proteccionistas da avifauna salvaxe que prohiben a utilización da pesca hidráulica nos bancos marisqueiros tradicionais do Wadden Sea (Pronker et al., 2013). Nun

recente programa de investigación,"*PGIDIT-CIMA 14/03 CROQUE" Posta a punto das técnicas de cultivo en minicriadeiro das especies do xénero Cerastoderma de Galicia*", levado a cabo no Centro de Investigacións Mariñas, puxemos a punto as técnicas básicas para a produción en criadeiro de semente de berberecho galego. Un dos resultados máis relevantes deste estudo foi demostrar que é posible obter, a partir desta semente producida en criadeiro, individuos co tamaño mínimo comercial mediante o seu engorde rápido en batea, antes de que se manifesten as consecuencias devastadoras do andazo da marteiliose. Deste xeito, semente de berberecho, producida no criadeiro do CIMA durante os años 2015 e 2016 a partir de reprodutores madurados artificialmente, foi engordada en cultivo en suspensión dende un tamaño inicial entre 5 e 10 mm (lonxitude antero-posterior) ata o tamaño comercial actual (25 mm) e incluso ata o tamaño comercial previo (28 mm) nun período moi curto de tempo (4-5 meses), antes da aparición invernal da marteiliose. Este feito abre a porta ó engorde experimental en batea de semente de berberecho producida en criadeiro, como técnica complementaria á explotación das poboacións presentes nos bancos naturais.

O obxectivo principal desta Acción de investigación foi demostrar que é posible levar a cabo unha estratexia semi-industrial e rendible de engorde en suspensión (batea) de semente de berberecho producida en criadeiro. Esta estratexia baséase na produción de semente fóra das épocas de maduración natural, mediante o acondicionamento dos reprodutores en criadeiro, para logo proceder ó seu engorde rápido en batea durante a primavera e o verán, antes da aparición no período outono/inverno dos episodios de marteiliose. Outros obxectivos foron: (1) optimizar as técnicas de maduración artificial en criadeiro (acondicionamento) mediante un estudo comparado do proceso de maduración entre un sistema en aberto e un sistema en recirculación, (2) mellorar as técnicas de cultivo larvario en criadeiro, mediante o uso de produtos que reduzan as mortalidades no cultivo e (3) mellorar as técnicas de indución das postas tanto en machos como en femias e do control dos cruzamentos.

## RESULTADOS

### Fase 1. Obtención, mantemento e acondicionamento dos reprodutores

O primeiro obxectivo desta Acción de investigación foi realizar un estudo comparado do proceso de maduración artificial en criadeiro (acondicionamento) dos berberechos entre un sistema en aberto (FTS) e un sistema en re-circulación (RAS). Durante o ano 2018 realizamos a segunda parte (a primeira parte realizouse no ano 2017) deste acondicionamento comparado entre os dous sistemas utilizando berberechos procedentes da ría de Noia e da foz do río Anllóns (Lotes CE-N e CE-RA, respectivamente).

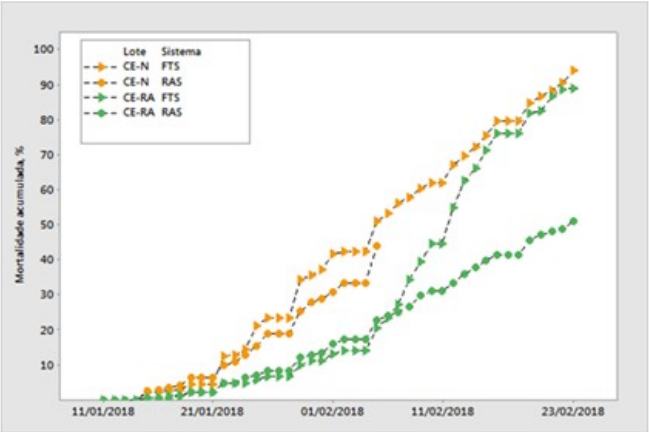
Así, o día 11 de xaneiro do 2018, iniciamos o acondicionamento dun total de 528 individuos de cada un dos dous lotes (1.056 en total), repartidos en 8 cubetas (4 para FTS e 4 para RAS), a razón de 132 individuos por cubeta. O índice gonadal (IG) destes individuos foi de 1,0 e 1,7 para os lotes CE-RA e CE-N, respectivamente, con mais do 60% dos individuos de ámbolos dous lotes en algún estado da gametoxénese (inicial, avanzada e/ou madurez). O acondicionamento destes individuos mantívose ata o 23 de febreiro de 2018. Tanto en FTS como en RAS, as desovas foron máis rápidas nos berberechos do lote CE-N (2 semanas dende o inicio do acondicionamento) que nos do lote CE-RA (3 semanas). Estas diferenzas foron, sen dúbida, debidas ao maior grao de desenvolvemento gonadal dos individuos CE-N. Como se pode observar na seguinte táboa, o número total de desovas foi moi similar para os dous lotes (7 e 8 para CE-RA e CE-N, respectivamente) pero moi diferente entre os dous sistemas de acondicionamento (12 e 3 para FTS e RAS, respectivamente).

| Lote | Sistema | Nº de desovas | Nº de larvas /desova (media±e.e.) |
|---|---|---|---|
| CE-RA | FTS | 5 | 134.550±12.650 |
| CE-RA | RAS | 2 | 29.600±7.400 |
| CE-N | FTS | 7 | 81.971±23.376 |
| CE-N | RAS | 1 | 96.500 |

Os valores do número medio de larvas por desova (columna dereita na Táboa) foron claramente inferiores aos rexistrados o ano anterior para as mesmas combinacións de lotes e sistemas. Neste caso, tampouco detectamos diferencias significativas no número de larvas por desova nin entre lotes (GLM ANOVA, F=1,04; P=0,328) nin entre sistemas (GLM ANOVA, F=2,57; P=0,135).

Tal e como se pode observar na seguinte figura, a mortalidade final acumulada dos individuos acondicionados en FTS (liñas con triángulos) foi considerablemente maior que a dos individuos acondicionados en RAS (liñas de círculos). Nas primeiras semanas do acondicionamento, cando aínda non se produciran as primeiras desovas, as mortalidades evolucionaron de xeito moi semellante.

As mortalidades acumuladas comezaron a diverxer xusto despois que os individuos acondicionados empezaron a desovar. No caso do lote CE-N, o seu acondicionamento no sistema RAS tivo que ser abortado o 5 de febreiro de 2018 por mor dunha súbita contaminación bacteriana que aumentou de forma brusca a mortalidade acumulada (círculos cor laranxa na figura).




**Fase 2. Indución da posta e obtención dos gametos**

Entre os días 16 e 27 de xuño de 2018 fixemos tres intentos de indución da posta de berberechos *C. edule* procedentes da foz do río Anllóns en Cabana de Bergantiños e Vilanova de Arousa (lotes CE-RA e CE-VN, respectivamente) e de berberechos birollos *C. glaucum* procedentes de Rianxo e Vilanova de Arousa (lotes CG-RX e CG-VN, respectivamente). En tódolos casos utilizamos o mesmo proceder. Unha vez no laboratorio, limpáronse os berberechos e introducíronse nun refrixerador en seco e a ≅ 4ºC, onde se mantiveron ata o día seguinte (≅15-20 horas). Pasado este tempo, transferimos os berberechos (≅50 individuos/lote) a vasos de plástico individuais cheos con auga de mar quentada a 20ºC, filtrada por 1µm e esterilizada por UVA. Despois de @ 1 hora nestas condicións, baleiráronse os vasos e enchéronse con auga de mar a 10ºC. Este ciclo térmico repetiuse varias veces. No primeiro intento (lotes CE-RA e CG-RX) non obtivemos desovas nin de ♂ nin de ♀. No segundo dos intentos (lotes CE-VN e CG-RX) conseguimos inducir as desovas de 3♂CE, 4♀CE, 1♂CG e 4♀CG aínda que non en tódolos casos con gametos de boa calidade. Despois de seleccionar os gametos de máis calidade, realizamos os seguintes cruzamentos: 3♀CE x 3♂CE e 1♀CG x3♂CE en cadanseu vaso de plástico de 2 L de capacidade.

Pasadas 48 horas dende as fecundacións atopamos oocitos sen fecundar en estado de degradación pero non embrións nin larvas en D en ningún dos dous cruzamentos.

No terceiro dos intentos (lotes CE-VN e CG-VN) obtivemos desovas de 3♂CE, 15♀CE, 3♂CG e 8♀CG o cal permitiunos levar a cabo cruzamentos das catro combinacións posibles: ♀CE x ♂CE, ♀CE x ♂CG, ♀CG x ♂CE e ♀CG x ♂CG. Non obstante, e como xa acontecera no intento anterior, tampouco neste caso fomos quen de obter nin embrións en desenvolvemento nin larvas en D en ningún dos catro cruzamentos realizados.

**Fase 3. Cultivo larvario e metamorfose**

Durante o ano 2018 fixemos novos cultivos larvarios a partir de varios lotes de berberechos *C. edule* procedentes do fondo da ría de Muros e Noia (CE-N), da foz do río Anllóns en Cabanas de Bergantiños (CE-RA) e dun banco marisqueiro de Vilanova de Arousa (CE-VN). Para estes cultivos utilizáronse prioritariamente os novos tanques de polipropileno gris de 150 L aínda que tamén en algunha ocasión os antigos de fibra de vidro de 50 L. En tódolos casos, os cultivos foron tratados cunha mestura de 4 mg/L de eritromicina e 4 mg/L de oxitetraciclina en lugar dos 8 mg/L de cloranfenicol subministrados en anos anteriores. Os resultados obtidos amósanse na seguinte táboa:

| Especie | Lote | Nº desovas | Nº de cultivos larvarios iniciados (% respecto nº de desovas) | Nº de larvas /desova (media ± e.e.) | Nº de cultivos estado metamorfose (% respecto nº cultivos larvarios iniciados) |
|---|---|---|---|---|---|
| CE | CE-N | 21 | 11 (52,4%) | 503.982 ± 272.243 | 5 (45,5%) |
| CE | CE-RA | 28 | 17 (60,7%) | 179.097 ± 41.794 | 13 (76,5%) |
| CE | CE-VN | 7 | 3 (42,9%) | 854.167 ± 477.984 | 3 (100%) |
| Total | Total | 56 | 31(55,4%) | 359.708 ± 111.276 | 21 (67,7%) |

A porcentaxe media total de cultivos larvarios iniciados respecto do número de desovas (55,4%) foi lixeiramente inferior ao rexistrado o ano anterior (66,2%). A porcentaxe media total de cultivos que acadan a metamorfose respecto

de cultivos larvarios iniciados foi lixeiramente superior (67,7% fronte a 53,0%).

Finalmente, o número medio de larvas por desova (359.708±111.276) foi moi semellante ao rexistrado o ano anterior (390.947±116.463).

**Fase 4. Pre-engorde da semente**

Unha vez completada a metamorfose de tódalas larvas de cada lote cultivado, as postlarvas (semente) superviventes foron pre-engordadas no criadeiro ata alcanzar o tamaño axeitado para o seu traslado á batea para continuar alí o seu engorde definitivo. Para este pre-engorde no criadeiro seguíronse os mesmos procedementos xa descritos para a anterior Acción de investigación "*CROQUE-Posta a punto das técnicas de cultivo en minicriadeiro das especies do xénero Cerastoderma de Galicia*".

No ano 2017, unicamente 3 dos 26 (11,5%) cultivos que chegaron á fase de metamorfose foron trasladados á batea para o seu engorde (cultivos CE-N-14 e CE-RA-3/6). Dezanove dos vinte e seis (73,1%) sufriron intensas mortalidades durante o período de pre-engorde pese a ser tratados con 8 mg/L de cloranfenicol. Tres dos vinte e seis (11,5%) produciron moi pouca semente e a semente dun último cultivo foi utilizado para outro experimento. No ano 2018, só 5 dos 21 (23,8%) cultivos que acadaron a fase de metamorfose foron transferidos a batea. O resto dos cultivos (76,2%) volveron a sufrir mortalidades inesperadas a pesar de ser tratados coa mesma mestura de antibióticos utilizada durante o cultivo larvario (4 mg/L de eritromicina + 4 mg/L de oxitetraciclina). Tanto no ano 2107 como no 2018, varias mostras de individuos dos lotes que sufriron as mortalidades foron analizadas mediante técnicas histopatolóxicas sen que se detectara parasito algún, nin lesión que puidesen xustificar as mortalidades acontecidas.

A aparencia histolóxica destes individuos foi totalmente normal e compatible coa de individuos sans, sen presencia de reacción hemocitaria que denotara signos de estrés. Tamén se realizaron cultivos en placas de ágar-ágar TCBS (Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarosa) para a detección de posibles infeccións de bacterias do xénero Vibrio. Estes cultivos realizáronse tanto con sobrenadantes de triturado de individuos afectados como coas augas de cultivo e da mestura microalgal, dando sinal positiva (colonias de cor verde) unicamente nalgunhas mostras de triturado de individuos afectados. Unha posible causa explicativa destas mortalidades recorrentes na fase de pre-engorde da semente sería unha potencial toxicidade acumulada dos antibióticos utilizados para previr as frecuentes infeccións bacterianas tanto na fase previa de cultivo larvario como na propia fase de pre-engorde.

Para confirmar ou desbotar esta posibilidade deseñamos una serie de experimentos ad hoc utilizando varias desovas dos lotes CE-RA e CE-VN. Nos dous primeiros experimentos utilizamos dúas desovas consecutivas do lote CE-RA. A primeira desova (CE-RA-27) foi tratada durante a fase de cultivo larvario coa dose habitual de mestura dos antibióticos eritromicina (4 mg/L) e oxitetraciclina (4 mg/L). A segunda desova (CE-RA-28) foi tratada coa metade desa dose. Unha vez que as larvas de cada cultivo presentaban signos da proximidade da fixación-metamorfose (activación do pé e presenza de "ollo"), o seu número foi determinado e establecéronse catro alícuotas por cada cultivo que se repartiron entre catro tambores de fixación de 100 µm (60.000 larvas/tambor) en cadanseu tanque tronco-cónico de 50 L de capacidade (8 tanques en total). O pre-engorde desta semente mantívose por 8 semanas seguindo os protocolos descritos na anterior Acción de investigación. Para cada un dos dous cultivos (CE-RA-27 e CE-RA-28) establecéronse os seguintes tratamentos:

1. Control C: semente sen tratar con antibiótico algún

2. Tratamento CL: semente tratada con 8 mg/l de cloranfenicol

3. Tratamento M: semente tratada con 8 mg/l de eritromicina + oxitetraciclina (50:50)

4. Tratamento M/2: semente tratada coa metade desa mestura

Ao inicio de cada pre-engorde, e logo unha vez por semana, fixéronse 4 estimacións por cada tratamento das seguintes variables:

1. O número de larvas vivas (LV)

2. O número de larvas mortas (LM)

3. O número de postlarvas vivas (POSTV)

4. O número de postlarvas mortas (POSTM)

5. O número de individuos deformes (D).

Nos dous seguintes experimentos utilizamos tamén dúas desovas consecutivas, pero neste caso do lote CE-VN. A primeira desova (CE-VN-5) foi tratada na fase de cultivo larvario coa metade da dose habitual de antibióticos (2mg/L de eritromicina+2mg/L de oxitetraciclina) e a segunda desova (CE-VN-6) foi tratada coa dose completa (4mg/L de eritromicina+4mg/L de oxitetraciclina). O resto do deseño experimental, tempo de engorde e variables medidas foron iguais aos dous anteriores experimentos agás os tratamentos empregados, que neste caso foron:

1. Control C: semente sen tratar con algún antibiótico

2. Tratamento CL: semente tratada con 8 mg/l de cloranfenicol

3. Tratamento ERI: semente tratada con 8 mg/L de eritromicina

4. Tratamento OXI: semente tratada con 8 mg/l de oxitetraciclina

Dos resultados obtidos nesta serie de experimentos non se pode concluír a existencia dunha toxicidade ou efecto adverso causado polos antibióticos que explique as

mortalidades da semente en anteriores experiencias de pre-engorde. Pola contra, si parece deducirse un efecto dos antibióticos no alargamento da fase de transición de larva a postlarva. Outra conclusión que se colixe destes experimentos é a conveniencia de utilizar antibióticos para aumentar a supervivencia da semente na fase de pre-engorde no criadeiro, aínda que este uso non sempre foi necesario.

Como no ano anterior, as bolsas foron introducidas en varias caixas perforadas de plástico que foron penduradas da batea formando unha restra. A evolución destes tres lotes na batea segue a levarse a cabo actualmente mediante mostraxes mensuais e está previsto que finalice no primeiro trimestre do ano 2019.

**CONCLUSIÓNS**

Do traballo desenvolvido nesta Acción de investigación "CROQUEDOUS – Engorde en batea de semente de berberecho producida en criadeiro. Mellora da metodoloxía de cultivo (código CIMA 16/10)" extraemos as seguintes conclusións:

1. A fase de acondicionamento (maduración artificial no criadeiro) dos individuos utilizados como reprodutores pódese levar a cabo tanto nun sistema con circulación de auga de mar en aberto (FTS), como nun sistema en recirculación (RAS).

   Dende o noso punto de vista é recomendable iniciar esta fase a partir de individuos reprodutores que xa iniciaran a súa gametoxénese no medio natural, para deste xeito evitar un excesivo estrés dos individuos acondicionados. Para unha resposta rápida recomendamos acondicionar estes individuos nun sistema en circuíto aberto, mentres que para un mantemento mais prolongado e a obtención de desovas máis tardías, recomendamos o uso do sistema RAS.

2. Mentres non se dispoña dunha tecnoloxía alternativa (axentes probióticos, produtos inmunoestimulantes, bloqueantes do "quorum sensing" ou loita mediante bacteriófagos) é recomendable utilizar na fase de cultivo larvario, tratamentos profilácticos con axentes antibióticos que eviten a aparición de bacterias oportunistas, especialmente as pertencentes ó xénero Vibrio. Como alternativa ao proscrito Cloranfenicol propoñemos o uso dos antibióticos Eritromicina e/ou Oxitetraciclina.

3. Para mellorar a supervivencia na fase de pre-engorde da semente propoñemos a continuación do tratamento profiláctico con estes mesmos antibióticos.

4. O intento de engorde de semente en batea ata o tamaño comercial, levado a cabo durante o ano 2017, fracasou debido a aparición precoz (mes de agosto) do andazo da marteiliose. Neste sentido, consideramos que a aparición cada vez máis precoz desta enfermidade e a súa posible evolución cara a unha patoloxía atemporal constituiría unha seria ameaza tanto para a estratexia que estamos a desenvolver nestas accións de investigacións como para outras estratexias de erradicación desta enfermidade.

# 5.2 Accións de investigación en PATOLOXÍA

| Título da Acción de investigación – Acrónimo – Código CIMA | |
|---|---|
| **Estudo da eliminación de virus entéricos patóxenos en ostra mediante procesos de reinstalación e depuración**. CIMA 16/08 | |
| **Investigador/a Principal** | |
| Dra. Mª Carmen López Gómez | |
| **Outros/as investigadores/as participantes** | |
| | INTECMAR: Cristina Alvarez.<br>USC: Dr. Jesús López Romalde (Microbioloxía)<br>Dr. Miguel Fernández Varela (Microbioloxía)<br>TRAGSATEC: Dra. Mariluz Vilariño Becerra |
| **Técnicos/as** | **Bolseiros/as** |
| Elena Penas Patiño | CIMA: Óscar Grande Ocampo<br>USC: Enrique Rivadulla |
| **Entidade que financia**: Consellería do Mar - Xunta de Galicia | |
| **Data de inicio**: Marzo de 2016 | **Data de finalización**: Marzo de 2018 |


**RESUMO**

Nos últimos anos o aumento da importancia das operacións comercias internacionais (exportacións e importacións de produtos naturais, movementos de animais e vexetais, etc.), xunto co incremento da presión demográfica nas zonas costeiras, incrementou o risco de transmisión dunha gran variedade de enfermidades, principalmente relacionadas cos produtos alimentarios provenientes do medio mariño.

Habida conta de que a normativa europea actual non contempla normas que regulen os niveis de Norovirus (NoV) e Virus da Hepatite A (HAV), e recoñecida a necesidade do seu seguimento e control, o Laboratorio Comunitario de Referencia (CLR) para o seguimento dos contaminantes virais e bacteriolóxicos dos moluscos bivalvos, estivo levando a cabo durante os últimos anos roldas de ensaios de aptitude para a detección dos virus (NoV e HAV) en moluscos coa participación de distintos grupos de traballo europeos de detección de virus en alimentos. Este estudo levou á publicación da Norma ISO/TS 15216-1 e 2:2013.

Os resultados obtidos en traballos anteriores indican a necesidade de establecer un procedemento optimizado de reinstalación e/ou depuración para reducir o risco real de contaminación por virus entéricos en moluscos que chegan ao mercado, principalmente aqueles que sexan consumidos crus, como é o caso da ostra. Polo que o esforzo do presente traballo está centrado no estudo da efectividade da reinstalación/depuración na eliminación dos virus entéricos.

Con este motivo deseñáronse 5 experiencias de reinstalación/depuración con cada especie de ostra (*Ostrea edulis* e *Crassostrea gigas*). As ostras proceden todas de Cambados D (ría de Arousa), por ser unha das zonas de maior produción e como zona de reinstalación escolleuse a ría de Aldán. En cada unha das experiencias levouse a cabo unha análise o día 0 (antes de levar as mostras á zona de reinstalación), día 15, día 22 e día 28.

Para o estudo da carga bacteriana de *Escherichia coli* (E. coli) empregouse a técnica do número máis probábel (NMP) segundo ISO-16649-3:2017 que é o método oficial para a clasificación das zonas de produción (Regulamento EU Nº 854/2004).

Para a detección de virus entéricos utilizouse a técnica de RT-qPCR (transcrición inversa e reacción en cadea da polimerasa en tempo real) con sondas TaqMan seguindo as recomendacións da técnica ISO/TS 15216-1:2013.

Para determinar a eficiencia de depuración ou efectividade de eliminación, nas zonas de reinstalación, comparáronse os datos obtidos a día 0; 14; 21 e 28 da carga de E. coli e dos distintos enterovirus analizados (NoV, HAV et SaV) nas 5 experiencias de reinstalación levadas a cabo para as dúas especies de ostra (ostra plana e ostra rizada). Indicar, que as experiencias con NoV,e HAV foron realizadas por duplicado no laboratorio do INTECMAR e na USC.

Das dez experiencias de reinstalación, en función das cargas virais atopadas, pensábase levar a cabo unha posterior depuración controlada en depuradora de moluscos, a elevada temperatura (15-17ºC), e avaliar a efectividade da depuración combinada previa detección e cuantificación viral (RT-qPCR), segundo ISO 15216-1:2013. Pero debido á baixa carga obtida ao final do proceso de reinstalación, non se considerou necesario facelo.

Os datos obtidos da carga bacteriana de *E. coli* están representados nas figuras 1 e 2.

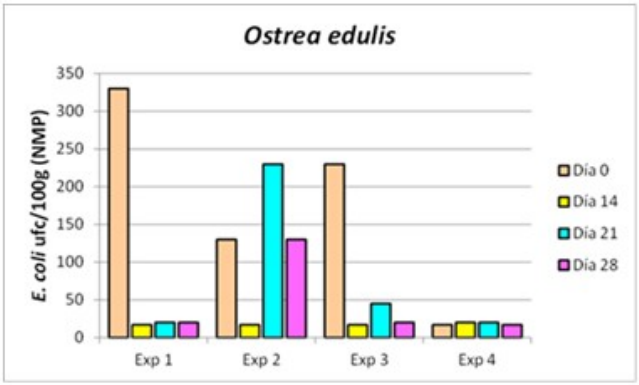



**Figura 1**. Resultados de E. coli en O. edulis (ostra plana)

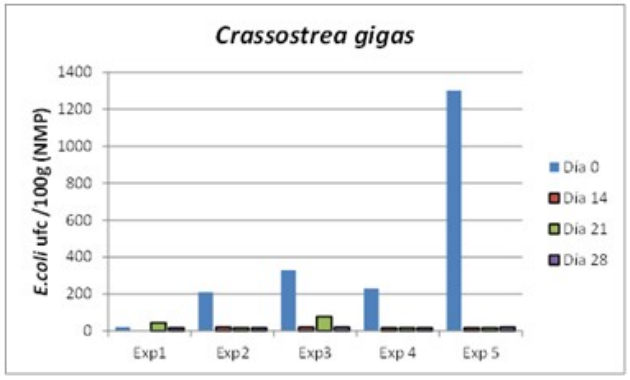



**Figura 2**. Resultados de E. coli en C. gigas (ostra rizada)

A ostra plana (*O. edulis*), mostrou en todo os casos, ao inicio das distintas experiencias (Día 0), unha carga de *E. coli* baixa/moi baixa. De todas maneiras no caso das experiencias 1 e 3 observouse capacidade de eliminación de E. coli (Figura 1). No caso da ostra rizada (*C. gigas*) sucede o mesmo, cabendo destacar a experiencia 5 na cal a carga bacteriana é a mais alta (1.300 ufc/100 g) de tódalas experiencias (incluídas as da ostra plana) e vese tamén nesta a capacidade de depuración (Figura 2). Estes datos indican que non houbo eventos de contaminación extraordinarios en ditas zonas nas datas analizadas.

Todos os resultados obtidos, tanto na ostra plana como na rizada, son coherentes coa clasificación microbiolóxica de cada zona, tanto a de produción como a de reinstalación, e non indican eventos de contaminación extraordinarios en ditas zonas.

Con respecto á presenza de virus entéricos (Norovirus, Hepatite A e Sapovirus). Os resultados amosaron que nas experiencias con ostra plana non se detectaron Norovirus (NoVGI nin GII), con excepción da mostra da experiencia 3 en Cambados (Día 0), na cal se observaron valores igual ao límite de cuantificación no caso de NoVGI (LOQ = 40 copias/g) e non moi elevado no caso de NoVGII (LOQ = 210 copias/g). Se temos en conta a suma das copias dos dous xenogrupos (750 copias/g) este valor está por debaixo das 1.000 copias/g que é o que a EFSA (European Food Safety Agency) segundo o proxecto "European Baseline Survey of Norovirus in oysters" considera como o nivel estimado de contaminación para a suma dos dous xenogrupos para un nivel de confianza do 95%. A baixa prevalencia xeral de virus entéricos podería estar relacionada coa meteoroloxía anómala para Galicia no inverno 2016/17 coa escaseza de precipitacións que evitaría o mal funcionamento das plantas de tratamento de augas residuais ou desbordamentos das mesmas, coa conseguinte diminución da posible contaminación das augas da ría.

Debido a falta de resultados positivos para NoV en O. edulis e tendo optimizado no laboratorio da USC o protocolo para detección de Sapovirus (SaV), sendo estes tamén virus entéricos moi relacionado con NoV, decidiuse analizar as mostras obtidas tamén para SaV.

Detectáronse SaV en todas as experiencias (Figura 3), ben na auga de emisario e cultivo en Cambados, ben nas primeiras mostraxes de tecido de ostra, pero non a tempo T21 e T28 despois da reinstalación. Neste caso parece, polo tanto, que a reinstalación en zona limpa é efectiva para a eliminación do virus.

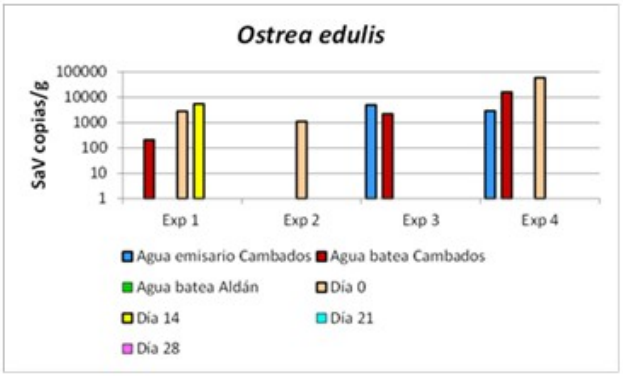



**Figura 3**. Resultados de SaV en *O. edulis* (ostra plana).

Os datos das experiencias con ostra rizada (Figuras 4 e 5) mostran que no laboratorio do INTECMAR, detectouse NoVGI en tódalas experiencias a tempo 0, excepto na experiencia 1, aínda que este dato non se pode considerar debido ao alto % de inhibición (80%, superior ao 75% que é o nivel máximo admitido), se ben tan só na experiencia 2 superáronse a tempo T0 as 103 copias/g de tecido. Na maioría das experiencias durante a reinstalación, os positivos atopados estiveron por debaixo de límite de cuantificación (LOQ = 40 copias/g). No caso do NoVGII só se detectou nas experiencias 1 e 2, e o valor obtido é superior a 103 copias de xenoma/g de tecido (1.027 e 2.082 copias/g en tempo 21 e 0, respectivamente) (Figura 5). Para NoVGII o límite de cuantificación (LOQ) da técnica é 210 copias/g e o límite de detección (LOD) 46 copias/g.

No laboratorio da USC unicamente se detectou NoVGI e GII na experiencia 4. Observouse NoVGI a tempo T0 en tecido de ostra (1.710 copias/g) (Figuras 4 e 5) valor considerablemente mais baixo que nos datos do INTECMAR (aínda que hai que destacar que a eficiencia de extracción foi mais baixa no caso do INTECMAR, o que poría xustificar este dato).Destacar que nas análises posteriores á reinstalación non se detectou NoVGI coincidindo cos datos do INTECMAR. Detectouse tamén

NoVGII en tecido de ostra nos tempos T0, T14 e T21 (5.210, 58.300 e 94.000 copias/g, respectivamente). É de destacar a detección do virus NoVGII na auga da zona de reinstalación (4.810 copias/g), o que podería explicar as deteccións en tecido de ostra nos tempos T14 e T21, así como os altos niveis de contaminación por NoVGII (103-104 copias de xenoma/g de tecido) tanto en auga como en tecido de ostra. Non se detectou ningún dos xenogrupos a tempo T28.

En xeral, observouse unha diminución do número de copias de xenoma no período de reinstalación, non detectándose en ningún caso valores > 103 copias de xenoma/g de NoVGI ou GII a tempo T28 ao final da reinstalación (Figuras 4 e 5), o cal o poderiamos considerar como un indicio de que a depuración na zona de reinstalación funciona.

En ningún dos laboratorios detectouse o virus da hepatite A (HAV) en ningunha das experiencias en tecido de ostra. Unicamente detectouse un positivo non cuantificable (<LOQ) en auga de cultivo de Cambados na experiencia 1 de ostra xaponesa.

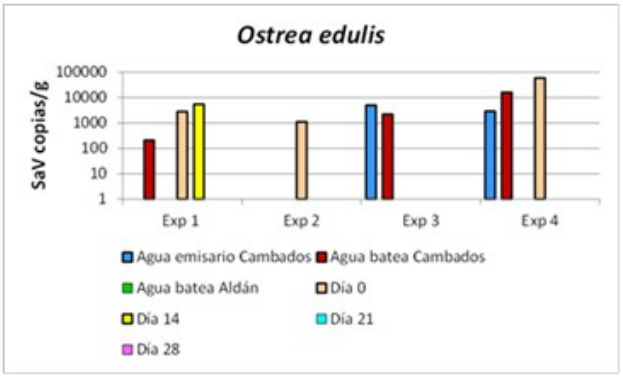



**Figura 4**. Resultados do NoVGI en *O. edulis* (ostra plana).

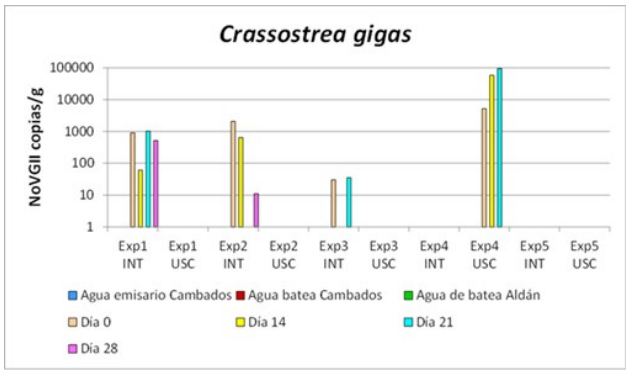



**Figura 5**. Resultados do NoVGII en *C. gigas* (ostra rizada).

Por outra banda, e de modo similar ao feito con ostra plana, as mostras foron analizadas para a detección de SaV. Detectáronse SaV en todas as experiencias agás nas experiencias 4 e 5 (Figura 6). Nas experiencias 2 e 3, realizadas entre xaneiro e marzo do 2018 observáronse os niveis de SaV máis elevados tanto nas mostras de auga como de tecido de ostra. Cabe mencionar que non se detectaron a T28, o tempo final despois da reinstalación. Nas experiencias 1 e 5, levadas a cabo en decembro de 2017 e xuño do 2018 respectivamente, os niveis de SaV estiveron por debaixo do LOQ, detectándose basicamente nas mostras de auga do emisario e da zona de cultivo en Cambados, pero non nos tecidos da ostra. Estes resultados poden indicar certa estacionalidade na detección de SaV, sendo máis abundante en inverno.

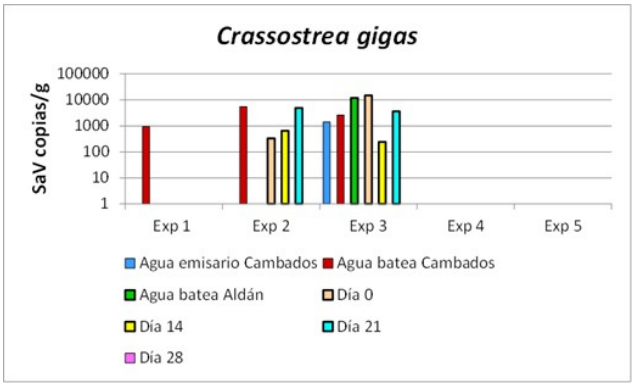



**Figura 6**. Resultados do SaV en C. gigas (ostra rizada).

Os resultados obtidos, aínda que se necesitarían máis experiencias para confirmalo, parecen indicar que a reinstalación asociada á depuración podería funcionar para unha mellor eliminación dos virus dos tecidos de ostra. Pero indican tamén a necesidade de analizar dende un punto de vista virolóxico as zonas de reinstalación para evitar posibles recontaminacións durante este período.

As diferenzas de resultados entre os laboratorios do INTECMAR e a USC non son significativas, correspondéndose con mostras con pouca carga viral próxima aos límites de cuantificación ou detección da técnica de RT-PCR en tempo real (protocolo ISO).

En xeral parece que a ostra rizada é máis propensa a acumular NoV que a ostra plana, pero non no caso do SaV. En calquera caso, as anomalías no tempo meteorolóxico (escaseza de choiva, temperatura, etc) durante a primeira metade do estudo (inverno 2016/2017), influíu moi probablemente na baixa detección de NoV durante este período que se correspondeu coas experiencias de ostra plana. Serían necesarios máis estudos para confirmar esta hipótese.

| Título da Acción de investigación – Acrónimo – Código CIMA | |
|---|---|
| **Estudo epidemiolóxico da ameixa rubia (Venerupis rhomboides) en Galicia afectada por colonias procariotas intracelulares na branquia (CPI-Br). Identificación das CPI. Seguimento da estrutura de tamaños das poboacións de ameixa rubia de 4 bancos da ría de Vigo**. AMEIXA RUBIA – CIMA 16/01 | |
| **Investigador/a Principal** | |
| Dra. Mª Carmen López Gómez | |
| **Outros/as investigadores/as participantes** | |
| CIMA: Fernando Manuel Febrero Mayor | INTECMAR:Dra. Susana Darriba Couñago<br>X.T. Territorial do Mar, Vigo: Luis Manuel Rodríguez González |
| **Técnicos/as** | **Bolseiros/as** |
| Maribel Meléndez Ramos;<br>Elena Penas Pampín;<br>María Brianes Beiras | Óscar Grande Ocampo |
| **Entidade que financia**: Consellería do Mar - Xunta de Galicia | |
| **Data de inicio**: Outubro de 2016 | **Data de finalización**: Decembro de 2018 |


**RESUMO**

Case toda a produción galega de ameixa rubia (*Polititapes rhomboides*) procede das Rías Baixas, sendo a ameixa rubia a especie típica e emblemática do marisqueo a flote, sector considerado como o máis profesionalizado dentro do marisqueo en Galicia.

Algunhas confrarías de pescadores teñen manifestado, con certa recorrencia, preocupación por eventos de mortalidade elevada nos bancos de ameixa rubia. No ano 2012 a Consellería do Medio Rural e do Mar encargou a investigadores do CIMA e técnicos da Delegación Territorial de Vigo unha Acción específica sobre a ameixa rubia na ría de Vigo "Análise preliminar da problemática de diminución da produción de ameixa rubia (*Venerupis rhomboides*) na ría de Vigo". Nas conclusións de dito traballo, no que respecta á patoloxía desta especie, destacábase a alta prevalencia e intensidade de colonias procariotas intracelulares (CPI) na branquia, así como a prevalencia do protozoo Nematopsis sp. tamén localizado na branquia. Por outra banda, o estudo das poboacións reflicte abundancias de poboación moi reducidas en conxunto e estruturas de tamaños desequilibrados, en moitos casos, suxerindo a existencia dun déficit na incorporación de xuvenís á fracción comercial. Sobre esta base esperábase que durante os dous seguintes anos a situación produtiva de ameixa rubia na ría de Vigo non mellorase ou mesmo empeorase.

De acordo cos rexistros obtidos da plataforma pescadegalicia.com xunto cos facilitados polos biólogos de zona da Xefatura Territorial de Vigo e asistencias técnicas das confrarías de pescadores da ría de Vigo, para o conxunto de Galicia, obsérvanse 3 períodos de escaseza nos desembarcos de ameixa rubia. O primeiro, entre os anos 1997-1999, no que existen datos parciais dalgunhas posibles causas naturais e de explotación (Sebe et al., 1999) e causas patolóxicas (Villalba et al., 1999). O segundo descenso nas capturas ocorre nos anos 2003-2004, coincidindo coa paralización da extracción nos tres meses posteriores ao afundimento do "Prestige", en novembro de 2002, o que posiblemente repercutiu nas extraccións de anos posteriores. O terceiro, algo máis longo, entre os anos 2011 e 2015, estando as mortaldades do 2011 asociadas a colonias procariotas intracelulares de tipo rickettsias (Darriba et al., 2012), que é o obxecto deste estudo.

En calquera caso, observamos que na ría de Vigo dende o ano 2010 ao ano 2013, hai un descenso produtivo moi acusado, tal e como ocorre no conxunto de Galicia. Dende o ano 2013 (último mínimo observado) ao remate do ano 2017, atopamos o que parece o principio dunha nova fase de recuperación no conxunto de Galicia, que non vai en correspondencia coa ría de Vigo. Dende o ano 2013 observamos nesta ría un pequeno estancamento cunha tendencia estable, de xeito contrario ao do conxunto de Galicia. Razón pola cal na presente Acción expúxose o desenvolvemento dun estudo patolóxico que pretendía a identificación das colonias de procariotas intracelulares (CPI) detectadas nos estudos anteriores (Darriba et al., 2012; Informe CIMA 2012) como axente patóxeno asociado a episodios de mortalidade e continuar o estudo epidemiolóxico iniciado con posterioridade ás mortalidades na ría de Vigo, así como o seguimento da estrutura de tamaños de poboacións de ameixa rubia de 4 bancos desta ría.

Segundo o criterio dos biólogos de zona (BZ) da Delegación Territorial de Vigo, seleccionáronse 4 bancos principais de ameixa rubia: 1) Cabo de Mar (marxe sur); 2) Liméns (marxe norte); 3) Tirán (interior); Illas Cíes (exterior). As mostraxes leváronse a cabo na primavera e no outono dende outubro de 2013 a maio de 2017. O procedemento da mostraxe consistiu en desprazarse aos puntos elixidos e fondear un cabo polos seus dous extremos co fin de constituír un transecto. A continuación, desprazándose a través do cabo, realizáronse tantas rañadas como foi preciso para acadar unha cantidade ideal mínima de 100 individuos de cada banco. O contido de cada rañada depositouse en bandexas plásticas, onde se separaron as ameixas rubias que aparecían, etiquetáronse por banco e conserváronse en neveira ate o seu traslado ao laboratorio da Xefatura Territorial de Vigo, para a toma de datos

biométricos e posterior envío ao laboratorio de patoloxía do CIMA. A análise dos datos biométricos tomados polos BZ foron posteriormente analizados para o estudo da estrutura de tamaños e abundancias relativas. As mostras enviadas ao CIMA foron analizadas mediante técnicas de histoloxía clásicas para ver a presenza de patóxenos e usáronse técnicas moleculares para a identificación molecular das CPI. No caso do estudo histopatolóxico o bancos de Cabío (ría de Arousa), do que non existen notificacións de episodios de mortalidade, foi utilizado como banco control.

No que respecta a estrutura de tamaños da poboación de ameixa rubia dos bancos estudados (Cabo de Mar, Tirán, Liméns e Cíes) observáronse diferenzas entre bancos, sendo no outono do 2013 cando Cabo do Mar e Illas Cíes presentaron unha estrutura de tamaños aparentemente equilibrada, entendida esta como aquela na que a abundancia de individuos menores de 40 mm e a frecuencia de individuos das novas cohortes é maior ca de individuos comerciais (>= 40 mm) e que, polo tanto, permita unha renovación eficaz da fracción da poboación obxecto de explotación. O resto dos bancos estudados presentaba unha estrutura de tamaños non equilibrada. A partir de outono de 2015, en cada un dos distintos bancos da ría de Vigo, a estrutura de tamaños comeza a estar equilibrada, o que permitiría pensar nunha mellora na dinámica da poboación, se non existise explotación de tamaños ilegais para acadar os topes. Na figura 1 onde a totalidade da poboación de ameixa rubia da ría de Vigo considérase como un único banco, a estrutura de tamaños obsérvase tamén equilibrada a partir de outono do 2015.O tamaño medio nos bancos equilíbrase tamén a partir da mostraxe de outono de 2015 (entendendo o equilibrio como o aumento da fracción de tamaño ilegal en comparanza coa fracción de tamaño legal). No presente informe úsanse os termos tamaños legais (≥ 40 mm) e ilegais (< 40 mm) en lugar de tamaño comercial e non comercial. A partir desa data existe un pequeno aumento do tamaño medio nas mostraxes de primavera e un descenso en outono ao atopar a nova fixación cun tamaño moito menor (Figuras 2 e 3).As abundancias relativas do conxunto da ría de Vigo, considerado na súa totalidade como un único banco, represéntanse na figura 4, onde se observa que vai diminuíndo ata alcanzar o mínimo en outono de 2014. A partires desa data as abundancias relativas das seguintes mostraxes foron aumentando ata primavera de 2016, descendendo en outono de 2016 e aumentando de novo na primavera de 2017.

A conclusión principal no marco deste obxectivo foi a recuperación das poboacións de ameixa rubia na ría de Vigo a partir do outono de 2015, con respecto ao descenso provocado polos episodios de mortalidade do ano 2010, tanto no que se refire a abundancia relativa como a estrutura de tamaños.

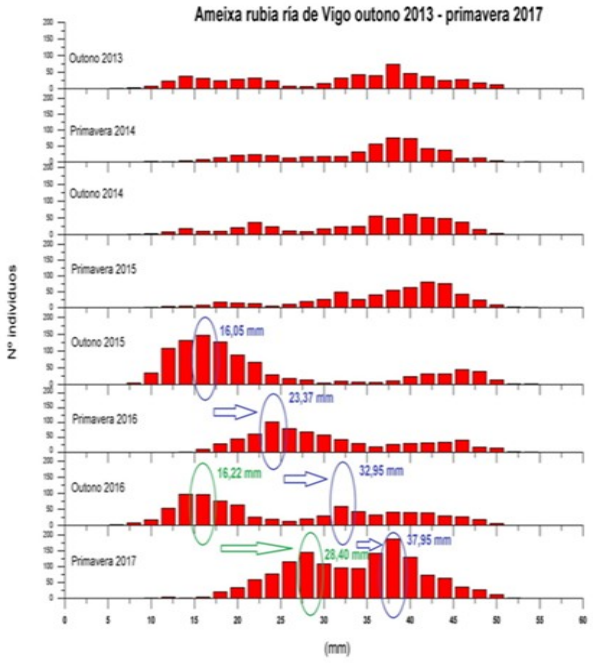



**Figura 1**. Estrutura de tamaños da poboación de ameixa rubia da ría de Vigo considerada como un único banco (outono de 2013 – primavera 2017), coas cohortes atopadas e o seu seguimento dende outono de 2015 (FISAT II normalizadas con NORMSEP).

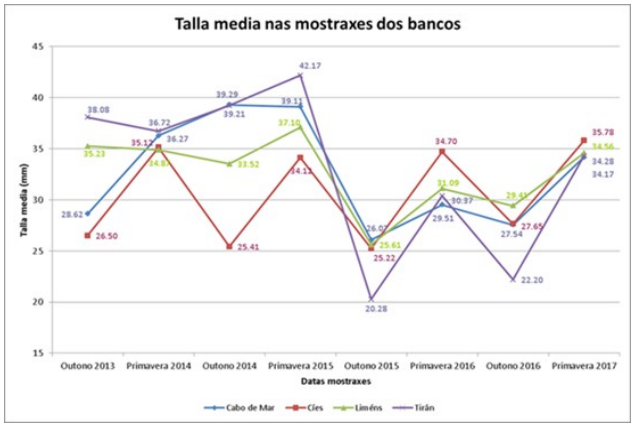



**Figura 2**. Tamaño medio dos individuos de ameixa rubia de cada banco do estudo (2013-2017)

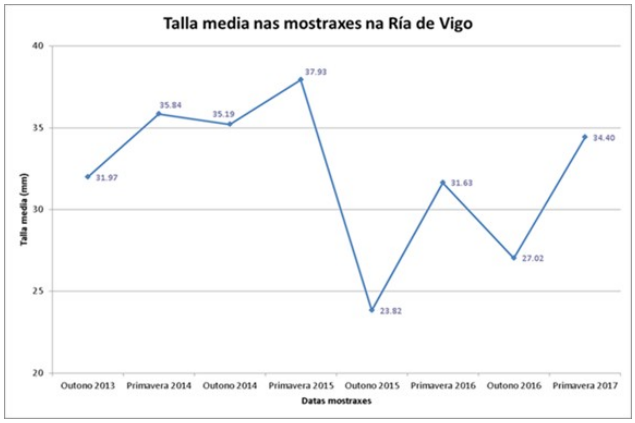



**Figura 3**. Tamaño medio dos individuos de ameixa rubia na ría de Vigo considerada como un único banco (2013-2017)

**Figura 4**. Media de individuos por mostra

En relación coa identificación molecular das CPI o estudo permitiu xerar dúas secuencias do xen 16sRNA, unha delas de 1.517 pb cos cebadores 27F e 1.518R (o Eub-B e Eub-A), a cal foi chamada IPO_1 gill P. rhomboides_Galicia e outra secuencia de 1.466 pb cos cebadores 27F e U1510R (o Eub-B e U1510R) chamada IPO_2 gill P. rhomboides_Galicia.

A análise, mediante BLAST, das secuencias obtidas mostrou no caso da secuencia IPO_1 gill P. rhomboides_Galicia un 98% de máxima identidade coa especie Endozoicomona atrinae (NR_134024.1 do GenBank) (porcentaxe de cobertura do 100%) e a secuencia IPO_2 gill P. rhomboides_Galicia un 97% de máxima identidade con distintas secuencias de Candidatus Endonucleobacter bathymodioli atopadas no GenBank (Figura 3) (porcentaxe de cobertura 100%). Estas bacterias pertencen ao grupo Gammaproteobacteria subgrupo Proteobacteria, e o Candidatus Endonucleobacter bathymodioli tamén está incluído na familia Endozoicomonaceae (http://www.uniprot.org/taxonomy). Datos similares foron observados por Cano et al. (2018) para un organismo procariota intracelular da glándula dixestiva e branquia da vieira (Pecten maximus) en Lyme Bay (Sudeste de Inglaterra), caracterizando ese organismo como do tipo-Endozoicomona (KX780138 do GenBank). Hai que destacar que os resultados negativos obtidos cos cebadores universais para organismos Chlamydiales coincide cos resultados (tamén negativos) de Cano et al. (2018). Este resultado confirma o observado por Darriba et al. (2012) con estudos ultraestruturais, no que concluían que as colonias procariotas intracelulares da branquia (CPI-Br) de ameixa rubia non era un organismo Chlamydial, senón do tipo-rickettsias.

Estudos moleculares recentes están poñendo en evidencia que o emprego do termo “organismos tipo-rickettsia” para definir aquelas colonias de organismos procariotas pleomórficos intracelulares con división por fisión binaria pode ser confuso, xa que se está a descubrir que moitas das infeccións intracelulares debidas a bacterias en moluscos (e noutros animais) non son realmente causadas por membros da Orde Rickettsiales, senón por membros tanto da Subclase Alphaproteobacterias (na que se atopan as rickettsias) como da Subclase Gammaproteobacterias (Cano et al., 2018).

A conclusión principal no marco deste obxectivo é que as colonias de organismos procariotas intracelulares da branquia (CPI1-Br) detectadas na ameixa rubia pertencen ao Grupo Gammaproteobacteria, Subgrupo Proteobacteria, Familia Endozoicomonaceae.

No que se refire a cuantificación das CPI-Br da ameixa rubia dos distintos bancos estudados da ría de Vigo observáronse prevalencias moi altas (en torno ao 100%) de CPI1-Br en tódalas datas. As intensidades medias de infección (Imi) foron moderadas (máis de 100 col./10 c.) en Liméns 2014 e 2015, e en Cíes no 2012, sendo o resto baixas (menos de 100 col./10 c.) ou moi baixas (menos de 50 col./10c). c.). No que respecta ás CPI2-Br, as prevalencias foron variables e as Imi moi baixas nos distintos bancos.

No banco de Cabo de Mar, onde se rexistrou o episodio de mortaldade no ano 2010 as prevalencias das CPI1-Br igualmente foron moi altas durante todo o período de estudo. A intensidade media (Imi) foi moi alta durante o evento de mortaldade no ano 2010 (máis de 300 col./10 c.) e alta (máis de 200 col./10 c.) ao longo do 2011. Observouse un descenso progresivo ata alcanzar na actualidade valores moi baixos (moi inferiores a 50 col./10 c.). No que respecta as prevalencias de CPI2-Br, estas foron moi altas igualmente no ano 2010 e 2011, observándose un descenso progresivo ata a actualidade. A Imi detectada no 2010 (mortaldade) foi baixa aínda que rexistrou o reconto máis alto de todos os bancos analizados (23 col./10 c.) e a partir do 2011 chega a acadar valores moi baixos.

Na ría de Arousa, onde nunca se detectou mortaldade, as prevalencias de CPI1-Br foron sempre máximas, aínda que a intensidade media (Imi) foi variable alcanzando valores moderados en mostraxes puntuais, con valores en torno ás 150 col./10 c., sen seguir un patrón estacional. As prevalencias de CPI2-Br foron baixas e a Imi sempre moi baixa (inferiores a 6 col./10 c.).

Así pois, compre resaltar que as intensidades de infección das CPI1-Br, tanto na marxe norte da ría de Vigo (Cangas-Massó: 621 col./10 c.) como na marxe Sur (Cabo de Mar: 396 col./10 c.) foron moi elevadas no ano 2010 (cando se rexistraron os episodios de mortaldade), namentres que na ría de Arousa, onde o banco analizado non sufriu episodios de mortaldade, as intensidades no mesmo ano eran moi baixas (Areoso: 6 col./10 c.).e CPI2-Br foron baixas e a Imi sempre moi baixa (inferiores a 6 col./10 c.).

As conclusións principais no marco deste obxectivo (estudo da presenza de CPI-Br) foron: 1) Que a presenza destas colonias procariotas intracelulares infectando a branquia da ameixa rubia (CPI-Br) pode considerarse normal ou habitual, xa que se atopan tanto en zonas nas que houbo episodios de mortaldade como en zonas consideradas “control” por non ter rexistro de episodios de mortaldade (Areoso e Langosteira). 2) O banco de Cabo de Mar acadou unha situación similar ao banco control (Areoso), no tocante aos niveis de infección, aproximadamente 2 anos despois do episodio de mortaldade do 2010. 3) Corrobórase a hipótese de que as CPI1-Br están involucradas nos episodios de mortaldade de ameixa rubia, sendo o aumento da intensidade de infección, por este axente patóxeno, a causa asociada.

No tocante ao estudio epidemiolóxico, aparte das colonias procariotas intracelulares na branquia (CPI), detectáronse tamén quistes bacterianos en branquia, no caso da ría de Vigo destacaron os niveis elevados de prevalencias nos bancos de Tirán (zona interna) e en Cabo de Mar (zona media sur), namentres que os bancos de Liméns (zona media norte) e Illas Cíes (zona externa) os niveis foron inferiores. No caso do banco de Cabío (ría de Arousa) obsérvase unha variabilidade nas prevalencias cun rango que vai do 17% ao 100%. Para avaliar estatisticamente estes resultados, realizouse unha análise das prevalencias globais por pares, obténdose que os bancos de Cabo de Mar e Tirán teñen as prevalencias significativamente máis altas dos bancos analizados, seguidos de Cabío con valores significativamente maiores que Liméns e este, á súa vez, ten valores significativamente maiores que as Illas Cíes, que acada os niveis significativamente máis baixos. Non obstante a ausencia de danos importantes nos tecidos así como as intensidades baixas en xeral, fan descartar efectos negativos no hospedador.

As colonias procariotas intracelulares (CPI) observadas na glándula dixestiva acadaron prevalencias variables, baixas en xeral en todos os bancos analizados.

Do grupo dos protozoos, destacaron especialmente as gregarinas do xénero Nematopsis, que se detectaron en tódalas mostras analizadas, con prevalencias máximas en case todas. Aínda así, as intensidades foron baixas en xeral, con casos puntuais de intensidades máis altas, e nunca coincidentes cos episodios de mortaldade. Observouse tamén un tipo de gregarinas non identificadas; aínda que con prevalencias baixas en xeral e non presentes en tódalas mostras.

Outros protozoos que se detectaron en tódalas mostras, con baixas intensidades, foron os ciliados nas branquias e con casos esporádicos na glándula dixestiva. A presenza de ciliados en simbiose con bivalvos é habitual e non só en actuar como parasitos senón como meros comensais.

Un protozoo do xénero Perkinsus foi detectado en mostras de ambas rías, aínda que con prevalencias baixas en xeral e sen amosar estados en fase de multiplicación. O banco no que se acadaron as prevalencias máis altas foi o de Illas Cíes (66%).

O feito de que non se observase ningún estado multiplicativo, sumado a que as prevalencias eran moi baixas e non causaban danos nos tecidos, fai que non se considerara patóxeno para a especie.

Plasmodios, dun suposto haplosporidio, foron detectados en mostras de ámbalas dúas rías, destacando os niveis acadados en Tirán, onde se acadou unha prevalencia do 88% en outubro de 2013, seguido de xuño de 2016 (83%). Existen citas da presenza deste haplosporidio en Galicia dende o ano 1993 e non parece constituír unha ameaza para as poboacións de ameixa (Villalba et al., 1993; López et al., 1998).

O outro grupo de protozoos detectado foron os coccidios no ril, que aínda que aparecen en case tódalas mostras analizadas, as prevalencias foron baixas en xeral.

Polo tanto, dentro do grupo dos protozoos, o máis salientable foron as altas prevalencias da gregarina Nematopsis sp., que a intensidades baixas non afecta negativamente ao bivalvo; pero que se aumentase de xeito notable taponando canais da branquia podería chegar a causar danos importantes.

Do grupo dos metazoos, o máis salientable son os crustáceos copépodos, que se rexistraron con maiores niveles de prevalencia no banco de Cabío (ría de Arousa), acadando valores próximos ao 70%, aínda que sen amosar unha tendencia estacional. Turbelarios en dixestivo (Paravortex sp.) foron detectados, con prevalencias variables, baixas en xeral. Larvas de trematodos en fase de esporoquiste con cercarias foron tamén detectados en todos os bancos analizados, con prevalencias baixas en xeral e non en tódalas mostras analizadas. Nos casos de intensidades altas observouse invasión da gónada, producindo castración. Observáronse en casos illados Metacercarias enquistadas de trematodos nalgunhas mostras da ría de Vigo. Polo tanto, non se identificou ningún metazoo simbionte que puidese asociarse con efectos negativos a nivel poboacional.

Dentro do estudo epidemiolóxico, pretendeuse afondar na dinámica das CPI1-Br debido a súa clara asociación cos episodios de mortaldade. Con esta intención avaliáronse parámetros ambientais, tamaño e o índice de condición fisiolóxico (ICF) para ver si tiñan relación coas infeccións.

A avaliación visual das gráficas obtidas dos parámetros ambientais (salinidade e temperatura) das estacións V3 (zona interna), V7 (zona media) e V5 (zona externa) da ría de Vigo, non revelou ningún patrón que marcase algunha diferenza entre o ano, nos que se acadaron os niveis máis elevados de intensidade de infección por CPI1-Br (2010), e os posteriores, no que a infección foi remitindo acadando niveis que poderíamos considerar normais (por comparación cos bancos control).

Para avaliar a posible relación entre as intensidades de infección das CPI1-Br co tamaño dos individuos, aplicouse un test non paramétrico de correlacións (Tau-b de Kendall; programa SPSS 16.0 para Windows) aos datos das mostras da ría de Vigo que incluían exemplares de tamaños comprendidos entre 6 e 54 mm (xuvenís e adultos). O test aplicouse sobre un total de 1.573 exemplares e o coeficiente obtido estivo moi próximo a cero (0,092) o que indica que as variables non están correlacionadas; que as intensidades de infección das CPI1-Br non varíen entre xuvenís e adultos, podería indicar que a enfermidade deuse nun determinado momento do tempo sen tratarse dunha infección que progresa ao longo da vida dos individuos. Noutras enfermidades de bivalvos, como a bonamiose, o parasito vaise multiplicando ao longo da vida do individuo, namentres que no caso das CPI1-Br a intensidade non progresa coa idade.

Avaliouse tamén a posible relación das intensidades de infección das CPI1-Br co índice de condición fisiolóxico (ICF), obténdose un coeficiente moi próximo a cero (0,046), o que reflicte novamente que as variables non están correlacionadas. Isto implica que o índice de condición non se ve diminuído co avance da infección, probablemente debido a que as CPI atópanse infectando a branquia que non é un órgano que participe na dixestión.

As conclusións principais no marco deste obxectivo (estudo epidemiolóxico) foron as seguintes: 1) Non se detectou ningún outro axente patóxeno, distinto das CPI1-Br, que se puidera asociar aos episodios de mortalidade da ameixa rubia. 2) A enfermidade deuse nunha determinada época, afectando a toda a poboación por igual, non tratándose dunha infección que progresa ao longo da vida dos individuos e non afecta ao índice de condición.

| Título da Acción de investigación – Acrónimo – Código CIMA | |
|---|---|
| **Determinación da posible resistencia á marteiliose dunha cohorte de berberecho *C. edule* detectada no banco do Ariño (Vilanova de Arousa)**. CIMA 17/06 | |
| **Investigador/a Principal** | |
| David Iglesias Estepa | |
| **Outros/as investigadores/as participantes** | |
| CIMA: M. Jesús Carballal Durán;<br>José Miguel Fuentes González | Confraría de Vilanova de Arousa (asistencia técnica) |
| **Técnicos/as** | **Bolseiros/as** |
| Gemma Martínez Verde, G.; Elena Penas Pampín;<br>Mª José Brianes Beiras | |
| **Entidade que financia**: Consellería do Mar - Xunta de Galicia | |
| **Data de inicio**: Xullo de 2017 | **Data de finalización**: Decembro de 2018 |


**RESUMO**

O berberecho *Cerastoderma edule* foi tradicionalmente a principal especie explotada do marisqueo en Galicia no que se refire a volume de capturas. No ano 2012 detectouse, por primeira vez en Galicia, o parasito Marteilia cochillia infectando berberechos da ría de Arousa e causando unha mortalidade sen precedentes que orixinou o colapso da súa explotación nesta ría. No ano 2013 a marteiliose estendeuse ás rías de Pontevedra e Vigo orixinando mortalidades elevadas de berberecho nas mesmas e unha caída dramática na produción desta especie en Galicia. Dende a aparición desta enfermidade, nas rías afectadas téñense detectado brotes anuais de marteiliose que habitualmente causan a extinción de cada nova cohorte recrutada e impiden a recuperación da explotación marisqueira.

No Nadal de 2016 constatouse que na lonxa de Vilanova de Arousa estábanse a comercializar berberechos de grande tamaño (exemplares de ate 37 mm) que acadaban un prezo de primeira venda moi elevado (prezos máximos de até 18 €/kg). Mentres tanto, no resto de lonxas da ría de Arousa apenas existía berberecho *C. edule* de tamaño legal nas poxas. Indagando na procedencia destes exemplares de berberecho de grande tamaño, confirmouse que procedían do banco do Ariño e, atendendo ao seu tamaño, moi probablemente correspondían a unha cohorte recrutada no ano 2015. Neste suposto trataríase de berberechos superviventes ao brote de marteiliose que a principios do ano 2016 asolara a ría de Arousa causando mortalidades masivas do berberecho fixado en 2015.

Na presente Acción de investigación propoñíase analizar a situación desta poboación de berberecho para tratar de dilucidar si:

(1) O banco do Ariño é unha zona refuxio libre de marteiliose dentro da ría de Arousa.

(2) O berberecho nesta zona presenta unha taxa de crecemento maior que o resto de zonas da ría de Arousa, o que explicaría o seu elevado tamaño aínda tratándose da cohorte recrutada no ano en curso.

(3) O berberecho C. edule desta zona presenta características particulares que o fan resistente ou máis tolerante á marteiliose.

De tratarse deste derradeiro suposto os individuos deste banco constituirían unha verdadeira oportunidade para o desenvolvemento de estratexias de loita contra a marteiliose baseados en programas de selección xenética empregando os berberechos desta zona como reprodutores.

Co fin de contrastar estas hipóteses seguíronse tres liñas de actividade:

**1. Desenvolvemento dun programa de seguimento espazo-temporal da enfermidade na ría de Arousa.**

Coincidindo coa aparición dos primeiros recrutas da Cohorte de 2017, iniciouse a finais de xuño de 2017 un seguimento do estado sanitario de berberecho no Ariño. Para elo recolléronse mensualmente 30 individuos que foron procesados mediante histoloxía e analizados ao microscopio óptico co fin de diagnosticar si estaban infectados polo parasito M. cochillia. Este seguimento estendeuse de xuño de 2017 a xuño de 2018, momento no que se verificou a práctica desaparición desta cohorte no banco, resultando imposible a obtención de mostra de individuos desta idade. Este seguimento repetiuse de novo entre xuño e decembro de 2018 na cohorte correspondente ao recrutamento da clase anual de 2018. Esta tarefa efectuouse de xeito paralelo, seguindo a mesma metodoloxía, nos bancos dos Lombos do Ulla e de Sarrido (neste último caso, beneficiándose da información obtida a través da Acción PGIDIT-CIMA 15/02 e do Proxecto COCKLES). Igualmente, en íntima colaboración coa Acción de investigación CROQUEDOUS (CIMA 16/10), realizouse un seguimento sanitario mensual de dous lotes de semente de berberecho producidos no criadeiro do CIMA nos anos 2017 e 2018 e engordados nunha batea que a Confraría de Cambados ten no polígono Cambados D. Este seguimento tivo lugar entre agosto e decembro de 2017 e en novembro e decembro de 2018.

**2. Análise da dinámica poboacional do berberecho**.

No caso do banco do Ariño realizáronse 8 mostraxes de avaliación de C. edule nos meses de setembro e decembro de 2017, xaneiro, abril, xuño, agosto e outubro de 2018, e xaneiro de 2019. En cada mostraxe, aproveitando momentos de baixamar en períodos de mareas vivas, recolléronse dúas mostras de 0,05 $m^2$ de superficie, empregando corers metálicos cilíndricos enterrados ate uns 20 cm de profundidade, en cada unha das estacións de mostraxe dunha rede de 8 distribuídas regularmente ao longo de todo o banco. As mostras laváronse e peneiráronse no campo a través dunha malla metálica de 5 mm de luz, recolléronse en bolsas plásticas etiquetadas e leváronse aos laboratorios do CIMA, onde se contabilizaron e mediron os berberechos presentes en cada mostra. Procedeuse do mesmo xeito nos Lombos do Ulla, pero neste caso, ao tratarse dun banco submareal, para a recollida das mostras empregouse unha draga Petersen de 0,23 m2 de superficie operada mediante guindastre dende unha embarcación. Recolléronse un total de dúas mostras na estación HD da rede de mostraxe que o CIMA ven desenvolvendo neste banco de xeito ininterrompido dende o ano 2002, e que se considerou representativa da dinámica poboacional de C. edule nesta zona.

Co fin de avaliar a mortalidade natural sen perturbacións debida á mortalidade por pesca nin á depredación, dispuxéronse tanto no banco do Ariño como nos Lombos do Ulla tres caixas de control de mortalidade. En cada unha delas depositáronse 30 berberechos e foron cubertas cunha malla plástica de 5 mm de luz para evitar a perda e depredación destes individuos control. As caixas revisáronse mensualmente contabilizando o número de berberechos superviventes, co fin de estimar a taxa de mortalidade mensual. Repuxéronse os berberechos mortos recollendo individuos do banco, de xeito que de novo houbese 30 individuos de control en cada unha das caixas. Fixados a estas caixas de control dispuxéronse sondas data-logger de rexistro continuo de temperatura, salinidade e profundidade, co fin de monitorizar a evolución temporal destas variábeis ambientais.

**3. Avaliación comparada do "rendemento" dos berberechos do banco do Ariño ao respecto de diferentes variables relacionadas coa resistencia á marteiliose**.

Aproveitando a información obtida a través da metodoloxía desenvolvida nos apartados anteriores, avaliouse de xeito comparado a evolución da enfermidade e da mortalidade dos berberechos dos bancos do Ariño e dos Lombos do Ulla. Así mesmo, co fin de dispor dun control, no verán de 2017 introducíronse 600 berberechos procedentes da ría de Noia (poboación nunca enfrontada á marteiliose) en caixas depositadas nunha estrutura metálica disposta nos Lombos do Ulla. Os berberechos foron marcados no laboratorio coa axuda dun rotulador indeleble, recubrindo posteriormente as marcas con laca de unllas para evitar que se borrasen. De xeito previo á inmersión efectuouse unha análise histopatolóxica sobre unha mostra de 30 individuos co fin de confirmar que non estaban infectados por *M. cochillia* nin por outros parasitos de importancia. Mensualmente inspeccionáronse as caixas para avaliar a mortalidade e recolléronse 30 individuos que foron procesados mediante histoloxía co fin de diagnosticar si se infectaran por M. cochillia. Este seguimento mantívose ate novembro de 2017momento no que tivo que suspenderse polo esgotamento dos berberechos introducidos. Unha nova experiencia deste tipo repetiuse no ano 2018.

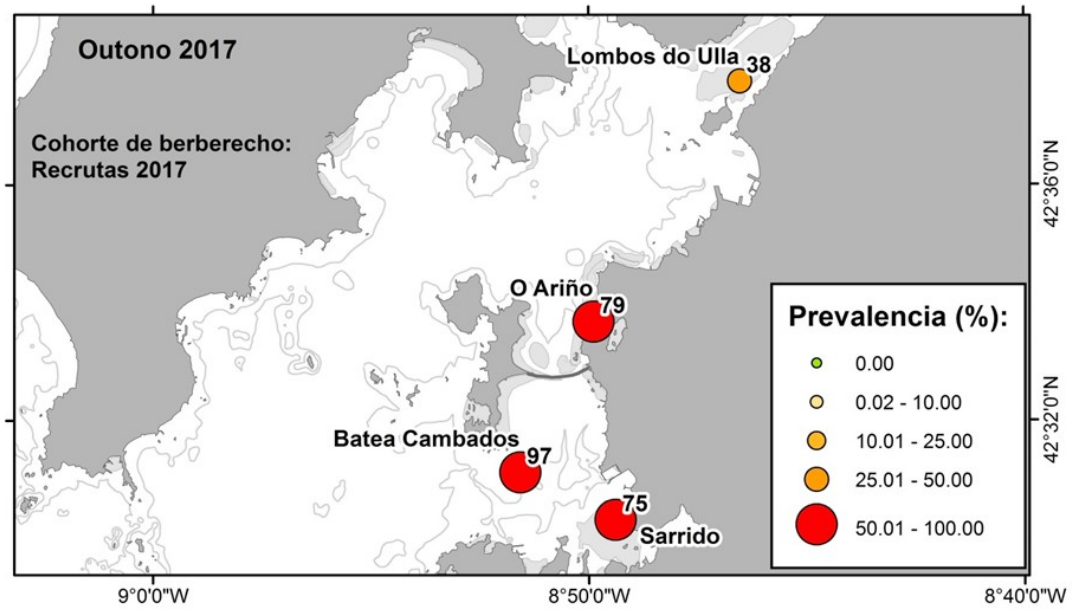



**Figura 1**. Distribución espacial da marteiliose en diferentes bancos de berberecho C. edule na ría de Arousa no ano 2017).

## RESULTADOS

**1) Desbótase a hipótese de que o banco do Ariño podería ser unha zona libre de marteiliose ou moi pouco afectada pola enfermidade.**

Os resultados diagnósticos do seguimento espazo-temporal desenvolvidos de xeito simultáneo no Ariño, nos Lombos do Ulla, no Sarrido e sobre lotes de semente do criadeiro do CIMA engordados en batea, mostran que o banco do Ariño veuse afectado por infeccións de *Marteilia cochillia* acadando prevalencias moi elevadas e similares as do resto de mostras da ría de Arousa (Fig. 1).

**2) Verifícase que os berberechos explotados no Ariño corresponden á clase anual de recrutamento pero presentan un crecemento tan elevado que, a igual idade, presentan un tamaño moi superior ao resto de berberechos da ría**.

A análise da progresión modal das diferentes cohortes identificadas en 2017 e 2018 mostra de xeito moi claro que os berberechos do Ariño presentan un crecemento moi superior aos dos Lombos do Ulla (Fig. 2). Así, no Ariño detéctanse berberechos de talla comercial (lonxitude > 25 mm) no mesmo ano natural en que ten lugar a fixación, permitindo a súa explotación xa na campaña de Nadal.

**3) Desbótase a hipótese de que os berberechos do banco do Ariño teñen algunha característica**.

Os berberechos do Ariño presentaron maiores prevalencias da marteiliose e maiores taxas de mortalidade que os berberechos dos Lombos do Ulla. Sen embargo, os berberechos de ámbolos dous bancos presentaron un mellor comportamento fronte á marteiliose que os berberechos de Noia (control) introducidos nos Lombos, que contraeron a enfermidade nun período de tempo relativamente curto dende a súa inmersión e, ademais, os niveis de prevalencia e mortalidade acumulada dispáraronse dun xeito moi rápido, levando á súa práctica extinción apenas transcorridos 4 ou 5 meses (Fig. 4). Esta observación suxire que os berberechos da Ría de Arousa desenvolveron certa tolerancia á marteiliose dende a irrupción da enfermidade na ría en 2012, facendo que esta progrese dun xeito máis lento na poboación.

Compre, non obstante, ser prudentes xa que, polo momento, ano tras ano a enfermidade ocasiona a práctica extinción de cada cohorte fixada na ría

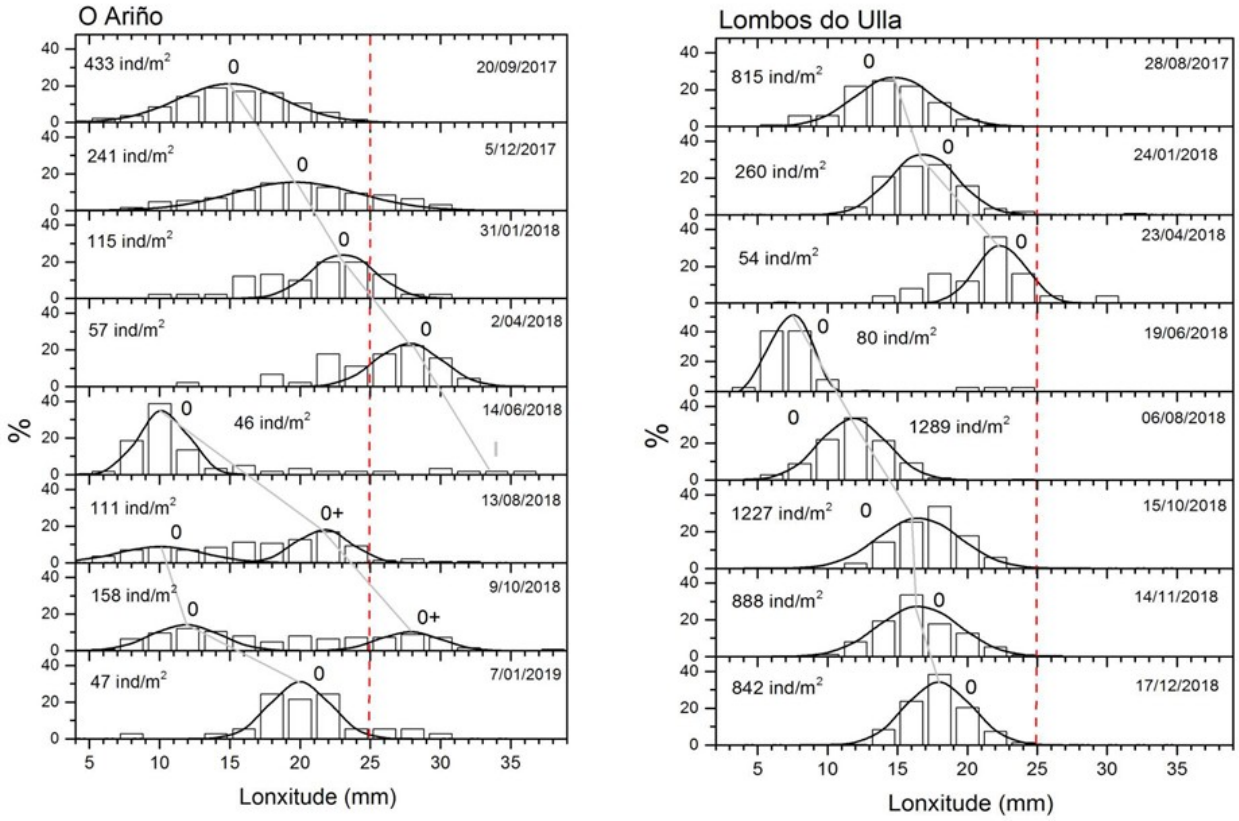



**Figura 2**. Análise de progresión modal das cohortes identificadas a partir dos histogramas de frecuencia de tamaños. Indícanse as clases de idade detectadas, as datas da mostraxe e a densidade de poboación total. A liña vermella descontinua mostra o tamaño mínimo legal para esta especie.

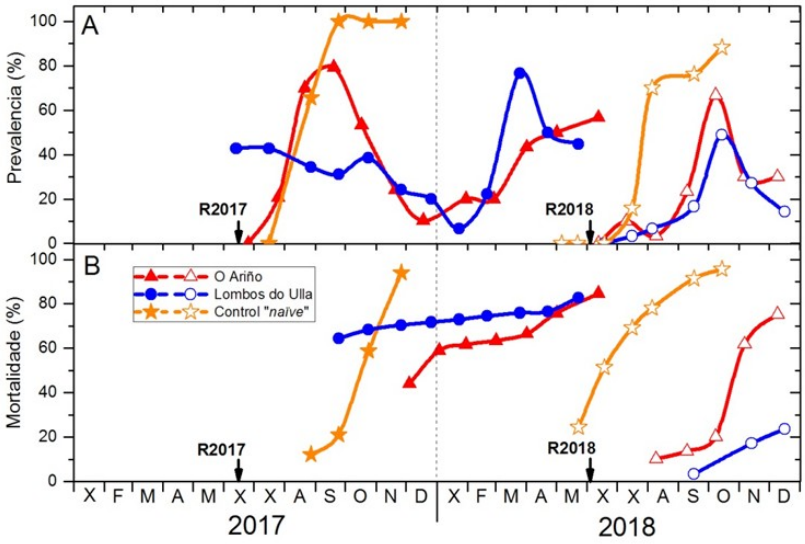



**Figura 3**. Evolución temporal da prevalencia de M. cochillia (A) e da mortalidade acumulada (B) en berberechos C. edule no banco do Ariño, nos Lombos do Ulla e nos grupos control correspondentes a berberechos de Noia introducidos nos Lombos. R2017: detección dos primeiros recrutas correspondentes á cohorte anual de 2017; R2018: idem para a cohorte anual de 2018.

| Título da Acción de investigación – Acrónimo – Código CIMA | |
|---|---|
| **Avaliación do incremento de supervivencia na engorda de ostra rizada Crassostrea gigas polo uso de semente descendente de superviventes á exposición prolongada ao virus herpes de ostreidos tipo 1. Identificación de marcadores moleculares de resistencia para a súa aplicación nun programa de selección de estirpes resistentes ao virus**. SECOHERPES - CIMA 16/02 | |
| **Investigador/a Principal** | |
| Antonio Villalba García | |
| **Outros/as investigadores/as participantes** | |
| CIMA: Mª Asunción Cao Hermida; José Miguel Fuentes González | |
| **Técnicos/as** | **Bolseiros/as** |
| Mª José Brianes Beiras; Ramón Giráldez Rivero; Ana Isabel González Fontela; Mª Victoria Gregorio Chenlo; Mª Isabel Meléndez Ramos; Elena Penas Pampín; Rúa Santervas, Patricia | Juana Beatriz Alonso Costas; María Sol Campañó Piñeiro; Guadalupe Pena Thomas; Raquel Viturro García |
| **Entidade que financia**: Consellería do Mar - Xunta de Galicia | |
| **Data de inicio**: Marzo de 2016 | **Data de finalización**: Decembro de 2018 |


**RESUMO**

A engorda da ostra rizada, *Crassostrea gigas*, na ría de Arousa vese afectado desde fai a lo menos 7 anos por unha mortaldade moi alta da semente, causada pola infección coa microvariante do virus herpes 1 de ostreidos (OsHV1-µvar). Trátase dunha enfermidade detectada inicialmente en Francia, no verán de 2008, que expandiuse a outros países europeos así como a Australia, Nova Zelanda e Corea do Sur. O noso grupo implicouse no estudo desta enfermidade, en particular na procura de procedementos que permitan aumentar a supervivencia da ostra rizada na engorda en Galicia. Outros autores demostraron que a temperatura da auga e a idade e o tamaño da ostra inflúen na dinámica da enfermidade; así, por debaixo de 16 ºC non hai mortalidade relevante e por encima de 24 ºC a mortalidade redúcese significativamente; a susceptibilidade da ostra á infección e mortalidade redúcese notablemente nos individuos maiores, con peso superior a 20 g. Nun proxecto previo avaliamos a eficacia de procedementos alternativos de engorde cuxo deseño baseárase na información sobre a influencia da temperatura e a idade e tamaño das ostras na mortalidade pero os resultados non foron satisfactorios pois a supervivencia foi baixa. Tendo en conta que en Francia obtivéranse resultados moi esperanzadores na loita contra a infección por OsHV1-µvar mediante programas de mellora xenética para aumentar a resistencia a este virus, baseados en utilizar como reprodutores ostras superviventes en zonas afectadas pola enfermidade, repetíndose o proceso en xeracións sucesivas, decidimos desenvolver un novo proxecto de investigación para avaliar si, tamén na ría de Arousa, a utilización de superviventes dunha zona afectada como reprodutores conduciría a un aumento da supervivencia dos seus descendentes durante a engorda e, en tal caso, sentar as bases para desenvolver un programa de selección xenética. Ademais, planeouse a procura de marcadores moleculares de resistencia á enfermidade que sirvan de apoio a un ulterior programa de mellora xenética, mediante dous enfoques, un proteómico, desenvolto polo noso grupo, e outro xenómico, a desenvolver polo equipo da Dra. María Prado Álvarez, investigadora do Instituto de Investigacións Mariñas (CSIC, Vigo).


**MATERIAIS E MÉTODOS**

A primeira etapa do proxecto implicou a produción de varias familias de semente de ostra rizada de dous orixes diferentes, (1) unha poboación nunca afectada polo virus, e (2) superviventes trala exposición ao virus nun área afectada. Un banco naturalizado de ostra rizada na ría de O Barqueiro (Mariña de Lugo) utilizouse como fonte de reprodutores adultos dunha poboación nunca afectada, o que se foi confirmando por mostraxes e análises sucesivos desde 2012 e ausencia de mortaldade anormal.

Como "superviventes", utilizáronse ostras dun lote producido nun criadeiro industrial a partir de reprodutores recollidos nese mesmo banco, que se transferiu para a súa engorda a unha batea da ría de Arousa moi afectada polo virus, en decembro de 2014, e que sufriu unha mortalidade moi alta na primavera de 2015. Na primavera de 2016, reprodutores de ambos orixes se repartiron en dous criadeiros, o da Estación de Ciencias Mariñas de Toralla (ECIMAT-Universidade de Vigo) e o do CIMA en Vilanova de Arousa, onde procedeuse ao seu acondicionamento para acelerar a gametoxéneses, obtivéronse gametos maduros mediante disección, posibilitouse a fecundación e cultiváronse as larvas resultantes. No criadeiro da ECIMAT, o equipo de Damián Costas produciu familias de semente descendentes de 6 parellas distintas de ostras recollidas na ría de O Barqueiro e de 3 parellas distintas de superviventes da ría de Arousa; as larvas de cada cruzamento se cultivaron por separado en todo momento. As limitacións do criadeiro do CIMA impedían manter por separado as larvas descendentes de cada cruzamento polo que no caso dos reprodutores da ría de O Barqueiro mesturáronse espermatozoides dunha ostra con oocitos de oito ostras e, no caso dos reprodutores superviventes da ría de Arousa, mesturáronse espermatozoides de 4 ostras cos oocitos de 13 individuos; as larvas resultantes de cada orixe cultiváronse por separado.

En setembro de 2016, sementes das 6 familias de orixe ría de O Barqueiro e as 3 familias descendentes de superviventes da ría de Arousa producidas en ECIMAT e dos lotes de cada unha das dúas orixes producidas no criadeiro do CIMA transferíronse a unha batea da ría de

Arousa para a súa engorda ata setembro de 2017; mensualmente avaliouse a mortalidade de cada familia e lote; o crecemento avaliouse con mostraxes máis distanciados. Ademais, realizáronse análises para diagnosticar a infección por OsHV1-µvar en momentos diferentes, mediante o procedemento de diagnóstico molecular (PCR) incluído nas directrices da UE para a vixilancia desta enfermidade.

A detección dunha mortaldade non esperada en fase adulta nalgunhas familias durante o verán de 2017, non atribuíbles á infección por OsHV1-µvar, conduciu a avaliar a implicación dunha bacteria, Vibrio aestuarianus, que se mostrara responsable de mortalidade alta de ostras rizadas adultas en Francia e Irlanda desde 2012.

Por elo recolléronse mostras de tecido de ostras de 6 familias con superviventes en setembro de 2017 e enviáronse á Dra. Marie Agnès Travers (IFREMER, La Tremblade, Francia) para que analizase a abundancia de V. aestuarianus mediante PCR cuantitativa.

Co obxectivo de identificar proteínas cun papel potencial na resistencia á infección por OsHV1-µvar, comparouse o perfil proteómico de mostras dos tecidos brandos de ostras de cada familia no momento de levala do criadeiro á batea (setembro 2016) co perfil proteómico de mostras tomadas de superviventes de cada familia pasado o seu pico de mortalidade inicial, a mediados de decembro de 2016. Para a separación e identificación de proteínas utilizouse a técnica de "shotgun" e secuenciación de novo. Para a anotación das secuencias peptídicas obtidas utilizouse o programa informático Blast2GO, con procuras na base de datos do *National Center for Biological Information* (NCBI).

## RESULTADOS E DISCUSIÓN

Con respecto á semente producida no criadeiro da ECIMAT, distinguíronse 3 períodos durante a engorda en función da mortaldade, que foi alta ou moi alta para toda as familias entre setembro e decembro de 2016, insignificante para todas as familias entre xaneiro e maio de 2017, mentres que a mortalidade foi alta para algunhas familias e insignificante para outras entre xuño e setembro de 2017 (Fig. 1).

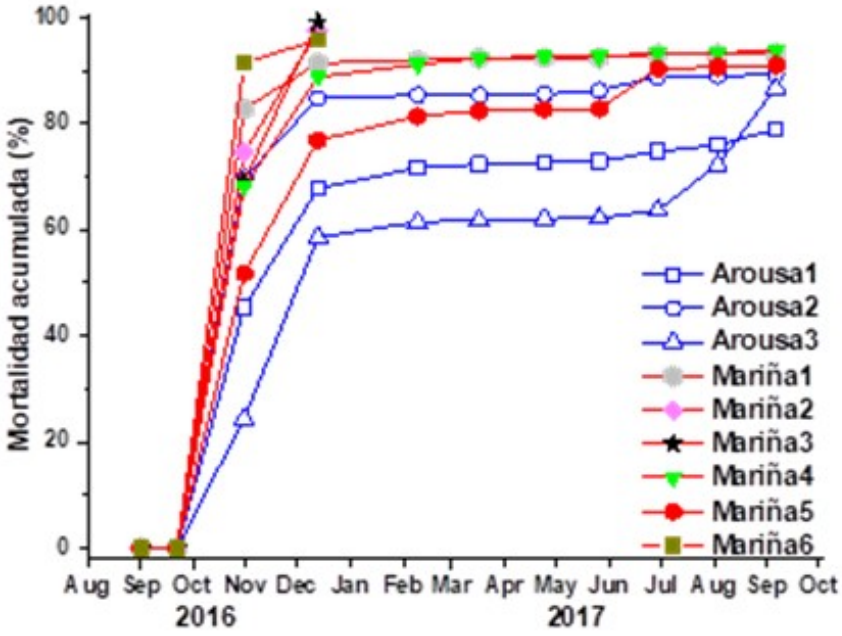



**Fig. 1**. Evolución temporal da mortaldade acumulada de cada familia de semente producida no criadeiro da ECIMAT, ao longo da súa engorda nunha batea da ría de Arousa. A alta mortaldade rexistrada nas familias Mariña 2, 3 e 6 frustrou a súa engorda en decembro de 2016.

No momento da transferencia á batea todos os individuos analizados resultaron negativos para o diagnóstico de infección por OsHV1-µvar, mentres que nas dúas mostraxes seguintes (22/09/2016 e 31/10/2016) detectáronse casos positivos en todas as familias (Táboa 1), polo que, moi probablemente, a alta mortalidade do outono de 2016 debeuse á infección da semente por OsHV1-µvar. É importante resaltar que a mortalidade acumulada o 13/12/2016 nas familias derivadas de reprodutores recollidos na ría de O Barqueiro (media de 91,6%) foi significativamente maior que nas descendentes de superviventes de Arousa (media de 70,4%). Tal como se esperaba, despois do pico de mortalidade alta da semente asociado á infección por OsHV1-µvar, a mortalidade pasou a ser insignificante.

Entre setembro e decembro de 2016 houbo períodos en que a temperatura da auga superou os 16 ºC (Fig. 2), sendo este o valor limiar que ha de superarse para que este virus provoque mortalidade de semente.

| Data | Familias descendentes de superviventes de Arousa | | | Familias descendentes de ostras recollidas en O Barqueiro | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Arousa1 | Arousa2 | Arousa3 | Mariña1 | Mariña2 | Mariña3 | Mariña4 | Mariña5 | Mariña6 |
| Inicio de engorde 01/09/2016 | 0 (10) | 0 (10) | 0 (10) | 0 (10) | 0 (10) | 0 (10) | 0 (10) | 0 (10) | 0 (10) |
| set + out 2016 | 67 (15) | 47 (15) | 87 (15) | 83 (12) | 87 | 100 (11) | 80 (15) | 60 (15) | 93 (15) |
| 03/07/2017 | | | | | | | | 43 (30) | |
| 03/08/2017 | | | 0 (30) | | | | | | |
| Fin de engorde 06/09/2017 | 0 (30) | 0 (30) | 0 (30) | 0 (30) | | | 0 (30) | 0 (30) | |

**Táboa 1**. Porcentaxe de casos positivos para o diagnóstico de OsHV1-µvar por PCR, en cada familia analizada en datas diferentes. O número de ostras analizadas mostrase entre parénteses.

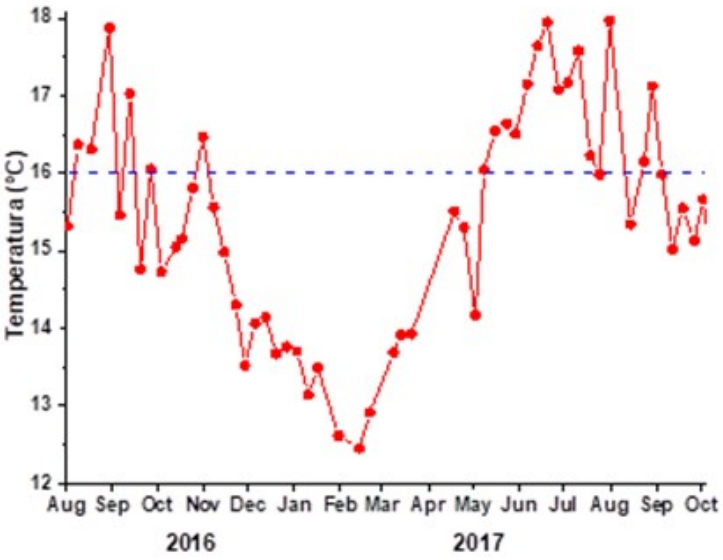



**Fig. 2.** Variación da temperatura da auga rexistrada a 4 m de profundidade na estación A7 da rede oceanográfica do INTECMAR, localizada cerca do polígono de bateas onde engordouse a semente de ostra rizada. A liña descontinua marca o valor de 16 ºC. Datos proporcionados polo INTECMAR

No verán de 2017, rexistrouse mortalidade alta durante o mes de xuño só na familia Mariña 5, mortalidade alta na familia Arousa 3 e moderada en Arousa 1 no período xullo-setembro, sendo baixa ou insignificante nas restantes.

A mortalidade rexistrada no verán de 2017 nalgunhas familias probablemente non se debeu á infección por OsHV1-µvar, polo menos na súa totalidade, pois non se rexistrou ningún caso positivo na mostra de agosto da familia Arousa 3 nin en ningunha das tomadas en setembro; tan só rexistráronse casos positivos na mostra de xullo da familia Mariña 5 (Táboa 1). A información epidémica recompilada sobre OsHV1-µvar suxire que este virus non causa mortalidade alta en adultos de ostra rizada incluso estando presente.

Non obstante, desde 2012 rexístranse episodios de mortaldade estival alta en ostras rizadas adultas en Francia e en Irlanda achacadas á infección pola bacteria *V. Aestuarianus*.

As análises para estimar a carga de *V. aesturianus* nas ostras, en mostras recollidas en setembro de 2017, demostraron unha carga media alta en tódalas familias, correspondendo os valores máis altos ás familias Arousa 1 e 3, que foron as que sufriron mortalidade (especialmente Arousa 3) no período xullo-setembro de 2017 (Fig. 3). Precisamente a familia Arousa 3, que rexistrou a mortalidade máis alta en dito período, foi a única familia na que se detectou a presencia de *V. aestuarianus* no 100% das ostras analizadas (Fig. 3).

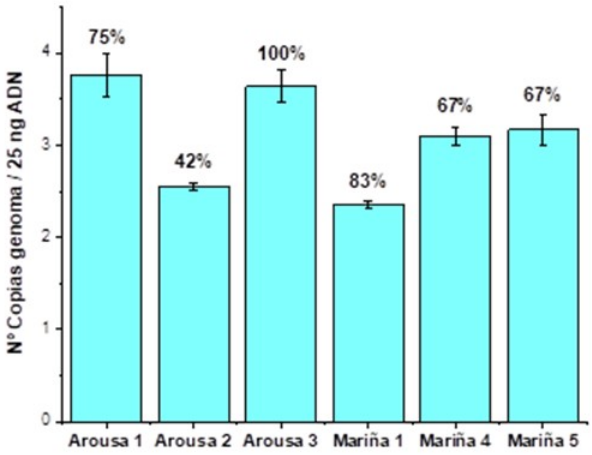



**Fig. 3**. Valores medios da carga de *Vibrio aestuarianus*, expresada como número de copias de xenoma bacteriano por 25 ng de ADN total, correspondentes a cada familia en mostras recollidas o 6 de setembro de 2007. Analizáronse 12 individuos de cada familia. Os segmentos no extremo de cada barra corresponden á desviación estándar. As cifras por encima das barras corresponden á porcentaxe de individuos positivos para *V. aestuarianus* de cada familia.

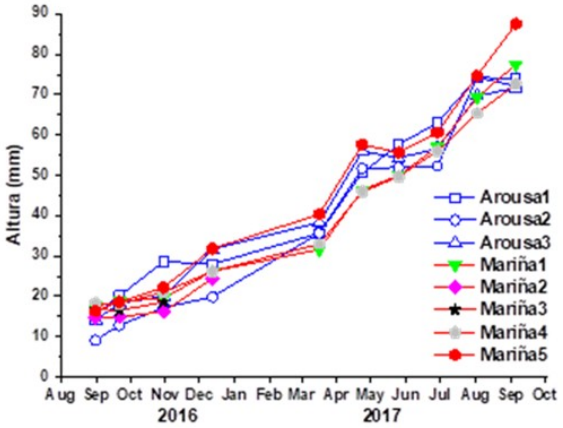



**Fig. 4**. Evolución temporal da talla (altura) media de cada familia de semente producida no criadeiro da ECIMAT, ao longo do seu engorde nunha batea da ría de Arousa. A alta mortalidade rexistrada nas familias Mariña 2, 3 e 6 frustrou o seu engorde en decembro de 2016.

En canto ao crecemento, a Fig. 4 mostra a evolución da talla media de cada familia durante a engorda. As familias derivadas de reprodutores da ría do Barqueiro que completaron a engorda mostraron un peso medio algo maior que o das familias derivadas de superviventes de Arousa (Táboa 2).

No caso da engorda dos lotes de semente producidos no criadeiro do CIMA, tamén rexistrouse unha mortalidade moi alta no outono de 2016, con valores de mortalidade acumulada o 13/12/2016 de 87,7% para o lote derivado de superviventes de Arousa e de 96,0% para o lote derivado de reprodutores recollidas na ría do Barqueiro. Non se detectou ningún caso de diagnóstico positivo para OsHV1-µvar no momento da transferencia á batea (22/09/2016) mentres que na mostraxe seguinte (31/10/2017) detectáronse casos positivos en ambos lotes, polo que a mortalidade deste período para ambos lotes de semente debeuse moi probablemente á infección por dito virus. Debido ao reducido número de superviventes de ambos os lotes (54 de Arousa e 24 de O Barqueiro) non se considerou oportuno continuar cun seguimento detallado da súa engorda.

Táboa 2. Peso medio (±DE, en gramos, N = 30) ao inicio e ao final do engorde de cada unha das familias que completaron o engorde, agrupadas en función da orixe dos reprodutores

| Data | Familias descendentes de superviventes de Arousa | | | Familias descendentes de ostras recollidas no Barqueiro | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Arousa 1 | Arousa 2 | Arousa 3 | Mariña 1 | Mariña 4 | Mariña 5 |
| 01/09/2016 | 0,7 ± 0,40 | 0,2 ± 0,12 | 0,5±0,38 | 0,7 ± 0,29 | 0,5 ± 0,30 | 0,6 ± 0.49 |
| 06/09/2017 | 43,5 ± 13,06 | 47,4 ±15,58 | 47,6 ±12,58 | 48,1 ±15,33 | 49,1 ±16,25 | 63,5 ±19,94 |

Con respecto á análise proteómica, secuenciáronse un total de 4.047 proteínas presentes nas mostras tomadas xusto antes de dispor a semente de ostra na batea, por tanto antes da exposición ao virus, das que se identificaron 2.615. Nas mostras dos superviventes recollidos en decembro, despois do pico de mortalidade causada polo virus, se secuenciaron un total de 5.383 proteínas, das que se identificaron 3.477.

A Táboa 3 mostra a distribución de proteínas identificadas en función da orixe das ostras (descendentes de superviventes de Arousa ou de ostras recollidas no Barqueiro) e do momento da mostraxe (antes de exposición ao virus ou despois do pico de mortaldade).

En relación co obxectivo de identificar proteínas como potenciais marcadores de resistencia ao virus, teñen especial relevancia as proteínas presentes nos superviventes que non se detectaran antes da exposición ao virus. Entre estas, identificáronse dúas proteínas presentes nos superviventes de ambas orixes, Arousa e O Barqueiro, a aril-sulfatasa B e a cadea 4 da NADH-ubiquinona oxidoreductasa, ambas con función inmune.

En conclusión, a utilización de descendentes de superviventes a un fenómeno de mortaldade masiva de semente de ostra rizada por infección con OsHV1-µvar contribuíu a unha redución significativa da mortalidade na engorda de semente nunha zona da ría de Arousa moi afectada por dito virus. Polo tanto, o desenvolvemento dun programa de mellora xenética mediante selección de cruzamentos albiscase como unha estratexia viable para minimizar a mortalidade de semente de ostra rizada debida a OsHV1-µvar tamén en Arousa, como xa se demostrara en Francia.

Táboa 3. Información sobre o número de proteínas identificadas e a súa distribución segundo diferentes criterios.

| | Antes de exposición ao virus | | Despois do pico de mortalidade por virus | |
|---|---|---|---|---|
| | Familias descendentes de superviventes de Arousa | Familias descendentes de ostras recollidas no Barqueiro | Familias descendentes de superviventes de Arousa | Familias descendentes de ostras recollidas no Barqueiro |
| Nº de proteínas totais identificadas | 998 | 1617 | 1139 | 2338 |
| Nº de proteínas presentes en tódalas familias de cada orixe | 22 | 12 | 15 | 24 |
| Considerando só as proteínas comúns a tódalas familias de cada orixe e comparando as dúas orixes: | | | | |
| Nº de proteínas exclusivas de cada combinación orixe/momento de mostraxe | 8 | 0 | 1 | 7 |
| Nº de proteínas presentes nas familias de ambas orixes e exclusivas de cada momento de mostraxe | 1 | | 2 | |

Non obstante, a detección de *V. aestuarianus* en asociación con mortaldade de ostras adultas supón unha seria complicación para o futuro da engorda da ostra rizada en Galicia, a lo menos na ría de Arousa, pois en Francia demostrouse que as estirpes de ostra rizada seleccionadas para aumentar a resistencia ao OsHV1-µvar mostran unha maior susceptibilidade á infección por *V. aestuarianus* que as estirpes non seleccionadas. Unha vez máis se demostra que a dependencia da importación de semente para manter a engorda de ostra en Galicia supón un elevado risco sanitario.

# 5.3 Accións de investigación en PROCESOS OCEANOGRÁFICOS COSTEIROS

| **Título da Acción de investigación – Acrónimo – Código CIMA** | |
|---|---|
| **Mellora analítica da detección de toxinas en moluscos bivalvos para maximizar o fluxo de traballo en sistemas de control MADeTox**. CIMA 17/01 | |
| **Investigador/a Principal** | |
| Juan Carlos Blanco Pérez | |
| **Outros/as investigadores/as participantes** | |
| | INTECMAR: Arévalo Bartolomé, F.; Moroño Mariño, A.; Correa Jorge, J., Lamas Castro, P., Rodríguez Cabo, T. |
| **Técnicos/as** | **Bolseiros/as** |
| CIMA: Mª Carmen Mariño Cadarso; Helena Martín Sánchez; Emilia Campaña Ferro | INTECMAR: Muñíz Romero, S |
| **Entidade que financia**: Consellería do Mar - Xunta de Galicia | |
| **Data de inicio**: 2017 | **Data de finalización**: Decembro de 2019 |


**RESUMO**

O control da toxicidade de tipo paralizante (PSP) e lipofílico lévase a cabo na actualidade por medio de bioensaio con rato e LC-MS/MS, respectivamente. Con todo, é inminente a adopción dun método de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), con oxidación pre-columna e detección de fluorescencia, como referencia na UE para a determinación da toxicidade PSP, substituíndo ao bioensaio de rato, o cal fai necesaria a súa adopción no sistema de control da Comunidade Autónoma de Galicia.

Ambas metodoloxías analíticas (HPLC e LC-MS/MS) presentan problemas cando se implementan en sistemas de control cunha grande carga de traballo, como é o caso de Intecmar .

Por outra banda, existe unha crecente preocupación por dous grupos de toxinas emerxentes en Europa –o da tetrodotoxina e o da palytoxina- que son de elevada potencia e que, ben pola expansión da súa área de distribución, ben pola súa posible introdución en produtos importados, están a aumentar o seu risco nos países da UE. A pesar desta preocupación non existen aínda métodos oficiais, nin nalgúns casos materiais de referencia, para levar a cabo a cuantificación destas toxinas, polo cal resulta importante contribuír ao seu desenvolvemento de forma que os que finalmente se adopten, poidan estar ben adaptados á dinámica dun sistema de control como o de Galicia.

O ano pasado desenvolveuse un método cromatográfico rápido para a determinación de toxinas PSP por HPLC con oxidación precolumna (3,5 min en lugar dos 15 min do método orixinal). Este ano constatáronse problemas na duración das columnas cromatográficas elixidas (Waters Atlantis T3 µm, 75 x 2,1 mm), que, aínda que non sendo graves xa que podían resistir unhas 900 inxeccións, supoñían un problema, fundamentalmente económico. Como solucións probáronse a redución do fluxo, a substitución da columna por unha doutra marca e a combinación das dúas. Tanto a redución do fluxo como a combinación desta redución co uso dunha columna Phenomenex Omega Polar 3 µm 100x2,1 mm, resultaron útiles, e a duración actual supera as 1.100 inxeccións.

Cos métodos desenvolvidos participouse nun exercicio intercomparativo internacional QUASIMEME obtendo moi bos resultados,

demostrando deste xeito que os métodos poden utilizarse con garantías para o control de toxinas PSP. Igualmente, os métodos foron transferidos a un novo equipo cromatográfico adquirido polo Intecmar.

Avaliouse un sistema automático de manexo de líquidos ASPEC de GILSON para os pasos de purificación e oxidación de extractos na determinación da toxicidade PSP por oxidación precolumna con resultados prometedores para o acurtamento do fluxo de traballo da analítica destes compostos.

Dado o laborioso das analíticas de toxinas PSP por medio de HPLC con detección por fluorescencia, estase a facer un esforzo internacional para a determinación destas toxinas con detección por espectrometría de masas. Neste ámbito, fíxose unha posta a punto da metodoloxía analítica e análise de mostras de toxinas PSP por medio de HPLC-MS/MS no marco dun estudo cooperativo internacional coordinado polo CEFAS, UK., e unha adaptación da mesma aos equipos dispoñibles en Intecmar e no CIMA.

Co obxectivo de reducir os problemas dos equipos analíticos utilizados para a análise de toxinas lipofílicas, avaliouse a posibilidade de diminución do número de mostras a analizar por combinación das mesmas (sen perda de concentración). Probáronse dous métodos, un

“on-line” e outro “off-line”. Os métodos “off-line” desenvolvidos utilizan columnas de extracción en fase sólida de diversos tipos, e con elas se consigue analizar conxuntamente 5 mostras ou mais, con boas recuperacións para o ácido okadaico (a toxina lipofílica máis importante en Galicia) e para a maior parte das toxinas lipofílicas reguladas. A metodoloxía afinarase durante o ano 2019.

O método “on-line” desenvolvido permite a análise conxunta de entre 6 e 8 mostras para o ácido okadaico, pero aínda queda por avaliar a súa efectividade para as outras toxinas lipofílicas.

Durante este ano, continuouse a purificación de palytoxina e ovatoxinas partindo de cultivos de Ostreopsis, e de posibles derivados do ácido okadaico, por medio de cromatografía de exclusión molecular con Sephadex.

# 5.4 Accións de investigación en RECURSOS MARIÑOS

| **Título da Acción de investigación – Acrónimo – Código CIMA** | |
|---|---|
| **Estudo das especies exóticas *Rapana venosa*, *Stramonita haemastoma* e *Callinectes sapidus*: bioloxía, distribución e abundancia, repercusións ambientais e socioeconómicas e medidas de prevención e protección**. CIMA 17/03 | |
| **Investigador/a Principal** | |
| Alberto de Coo Martín | |
| **Outros/as investigadores/as participantes** | |
| Antonio García Fernández; Aurora Fernández Álvarez | |
| **Técnicos/as** | **Bolseiros/as** |
| | |
| **Entidade que financia**: Consellería do Mar - Xunta de Galicia | |
| **Data de inicio**: 2017 | **Data de finalización**: Decembro de 2019 |


**RESUMO**

O problema xerado polas especies exóticas é unha fonte de conflito que ten xerado preocupación polos problemas medioambientais e económicos que esta xera. Por todo elo, tanto a nivel europeo como estatal e autonómico se teñen xerado accións para atallar o problema, tanto a nivel lexislativo como de impulso do coñecemento destas especies e a súa repercusión sobre as poboacións autóctonas e a diversidade. Pola súa posible repercusión nos recursos marisqueiros, e dado o amplo traballo realizado estes anos pasados sobre *Bolinus brandaris* e *Hexaplex trunculus* (altamente depredadores de recursos marisqueiros), tres son as especies que se propón estudar no presente proxecto.

*Rapana venosa* é un gasterópodo pertencente á familia Muricidae, e provinte do océano Pacífico oeste: mar de Xapón, mar Amarelo e mar da China. Con todo, estendeuse primeiramente polo mar Negro en 1947 e despois polo mar Mediterráneo oriental, e posteriormente por diversas zonas do océano Atlántico como a Bretaña Francesa (1997), mar do Norte (2005), e costas de EEUU (1998), Arxentina e Uruguai (1999).

O gasterópodo *R. venosa* polo xeral se alimenta de ostras, mexillóns e ameixas (Harding e Mann 1999; Savini et al., 2002; Seyhan et al., 2003; Savini Occhipinti Ambrogi de 2006; Harding et al., 2007) e o impacto ecolóxico sobre poboacións nativas de bivalvos pode ser moi elevado, podendo incluso causar a desaparición de poboacións locais enteiras (Zolotarev, 1996).

Esta especie pode tolerar unha ampla gama de temperatura e salinidade, isto en combinación cun comportamento xeralista de alimentación, un rápido crecemento, alta fecundidade e larvas planctónicas permítelle á especie colonizar novas áreas e aumentar o seu rango (Gilberto et al., 2011); estamos pois diante dun depredador moi importante e cunha gran capacidade expansiva.

Ata o momento rexistráronse 6 individuos adultos vivos e a cuncha dun individuo xuvenil, todos na ría de Arousa. O primeiro achado existente é do ano 2003 (Bañón & Otero, 2014): dous individuos adultos en posición de cópula.

Esta situación perigosa vese reforzada por 3 aspectos:

- Atopar individuos adultos e xuvenís que implica a posibilidade de crecemento nas nosas augas

- Individuos adultos en postura de cópula e as súas implicacións na posible reprodución.

- Localización en varias zonas da ría de Arousa expoñendo unha expansión real e varias vías de entrada

Aínda que o número de individuos atopados é escaso ata o momento, é interesante comprobar que o seu asentamento é ocasional, froito dalgunha acción puntual, ou ven xa se atopa asentada nas nosas rías.

*Stramonita haemastoma* (Linné, 1767) é un molusco gasterópodo da familia Muricidae. É un depredador común do intermareal e submareal da costa sureste de Estados Unidos (Watanabe & Young, 2006); máis ao sur atópase a variedade Thais haemastoma floridana que é un importante depredador na zona intermareal das costas rochosas brasileiras (Rocha-Barreira et al., 2004); e no Mediterráneo (Calvin Calvo J.C. 1995).

Aínda que nun principio, non se documentou viva en Galicia a excepción dun par de exemplares achados nun madeiro a flote na praia de Carnota, na costa occidental da provincia da Coruña (Otero, J. & Trigo, J. 1990) en Vázquez Varela, J. M. (1996), sábese que foi aproveitado como recurso marisqueiro en tempos prehistóricos e na época romana, tal como evidencia o achado de cunchas entre os restos dos concheiros dos castros litorais e en asentamentos romanos.

Nunha revisión da fauna das praias de Galicia, Souto, J. et al. (2008) observaron, en dúas localidades da costa de Lugo, un gran número de exemplares vivos de *S. haemastoma* e de postas, o que indica que a especie está asentada nesta zona.

En probas realizadas en acuario, nun anterior proxecto, mostran que dentro da súa alimentación se inclúen especies de alto valor económico como poden ser os mexillóns e os percebes co problema que se xeraría coa súa expansión.

Dado o alto nivel depredador e reprodutor descrito, e comprobado nos acuarios do CIMA tanto en Ribadeo como en Corón, o estudo da aparición, distribución e evolución destas especies sería importante para o sector marisqueiro pola afectación que se pode dar nos seus recursos produtivos.

Outro problema importante é a posibilidade, sobre todo na *Stramonita*, da expansión que poida ter esta especie.

Aparentemente a súa presenza está circunscrita hoxe en día á costa de Lugo, pero a posibilidade de que, por algún medio, puidese afectar ao resto das Rías Galegas, xeraría un problema dunha maior magnitude.

Callinectes sapidus, coñecido como cangrexo azul é un molusco de grande tamaño que destaca pola vistosa cor azulado da súa caparazón. Este animal foise expandindo por todo o arco mediterráneo, costa portuguesa, golfo de Biscaia e tense rexistrado un exemplar na ría de Vigo en novembro de 2015. De acordo con Bañon (2016): "Autóctono do Atlántico occidental, cun patrón de distribución, dende o norte de Estados Unidos e Canadá (Nova Escocia, Maine e Norte de Massachusetts) a Venezuela, Baía, Brasil, ata Arxentina (Williams,1984; Santos & D'Incao, 2004), foi introducido fora do seu ambiente nativo no Atlántico oriental en 1900, na costa atlántica en Francia (Bouvier, 1901). Posteriormente, os especímenes foron detectados no mar do Norte (1932) o mar Mediterráneo (1949, ) e o delta do Ebro en 2012 (Castejón & Guerao, 2013). Foi informado en Lisboa, Portugal, en 1979 (Gaudencio & Guerra, 1979), rexistráronse datos no estuario do Guadalquivir en 2002 (Cabal et al., 2006); e no mar Cantábrico en 2004 (Cabal et al., 2006); e estuario de Sado".

Dadas as dimensións corporais e o potencial depredador destas especies de bivalvos de interese comercial en Galicia e tamén (é de apuntar a súa importancia) a posible afectación as pesqueiras de cangrexos, clave na pesca artesanal galega como a nécora ou as poboacións xuvenís de centola (entre outras), consideramos de importancia facer unha detida inspección do estado de presenza e expansión desta especie.

**OBXECTIVOS**

Os obxectivos da presente Acción serían :

1º. Comprobar si existe unha Expansión da introdución puntual de Rapana venosa na ría de Arousa e en caso positivo o seguinte obxectivo.

2º. Estudar o potencial expansivo da anteriormente citada especie e as súas presas e taxas alimenticias e capacidade e límites reprodutivos.

3º. Avaliar a Expansión que está a rexistrar S*tramonita homeastoma* na costa lucense

4º. Estudar as taxas alimenticias e capacidade e límites reprodutivos da anterior especie

5º. Estudo de crecemento en medio Natural e Laboratorio a partir das postas e con selección de tamaños.

6º. Estudar a presenza e posible extensión de *Callinectes sapidus*.

7º. Xerar unha avaliación de riscos de que esta última especie poida implantarse nas restantes rías de Galicia de forma relevante nas Rías Baixas.

**Actividades realizadas no 2018**

1.1. Realización Memoria Anual do ano 2017.

1.2. Reunións de programación traballo anual do equipo de investigación.

1.3. Revisión actualizada da bibliografía e noticias e información aparecida sobre as EEIM.

1.4. Execución dos diversos trámites tanto a nivel administrativo como financeiro referente aos aspectos da Acción de investigación.

1.5. Posta en marcha e mantemento das unidades de acuarios de auga mariña controlada no CIMA de Ribadeo.

1.6. Mantemento das unidades de acuarios de auga mariña controlada no CIMA de Corón.

1.7. Labores de mantemento xerais, ao carecer de persoal auxiliar/laborante de laboratorio.

1.8. Realización de Mostraxes na ría de Vigo e de Arousa para localización ou confirmación de ausencia de *Rapana venosa* e Cangrexo azul *Callinectes sapidus*.

Estas mostraxes se realizaron, este ano, con tres tipos de artes: nasas na ría de Vigo, rastro de vieira, rastro de ameixa e mergullo de navalla, na ría de Arousa.

1.9. As diversas mostras se inspeccionan in situ e posteriormente se incorporan os exemplares vivos aos acuarios, se procesa directamente, ou conxelan para posterior tratamento.

Todas as mostraxes e puntos de extracción cartografáronse e delimitaron xeograficamente

| | |
|---|---|
| Piñeira | Presenza de individuos e postas |
| Areosa | Presenza e caracolas baleiras |
| Xuncos | Observamos 27 individuos vivos e 20 caracolas |
| Castros | Non presenza no extremo oriental |
| Illas | Non se aprecian variacións en número en relación ao verano anterior |
| Catedrais | Non se aprecian variacións en número en relación ao verano anterior |
| Reinante | No extremo oriental observamos 18 individuos, deles, 10 estaban totalmente cubertos por area. Ademais de tres postas |
| As Pasadas | Observamos, no extremo oriental, 21 individuos e unha posta |
| Praia de Lago | Observamos tres individuos de *Stramonita homeastoma* de gran tamaño |

Na costa lucense as mostraxes realizáronse a pé nas zonas recollidas nesta Táboa

Os resultados e conclusións provisionais a estas datas da Acción poderían agruparse en:

- Parece confirmarse a expansión de distribución de *Stramonita* que ademais das diversas mostraxes en praia ven avaliado polos seguintes factores:

O elevado nivel de postas e a súa relación coa elevación da temperatura, tanto no inicio da data de posta como do número delas, tal como se aprecia na táboa seguinte de postas recollidas no acuario do CIMA Ribadeo a 20ºC.

O elevado metabolismo e a aceptación de todo tipo de presas nas probas realizadas nos acuarios experimentais do CIMA-Corón.

| Data | Zona frontal (N.º cápsulas) | Zona lateral (N.º cápsulas) | N.º total de cápsulas |
|---|---|---|---|
| 11/06/18 | 68 | | 68 |
| 13/06/18 | 20 | | 88 |
| 14/06/18 | 10 | | 98 |
| 15/06/18 | 33 | | 131 |
| 18/06/18 | 70 | | 201 |
| 20/06/18 | 77 | 19 | 297 |
| 22/06/18 | 142 | 10 | 449 |
| 25/06/18 | 320 | 18 | 787 |
| 26/06/18 | 96 | | 883 |
| 27/06/18 | 37 | | 920 |
| 29/06/18 | 117 | | 1037 |
| 02/07/18 | 60 | | 1097 |
| 07/07/18 | 109 | | 1206 |
| 10/07/18 | 80 | | 1286 |
| 13/07/18 | | 53 | 1339 |
| 16/07/18 | 11 | 11 | 1361 |
| 20/07/18 | 35 | | 1396 |

Tendo en conta todo o anterior, nun contexto de Cambio Climático que xa se está deixando notar en Galicia.

- Non se rexistrou ningún exemplar de *Rapana* nin Cangrexo azul nas diversas mostraxes ou informacións recibidas. Podendo estimar que non existen, unha dimensión ou expansión notable ata o momento destas dúas especies.

- Pola contra, constatouse a notable dimensión que está a experimentar *Crepipatella dilatata* (Lammarck,1822).

Así mesmo, a Confraría de O Grove informou dunha expansión de *Bolinus brandaris* á zona de Rons, no mes de xuño de 2018: "A semana pasada na zona de Rons, varias embarcacións do sector de marisqueo a flote, que se atopaban traballando na zona de Rons trouxeron canaílla a lonxa". Ante a dúbida de se esta canaílla fora realmente extraída nese banco, ou fora capturada na zona da Enseada o día anterior para a súa posterior venda na lonxa ao día seguinte, se lle pide ao servizo de vixilancia que confirme ou non a presenza da canaílla.

| Acuario 1 | Mexillón | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Días | Dieta | Nº ind | Nº com | % | Vianda | % | Vianda/dia |
| 2 | 185,062 | 10 | 10 | 100 | 108,31 | 58,5 | 54,16 |
| 3 | 187,456 | 11 | 11 | 100 | 102,08 | 54,5 | 34,03 |
| 3 | 186,15 | 11 | 11 | 100 | 108,27 | 58,2 | 36,09 |
| 3 | 186,288 | 14 | 14 | 100 | 109,81 | 59 | 36,6 |
| 4 | 167,523 | 18 | 18 | 100 | 99,047 | 59,1 | 24,76 |

| Acuario 1 | Mexillón | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 | 187,583 | 10 | 10 | 100 | 109,25 | 58,2 | 21,85 |
| 5 | 184,29 | 13 | 13 | 100 | 110,93 | 60,2 | 22,19 |
| 3 | 183,915 | 9 | 9 | 100 | 109,11 | 59,3 | 36,37 |
| 5 | 187,374 | 14 | 14 | 100 | 108,69 | 58 | 21,74 |

| Acuario 2 | Lapa | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Días | Dieta | Nº ind | Nº com | % | Vianda | % | Vianda/día |
| 6 | 162,769 | 6 | 6 | 100 | 62,371 | 38,3 | 10,4 |
| 3 | 165,18 | 12 | 6 | 50 | 64,533 | 39,1 | 21,51 |
| 3 | 175,792 | 11 | 10 | 91 | 79,821 | 45,4 | 26,61 |
| Non comen | | | | | | | |

| Acuario 2 | Berberecho | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 | 163,794 | 15 | 15 | 100 | 85,259 | 52,1 | 17,05 |
| 5 | 165,09 | 14 | 14 | 100 | 92,083 | 55,8 | 18,42 |
| 6 | 159,47 | 15 | 15 | 100 | 86,811 | 54,4 | 14,47 |
| 10 | 165,306 | 14 | 14 | 100 | 69,318 | 41,9 | 6,93 |

| Acuario 3 | Xapónica | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Días | Dieta | Nº ind | Nº com | % | Vianda | % | Vianda/día |
| 6 | 140144 | 6 | 6 | 100 | 60,879 | 0,04 | 10,15 |
| 8 | 141,207 | 6 | 6 | 100 | 61,658 | 43,7 | 7,71 |
| 7 | 148,162 | 8 | 8 | 100 | 64,842 | 43,8 | 9,26 |
| | | | | | | | |
| 6 | 137,685 | 6 | 6 | 100 | 56,376 | 41 | 9,4 |

| Acuario 3 | Xapónica | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 7 | 139,133 | 7 | 7 | 100 | 64,5 | 46,4 | 9,21 |
| 8 | 142,079 | 8 | 8 | 100 | 66,003 | 46,5 | 8,25 |
| 8 | 139,594 | 9 | 9 | 100 | 61,386 | 44 | 7,67 |
| 8 | 139,594 | 9 | 9 | 100 | 65,539 | 47 | 8,19 |

| Título da Acción de investigación – Acrónimo – Código CIMA | |
|---|---|
| **Incidencia da depredación por cangrexos, con especial referencia ao seu desenvolvemento xuvenil, sobre as primeiras fases do recrutamento de ameixas e berberechos no medio natural**. CANGREXOS CIMA 18/04 | |
| **Investigador/a Principal** | |
| Carmen Pérez Acosta | |
| **Outros/as investigadores/as participantes** | |
| Alberto de Coo Martin, Antonio García Fernández, Justa Ojea Martínez | Confraría de Vilaxoán (asistencia técnica) |
| **Técnicos/as** | **Bolseiros/as** |
| Mercedes Fernández Besada | |
| **Entidade que financia**: Consellería do Mar - Xunta de Galicia | |
| **Data de inicio**: Xuño de 2018 | **Data de finalización**: Decembro de 2020 |


**RESUMO**

En Galicia, debido ás excepcionais condicións ambientais, oceanográficas e de produtividade primaria, as poboacións de bivalvos en substrato brando presentan altas densidades constituíndo grandes bancos naturais que son o sustento do marisqueo galego.

Esta elevada densidade poboacional, é a súa vez unha das bases alimentarias importantes da cadea trófica que serve de sostén a grande cantidade de especies. Entre elas, numerosas especies de depredadores que tamén adaptaron o seu ciclo reprodutivo e o desenvolvemento das súas primeiras fases de vida a este boom alimentario, que constitúe as fases iniciais do recrutamento de berberechos, ameixas e outros bivalvos e que ten lugar ao comezo da primavera e verán.

Dentro destas especies depredadoras de bivalvos, é de destacar os cangrexos e de forma preferente *Carcinus maenas* (Linnaeus, 1758), debido a súa abundancia na zona intermareal, grande capacidade depredadora e rápido crecemento, produto da súa elevada taxa metabólica e de inxesta. Esta actividade sobre as poboacións de bivalvos e o feito de ser tan representativa levounos a elixila como especie depredadora principal na investigación, pero a diferenza das numerosas investigacións sobre o tamaño adulto que existen ata o momento, nós queremos centrar os esforzos nas primeiras fases (tamaños) de vida xa que é onde sexoga grande parte da subministración de novos individuos ás poboacións comerciais.

O obxectivo desta Acción é abordar o estudo dunha fase moi pouco estudada, como é a fase xuvenil dos cangrexos en praias, analizando a depredación e actividade alimentaria, sobre os primeiros pasos do recrutamento (entre 1 e 5 mm) de bivalvos comerciais, así como a elevada taxa de mortalidade (e o seu posterior condicionamento e minoración) no recrutamento final.

Para levar a cabo este estudo propoñémonos os seguintes obxectivos:

1. Estimar a taxa de mortalidade que experimentan as primeiras fases (tamaño 1-5 mm) de berberecho (*Cerastoderma edule*) e ameixas (*Ruditapes decussatus*, *Venerupis corrugata* e *Ruditapes philippinarum*) durante o inicio do seu recrutamento na praia.

2. Avaliar e documentar a actividade depredadora-alimentaria de xuvenís de cangrexo (*Carcinus maenas*).

3. Avaliar as épocas de maior actividade e abundancia de xuvenís de cangrexos no medio natural. Estimación da importancia da actividade depredadora.

4. Estimar o impacto doutros depredadores (gasterópodos, peixes e aves).

5. Avaliar sistemas de protección e prevención para mellorar a supervivencia do recrutamento nas primeiras fases. Realizar unha análise ecolóxica e de sostibilidade axeitada.

Durante o ano 2018 ademais da adquisición, montaxe e posta a punto do material programado: acuarios, lupas, estabuladores de semente de bivalvos, etc., levaron a cabo as seguintes tarefas:

- Comprobar a dispoñibilidade (abundancia e captura), estrutura da poboación e distribución zonal da especie prioritaria da Acción: *Carcinus maenas* con especial atención aos seus tamaños inferiores. Para iso realizáronse mostraxes a pé e con nasas nas diversas épocas estacionais.
- Optimizar o manexo e estabulación de exemplares de cangrexo en laboratorio.
- Observar e comprobar o seu comportamento nos acuarios e estabulación en cuarteróns, a influencia de condicións ambientais: luz incidente, Tª, aireación, tamaño así como o efecto da complexidade do habitat: acuarios desprovistos de calquera obxecto, con area, con pedras, algas, cunchas, etc.
- Determinar das épocas e zonas de semente natural e inicio do recrutamento en praia. Para

iso realizáronse diversas mostraxes con calicata e observouse detidamente, coa axuda de lupas, a fracción de area onde está asentada a semente de bivalvos máis pequena.

- Dispoñibilidade e subministración, e mantemento en laboratorio, de alimento e semente viva de bivalvos para conservación de cangrexos e probas experimentais. Para iso cóntase co alimento dispoñible nas praias próximas ao CIMA e a semente producida tanto no CIMA de Ribadeo como no IGAFA.

- Realizar as probas experimentais preliminares sobre a capacidade de depredación dos cangrexos de tamaño pequeno sobre o recrutamento de bivalvos

**RESULTADOS**

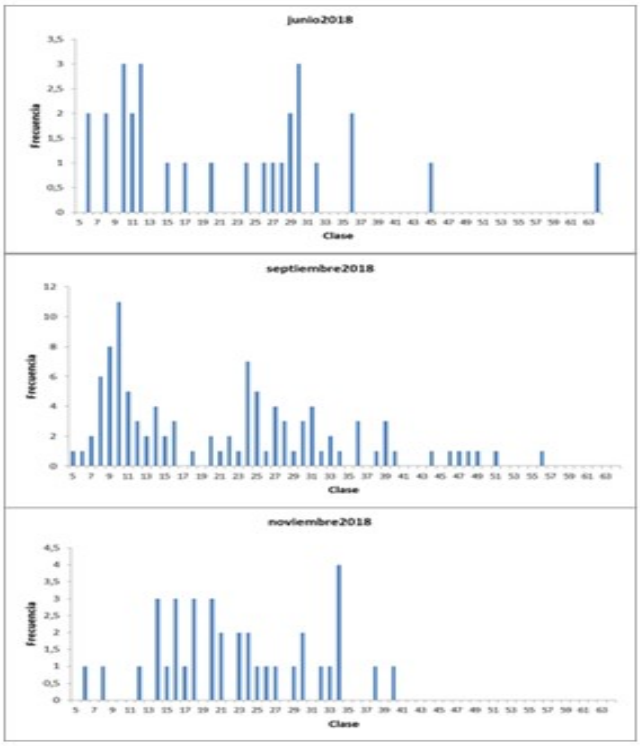
**Estrutura da poboación de *Carcinus maenas***:

Das mostraxes efectuadas dedúcese a existencia de todas as tallas de cangrexo (ver Figuras seguintes) durante todo o ano, aínda que cunha maior predominancia na primavera-verán.

Os tamaños pequenos no verán tenden a localizarse nas zonas altas do intermareal mentres que no outono existe unha maior abundancia delas na zona baixa do intermareal.

Esta presenza continuada de tamaños pequenos (con moita maior abundancia das mesmas no verán) determina, tamén que podan afectar a todos os inicios do recrutamento das diversas especies de bivalvos comerciais que se dan desde inicios da primavera (berberecho e babosa) ata verán e finais de verán (ameixa xapónica e fina).

En relación á forma de captura, o emprego de nasas adaptadas favorece a captura de exemplares xuvenís.




**Manexo e estabulación de exemplares de cangrexo**:

Concluíuse que os cuarteróns eran negativos para a supervivencia dos mesmos, interferindo nos ensaios de alimentación, por canto os ocos dos cuarteróns provocan numerosas roturas nas patas dos cangrexos e o ambiente interior e desprotexido xera un elevado stress. Por todo iso realizáronse diversas probas en acuarios modificando a súa hábitat: con algas, cunchas, pedras, con area ou con fondo de pano liso-rugoso, que permitise non só un bo desprazamento dos exemplares de cangrexo senón tamén protección.

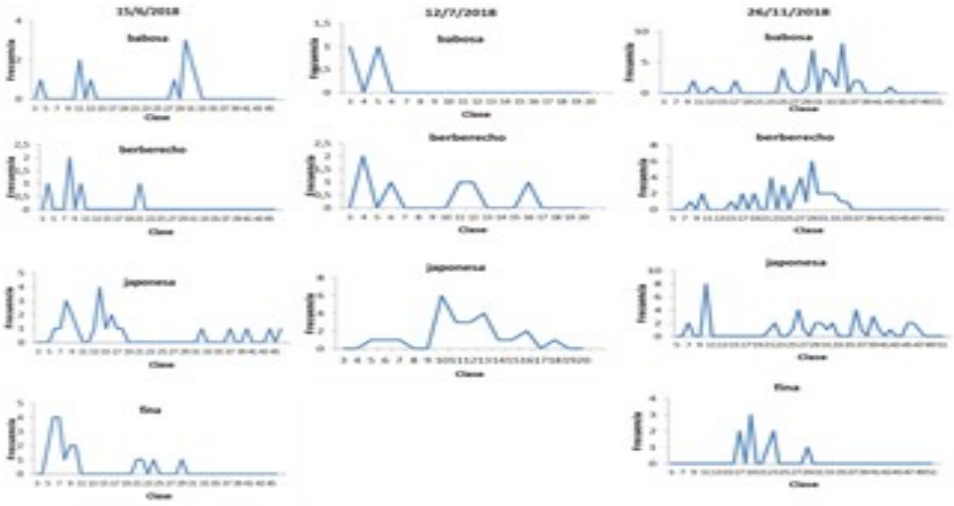
A estabulación e conservación dos cangrexos para as probas experimentais en laboratorio que se considerou máis adecuada foi simulando o seu medio natural, con area e abundantes superficies refuxio que evite os episodios de

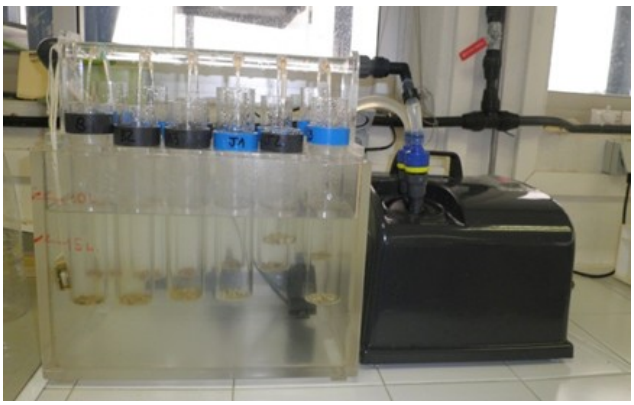
mortalidade por agresións e canibalismo.

**Recrutamento de semente de moluscos en praias**:

Nas mostraxes na praia de Corón (Vilaxoán) anexa ao CIMA comprobouse a existencia de recrutamento das diversas especies.

Cos datos obtidos nesta zona e de outras zonas de Galicia coas que se mantén unha colaboración, puidéronse constatar varias postas de berberecho e os recrutamentos das outras especies detectadas en Corón. (ver Figura seguinte

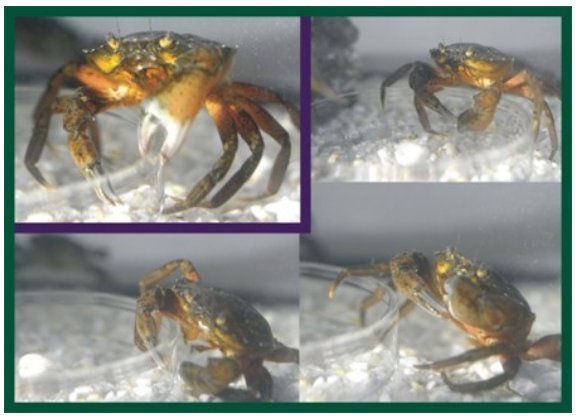


A semente de ameixa babosa foi mantida viva con éxito, no interior de cilindros con fondo de malla, situados nun sistema con auga de mar filtrada en circuíto pechado e con recirculación, a través dunha bomba mergullada, a unha temperatura de 16°C mantida mediante arrefriador. A semente alimentábase cunha mestura de microalgas engadida diariamente

**Capacidade depredadora dos cangrexos pequenos**:

Nas probas realizadas con individuos menores de 12 mm libres nos acuarios, observamos unha rápida reacción por alimentarse e a capacidade dos cangrexos pequenos, para abrir e comer ameixas dun tamaño moi próximo á súa anchura total (ver fotos seguintes).



| Título da Acción de investigación – Acrónimo – Código CIMA | |
|---|---|
| **Estudo da bioloxía, status poboacional e diversidade xenética da holoturia (*Holothuria forskali*) na ría de Vigo.** HOLOTURIA.- CIMA 17/05. | |
| **Investigador/a Principal** | |
| Fernando Manuel Febrero Mayor | |
| **Outros/as investigadores/as participantes** | |
| CIMA: Pedro Cuiñas Olmedo | X.T. Vigo: Luís Manuel Rodríguez González, Rosa Ana Iglesias Nuñez, Ana Riveiro Cruz.<br>Universidade de Vigo – ECIMAT: Alba Hernández Otero, Tania Ballesteros Otero.<br>ANFACO: Montserrat Espiñeira Fernández, Francisco J. Santaclara Nores, Fátima C. Lago Soriano.<br>Confraría de Vigo (asistencia técnica)<br>Confraría de Cangas (asistencia técnica) |
| **Técnicos/as** | **Bolseiros/as** |
| **Entidade que financia**: Consellería do Mar - Xunta de Galicia | |
| **Data de inicio**: Xuño de 2018 | **Data de finalización**: Agosto de 2020 |


**RESUMO**

Con esta Acción preténdese adquirir información científica que sexa relevante para a xestión da pesqueira da especie *Holothuria forskali* (Delle Chiaje, 1823) coñecida como holoturia, cogombro de mar negro, cogombro de mar, carallo de mar, etc.

Obterase información específica sobre:

- Estado da poboación sobre a distribución espacial (delimitación de bancos), agregación, estrutura de tamaños, densidade e biomasa do stock nos bancos seleccionados.
- Ciclo reprodutivo, tamaño de primeira madurez, crecemento e relacións biométricas.
- Estudo da diversidade xenética e a estrutura da poboación da especie de cogombro de mar *Holothuria forskali*, empregando diversos marcadores xenéticos (planéase o estudo de dúas rexións de mitocondrias, así como o estudo dun mínimo de 9 marcadores microsatélite).

A zona de estudo centrouse principalmente nos bancos naturais de holoturia do ámbito territorial da Confraría de Cangas, por ser nestes bancos nos que se levou a cabo unha explotación máis regular deste recurso.

O obxectivo xeral é ampliar o coñecemento máis relevantes para a súa xestión pesqueira, así como liñas de traballo cos axentes interesados.

Os obxectivos parciais foron:

**Estudos da poboación (CIMA)**

1. Delimitación dos bancos explotados e elección dos bancos para estudar.
2. Avaliación das densidades da poboación e a súa distribución espacial.
3. Estimación da biomasa comercial existente nos bancos.
4. Obtención de frecuencias de tamaños e/ou pesos para coñecer a estrutura da poboación e se fora posible a identificación de cohortes.
5. Avaliación da poboación de zonas non explotadas.

**Estudos biolóxicos (ECIMAT)**

1. Relacións das biometrías: seleccionar as biometrías e as relacións tamaño-peso que aseguren a máxima precisión e exactitude.
2. Ciclo reprodutivo: estudar a variabilidade temporal do ciclo reprodutivo na ría de Vigo e a súa relación coas principais variables ambientais.
3. Tamaño de primeira madurez: estudar o tamaño no que o 90% dos individuos están sexualmente maduros.
4. Crecemento: determinar o crecemento de xuvenís e coñecer o tempo necesario que precisa para acadar o tamaño/peso comercial.

**Estudos xenéticos (ANFACO)**

1. Avaliación da diversidade xenética e a estrutura da poboación mediante secuenciación e análise filoxenética de marcadores de mitocondrias (COI e 16S).
2. Avaliación do funcionamento dos marcadores microsatélite previamente descritos en especies próximas a *Holothuria forskali*.
3. Illamento de microsatélites de novo a partir da construción de xenotecas enriquecidas.

4. Construción de paneis de xenotipado e aplicación ás mostras.

5. Estimación da diversidade xenética, estudo da conectividade entre stocks e avaliación dos niveis de endogamia a partir dos datos de xenotipado mediante microsatélites.

**RESULTADOS OBTIDOS**

**Medicións Biométricas** (en campo e laboratorio)

Medicións biométricas entre distintas variables morfolóxicas dos individuos, para a súa utilización no cálculo de relacións tamaño-peso biomasa de holoturia (stock) presente nos bancos estudados mediante mostraxe.

A actividade consistiu na medición en laboratorio de individuos de holoturia baixo dúas condicións: medición en fresco (directamente unha vez sacadas da auga) e medición despois de someter os individuos á relaxación mediante inmersión, durante 15 minutos, nunha solución ao 5% de MgCl2.

As variables medidas para cada individuo foron:

- Lonxitude do corpo, en fresco e relaxado
- Perímetro do corpo na súa parte central, en fresco e relaxado
- Peso en fresco e relaxado
- Volume en fresco e relaxado (medición por inmersión en probeta graduada)
- Lonxitude unha vez aberta lonxitudinalmente e eviscerada
- Anchura unha vez aberta lonxitudinalmente e eviscerada
- Peso unha vez aberta lonxitudinalmente e eviscerada
- Peso seco unha vez eviscerado
- Lonxitude seca eviscerado
- Anchura seco eviscerado

Ademais das medidas en laboratorio tamén se tomaron medidas (“en fresco”), de lonxitude, perímetro na parte central do corpo e volume do corpo, a bordo da embarcación utilizada para as mostraxes das poboacións no seu medio natural.

Para o caso de mostraxes de holoturia no medio mariño, interésanos utilizar medidas sinxelas e, a ser posible, que poidan realizarse a bordo da embarcación de mostraxe en estado fresco, xa que o traslado dos individuos e a súa manipulación é complicada, debido a problemas de evisceración, secreción de túbulos de Cuvier e ter que ser mantidos en inmersión.

No caso da holoturia, que non presenta estruturas ríxidas facilmente medibles e cuxa lonxitude corporal varia notablemente en pouco tempo segundo o estado de actividade e do estrés do individuo, o tamaño do individuo en fresco non resultou unha variable axeitada para relacionala co peso do individuo.

Outras relacións que se exploraron foron:

- Relación entre o peso fresco dos individuos e o produto da lonxitude polo perímetro.
- Relación entre o peso fresco dos individuos e a asimilación do corpo a un cilindro calculado a partir dos eixes lonxitudinal e transversal do corpo.
- Relación entre o peso fresco dos individuos e o esferoide calculado a partir dos semieixes lonxitudinal e transversal do corpo.
- Relación entre o peso fresco dos individuos e a área da elipse calculada a partir dos semieixes lonxitudinal e transversal do corpo.

Para obter estas relacións utilizáronse tanto os datos do volume medido por inmersión en probeta graduada, a bordo da embarcación e densidade obtida previamente en laboratorio, como os do peso fresco obtido no laboratorio con balanza de precisión,

As relacións que se obtiveron coas medicións foron todas moi similares, xa que en realidade todas dependen da lonxitude e do perímetro, a relación encontrada entre o produto da lonxitude e o perímetro do corpo dos individuos e o peso fresco foi a seguinte (Táboa I).

O axuste da ecuación é bo, e os erros Standard da regresión e da pendente son pequenos, pero a distribución dos residuos non é homoxénea e vólvese maior para os individuos de tamaño máis grande. Para obter esta relación é necesario medir a lonxitude e o perímetro dos individuos, as dúas varían constantemente para un mesmo individuo, pero cando non existe perda de auga, unha diminución na lonxitude resulta nun aumento do perímetro do individuo, e viceversa. A medición do perímetro non é tan sinxelo como o da lonxitude porque ao premer sobre o corpo do individuo alterase a medida.

En vista de que a variable máis sinxela de medir (a lonxitude), non resulta moi axeitada como variable de predición para o peso das holoturias, unha das mellores alternativas para obter o peso fresco é medir o volume por inmersión dos individuos en probeta graduada e utilizar a súa densidade para calcular o peso.

A densidade dos individuos en estado fresco medida en laboratorio foi a seguinte d = 1,016 (± 0.015; α=0,05; n=19) g/cm3.

Este método tamén foi utilizado para obter o peso nas mostraxes dende embarcación.

**Táboa I**. Estatísticas da transformación logarítmica (Log y=loga+b*logx).

| | |
|---|---|
| Coeficiente de correlación múltiple | 0,93669443 |
| Limite inferior R (95%) | 0,90959608 |
| Limite superior R (95%) | 0,95585788 |
| Error Standard de R | 0,03293914 |
| Coeficiente de determinación R^2 | 0,87739645 |
| R^2 axustado | 0,87631147 |
| Error típico | 0,07881372 |
| Observacións | 115 |

Medidas biométricas en laboratorio

Coas medicións biométricas en laboratorio tentouse de conseguir relacións entre variables sinxelas de obter, como lonxitude, perímetro ou peso húmido, como variables de predición e o peso húmido eviscerado e o peso seco eviscerado como variables dependentes.

Neste caso atopáronse boas correlacións entre esas variables, aínda que hai que tomar estes datos con certa cautela, porque aínda que son datos obtidos en laboratorio con máis exactitude que os recollidos en campo, non son moi numerosos (n=20). Ademais, non se atoparon boas relacións para estas variables co peso en fresco, cando se utilizaron maior número de datos procedentes de medicións en embarcación.

As rectas de regresión que se obtiveron con boas correlacións son:

- Recta de regresión entre Lonxitude do individuo en fresco e Peso húmido eviscerado
- Lonxitude do individuo en fresco - Peso seco eviscerado
- Peso húmido fresco – Peso húmido eviscerado
- Peso húmido fresco – Peso seco eviscerado
- Peso húmido eviscerado – Peso seco

Mostraxe submareal

Para realizar a avaliación das poboacións de holoturia presentes na ría de Vigo escolléronse 5 sitios considerados como bancos de esta especie por varios mariscadores con Permex (mediante mergullo) de ourizo, holoturia e anemone.

Todos estes lugares pertencen ao ámbito territorial da Confraría de Cangas, xa que ata o de agora foi a única confraría da ría que explotou este recurso.

A situación e denominación destes bancos é a seguinte:

Costa norte da ría de Vigo (concello de Cangas):

"Castro" na Punta Corbeiro dos Castros (realizáronse 12 transectos de 100 metros)

"Melide" entre Punta Subrido e Punta Robaleira (realizáronse 4 transectos de 100 metros)

Arquipélago de Cíes (concello de Cangas):

"Cantareira" na costa este da Illa Monteagudo (realizáronse 4 transectos de 100 metros)

"Freu da Porta" na costa sur da Illa do Faro no canal entre as illas do Faro e San Martiño, entre Punta Carracido e Punta Canabal (realizáronse 4 transectos de 100 metros)

"Fornos" situado na costa sur da illa de San Martiño, na enseada dos Fornos, entre Cabo Vicos e Punta Cabaliño (realizáronse 4 transectos de 100 metros)

As mostraxes submareais de avaliación de holoturia realizáronse dende unha embarcación mediante censos visuais e extractivos utilizando técnicas de mergullo. Consistiron en contar e recoller individuos ao longo de transectos lineais de 100 metros de lonxitude, trazados no fondo mariño ata unha profundidade máxima de 15 metros. A lonxitude, perímetro e volume dos individuos recollidos foron medidos a bordo da embarcación e devoltos ao mar na mesma zona de extracción.

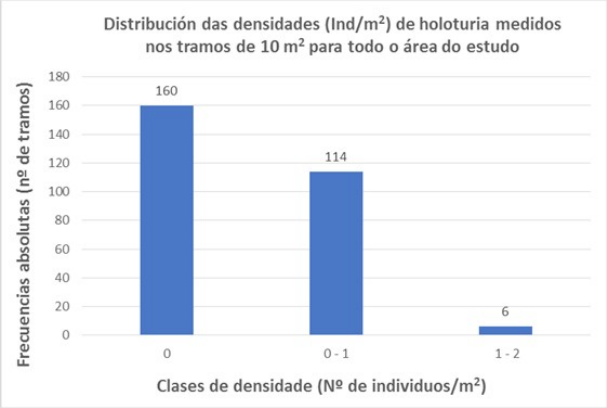
O censo visual realizouse por medio de dous mergulladores, un deles utilizou unha varela marcada no seu punto medio, para delimitar unha franxa dun metro de ancho ao longo de todo o percorrido do transecto, rexistrando nunha folla, para cada tramo de 10 metros o nº de individuos, a profundidade e o tipo de substrato. O outro mergullador recolleu a man os individuos atopados en cada tramo de 10 metros para o seu traslado a bordo da embarcación.

Preséntanse os resultados para cada zona e tamén conxuntamente para todos os bancos (ría e arquipélago de Cíes).

Distribución espacial

Utilizando os tramos de 10 metros nos que se dividiu cada unidade de mostraxe de 100 metros (transecto), podemos obter a gráfica de clases de densidades (individuos/m2) (Gráfico 1).

Os valores de densidades de holoturia atopadas para eses tramos de 10 metros evidencian que a clase de 0 individuos/m2 é moi maioritaria (57% dos tramos) e que a densidade de individuos, en xeral para toda a área, é baixa (menor de 1 individuo/m2) presentándose os máximos en determinadas zonas, con só 6 observacións por riba de 1 individuo/m2 que representan o 2% do total de casos en toda a área de estudo.




Os valores de densidades de holoturia atopadas para eses tramos de 10 metros evidencian que a clase de 0 individuos/m2 é moi maioritaria (57% dos tramos) e que a densidade de individuos, en xeral para toda a área, é baixa (menor de 1 individuo/m2) presentándose os máximos en determinadas zonas, con só 6 observacións por riba de 1 individuo/m2 que representan o 2% do total de casos en toda a área de estudo.

Estrutura da poboación (por pesos)

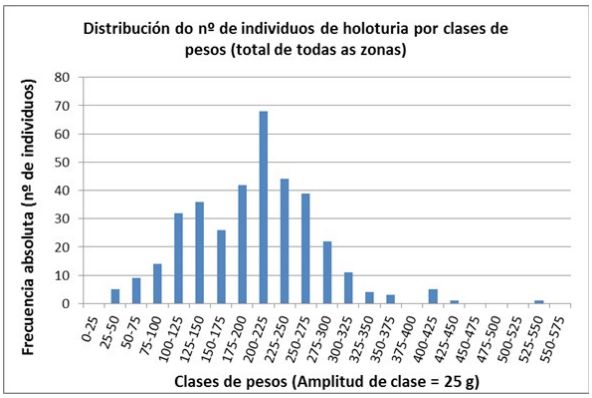
As holoturias presentan a capacidade de contraer ou alargar o corpo nunha alta porcentaxe, é por isto que existe dificultade para distribuílas por tamaños para o estudo da estrutura da poboación. As medidas que se toman nas mostraxes son o volume e  Por isto en vez de utilizar os tamaños, como na maioría de especies mariñas, empregaremos o peso para clasificar a poboación de holoturias.

O peso medio dos individuos non varía moito entre as distintas localizacións excepto en “Fornos” que teñen un peso medio significativamente menor que o resto e O Castro que o ten maior. Preséntase a estatística descritiva de todos xuntos, (Táboa II) porque os individuos de pouco peso (xuvenís) son escasos e os lugares de peso significativamente distinto, presentan baixas densidades.

**Táboa II.**- Estatística descritiva do peso das holoturias

| *Estatística descritiva* | *Peso (g)* |
|---|---|
| Media | 201,50 |
| Error típico | 3,88444644 |
| Mediana | 208,68 |
| Moda | 220,12 |
| Desviación estándar | 73,91 |
| Varianza da mostra | 5462,19054 |
| Curtose | 1,32011098 |
| Coeficiente de asimetría | 0,38454562 |
| Rango | 517,33 |
| Mínimo | 30,76 |
| Máximo | 548,10 |
| Suma | 72944,2879 |
| Conta | 362 |
| Nivel de confianza (95,0%) | 7,63898567 |

O gráfico 2 amosa a distribución de pesos, de todos os individuos recollidos nas cinco zonas, pódese comprobar que non se encontraron individuos de pequeno peso, ben porque sexan difíciles de detectar con este sistema de mostraxe ou ben porque realmente non estaban presentes nas zonas no momento da mostraxe, este punto está aínda por determinar.




Densidades en cada zona

Na Táboa III preséntanse os resultados para as catro zonas de mostraxe, só existen datos de densidades (individuos/m2 ; biomasa g/m2). A avaliación do stock poderase realizar cando dispoñamos dunha delimitación ao detalle dos distintos bancos.

Tampouco se fai unha clasificación en individuos comerciais porque aínda non existe un tamaño mínimo (ou peso) permitido.

En calquera caso, a gran maioría dos individuos das mostras foron adultos de peso axeitado para extracción comercial.

En principio, a densidade media para as zonas de Castro, Melide e Fornos parece baixa, pero habería que comprobar que, si debido a unha distribución en agregados, existen zonas de alta densidade nestes bancos, de feito nos bancos que atopamos altas densidades non foi de forma homoxénea, se non que foi en zonas concretas.

**Táboa III.- Densidade (individuos e biomasa) nos diferentes bancos**

| | Individuos/m² | Lim +/- t(0,05EE) | g/m² | Lim +/- t(0,05EE) |
|---|---|---|---|---|
| **Castro** | 0,06 | 0,07 | 13,7 | 16,1 |
| | | 0,05 | | 11,3 |
| **Melide** | 0,06 | 0,1 | 10,8 | 18,1 |
| | | 0,01 | | 3,5 |
| **Cantareira** | 0,425 | 0,63 | 80,63 | 129 |
| | | 0,22 | | 32 |
| **Freu da Porta** | 0,198 | 0,37 | 41,66 | 81 |
| | | 0,02 | | 2 |
| **Fornos** | 0,060 | 0,12 | 8,25 | 17 |
| | | 0 | | 0 |
| **Total** | 0,159 | 0,20 | 31 | 40,5 |
| | | 0,12 | | 21,6 |

| **Título da Acción de investigación – Acrónimo – Código CIMA** | |
|---|---|
| **Estudo da variabilidade espacial e do ciclo reprodutivo da navalla na Ría de Vigo e a súa aplicación á xestión pesqueira.** NAVALLA - CIMA 17/04. | |
| **Investigador/a Principal** | |
| Fernando Manuel Febrero Mayor | |
| **Outros/as investigadores/as participantes** | |
| CIMA: Pedro Cuiñas Olmedo | X.T. Vigo: Luís Manuel Rodríguez González, Rosa Ana Iglesias Nuñez, Ana Riveiro Cruz.<br>Universidade de Vigo – ECIMAT: Alba Hernández Otero, Tania Ballesteros Otero, Ana Tubío Otero.<br>Universidade de Vigo – AtlanTIC: Javier González Castaño<br>Confraría de Vigo (asistencia técnica) |
| **Técnicos/as** | **Bolseiros/as** |
| **Entidade que financia**: Consellería do Mar - Xunta de Galicia | |
| **Data de inicio**: Novembro de 2017 | **Data de finalización**: Agosto de 2020 |


## RESUMO

A Acción de investigación vai estudar a variabilidade do ciclo reprodutivo, tamaño de primeira posta e crecemento da navalla (*Ensis magnus* Schumacher, 1817) na ría de Vigo, desde os bancos máis interiores (Rande) ata os máis exteriores (Illas Cíes), así como o desenvolvemento da ferramenta que se emprega na ría de Pontevedra e a súa aplicación por parte das asistencias técnicas e os biólogos de zona para axudar á pesqueira. Coñecer e reducir os períodos de peche e os descartes de exemplares que se producen unha vez realizada a posta pola perda do pé ao realizar a extracción (capamento) e a súa variabilidade anual.

Estudo da estrutura de tamaños e biomasa de tres – catro bancos principais de navalla na ría de Vigo desde o seu interior ao exterior (Cabanas, Costal, Domaio, Tirán e Cabo de Mar), con mostraxes cada ano e a súa implantación noutros bancos con posterioridade. Estudo das biometrías da navalla dos diferentes bancos.

Desenvolvemento dunha plataforma para a visualización do estado do recurso dos distintos bancos que inclúa un servidor de base de datos accesible remotamente, un servidor de proceso e paxinas web de entrada/saída para mariscadores, asistencias técnicas e biólogos de zona, para Android e ordenadores de sobremesa.


## RESULTADOS OBTIDOS

**Banco de Cabanas** (192.718 m$^2$; Fonte: ww3.intecmar.gal/Sigremar/)

| | Navalla | | lim.conf.95% |
|---|---|---|---|
| **Dens. (Ind./m²)** | **media** | **L2** | **L1** |
| non comercial | 1.33 | 1.64 | 1.09 |
| comercial | 4.67 | 5.90 | 3.69 |
| Total | **6.00** | 11.29 | 3.19 |
| **Biomasa** | | | |
| **kg comercial** | **11.985.85** | 92.552.84 | 1.552.20 |
| g/m² totais | **141.08** | 323.98 | 61.43 |
| **tamaño - peso** | Data | Banco | Estrato |
| Navalla | 15/10/2018 | **Cabanas** | Ría de Vigo |
| Submareal | Coeficientes: | -4.53496443 | 2.85260543 |

**Táboa I.** Densidade (Ind/m$^2$), biomasa (g/m$^2$) e kg comercial mediante o programa Arousa.

| *Tamaño (mm)* | | *Peso (g)* | |
|---|---|---|---|
| **Media** | **113.88** | **Media** | **22.77** |
| Error típico | 5.62 | Error típico | 2.60 |
| Mediana | 117.14 | Mediana | 22.82 |
| Moda | | Moda | |
| **Desviación estándar** | **23.86** | **Desviación estándar** | **11.03** |
| Varianza da mostra | 569.1619938 | Varianza da mostra | 121.732339 |
| Curtose | 0.957908947 | Curtose | -0.56671651 |
| Coeficiente de asimetría | -0.909056771 | Coeficiente de asimetría | 0.058862521 |
| **Mínimo** | **56.68** | **Mínimo** | **3.23** |
| **Máximo** | **148.93** | **Máximo** | **41.21** |
| Nivel de confianza (95.0%) | 11.86386478 | Nivel de confianza (95.0%) | 5.486700138 |

**Táboa II.** Estatística descritiva do banco de Cabanas.

A navalla atopada neste banco ten unha alta porcentaxe de tamaño legal cun 77,8%. O tamaño menor foi de 56,68 mm cun peso de 3,23 g.

**Banco de Costal Domaio** (74.496 m$^2$; Fonte: ww3.intecmar.gal/Sigremar/)

| | Navalla | | lim.conf.95% |
|---|---|---|---|
| **Dens. (Ind./m²)** | **media** | **L2** | **L1** |
| non comercial | 0.00 | | |
| comercial | 5.33 | 17.95 | 1.58 |
| Total | **5.33** | 17.95 | 1.58 |
| **Biomasa** | | | |
| **kg comercial** | **12,377.49** | 32,727.69 | 4,681.12 |
| g/m² totais | **166.15** | 439.32 | 62.84 |
| **Tamaño - peso** | Data | Banco | Estrato |
| Navalla | 15/10/2018 | **Costal Domaio** | Ría de Vigo |
| Submareal | Coeficientes: | -4.53496443 | 2.85260543 |

**Táboa III.** Densidade (Ind/m$^2$), biomasa (g/m$^2$) e kg comercial mediante o programa Arousa.

| tamaño (mm) | | Peso (g) | |
|---|---|---|---|
| **Media** | **129.52** | **Media** | **32.93** |
| Error típico | 2.7245232 | Error típico | 2.010065809 |
| Mediana | 129.24 | Mediana | 32.73 |
| Moda | #N/A | Moda | #N/A |
| **Desviación estándar** | **10.90** | **Desviación estándar** | **8.04** |
| Varianza da mostra | 118.7684267 | Varianza da mostra | 64.64583292 |
| Curtose | 0.37060938 | Curtose | 0.968630648 |
| Coeficiente de asimetría | -0.077822303 | Coeficiente de asimetría | 0.276907759 |
| **Mínimo** | **107.39** | **Mínimo** | **16.63** |
| **Máximo** | **149.32** | **Máximo** | **50.27** |
| Nivel de confianza (95.0%) | 5.807183736 | Nivel de confianza (95.0%) | 4.284353856 |

**Táboa IV.** Estatística descritiva do banco de Costal Domaio

Os tamaños, neste banco, foron sempre exemplares de tamaño legal (<100 mm). O tamaño mínimo foi de 107,39 mm cun peso de 16,63 g.

**Banco de Cabo de Mar** (817.219 m$^2$; Fonte: ww3.intecmar.gal/Sigremar/). Mergullo

| | Navalla | | lim.conf.95% |
|---|---|---|---|
| **Dens. (Ind./m²)** | **media** | **L2** | **L1** |
| non comercial | 0.31 | 1.09 | 0.09 |
| comercial | 2.77 | 6.33 | 1.21 |
| Total | **3.08** | 6.58 | 1.44 |
| **Biomasa** | | | |
| **kg comercial** | **65,483.93** | 122,341.77 | 35,050.55 |
| g/m² totais | **83.78** | 158.32 | 44.33 |
| **tamaño - peso** | Data | Banco | Estrato |
| Navalla | 15/10/2018 | **Cabo de Mar** | Ría de Vigo |
| Submareal | Coeficientes: | -4.53496443 | 2.85260543 |

**Táboa V.** Densidade (Ind/m$^2$), biomasa (g/m$^2$) e kg comercial mediante o programa Arousa

| Tamaño (mm) | | Peso (g) | |
|---|---|---|---|
| **Media** | **121.51** | **Media** | **26.94** |
| Error típico | 3.891673259 | Error típico | 2.69217 |
| Mediana | 123.58 | Mediana | 25.89681 |
| Moda | | Moda | |
| **Desviación estándar** | **17.40** | **Desviación estándar** | **12.04** |
| Varianza da mostra | 302.9024151 | Varianza da mostra | 144.9555 |
| Curtose | -0.353025247 | Curtose | 2.240408 |
| Coeficiente de asimetría | -0.093941348 | Coeficiente de asimetría | 1.058835 |
| **Mínimo** | **90.34** | **Mínimo** | **10.83** |
| **Máximo** | **157.93** | **Máximo** | **61.60** |
| Nivel de confianza (95.0%) | 8.145365743 | Nivel de confianza (95.0%) | 5.634776 |

**Táboa VI.** Estatística descritiva do banco de Cabo de Mar

**Banco de Tirán** (160.063 m$^2$; Fonte: ww3.intecmar.gal/Sigremar/)

| | Navalla | | lim.conf.95% |
|---|---|---|---|
| **Dens. (Ind./m²)** | **media** | **L2** | **L1** |
| non comercial | 0.50 | 0.94 | 0.26 |
| comercial | 2.50 | 3.02 | 2.07 |
| Total | **3.00** | 3.22 | 2.79 |
| **Biomasa** | | | |
| **kg comercial** | **12,313.24** | 61,582.31 | 2,462.00 |
| g/m2 totais | **82.90** | 429.97 | 15.98 |
| tamaño - peso | Data | Banco | Estrato |
| Navalla | 15/10/2018 | **Tirán** | Ría de Vigo |
| Submareal | Coeficientes: | -4.53496443 | 2.85260543 |

**Táboa VII.** Densidade (Ind/m²), biomasa (g/m²) e kg comercial mediante o programa Arousa

| **Tamaño** | | **Peso** | |
|---|---|---|---|
| **Media** | **122.91** | **Media** | **29.15** |
| Error típico | 4.804461205 | Error típico | 2.935073036 |
| Mediana | 123.945 | Mediana | 31.565 |
| Moda | | Moda | |
| **Desviación estándar** | **16.64** | **Desviación estándar** | **10.17** |
| Varianza da mostra | 276.9941697 | Varianza da mostra | 103.3758447 |
| Curtose | 0.539981548 | Curtose | -0.460925144 |
| Coeficiente de asimetría | -0.88468037 | Coeficiente de asimetría | -0.769886996 |
| Rango | 56.97 | Rango | 29.29 |
| **Mínimo** | **88.28** | **Mínimo** | **11.40** |
| **Máximo** | **145.25** | **Máximo** | **40.69** |
| Nivel de confianza (95.0%) | 10.57454782 | Nivel de confianza (95.0%) | 6.460052195 |

**Táboa VIII.** Estatística descritiva do banco de Tirán

A porcentaxe de ilegais é moi baixa, 16,67 %. O tamaño mínimo foi de 88,28 mm cun peso de 11,40 g.

Os tamaños medios de todos os bancos superan a legal. O banco que ten máis individuos/m$^2$ é o de Cabanas con 6 ind/m$^2$, mentres que é o banco de Costal Domaio o que ten unha biomasa maior por m$^2$, 166,15 g/m$^2$, polo maior tamaño atopado. O banco que en teoría ten maior biomasa comercial en total é o de Cabo de Mar con 65.483,93 Kg, debido a súa grande extensión (programa Arousa®).

Realizouse unha análise da varianza, empregando o programa estatístico Minitab 17®, para ver se existe unha diferencia entre os medios dos tamaños das mostraxes de cada banco. Os resultados amosan que non existe diferencia significativa entre os medios dos tamaños ao 5% (0,104>0,05), polo que non se realizou a proba de medias (Táboa IX).

Táboa IX. Análise de varianza de medias de tamaños de todos os bancos

Análise de Varianza

| Orixe variacións | Grados liberdade | Suma cadrados | Promedio cadrados | F | Probabilidade |
|---|---|---|---|---|---|
| Factor | 3 | 2096 | 698.7 | 2.14 | **0.104** |
| Error | 62 | 20259 | 326.8 | | |
| Total | 65 | 22355 | | | |

| Título da Acción de investigación – Acrónimo – Código CIMA | |
|---|---|
| **Seguimento científico-técnico da explotación nos bancos de libre marisqueo do litoral de Galicia. Estratexia mariña integrada**. BLM – EMI. CIMA 18/02 | |
| **Investigador/a Principal** | |
| Carlos Gabín Sánchez | |
| **Outros/as investigadores/as participantes** | |
| CIMA: Ana Alonso Martínez; David Iglesias Estepa | X.T. A Coruña: Beatriz Asorey Torres; Diana Fernández Márquez; Susana Fandiño Silva<br>X- T. Vigo: Jesús Fernández Barreiro; Carmen Morales de la Fuente; Diana María Pastoriza Durán; Luís Manuel Rodríguez González, Rosa Iglesias Núñez; |
| **Técnicos/as** | **Bolseiros/as** |
| X. T. Vigo: Iria Santamaría Bua | Alba Ameal Romero |
| **Entidade que financia**: Consellería do Mar - Xunta de Galicia | |
| **Data de inicio**: Xuño de 2018 | **Data de finalización**: Decembro de 2020 |


**RESUMO**

Esta Acción de investigación pretende servir de base para ampliar o conxunto de datos obtidos ao longo de máis dunha década co sistema de seguimento científico-técnico implantado polos investigadores do departamento de Recursos Mariños do CIMA.

O **primeiro obxectivo** desta Acción é unha análise en profundidade cunha perspectiva histórica do conxunto de datos obtidos dende o inicio do seguimento e así poder adquirir un mellor coñecemento da bioloxía, ecoloxía e dinámica das poboacións das especies obxecto da explotación marisqueira en cada área, para poder estimar a dispoñibilidade do recurso extraíble ao comezo das campañas de produción.

Para a análise da explotación ó longo do tempo e do seu estado actual, utilizaremos os modelos clásicos de segmento de pesqueiras, así como os últimos aportes científicos efectuados neste campo.

O **segundo obxectivo**, relacionado coa Directiva Marco da Estratexia Mariña, é actualizar o SIX (Sistema de Información Xeográfica), empregado por distintos departamentos da Consellería do Mar con novas capas de información relacionadas coa diversidade de especies que forman parte dos bancos de libre marisqueo, así como os indicadores do estado do hábitat.

Con esta Acción preténdese dar cabida e axuda orzamentaria a aquelas actividades do grupo de traballo implicado que supoñan apoio, formación e asesoramento ao persoal técnico das entidades e da administración involucrados na xestión da explotación marisqueira en Galicia.


**Seguimento da explotación dos bancos de libre marisqueo da ría de Arousa**

Durante o 2018 no ámbito desta Acción encadráronse tódalas actividades relacionadas co seguimento científico técnico da explotación dos bancos marisqueiros a flote de Lombos do Ulla, O Bohído e Cabío, iniciadas no ano 2002, 2006 e 2009, respectivamente. Os resultados destes seguimentos son empregados como base para o asesoramento dos órganos da Consellería do Mar e as confrarías de pescadores implicadas na xestión da explotación dos bancos.

En cada banco (Fig.1), antes do inicio da campaña (de outubro a marzo) e despois do seu remate, realízanse mostraxes cuantitativas nas que se empregan dragas de inserción vertical manexadas dende a embarcación. Faise un primeiro cribado a bordo con auga a presión nunha peneira metálica con luz de malla de 5 mm e, posteriormente, mídense as especies comerciais no CIMA coa axuda dun calibre dixital.

No mes de setembro, realizáronse un total de 204 mostras no banco de Lombos, 124 mostras en Cabío e 78 mostras en O Bohído.

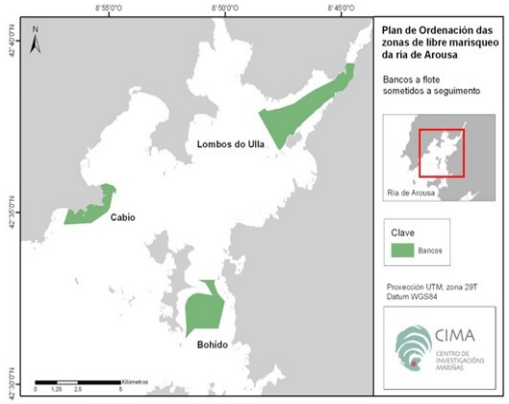



**Fig. 1**. A: Mapa da situación dos tres bancos de Libre Marisqueo: Lombos do Ulla, Cabío e Bohído

Con estas prospeccións obtéñense, entre outros datos, as estimas de biomasa comercial e non comercial, as densidades, os mapas de distribución espacial destas variables ou a estrutura de tamaños das poboacións das diferentes especies de interese comercial, fundamentalmente: berberecho (*Cerastoderma edule*),

ameixa fina (*Ruditapes decussatus*), ameixa xaponesa (*Ruditapes philippinarum*) ameixa babosa (*Venerupis corrugata*) ameixa rubia (*Polititapes rhomboides*), ameixa bicuda (*Paphia aurea*), reló (*Dosinia exoleta*) e a distribución espacial mediante cartografía dixital.

Resultados gráficos de biomasa e densidade comercial estimada médiante cartografía dixital.

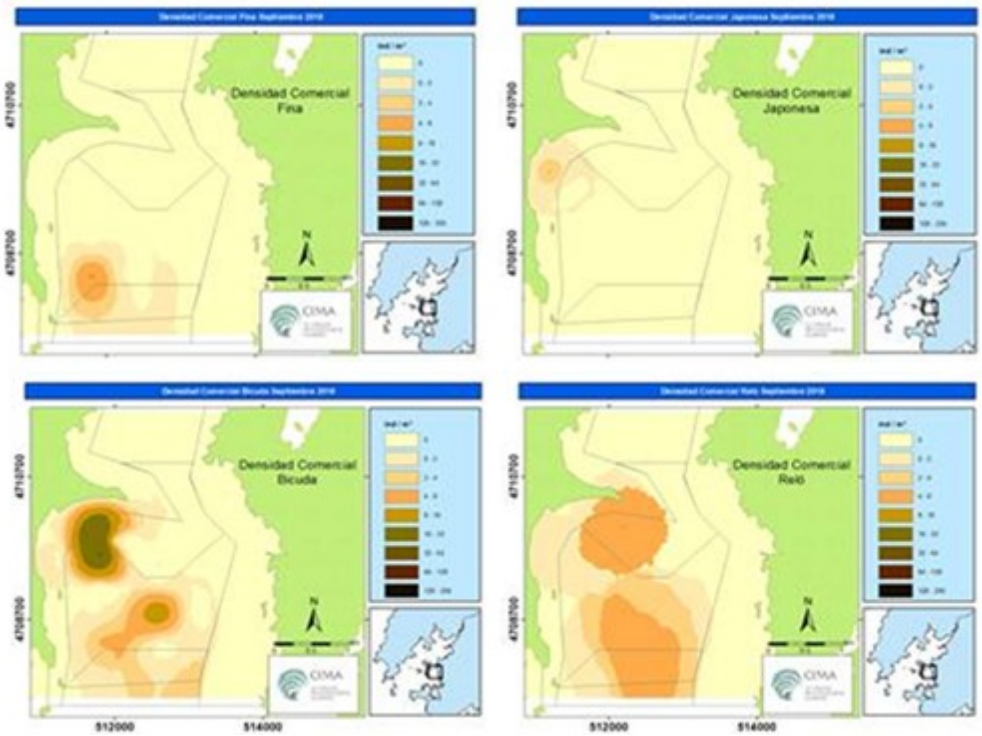



**Fig. 1. B**: Cartografía dixital onde se mostran as densidades comerciais das distintas especies de bivalvos do Lombos do Ulla.

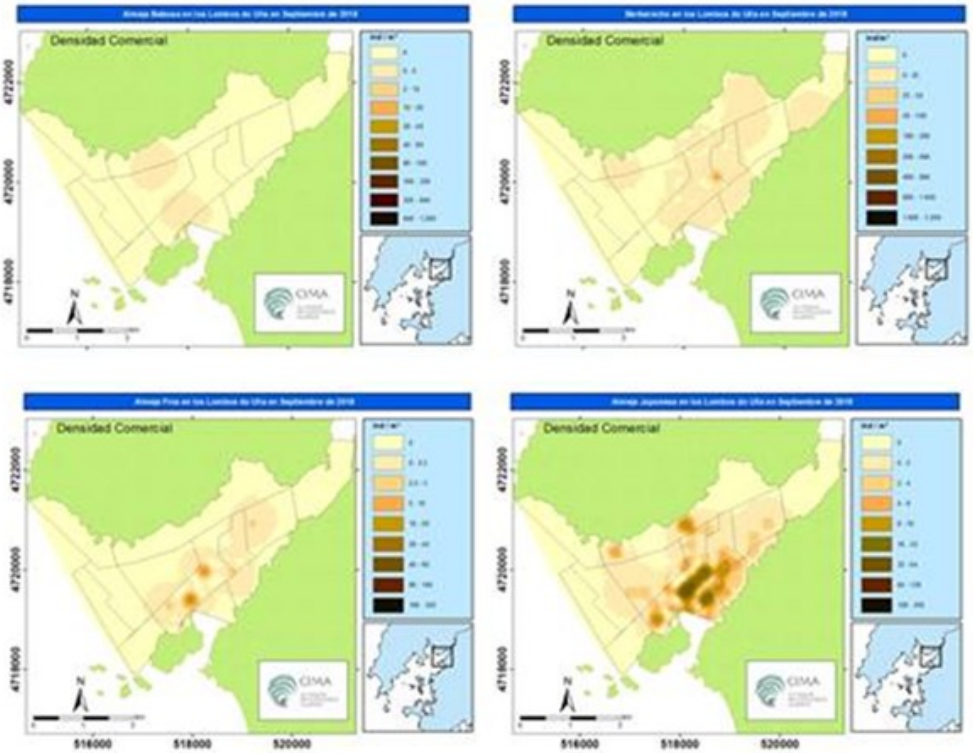



**Fig. 2. A**: Cartografía dixital onde se mostran as densidades comerciais das distintas especies de bivalvos no banco de O Bohído

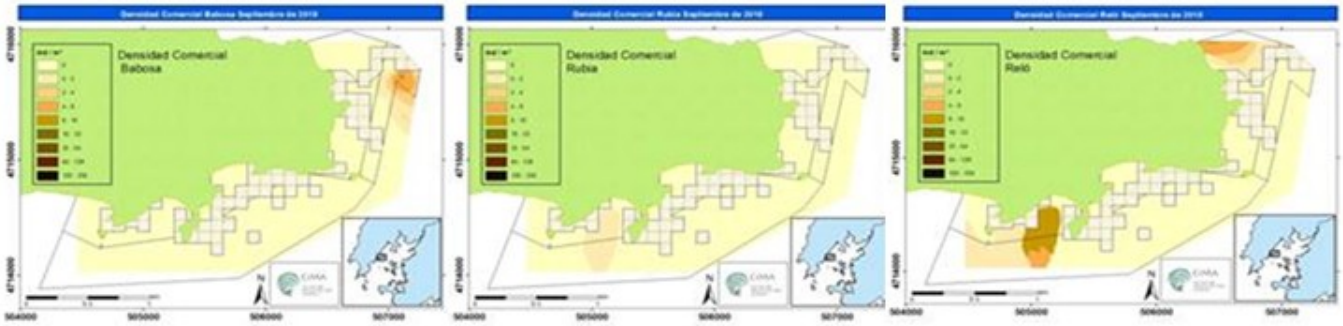



**Fig. 2. B**: Cartografía dixital onde se mostran as densidades comerciais das distintas especies de bivalvos no banco de Cabío.

**Biomasa comercial estimada (t)**

| BANCO | Ameixa babosa | | Ameixa fina | | Ameixa xaponesa (>35mm) | | Berberecho | | Reló (30 – 35mm) | | Ameixa rubia | | Ameixa bicuda | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Mes mostraxe* | *Abr.* | *Set.* | *Abr.* | *Set* | *Abr.* | *Set.* | *Abr.* | *Set.* | *Abr.* | *Set.* | *Abr.* | *Set.* | *Abr.* | *Set.* |
| LOMBOS DO ULLA | 16 | 2 | 20 | 33 | 67 | 204 | 28 | 59 | - | - | - | - | - | - |
| CABÍO | - | 6 | - | - | - | - | - | - | 39 | 118 | 23 | 22 | - | - |
| O BOHÍDO | 9 | 6 | - | - | - | - | - | - | 375 | 130 | - | - | 184 | 63 |
| *TOTAIS* | 25 | 14 | 20 | 92 | 91 | 204 | 32 | 59 | 414 | 248 | 23 | 22 | 199 | 63 |

**Táboa I**. Biomasa comercial estimada nas mostraxes de abril (esquerda) e setembro (dereita) de 2018. Abr. = abril; Set. = setembro

## Descritores da Directiva Marco

Neste segundo obxectivo inclúense o emprego dos descritores e indicadores definidos pola Directiva Marco sobre a Estratexia Mariña, como criterios para definir o bo estado medioambiental. A Directiva Marco establece un total de 11 descritores do estado ambiental das augas mariñas, así como os indicadores que se deberán utilizar para avaliar a consecución do bo estado medioambiental dos tres bancos de Libre Marisqueo. Nos tres bancos de Lombos, Cabío e Bohído realízanse mostraxes para recoller información sobre os descritores 1 (biodiversidade), 2 (especies alóctonas), 3 (poboacións explotadas,) 6 (integridade do solo mariño) e 10 (lixo mariño). Para a descrición do medio mariño e a súa calidade utilizamos os formularios estándar de recollida de datos que prové a aplicación ArouSa. Os datos son procesados con esta aplicación e permítenos un estudo temporal e comparado da descrición do medio mariño entre os distintos bancos de Libre Marisqueo sometidos a explotación. Estes formularios son envorcados nunha plataforma FTP para a súa introdución na base de datos SIGREMAR para o seu estudo comparado e a súa representación espacial. Ata o momento, avaliouse a biodiversidade de especies obtidas no banco de Cabío; parte dos resultados móstranse na figura 3.

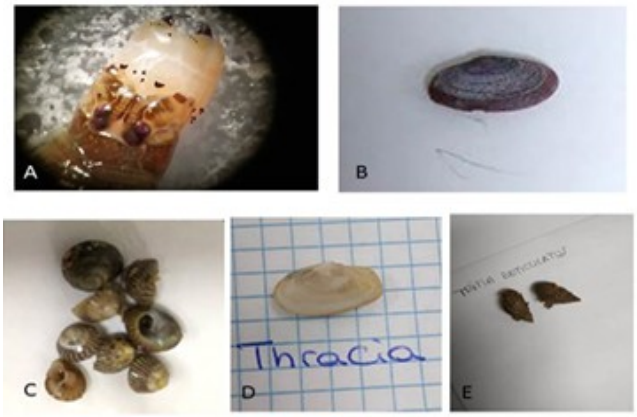



**Fig. 3**. Diversidade de especies no banco de Cabío. A: *Hediste diversicolor*. B: *Gari depressa*. C: *Gibbula* sp. D: *Thracia phaseolina* E: *Tritia reticulatus*.

**BANCOS DA RÍA DE AROUSA**

En Lombos do Ulla destaca a escasa biomasa comercial estimada de berberecho, provocada pola marteiliose. A ameixa xaponesa é a especie con máis biomasa comercial estimada, polo que aguantará a explotación nos primeiros meses. No que respecta a ameixa babosa, existe un claro descenso da biomasa comercial dende abril (16t) a setembro (2t), o cal pode deberse a unha baixada de salinidade no mes de abril e, principalmente, á mortalidade por pesca. En canto á ameixa fina, atópase unha representación de individuos de tódolos tamaños, acadando en setembro unha biomasa comercial estimada de 33t.

No banco de O Bohído, as especies de tamaño comercial máis abundantes son o reló e a ameixa bicuda, con escasa presenza de ameixa babosa. No caso de ameixa bicuda, a baixada de biomasa estimada pode deberse a factores sociais, xunto cunha posible neoplasia diseminada, enfermidade que afecta a esta especie e que manifesta unha alta mortalidade nos meses do verán, segundo o estudo realizado por Iglesias et al. (2007), presentado na XIII Conferencia Internacional da EAFP (Italia).

En Cabío, a especie de tamaño comercial máis abundante é o reló (130t), seguida pola ameixa rubia (22t) e a babosa (6t), na que se aprecia unha recuperación paulatina.

Con respecto aos indicadores e descritores da estratexia mariña, entre a biodiversidade do banco de Cabío obsérvanse especies tanto autóctonas como alóctonas, destacando a presenza de *Phymatolithon calcareum* (alga coralina ou maërl).

**BANCOS RÍA DE ARES - BETANZOS**

No mes de setembro de 2018 na ría de Ares – Betanzos procedeuse a realizar a delimitación de dous bancos de libre marisqueo; así como, a realizar unha estimación da biomasa das especies de bivalvos existentes nas áreas previamente delimitadas.

Sobre os límites brutos de cada banco foi establecida unha malla regular de puntos cunha separación de 100 m. Esta malla de puntos foi empregada para a obtención de mostras do fondo mariño  e una primeira prospección cualitativa do sedimento e da fauna cunha draga van Veen de 50 x 50 cm. En cada mostra foi rexistrada a ausencia/presencia das especies obxectivo de cada banco e a presenza doutras especies de interese comercial presentes na zona de traballo.

Os resultados foron representados nun SIX para a delimitación do banco e, de ser o caso, para a detección de subzonas homoxéneas susceptibles de ser definidas como estratos para unha futura mostraxe regular estratificada ou para unha xestión da explotación baseada na rotación de zonas.

Como resultado desta experiencia delimitouse un área no entorno de Sada cunha superficie de 90.330m$^2$ con presenza de ameixa babosa, e outra no entorno do peirao de Ares, cunha superficie de 391.381m$^2$ cuxa especie principal é a ameixa rubia.

**RESULTADOS EN BIOMASA**

No banco de Sada atopáronse principalmente ameixa babosa e ameixa rubia, secundariamente apareceron reló, carneiro e longueirón. A biomasa de ameixa babosa foi estimada nunha media de 53,85 ind/m$^2$ totais, dos que 2,85 ind/m$^2$ correspondían con exemplares de tamaño comercial.

A poboación de ameixa rubia presentou un stock estimado de 7,07 ind/m2 totais, dos que 1,01 ind/m$^2$ se correspondían con exemplares de tamaño comercial.

No que respecta ao banco de Ares foron atopadas poboacións de ameixa rubia e navalla como especies principais en termos de abundancia, e ameixa babosa e reló como secundarias. O stock da poboación de ameixa rubia foi estimado nunha densidade media total de 27,1 ind/m$^2$ dos que 3,3 ind/m$^2$ eran individuos de tamaño comercial. Na estrutura de tamaños parecían identificarse tres cohortes con tamaños modais na contorna de 12, 28 e 30 mm. A cohorte situada preto do tamaño comercial aparece ben conformada, cun amplo número de exemplares próximos ao tamaño comercial.

A navalla resultou a segunda especie en orde de importancia neste banco, cunha densidade total media de 13,66 ind/m$^2$, dos que a metade eran de tamaño comercial. A súa presenza no banco tiña unha distribución espacial cuns límites semellantes aos da ameixa rubia.

A ameixa babosa apareceu unicamente representadas por exemplares xuvenís, con tamaños entre 8 e 16,9 mm.

| Título da Acción de investigación – Acrónimo – Código CIMA | |
|---|---|
| **Determinación das causas da diminución dos bancos de cadelucha. Condicionantes naturais e antropoxénicos**. CADELUCHA. CIMA 16/06 | |
| **Investigador/a Principal** | |
| Dorotea Martínez Patiño | |
| **Outros/as investigadores/as participantes** | |
| CIMA: Susana Nóvoa Vázquez; Justa Ojea Martínez; Jaime Montes Pérez | UVIGO: Miguel Angel Nombela Castaño; Irene Alejo Flores; Paula Diz Ferreiro; María Jesús Álvarez; Tania Tato<br>Ricardo Beiras García-Sabell; Sergio González Fernández;<br>CSIC: Xosé Antón Álvarez Salgado; Jaime Otero Villar<br>X.T. da Consellería do Mar: Carlos Brezmes Comesaña; Ignacio Mª Liñán Gil; Olga Teijeiro Golpe; Daniel Cerdeira Arias; José Luís Catoira Gómez; Fernando Febrero Mayor; Luis Manuel Rodríguez González<br>USC: Juan Luís Barja Pérez; Susana Prado Plana; José Gabriel Olveira Hermida<br>UDC: Josefina Méndez Felpeto; Ana Insua Pombo; Ana Nantón Varela; Yenifer Fernández Pérez |
| **Técnicos/as** | **Bolseiros/as** |
| Victoria Bouzamayor Yáñez.; Mª Josefa Cotarelo Jardón; Francisco Javier Páez Pérez.; Beatriz Rodríguez Álvarez; Mercedes Ruíz Misioné María José Brianes Beiras, Elena Penas Pampín, Patricia Margarita Rúa Santervas, Isabel Meléndez Ramos | |
| **Entidade que financia**: Consellería do Mar - Xunta de Galicia | |
| **Data de inicio**: Xuño de 2016 | **Data de finalización**: Decembro de 2018 |


**RESUMO**

Esta Acción foi a continuación dos estudos que realizamos diversos equipos de investigación que, co obxectivo principal de recuperación da cadelucha ou coquina (*Donax trunculus* Linnaeus, 1758) nos bancos naturais de Galicia, unimos as nosas investigacións nunha Acción que rematou no ano 2015.

Nestas investigacións centrámonos sobre todo, nos estudos comparativos dos tres bancos mais produtivos historicamente: O Lombo das Navallas (na ría do Barqueiro), a Praia de Vilarrube (na ría de Cedeira) e na Praia América (na ría de Vigo). Ademais avaliamos puntualmente outros bancos onde a presenza desta especie foi palpable como: as praias de Vilela, Abrela, Area e Altar (no Cantábrico, provincia de Lugo); as praias dos Cabalos, Bastiagueiro, Carnota e Estorbe (na provincia da Coruña) e a praia da Lanzada (na provincia de Pontevedra).

Os aspectos que se abordaron nestes estudos foron os medios ambientais que podían influír nas poboacións como son: análises dos tipos de sedimentos; controis topográficos con niveis ópticos estudando os cambios morfodinámicos dos bancos; avaliacións ecotoxicolóxicas dos sedimentos; análises das augas tanto continentais como marítimas e as poboacións en si; avaliacións da densidade e tamaños; patoloxías, aspectos xenéticos e análises reprodutivas.

Dos resultados obtidos a conclusión máis salientable é que o banco de Vilarrube era o único que continuaba sendo explotable. Tódolos datos apuntaban cara unha diminución da poboación de cadelucha en todas as praias e esta diminución estaba causada pola escaseza, de individuos adultos de tamaño maior a 28 mm, e en Vilarrube, concretamente, comezaban a escasear os individuos de tamaño comercial (>35 mm).

Pero deste problema de perda de poboación non se puideron identificar como causas, as orixinadas pola contaminación química nos sedimentos nin da auga; a redución da diversidade xenética e as mortalidades por patoloxías. Tampouco o tamaño do gran de sedimento e o seu grado de selección, eran factores determinantes.

O que si se atopou foi a presenza dunha importante fonte de contaminación derivada do emisario da EDAR de Nigrán e que podería estar afectando a zona submareal de Praia América. Tamén se atoparon nos resultados das análises de sedimentos que, amosaban diferenzas significativas na composición de texturas entre os actuais bancos non produtivos respecto ó produtivo (Vilarrube). E por último, detectouse a presenza de polo menos dúas especies de Donax (*Donax trunculus* na zona intermareal e *Donax vittatus*, na zona sublitoral) nas praias de Corrubedo, A Lanzada e Praia América.

Analizando tódolos resultados obtidos nestas primeiras investigacións, precisábase dunha nova Acción para poder chegar e para poder extraer conclusións definitivas e firmes. Os traballos desenvolvidos ó longo desta nova Acción estiveron directamente relacionados cos seus obxectivos.

Controlouse de forma temporal a variación das texturas do sedimento en cada unha das estacións de mostraxe de poboacións e caracterizouse e controlouse a variabilidade tamén temporal dos cambios na topografía intermareal do banco de Vilarrube.

Estudouse a variabilidade interanual ó longo do tempo na densidade e estrutura de tamaños poboacionais, así como na produtividade dos bancos de cadelucha de Praia América, Lombo das Navallas e Vilarrube en función dos cambios meteorolóxicos que afectan as súas condicións hidrográficas.

Fixéronse estudos poboacionais avaliando as densidades nos bancos estudados e determináronse relacións dos sedimentos con ditas densidades e tamaños das poboacións.

Afondouse nos estudos da fecundidade da cadelucha determinando o seu tamaño de madurez sexual.

Transferíronse os coñecementos de cultivo desta especie desde o criadeiro de Ribadeo cara ás instalacións do minicriadeiro do Vicedo co fin de producir unha cantidade suficiente de semente para facer os primeiros ensaios piloto de posta a punto de futuras repoboacións.

Estudouse a situación actual das patoloxías que afectan as poboacións de cadelucha mediante análises histolóxicas avaliando a prevalencia e intensidade dos parasitos atopados e por último continuouse co estudo da presenza/ausencia de herpesvirus nos bancos de cadelucha.

## RESULTADOS

### Sedimentos intermareais do banco de Vilarrube

Os resultados promedio mostran que os sedimentos non varían nin estacional nin anualmente dun xeito significativo tendo en conta unicamente a variabilidade do tamaño dos sedimentos. Mantense o tamaño do grao e as características da súa distribución granulométrica.

As únicas diferenzas detectadas, é un lixeiro aumento do tamaño medio en decembro de 2016 cun predominio da moda de 215 micras e a lixeira diminución do tamaño medio en marzo de 2018.

Os contidos en materia orgánica e carbonatos tampouco presentan grandes variacións salvo en setembro de 2016 e marzo de 2018, mostraxes nos que si se observan diferenzas significativas.

Podemos concluír que non hai aportes de sedimentos nin dende o mar nin dende os ríos, tratándose duns sedimentos relictos que son retraballados polo oleaxe acumulando os mais finos cara á zona algo máis protexida do oleaxe dominante.

A priori, non parece que o tamaño dos sedimentos explique as variacións na produtividade deste banco. Non obstante hai que facer a análise completa co resto de parámetros obtidos en cada mostraxe.

### Topografía intermareal do banco de Vilarrube

Os datos mostrexados indican que o banco de Vilarrube é unha zona moi dinámica, onde existe gran variabilidade de barras areosas, canles de desaugadoiro e estruturas sedimentarias. Estas variacións condicionan o grao de compactación do sedimento, mobilidade e grao de encharcamento.

Rexistráronse importantes variacións en altura topográfica de cada punto da mostraxe, en relación á situación que ocupan en cada período da mostraxe.

O seguinte paso é cruzar estes resultados cos datos de compactación e capturas para avaliar se é posible obter un patrón.

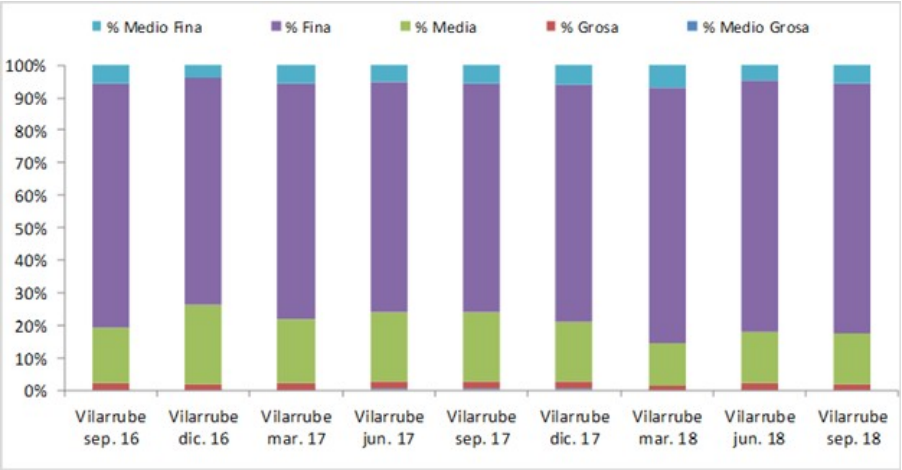



**Figura 1**. Composición en porcentaxes medias dos tipos de area (Medio Grosa, Grosa, Media, Fina e Medio Fina) dos sedimentos obtidos en tódalas estacións da mostraxe ó longo do estudo realizado (dende setembro do 2016 ata setembro do 2018

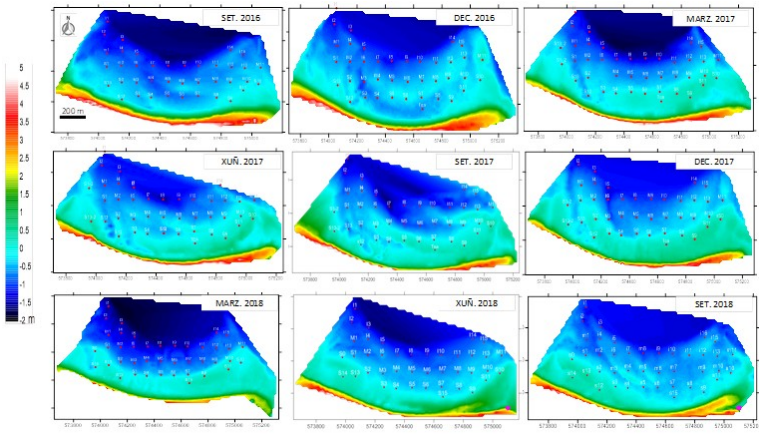



**Figura 2**. Comparación da topografía da praia de Vilarrube durante as mostraxes realizadas ó longo do estudo (setembro de 2016 a decembro de 2018). Inclúense as estación da mostraxe e obsérvanse a presenza das barras areosas (tons azuis claro) e os canais de desaugado (tonos azuis escuros).

**Figura 3**. Erosión e retroceso da fronte dunar continuado dende decembro de 2016 ata decembro de 2017

**Influencia das condicións hidrolóxicas e meteorolóxicas**

Os datos recompilados ata o momento amosan moita variabilidade na distribución de tamaños coas mostraxes onde conviven dúas cohortes e outros casos nos que a distribución é unimodal con presenza maioritaria de exemplares de tamaño medio.

As relacións alométricas (principalmente a relación tamaño-peso) parece que varían entre mostraxes pode indicar diferenzas no crecemento, dependendo do momento do ano.

A distribución espacial da densidade na praia variou sensiblemente entre mostraxes, aínda que parece que hai unha maior abundancia nos extremos da praia (principalmente na parte do oeste) e menor na zona central.

A abundancia media baixou dende setembro de 2013 a setembro de 2016 para volver a acadar os valores iniciais nas últimas mostraxes.

Así mesmo o tamaño tamén variou espacial e temporalmente con individuos máis pequenos nos extremos e maiores no centro aínda que se atopou moita variabilidade máis aló deste patrón xeral.

A abundancia en Vilarrube parece que ten relación coa xeomorfoloxía da praia, mentres que o tamaño parece que no ten moita relación con esas variables.

Finalmente, as condicións oceanográficas nas Rías Altas difiren das Rías Centrais e Baixas e parece co afloramento conxuntamente coa descarga dos ríos poden definir as capturas por unidade de esforzo tanto na zona de Vilarrube como no Barqueiro.

**Estudos poboacionais**

**VILARRUBE**

Os resultados da última mostraxe (24/01/2019), en comparación cos tres anteriores, amosan unha relativa melloría xeral do banco no ano 2018, que en caso de proseguir nesa tendencia indicaría a progresiva recuperación do banco.

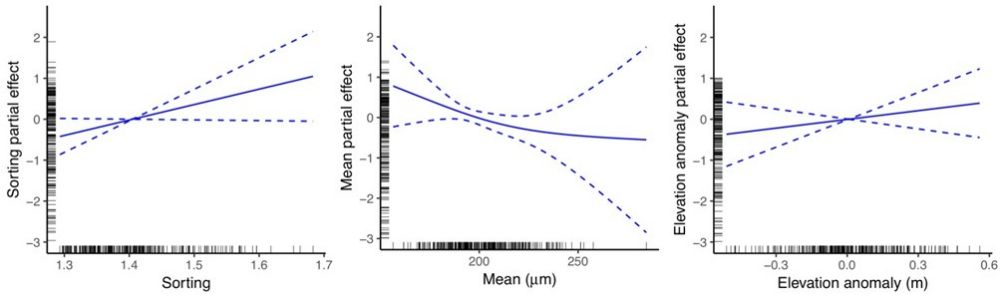



**Figura 4**. Efectos parciais obtidos de axustar un modelo aditivo xeneralizado (GAM, asumindo unha distribución negativa binomial e usando o tamaño da calicata como "offset") ó número de individuos (indiv. m-2) en función da xeomorfoloxía da praia e o mes da mostraxe

O principal problema atópase no stock comercial, existindo un recrutamento de xuvenís axeitado. O stock comercial atopado diminuíu nesta mostraxe respecto á anterior (29/09/2018) en 84 kg, sendo as capturas efectuadas nese período entre ambas mostraxes de 114 kg. As maiores densidades de cadelucha atopadas na mostraxe submareal están nos puntos de menor profundidade, e próximas á zona intermareal.

Na mostraxe submareal realizada non se atoparon exemplares de *D. Vittatus.*

**ZONA NORTE**

Os resultados das mostraxes efectuadas nos distintos bancos naturais situados nas praias galegas amosan unhas poboacións de cadelucha cunhas densidades baixas e carentes de adultos. Nos atopamos ante un mal estado xeral das poboacións de cadelucha en tódolos bancos galegos.

Estas poboacións atópanse nun estado de supervivencia, onde os recrutamentos existentes e continuados só poden vir a partir das desovas de individuos maduros, nestes casos, os individuos maiores de 12 mm. Todo parece indicar que, na maioría dos areais, unha vez realizadas as primeiras desovas os individuos desaparecen.

No Lombo das Navallas, atopamos un ciclo estacional anual marcado polo tamaño medio, con mínimos no verán, coincidentes coa época de recrutamento, e máximos no inverno. Atopamos tamén un punto de inflexión no ano 2010 no que se agudiza a carencia total de adultos, baixando a lonxitude media dos individuos. Este feito se presenta tamén, aínda que dun xeito máis solapado, en outras praias (Abrela e Vilela).

A constante nas relacións lonxitude–peso indica que estamos ante as mesmas poboacións ao longo do tempo.

Os datos da compactación amosan unhas praias moi dinámicas aínda que constantes na súa dureza, e que recuperan a baixada da mesma tralos temporais do inverno.

**ZONA MEDIA**

Polo de agora, dada a escasa poboación rexistrada na praia de Bastiagueiro, é innecesario seguir co seu control e cas mostraxes.

Segundo as experiencias de cultivo de cadelucha pódese concluír que a supervivencia da semente é maior nos individuos que inician o preengorde con maior tamaño. A partir de tamaños de 20 mm, relentízase o crecemento e existen maiores taxas de mortalidade.

**ZONA SUR**

A poboación de cadelucha do banco de praia América-Panxón atópase nun estado de supervivencia, onde observamos 2 períodos de recrutamento non continuados (separados 3 anos: 2014, 2017). Ata o momento, todo parece indicar que, unha vez realizadas as desovas, os individuos proxenitores desaparecen.

O aumento do número de individuos comeza (nos dous períodos de recrutamento atopados) no mes de abril, e se incrementa no mes de decembro. Dende o inicio deste estudo (2013), os datos máis favorables en canto as cohortes e estrutura de tamaños son os actuais, aínda que na última mostraxe de decembro de 2018, atopamos unha baixada importante da densidade de poboación.

**Probas en criadeiro**

En xeral hai diferenzas no desenrolo gametoxénico nas clases de tamaños máis pequenos, nas inferiores a 20 mm.

Nos outros tamaños o comportamento é similar ao longo do ano.

Madurez nos meses de abril a agosto. Repouso a partir de setembro. Este ciclo coincide con outros anos.

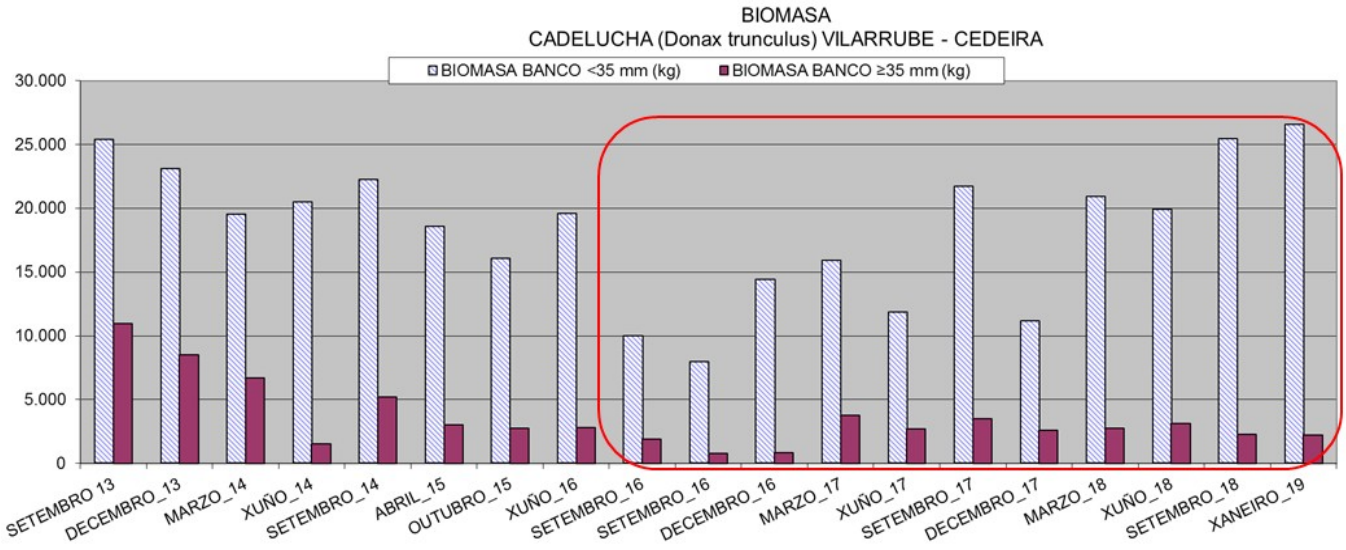



**Figura 5**. Biomasa total en kg estimada para o banco de Vilarrube (A Coruña) de individuos de cadelucha *Donax trunculus* de tamaño inferior ao comercial (< 35 mm) e de tamaño comercial (≥ 35 mm). No eixo das abscisas indícase o mes e o ano de realización das mostraxes.

Obsérvanse cadeluchas con tamaños entre 13,67-14,5 mm que xa están maduras. Cos datos que temos estudarase o tamaño de primeira maduración.

No criadeiro é posible acondicionar proxenitores de cadelucha e se conseguiron desovas dende o mes de febreiro.

Dende o ano 2017 se están a facer repoboacións de semente marcada cultivada no CIMA de Ribadeo, na praia de Abrela (Costa Cantábrica).

**Histopatoloxía**

Debemos ter en conta, aínda que os esforzos das mostraxes centrábanse en analizar os tamaños críticos a partir dos 25 mm, en moitos casos o tamaño era sensiblemente inferior por non atopar ditos tamaños, sobre todo nas mostraxes de praia América. Debido a esta situación, estivéronse analizando exemplares nas primeiras etapas de crecemento, cando as principais parasitoloxías adoitan darse en organismos adultos e non en exemplares xoves.

En todo caso, en organismos de tamaño comercial tampouco se atoparon patoloxías relevantes.

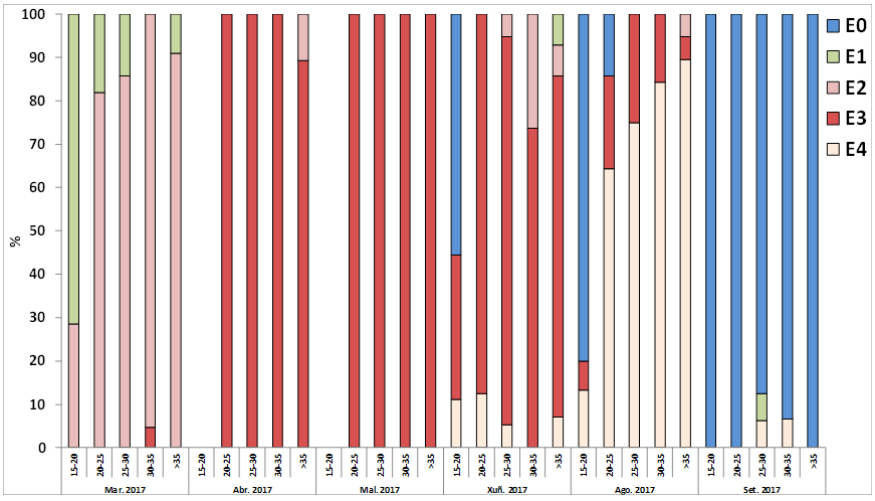



**Figura 6**. Representación das porcentaxes de individuos atopados nos diferentes estadios gametoxénicos (E0, E1, E2, E3 e E4) ó longo das mostraxes de marzo, abril, maio, xuño, agosto e setembro de 2017 nos diferentes rangos de tamaño (15-20; 20-25; 25-30; 30-35 e >35mm).

Debemos tamén considerar que as patoloxías consideradas importantes en moluscos, adoitan darse en densidades de cultivo elevadas, que tampouco se dan no caso da cadelucha.

Os resultados obtidos están en liña cos xa establecidos en anos anteriores, non podéndose establecer un patrón nin xeográfico nin estacional. As patoloxías detectadas pola súa prevalencia e, sobre todo, pola súa intensidade non se poden considerar como responsables de mortalidades.

**Microbioloxía**

Ata agora non se puido demostrar a implicación de axentes microbianos o parasitarios nas mortalidades observadas en cadelucha.

Nas análises realizadas mediante PCR e PCR en tempo real non se detectou a presenza do virus OsHV-1 nin de OsHV-1 Var en ningunha das mostras analizadas pero si atopáronse en D. trunculus de Irlanda e Francia.

# 6 PROXECTOS DE INVESTIGACIÓN

| **Proxecto** | |
|---|---|
| **Exploring the biological and socio-economic potential of new/emerging candidate fish species for the expansión of the European aquaculture industry**. DIVERSIFY | |
| **Investigador/a Principal** | |
| **INVESTIGADOR PRINCIPAL (CIMA)**: Fátima Linares Cuerpo<br>**Coordinador do proxecto**: Constantinos C. Mylonas, HCMR. GREECE | |
| **Outros/as investigadores/as participantes** | |
| | IGAFA: José Luis Rodríguez Villanueva<br>Investigadores pertencentes a 20 centros de investigación, 9 pequenas e medianas empresas, 3 grandes empresas, 5 asociacións profesionais e 1 de consumidores de 12 países diferentes |
| **Técnicos/as** | **Bolseiros/as** |
| Belén Méndez Pérez; Gema Pazos Sieira; Mª José Cores González; Angeles Camino Saco; Rosa Ana Penín Bua | Alexis Araujo Sendín; Noelia Fuentes Villar; Sonia Díaz Carballal; Juan José Sánchez Prego |
| **Entidade que financia**: Unión Europea 7º Programa Marco. KBBE2013.1.2.09 Diversification of fish species and products in European Aquaculture Area 2.1.2. Increased Sustainability of all Production Systems (agriculture, forestry, fisheries and aquaculture) | |
| **Data de inicio**: Decembro de 2013 | **Data de finalización**: Decembro de 2018 |


**RESUMO**

O proxecto "DIVERSIFY" ten como obxectivo fundamental a expansión da industria da acuicultura europea abordándose o estudo dos aspectos clave das 6 especies seleccionadas previamente: a corvina (*Argyrosomus regius*) e o halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), cuxo estado de produción e investigación é o máis avanzado, seguidas pola perca (*Sanders lucioperca*) e a seriola (*Seriola dumerili*) con algunha produción e investigación, a cherna (*Polyprion americanus*) da que non existe produción e está en fase de investigación e a lisa (*Mugil cephalus*) cuxa acuicultura se realiza a partir de alevíns capturados do medio natural. No proxecto participaron 38 institucións de 12 países: 20 centros de investigación, 9 pequenas e medianas empresas, 3 grandes empresas, 5 asociacións profesionais e 1 de consumidores.

A especie na que está involucrada a Consellería do Mar (CIMA e IGAFA) conxuntamente co IEO e o Acuario da Coruña (AF) é a cherna (*Polyprion americanus*). Ademais, outros centros de investigación españois e estranxeiros participan no desenvolvemento desta especie: Hellenic Center for Marine Research (HCMR), Universidad de las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), Institut de Recerca i Tecnoloxía Agroalimentaries (IRTA), Institut Francais de Recherche pour L'Exploitation da Mer (IFREMER), Universidad de La Laguna (ULL). Así mesmo contouse coa colaboración do Acuario do Grove.

A cherna (*Polyprion americanus*) pertencente á familia Polyprionidae é unha especie moi atractiva para a acuicultura comercial xa que ten un crecemento rápido, madurez reprodutiva tardía, alto prezo no mercado e fácil manipulación en cativiade.

É unha das especies de peixes de maior tamaño podendo alcanzar os 100 kg, ten unha ampla distribución xeográfica, é moi apreciada dende o punto de vista gastronómico e con gran potencial exportador. Ademais a súa pesqueira viuse reducida nos últimos anos.

O control da reprodución, o establecemento de protocolos de cultivo larvario e a obtención de dietas óptimas para reprodutores e larvas son os principais retos para o desenvolvemento do cultivo desta especie.

Durante o ano 2018 desenvolvéronse diversas tarefas incluídas nas seguintes áreas de traballo (WPs): Reprodución da cherna (WP6), Nutrición (WP12) e Cultivo larvario (WP18).


**WP6. Reprodución da cherna**

*Captura de exemplares salvaxes para establecer novos stocks de reprodutores*

Tres novos exemplares de cherna capturados no Mediterráneo (43º10'N-05º36'E, Francia) foron subministrados pola empresa Flying Sharks e levados ás instalacións do CO de Vigo en agosto de 2018. Fixéronse mostraxes de peso e lonxitude 2 veces/semana e os pesos iniciais foron de 351,5; 351,8 e 609 g, e as lonxitudes de 32,5; 33,5 e 36 cm, respectivamente. Mantivéronse en condicións de fotoperíodo e termoperíodo natural, cunha media de temperatura da auga entre 15,4ºC e 19ºC e alimentáronse 3 veces/semana con penso fabricado pola empresa SPAROS.

**Figura 1**. Desova espontánea. Recollida de ovos (a), separación de ovos viables flotantes (b)

*Descrición do ciclo reprodutivo e control das postas*

Gran parte do traballo correspondente a esta tarefa foi realizado nos anos anteriores de vixencia do proxecto (2013-2017), no ano 2018 continuouse co seguimento dos stocks de reprodutores de cherna (IEO, AF e IGAFA).

Durante o período de posta, un colector de ovos foi colocado na saída dos tanques para verificar a aparición de calquera desova. Unha vez recollida a desova (Fig. 1 a), foi transferida a un recipiente cun volume suficiente de auga para poder separar a fracción de ovos afundidos dos ovos flotantes (Fig. 1 b) e mediuse o volume total de ovos, flotantes e non flotantes (sendo estes últimos descartados).

Co ovo flotante mídese a porcentaxe de fertilización (Nº ovos *flotantesx100/Nº ovos totais*) e a fase de desenvolvemento embrionario usando unha lupa estereoscópica. O número total de ovos calcúlase multiplicando o número total por 150, que é o número de ovos que contén 1cc. Os ovos flotantes foron trasladados a un tanque de incubación cilíndrico cun fondo cónico e un caudal de auga a 16ºC, con suficientes burbullas de aire procedentes do fondo para permitir suavemente a distribución de ovos en toda a columna de auga.

Ademais fíxose un experimento de indución á posta no ano 2018 mediante a administración do análogo da hormona liberadora de gonadotropina (GnRHa), a unha femia do stock AF cando os ovocitos tiñan un diámetro de 1.172 mm e utilizando implantes cunha dose alta da hormona (87µg/kg de GnRHa).

Neste ano non se realizaron ensaios de fertilización inducidos ou in vitro nos stocks do IGAFA e do IEO, xa que se rexistraron desovas espontáneas naturais.

**WP12. Nutrición da cherna**

Enriquecementos de presas vivas para larvas de cherna

No ano 2018 formuláronse dous novos enriquecedores de presas vivas: enriquecedor control (CE) e enriquecedor ARA (AE) cun contido de proteínas e lípidos de 46,7 e 29,9%, respectivamente no CE e 43 e 31,8% en AE. Os niveis de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) foron entre o 62-63%, sendo os n-3PUFA un 41% do total de ácidos graxos (TAG) en ambos enriquecedores e 19 e 22% de n-6 PUFA en CE e AE, respectivamente.

O contido de ácido araquidónico (ARA) foi de 2,1% en CE e de 5,4% en AE. Os índices DHA / EPA e EPA / ARA foron 8,3 e 2 en CE e 7,2 e 0,9 en AE.

*Experimentos de nutrición larvaria*

En 2018 realizáronse tres experimentos de alimentación larvaria:

1. Efecto de diferentes presas vivas na composición de ácidos graxos das larvas de cherna. O cultivo larvario realizouse nas instalacións do IEO con larvas procedentes dunha posta (24/18).

2. Composición de ácidos graxos de larvas de diferentes postas. Leváronse a cabo análises de ácidos graxos a partir de ovos e larvas con distintas idades de 5 postas diferentes. Para a alimentación das larvas utilizáronse presas vivas (Rotifero e Artemia) enriquecidas co mesmo enriquecedor (ARA-Enriquecemento).

3. Evolución do perfil de ácidos graxos de larvas a través do desenvolvemento larvario (ata 58 días de vida).

A secuencia de alimentación para cada lote de larvas móstrase na Táboa I.

Influencia dos réximes de alimentación de reprodutores na fecundidade e calidade das postas

Os resultados obtidos nos anos anteriores demostraron que a maior parte dos alimentos secos comerciais teñen moita graxa para a alimentación dos reprodutores de cherna, e un novo alimento seco (Penso seco 2) foi formulado cun nivel de graxa moi inferior ó dos pensos comerciais.

Este penso contén unha grande cantidade de n-3 PUFA e a relación EPA/ARA debe ser de aproximadamente 1.5, similar á obtida anteriormente en peixes salvaxes. As distintas dietas subministradas ós reprodutores de cherna do IEO e o IGAFA dende o inicio do proxecto amósanse na Táboa II.

| Postas | 0-5° día | 5-10° día | 10-15° día | 15-20° día | 20-25° día | 25-30° día | 30-40° día | A partir do 40°- día |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 14/18 IEO | Xaxún | Xaxún | Comezo da alimentación ó 11° día: Rot ARA | Rot ARA + Ao | Rot ARA+Ao Final 24° día | | | |
| 15/18 IEO | Xaxún | Xaxún | Comezo da alimentación ó 13° día: Rot ARA | Rot ARA + Ao | Rot ARA+Ao | Rot ARA+Ao Final 28° día | | |
| 24/18 IEO | Xaxún | Comezo da alimentación ó 9 día: Rot Control e Rot ARA | Rot Control e Rot ARA 12° día Ao | Ao 17° día $A_1$ enriquecida control e ARA | $A_1$ enriquecida control e ARA | $A_1$ enriquecida control e ARA Final 21° día | | |
| 30/18 IEO | Xaxún | Comezo da alimentación ó 9° día: Rot ARA | Rot ARA | Rot ARA (15-17° día), Ao(15-18° día), $A_1$(18° día) | $A_1$ enriquecida ARA | $A_1$ enriquecida ARA | $A_1$ enriquecid a ARA | $A_1$+ penso 48° día |
| AF | Xaxún | Comezo da alimentación ó 8° día: Rot ARA | Rot ARA | Rot ARA (15-19° día), Ao(18-20° día), | $A_1$(23° día) | $A_1$ | $A_1$ | $A_1$+ penso 48° día |

**Táboa I**. Secuencia de alimentación das larvas.

| | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 | 2018 |
|---|---|---|---|---|---|
| Stock IEO Tanque S1 (n=5) | Dieta semihúmida | Dieta semihúmida | Dieta semihúmida | Dieta semihúmida | Dieta semihúmida e Penso Seco 3 |
| Stock IEO Tanque S2 (n=6) | Dieta semihúmida | Penso Seco 1 | Penso Seco 2 | Penso Seco 2 | Pensos Secos 2 e 3 |
| Stock IGAFA (n=10) | Vitalis Repro/Vitalis Cal | Lura | Lura | Merluza/Lura | Merluza/Lura e Penso Seco 3 |

**Táboa II**. Alimentación subministrada ós reprodutores de cherna

Con base nos resultados obtidos, algunhas pequenas modificacións foron feitas no alimento seco por parte de Sparos para obter un alimento máis comercial. Penso seco 3 (Táboa III) que foi subministrado ós reprodutores do IEO en setembro de 2018 e ó final deste ano a un tanque de reprodutores do IGAFA.

*Fecundidade das femias e dieta*

A fecundidade relativa (nº ovos/kg femia) de nove femias foi rexistrada ó longo do proxecto, unha do tanque S1 do IEO (9703) en 2015 e 2018 alimentada con dieta semi-húmida, catro do tanque S2 do IEO (7938; 9821; 9837; 9931) en 2016, 2017 e 2018 alimentadas con alimento seco e catro de IGAFA (3FF2; 7B19; 6D01; 499A) durante 2016, 2017 e 2018 alimentadas con pescada e lura. O número de desovas tamén se rexistrou en femias dos stocks do IEO e IGAFA alimentadas con distintas dietas no período 2015-2018.

| Penso Seco 3 | |
|---|---|
| Composición | |
| Proteínas (%) | 60 |
| Graxa (%) | 13 |
| Cenizas (%) | 9 |
| Fósforo total (%) | 1.2 |
| Calcio (%) | 1.7 |
| Sodio (%) | 0.6 |
| Tau (% alimento) | 0,9 |
| Se (mg/Kg) | 2,5 |
| Vit A (IU/Kg) | 40248 |
| Vit C (mg/Kg) | 2000 |
| Vit E (mg/kg) | 650 |
| Vit D (IU/Kg) | 2902 |
| Astaxantina (mg/Kg) | 50 |
| Composición (% alimento) | |
| C14 | 0.55 |
| C16 | 2.10 |
| C18 | 0.44 |
| C18:1n9 | 1.65 |
| LNA (C18:2n6) | 1.08 |
| ALA (C18:3n3) | 0.18 |
| ARA | 0.51 |
| EPA | 0.72 |
| DHA | 1.66 |
| EPA+DHA | 2.38 |
| ARA/EPA | 0.70 |
| Fosfolípidos totais | 2.40 |

**Táboa III**. Composición do alimento seco

*Definición das condicións óptimas de cultivo larvario de cherna*

Para a realización desta tarefa no ano 2018 fixéronse diferentes experimentos:

1. Efecto de dous intervalos de temperatura (14-17ºC e 19-22ºC) na incubación dos ovos. O experimento realízase por triplicado nas instalacións do IEO Vigo

2. Utilización de dous sistemas de cultivo larvario: recirculación (RAS) e fluxo continuo.

Durante o ano 2018 máis de 50 experimentos de cultivo larvario realizáronse nas instalacións do IEO en sistema de fluxo continuo. Probáronse diferentes variables como o fotoperíodo, o circuíto de auga, o uso da aireación ou a secuencia de alimentación que foron modificadas a medida que avanzaba a tempada. Os primeiros experimentos realizáronse en circuíto pechado ata 6-12 días de vida, fotoperíodo de 12 h luz: 12 h escuridade, aireación moderada no centro do tanque, auga verde desde o día cero e temperatura de 15-18ºC. A densidade de larvas variou de 2 a 30 larvas l-1 e a supervivencia variou entre 4 e 30 días de vida. A secuencia de alimentación foi rotífero (10-25 días) e nauplius de Artemia (11-30 días). Nas últimas probas algunhas variables foron modificadas: densidade de cultivo entre 5-15 larvas l-1, a temperatura foi controlada a 17,9 ± 1°C, o osíxeno entre 7,0 e 8,4 mg.l-1, a intensidade durante o período de luz foi axustada a 400 lux na superficie do tanque e a secuencia de alimentación foi: rotífero (7-18 días), nauplius de Artemia (12-19 días) e metanauplius de Artemia enriquecidos (17-30 días).

Os cultivos larvarios de AF foron realizados en fluxo continuo a temperatura da auga de 17,5-18,8°C e a alimentación consistiu en rotíferos e copépodos (Acartia). A densidade larvaria estaba entre 0,2 e 11,1 larvas l-1 e a supervivencia foi ata día 22 de vida.

Diferentes sistemas de cultivo foron utilizados no IGAFA. Os mellores resultados obtivéronse con condicións de recirculación (RAS) con dous lotes, un procedente dunha posta do IEO e outro de AF. As condicións de cultivo foron as seguintes:

densidade 12,5 larvas l-1, temperatura da auga 16-17°C, salinidade 36,4 ± 1,75 ‰, osíxeno 7,2-8,4 mg .l-1, sen aireación e fotoperíodo natural dende 7-9 días de vida.

**RESULTADOS**

**WP6. Reprodución da cherna**

Captura de exemplares salvaxes para establecer novos stocks de reprodutores

Os resultados de peso (g) e lonxitude (cm) dos xuvenís capturados en 2018 (Fig. 2) mostran que nos dous meses en catividade, 2 dos xuvenís dobraron o seu peso, mentres que o outro alcanzou un peso de 1 kg. A taxa de inxestión foi do 1% e a taxa de conversión de alimento (FCR) e a taxa de crecemento específica (SGR) foron 0,7 e 1%, respectivamente.

Descrición do ciclo reprodutivo e control das postas

O comportamento de reprodución natural caracterizouse por machos maduros que perseguían ás femias maduras con liberación de ovos, que foron inmediatamente fertilizados cos espermatozoides liberados na auga polo macho.

A desova ocorre principalmente durante a noite ou moi cedo pola mañá. En 2018, a desova espontánea nos stocks do IEO, IGAFA e AF produciu unha grande cantidade de ovos fertilizados e obtivo unha alta porcentaxe de fertilización, establecéndose claramente un período de 3-5 días entre as diferentes postas dunha femia en tódalas poboacións. A maior parte das postas tiveron lugar entre as 5-8 h da mañá, excepto algunhas que tiveron lugar ó mediodía. O número total de desova anual de tódolos stocks aumentou substancialmente en 2018 (Táboa IV).

A porcentaxe de ovos fertilizados foi entre 50 e 100%, con ovos de mellor calidade na parte final do período de desova. As femias foron capaces de desovar unha media de 10 veces por cada período de reprodución.

O resultado do experimento de indución con GnRHa amósase na Táboa V obténdose 9 postas cun volume de ovos maior de 1.100 ml e unha fertilización que variou entre o 36 e o 97%.

| STOCK | ANOS | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 2015 | 2016 | 2017 | 2018 |
| IEO | 10 | 9 | 13 | 43 |
| AF | 14 | 23 | 5 | 19 |
| IGAFA | 0 | 4 | 9 | 30 |
| Total | 24 | 36 | 27 | 92 |

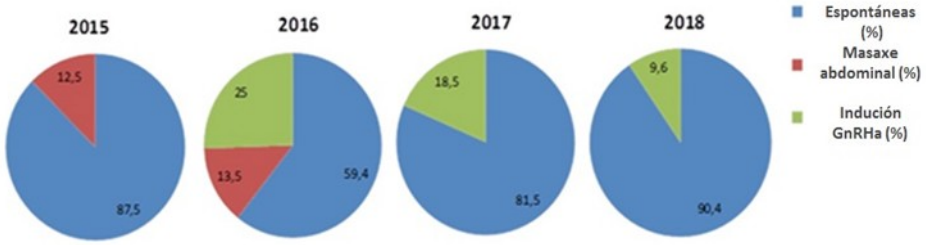
Táboa IV. Número de postas obtidas de 2015 a 2018 nos stocks do IEO, AF e IGAFA

A resposta das femias ós implantes de GnRHa variou nos diferentes anos de experimentación. Así, mentres que no ano 2015 non houbo resposta, no ano 2016 producíronse postas espontáneas con ovos sobremaduros, en 2017 conseguíronse bos resultados en maduración e fertilización pero non en embrioxénese e na eclosión das larvas, e en 2018 obtivéronse bos resultados de fertilización, calidade de ovos e na eclosión das larvas (ata un 31%) cunha dose alta da hormona GnRHa (87 µg de GnRHa/kg de peso da femia).

Nos últimos anos o número de postas espontáneas nos stocks de reprodutores de cherna aumentou, mentres que as postas por indución hormonal reducíronse (Fig. 3). Os motivos deste incremento de postas espontáneas nos stocks en catividade pode deberse a varios factores: a idade dos exemplares, o tempo en catividade, a alimentación adecuada ós seus requirimentos nutricionais e ós coidados na manipulación evitando o stress innecesario.

| ANO | STOCK | EXEMPLAR | PESO (Kg) | DATA DO IMPLANTE | TAMAÑO DOS OVOCITOS (mm) | IMPLANTE GnRHa (µg) | DOSE (µg/Kg) | DATA DE POSTA | OVOS TOTAIS (mL) | FECUNDACIÓN (%) | OBSERVACIONS |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2018 | AF | 2847 | 20,1 | 20/06/2018 | 1,172 | 1750 | 87,0 | 26/06, 30/06, 4/07, 8/07, 12/07, 16/07, 19/07, 23/07 e 26/07 | 1800, 1900, 1650, 1300, 1100, 1200, 1000, 1600 e 1600 | 97, 94, 97, 82, 77, 91, 85, 95, 36 e 76 | Todas as postas espontáneas |

**Táboa V**. Indución á desova dunha femia de AF con GnRHa durante 2018.



**WP12. Nutrición da cherna**

*Enriquecementos de presas vivas para larvas de cherna*

A análise (proteínas, lípidos e ácidos graxos) de presas vivas (rotíferos e Artemia) enriquecidas cos enriquecedores formulados no 2018 móstranse na Táboa VI.

O nivel de proteínas en rotíferos varía entre 62,3% (PS) en rotíferos non enriquecidos (NoERot), 60,4% en rotíferos enriquecidos con enriquecemento de control (CERot) e 59,4% en rotíferos enriquecidos con enriquecemento ARA (AERot).

O contido de lípidos foi de 12,4% (PS) en NoERot, 15,5% en CERot e 17,4% en AERot.

No que se refire aos ácidos graxos, o nivel de PUFA era moito menor nos NoERot (17.5% TAG) que nos rotíferos enriquecidos con valores de 50,6% en CERot e 48,8% en AERot; en canto ós PUFA n-3 aumentaron do 5,4% en NoERot ata o 33,8 e o 30,5% en CERot e AERot, respectivamente e os n-6 PUFA desde 8,9% en NoERot ata o 14,8% e o 16,2% en CERot e AERot. ARA, EPA e DHA foron 1,1; 1,1 e 0,7% TAG, respectivamente en NoERot; 1,8; 4,1 e 26,7% en CERot e 4; 3,7 e 24% en AERot. DHA/EPA foi menor en NoERot (0.7) que en CERot (6,6) e AERot (6,4), o ratio EPA/ARA era 1 en NoERot, 2,3 en CERot e 0,9 en AERot. Por outra parte, a Artemia sen enriquecemento (NoEArt) tiña un 61,6% (PS) de proteínas e o 18,9% de lípidos e a Artemia enriquecida co enriquecedor ARA (AEArt) tiña o 69,5% de proteínas e o 19,7% de lípidos. O contido de PUFA alcanzou o 34,6 e o 36,8% dos ácidos graxos totais en NoEArt e AEArt. Os PUFA n-3 representan o 22% dos totais de ácidos graxos (TAG) en ambos tipos de Artemia, non enriquecida e enriquecida e os n-6PUFA foron 11,2 e 14% de TAG en NoEart e AEArt, respectivamente. Os niveis de ARA, EPA e DHA foron 2,5; 9,9 e 0,1 en NoEArt e 4,8; 10,9 e 3,4% TAG en AEArt. DHA/ EPA e EPA/ARA foron 0,01 e 0,3 e 4 e 2,3, respectivamente en NoEArt e AEArt.

| | Rotífero sen enriquecemento | Rotífero Control | Rotífero enriquecido con ARA | *Artemia* Control | *Artemia* enriquecida con ARA |
|---|---|---|---|---|---|
| **Análise aproximado (% peso seco)** | | | | | |
| **Proteinas** | 62,33±1,11 | 60,45±0,58 | 59,41±2,79 | 61,64±0,41 | 69,48±1,96 |
| **Lípidos** | 12,43±0,18 | 15,53±0,72 | 17,36±3,66 | 18,89±3,05 | 19,72±2,74 |
| **Contido de ácidos graxos (% acidos graxos totais)** | | | | | |
| **Saturados (SAFAs)** | 17,88±0,26 | 16,83±0,05 | 16,80±0,31 | 19,93±0,00 | 21,06±0,07 |
| **Monoinsaturados (MUFAs)** | 64,91±0,25 | 32,94±0,28 | 34,77±0,33 | 45,58±0,09 | 42,31±0,03 |
| **20:4 n-6 (ARA)** | 1,08±0,04 | 1,79±0,02 | 4,04±0,03 | 2,48±0,01 | 4,82±0,02 |
| **20:5 n-3 (EPA)** | 1,08±0,04 | 4,06±0,02 | 3,74±0,01 | 9,88±0,00 | 10,93±0,02 |
| **22:6 n-3 (DHA)** | 0,71±0,01 | 26,71±0,16 | 23,97±0,23 | 0,06±0,00 | 3,38±0,04 |
| **Poliinsaturados (PUFAs)** | 17,49±0,14 | 50,60±0,24 | 48,81±0,35 | 34,56±0,09 | 36,78±0,06 |
| **Σn-3** | 5,40±0,09 | 33,78±0,20 | 30,52±0,25 | 22,48±0,10 | 22,11±0,02 |
| **Σn-6** | 8,87±0,04 | 14,83±0,05 | 16,23±0,11 | 11,22±0,01 | 13,99±0,01 |
| **n-3/n-6** | 0,61±0,01 | 2,28±0,01 | 1,88±0,00 | 2,00±0,01 | 1,58±0,00 |
| **DHA/EPA** | 0,66±0,02 | 6,57±0,04 | 6,42±0,05 | 0,01±0,00 | 0,31±0,00 |
| **EPA/ARA** | 1,00±0,03 | 2,27±0,03 | 0,92±0,01 | 3,99±0,02 | 2,27±0,01 |

HUFA, ácidos graxos altamente insaturados; ARA ácido araquidónico; DHA ácido docohexaenoico; EPA ácido eicosapentaenoico

**Táboa VI**. Proteínas, lípidos e ácidos graxos das presas enriquecidas cos produtos de enriquecemento

*Experimentos de nutrición larvaria*

*1. Efecto de diferentes presas vivas na composición de ácidos graxos das larvas de cherna*

Non se atoparon diferenzas entre larvas alimentadas con rotíferos e Artemia enriquecidos cos dous enriquecementos (Control e ARA) a 11; 18 e 21 días. O contido de PUFA varía entre 46-50%, n-3 29-33%, n-6 14-17% (Fig, 4a). Os contidos de EPA, DHA e ARA varían entre 5-5,5; 21-24 e 6-6,5% (Fig. 4b).

As diferenzas atopadas en n-6 PUFA entre larvas de 21 días con enriquecemento ARA e control débense á gran variabilidade atopada no contido de ácido linolénico (LNA, 18: 2n-6) en larvas alimentadas con Artemia enriquecida con ARA e non son significativas.

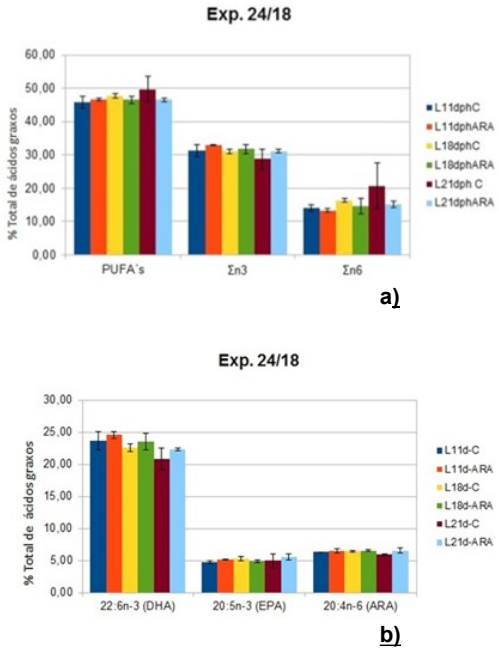



**Figura 4**. Contido de ácidos graxos (% TAG) en larvas a 11; 18 e 21 días alimentadas con dúas presas enriquecidas diferentes.

*2. Composición de ácidos graxos de larvas de diferentes postas*

Os lípidos totais alcanzaron o 15-19% do peso seco (PS) nos ovos sen diferenzas significativas entre as distintas postas. Non hai diferenzas significativas no contido de PUFA dos ovos das diferentes postas con valores de 43-45% (% total) e atopáronse valores similares en larvas de 1 a 25 días de vida. DHA varía entre un 20-25% con poucas diferenzas en ovos e larvas entre 1-10; 10-15; 15-20 e 20-25 días, con excepción das larvas AF que presentan unha variación maior.

Non se atoparon diferenzas en EPA e ARA en ovos e larvas de diferentes postas con valores entre o 4-7% e o 6%, respectivamente, e só se produciu un aumento do valor da EPA (10%) e unha diminución en ARA (3%) en larvas de AF de 15-20 días. Os ratios DHA/EPA e EPA/ARA teñen valores similares de 3-6 e 0,6-1,1 respectivamente en larvas das diferentes postas e só as larvas AF mostran diferenzas en larvas entre 10-15 e 15-20 días que reflicten os valores atopados en EPA e ARA.

*3. Evolución do perfil de ácidos graxos a través do desenvolvemento larvario*

A evolución do perfil de ácidos graxos ó longo do desenvolvemento larvario de cherna mostra un contido en SAFA entre 19-23% do total de ácidos graxos ata 32 días de vida e un aumento nas larvas de 56-58 días (29%) e, pola contra, o contido en MUFA era de 37% en ovos e larvas de 1 día, 31-35% en larvas de 12 a 32 días e os valores máis baixos (24-25%) atopáronse a 56-58 días. O nivel de PUFA mantívose entre 43-47% do total ó longo do cultivo (1-58 días), ARA representa ao redor do 6% ata 32 días e observouse un lixeiro aumento (7.5-8) a 56-58 días. Os valores máis altos da EPA obtivéronse a partir de 32 días das larvas (8,9% do total) e DHA é maior nas larvas de 1 a 12 días (24-25%).

O ratio DHA/EPA é maior en larvas de 12 e 18 días (6) que en ovos e larvas de 1 día (4) e os valores máis baixos obtivéronse en larvas de 32-58 días (2-3). A relación EPA/ARA ten os valores máis baixos (0,7) a 12-18 días e 1 no resto das larvas.

*Influencia dos réximes de alimentación de reprodutores na fecundidade e calidade das postas*

A maior fecundidade relativa (Fig. 5) observouse nas femias alimentadas con penso seco (tanque S2-IEO) cun valor medio de 126.627,36 ovos/kg de femia en 2018, só unha femia do tanque S1 do stock do IEO alimentada con dieta semi-húmida tivo un valor máis alto (133.178.57 ovos/kg de femia). As femias do IGAFA tiveron unha fecundidade media de 43.530,06 ovos/kg de femia en 2018 e foron alimentadas con pescada e lura (metade e metade). En tódalas femias do IEO e IGAFA, a fecundidade aumentou ó longo dos anos.

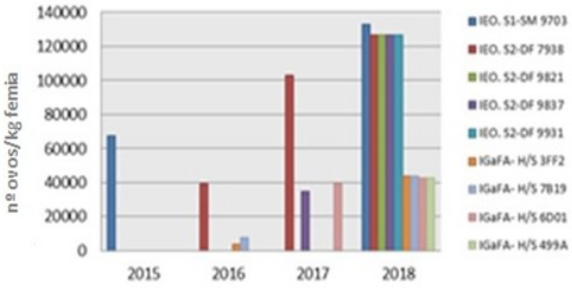



**Figura 5**. Fecundidade relativa (nº de ovos/kg de femia) no período 2015-2018

No que respecta ó número de desovas (Fig. 6), estas incrementáronse ó longo dos anos nas femias dos stocks do IEO e IGAFA. Os exemplares alimentados con penso seco tiveron 10 desovas en 2016 de só unha femia, 19 en 2017 de dúas femias e 36 en 2018 de 4 femias. Das femias alimentadas con dieta semi-húmida só unha femia desova no ano 2015, non se obtiveron desovas en 2016 e 2017 e en 2018 houbo 10 postas.

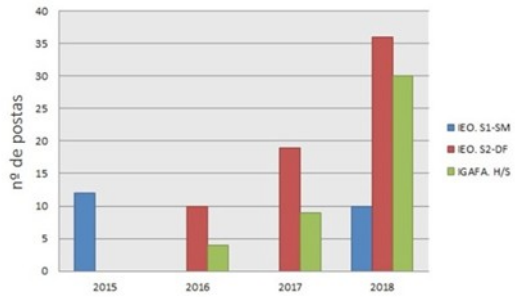



**Figura 6**. Número de postas no período 2015- 2018

En canto ás femias do IGAFA alimentadas con pescada/lura, as postas iníciansе en 2016 a partir de só unha femia (4 desovas) e aumentaron en 2017 (9 desovas) e 2018 con 30 desovas procedentes de 4 femias. Os resultados obtidos en 2017 e 2018 suxiren unha influencia da dieta dos reprodutores sobre a fecundidade das femias, aínda que é necesario verificalos con datos de máis femias.

Os resultados obtidos en 2017 e 2018 suxiren unha influencia da dieta dos reprodutores sobre a fecundidade das femias, aínda que é necesario verificalos con datos de máis femias

**WP18. Cultivo larvario da cherna**

1. *Efecto de dous intervalos de temperaturas (14-17ºC e 19-22ºC) na incubación dos ovos*

Os resultados mostraron que as temperaturas máis baixas (14±0,5ºC) promoven máis larvas deformes e taxas de eclosión inferiores con máis mortalidade de ovos nos primeiros tres días de incubación (Fig. 7).

Aínda que é posible realizar a incubación dos ovos a 19±0,5ºC, debido ao grande tamaño das larvas de cherna o uso de temperaturas elevadas aumenta os niveis de amonio, pH e especies oportunistas (ciliados). A

temperatura adecuada para o cultivo larvario estivo entre 15.5±0,5ºC e 19.1±0,6ºC con bos rendementos ata o día 26 de vida obténdose larvas de 0,47 mg de peso seco (Fig. 8).

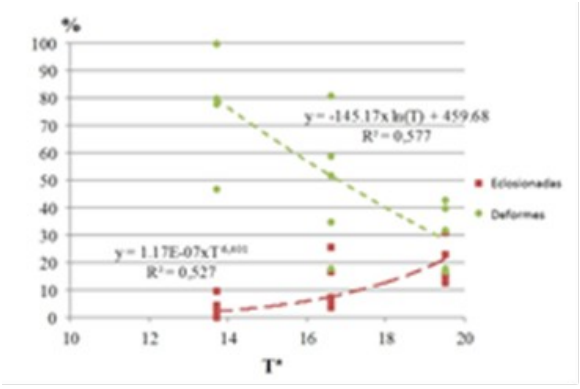



**Figura 7**. Rectas de regresión dos % de eclosión e larvas deformes en función da temperatura.

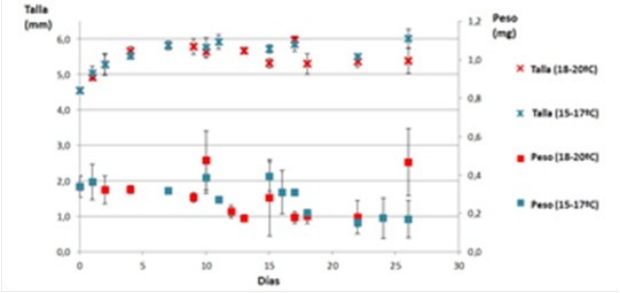



**Figura 8**. Lonxitude e peso seco de larvas cultivadas a diferentes temperaturas

acción conxunta de incubación entre 16,5-19,5°C e cultivo larvario entre 15,5 e 19,1ºC suxiren que un intervalo de temperatura entre 16-18ºC pode ser adecuado para mellorar a supervivencia e o crecemento das larvas de cherna.

2. *Utilización de dous sistemas de cultivo larvario: recirculación (RAS) e fluxo continuo*

Durante o ano 2018 fixéronse grandes avances no cultivo larvario nas tres institucións participantes no proxecto (IGAFA, IEO e AF) con resultados de eclosión de 42-82% e supervivencia media ata 34-37 días de vida. No IGAFA obtivéronse os mellores resultados obténdose larvas e alevíns de cherna por primeira vez no proxecto en condicións de recirculación (RAS) con dous lotes de larvas, un procedente dunha posta do IEO e outro do AF.

As condicións de cultivo foron as seguintes: densidade 12,5 larvas l-1, temperatura da auga 16-17°C, salinidade 36,4 ± 1,7 5‰, osíxeno 7,2-8,4 mg .l-1, sen aireación e fotoperíodo natural desde 7-9 días de vida.

Tamén fixéronse importantes avances na secuencia de alimentación (Fig. 9):

• *Rotífero* enriquecido (con enriquecedor ARA: 8-19 días (4-6 rot/ml)

• Nauplius de *Artemia*: 15-23 días (0,2-0,7 A0/ml)

• Metanauplius de *Artemia* (con enriquecedor ARA 18-48 días (0,2-0,7/ml)

• Penso seco desde 40 días de vida

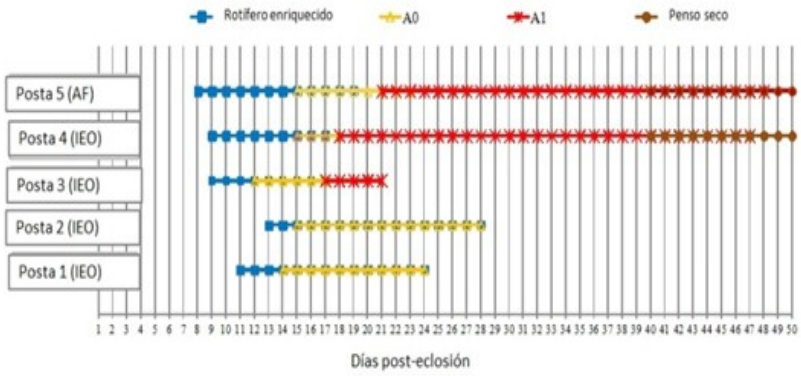



**Figura 9**. Secuencia de alimentación utilizada no cultivo larvario do IGAFA

As larvas foron totalmente destetadas a 48 días de vida. O crecemento en lonxitude das larvas ata 65 días de vida mostrase na Fig. 10. Algúns datos importantes sobre o comportamento foron coñecidos durante o proxecto:

• Pico de mortalidade larvaria: entre 7-11 días de vida.

• Vesículas e deformidades aéreas: desde 10 días de vida.

• Comen vorazmente desde o día 6-7 a 16-18ºC (boca aberta).

• Soben á superficie entre os días 7-15 de vida onde permanecen o resto do tempo.

• As larvas de cherna caracterizáronse polo gran tamaño do saco vitelino con reservas endóxenas até 20 días de vida a 17 ± 0,5°C. O grande tamaño do saco vitelino e a grande gota de graxa indican unha longa fase larval autotrófica.

A produción de xuvenís de cherna no IGAFA significa un importante fito para o desenvolvemento do cultivo desta especie. Adquiríronse datos importantes sobre o crecemento e aumentou o coñecemento sobre o protocolo de alimentación e o comportamento específico das larvas de cherna.

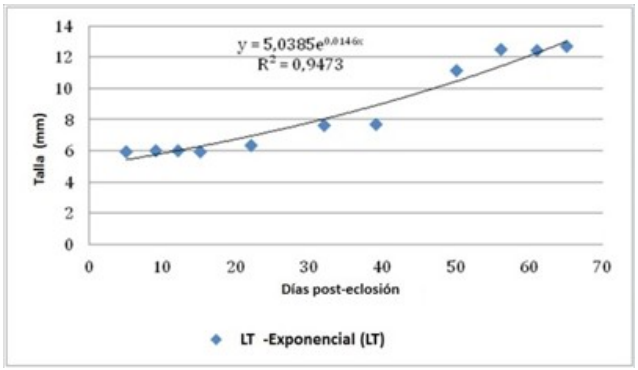



**Figura 10**. Crecemento en lonxitude de larvas de cherna de 5 a 65 días de vida

Información detallada deste proxecto na web: [www.diversifyfish.eu/](www.diversifyfish.eu/)

| Proxecto | |
|---|---|
| **Poboacións bacterianas en criadeiros de bivalvos. Procesos de patoxénese.** BAPOHATCH II. | |
| **Investigador/a Principal** | |
| USC: Dr. Juan L. Barja Pérez | |
| **Outros/as investigadores/as participantes** | |
| CIMA: Jaime Montes Pérez; Susana Nóvoa Vázquez; Justa Ojea Martínez | USC: Susana Prado Plana; Sergio Rodríguez Rodríguez; Javier Dubert Pérez; |
| **Técnicos/as** | **Bolseiros/as** |
| CIMA: Isabel Meléndez Ramos; Elena Penas Pampín; Mª José Brianes Beiras; Patricia Rúa Santervas; Victoria Bouzamayor Yáñez; Mª Josefa Cotarelo Jardón; Francisco Javier Páez Pérez; Beatriz Rodríguez Álvarez; Mercedes Ruíz Misioné; Soledad Núñez García | CIMA Ribadeo: Sonia Castilla del Río, Sonia; Eduardo Granjel Piñeiro; Nerea Fontán Valdivia; Bibiana Viñas Camiña<br>USC: Néstor Fabián Galvis Serrano |
| **Entidade que financia**: Ministerio de Economía, Industria y Competitividad | |
| **Data de inicio**: Xaneiro de 2015 | **Data de finalización**: Abril de 2018 |


**RESUMO**

O proxecto BAPOHATCH II avanzou substancialmente no coñecemento específico dos procesos de patoxénese en criadeiros de bivalvos, imprescindible para lograr a produción da semente necesaria para o sostemento desta acuicultura.

As investigacións realizadas revelaron o proceso completo de colonización de larvas de bivalvos por vibrios patóxenos, mediante técnicas de marcaxe molecular específica (GFP). Describiuse a progresión espazo-temporal, constatando a ausencia de signos de enfermidade ata que a infección está moi avanzada, o que explica a ineficacia dos tratamentos e fai necesarias novas achegas enfocadas a evitar a proliferación de patóxenos oportunistas na instalación ata niveis que resulten letais para os cultivos.

Abordouse o estudo *in silico* e *in vitro* na procura de factores de virulencia nestes patóxenos larvarios, para o que se secuenciou o xenoma de 12 cepas Vibrio spp.

A análise bioinformática revelou un grupo de xenes implicados na biosíntese dun novo sideróforo tipo anfibactina.

Construíuse un mutante que, en ensaios *in vitro* (CAS-Agar e crecemento en presenza dun axente quelante), amosou unha perda de produción de sideróforos.

Unha parte importante da experimentación desenvolveuse en criadeiro. Así, aínda que aumentou a laboriosidade dos ensaios pola necesidade de adoptar precaucións extremas e non interferir co traballo na instalación, os resultados foron máis reais e permitiron axustes e aplicacións inmediatas.

Os estudos da dinámica dos patóxenos no criadeiro revelaron unha complexa rede de interaccións. Confirmouse a importancia da transmisión vertical (reprodutores-ovos-larvas) e a carga bacteriana inicial dos cultivos larvarios. En seguimentos reais, a presenza inicial de vibrios patóxenos, aínda en baixo número, traduciuse na mortalidade do cultivo durante o desenvolvemento larvario, independentemente da especie de bivalvo.

Demostrouse a capacidade dos patóxenos para formar biopelículas persistentes nos tanques, que explica a súa presencia recorrente na planta e a falta de susceptibilidade a tratamentos e limpezas.

As interaccións do fitoplancto con estes vibrios abriron unha interesante liña. A capacidade de inhibición dos cultivos activos de microalgas e de supervivencia dos vibrios neles variaron especie a especie, tanto de fitoplancto como de bacterias. Así, aínda que os patóxenos larvarios non o son para as microalgas, nalgúns casos son capaces de sobrevivir nos seus cultivos (diseminación), mentres que noutros son inhibidos por estas (control).

Os achados do proxecto son en gran medida aplicables en criadeiro, axudando a optimizar os protocolos de cultivo, manexo, limpeza e control, ao igual que as melloras metodolóxicas e tecnolóxicas implementadas.

BAPOHATCH II abre liñas de investigación relacionadas coa patoxénese en criadeiros de bivalvos relacionadas coas biopelículas, o fitoplancto e a transmisión dos patóxenos, así como os factores de virulencia, para axudar na imprescindible actualización dos protocolos destas instalacións e optimizar o seu rendemento.

Os obxectivos do proxecto acadaron resultados satisfactorios, abrindo en moitos casos novas liñas de investigación de gran interese.

**Obxectivo 1. Estudo dos mecanismos de infección bacteriana en cultivos larvarios de bivalvos**.

Este obxectivo considérase completado, xa que se avanzou significativamente no coñecemento do mecanismo de infección, tanto *in vivo*, coa descrición do proceso de infección en larvas, como *in silico* e *in vitro*, co arranque do estudo de factores de virulencia, e a identificación e demostración dun novo sideróforo.

**Obxectivo 2. Coñecemento da dinámica dos patóxenos no criadeiro**.

O obxectivo do coñecemento da dinámica dos patóxenos no criadeiro abordouse desde todos os enfoques previstos, demostrando unha complexa rede de interaccións.

Un factor de gran influencia no éxito/fracaso dos larvarios é a carga bacteriana inicial dos cultivos, debida tanto á transmisión vertical directa como ás biopelículas. Estas confirmáronse como potencial forma de persistencia dos vibrios patóxenos na instalación, que explicaría a súa recorrencia.

Constatouse tamén o papel relevante dos cultivos de microalgas e as súas interaccións cos vibrios patóxenos. Todos os resultados abren novas liñas de investigación nas que se está a afondar xa no marco dun novo proxecto.

**Obxectivo 3. Clarificación do papel de diferentes grupos de illados bacterianos na supervivencia dos cultivos larvarios: Realización de ensaios de patoxenicidade**.

Os traballos neste apartado aportaron un avance metodolóxico, coa finalidade última de desenvolver modelos de ensaios de patoxenicidade sen necesidade de cultivo larvario *in vivo*. Con eles estableceuse unha patoxenicidade "atípica" en illados VSL (*V. splendidus-like*), primeiro paso para explicar a súa asociación recorrente con episodios de mortaldades larvarias de evolución máis lenta e nos que non se illan os patóxenos coñecidos. As probas con novos grupos de vibrios redirixíronse cara a ensaios de illados de *V. mediterranei* (*'V. shiloi'*) relacionados con mortalidades do bivalvo *Pinna nobilis*.

**Obxectivo 4. Aplicación dos coñecementos á xestión do criadeiro**.

Todos os coñecementos, tanto científicos como metodolóxicos, aplicáronse á xestión do criadeiro, cun "*feed-back*" constante. Dado que a experimentación in vivo se levou a cabo maioritariamente na instalación, realizáronse axustes continuos ao longo do proxecto, permitindo ademais a comunicación inmediata. Esta interacción directa, aínda que moito máis laboriosa, permite acadar resultados máis realistas e útiles.

Actividade 1. Ensaio de inoculación en laboratorio de larvas de bivalvo con vibrios patóxenos marcados con "green fluorescent protein" (GFP) para coñecer o proceso de infección.

É a primeira descrición do proceso completo de colonización de larvas de bivalvos por vibrios patóxenos empregando técnicas de marcaxe molecular específico (GFP).

Actividade 2. Secuenciación do xenoma de *V. europaeus* PP-638; *V. bivalvicida* PP2-605; *V. neptunius* PP-145.98, PP-256.98, PP-259.98 e PP-313.98; *V. ostreicida* PP-203; *V. splendidus-like* 47, 58, 3154, 3155 e 3159; e *V. mediterranei* (*'V. shiloi'*) PN100, PN101 e PN201.

Actividade 3. Análise de xenomas de vibrios patóxenos de bivalvos mediante ferramentas bioinformáticas e procura de xenes candidatos relacionados coa patoxenicidade.

A análise bioinformática do xenoma de *V. neptunius* PP-145.98 revelou un grupo de xenes implicados na biosíntese dun novo sideróforo tipo anfibactina.

Construíuse un mutante por deleción (gen nrp) e obtívose unha cepa coa mutación revertida por pases consecutivos. Observouse unha perda de produción de sideróforos no mutante, en ensaios de CAS-Agar e de crecemento en presenza dun axente quelante.

É o primeiro estudo de sideróforos no patóxeno de larvas de bivalvos *V. neptunius*.

Actividade 4. Seguimento en criadeiro dun episodio de mortaldade larvaria de ameixa fina. Análise de datos, identificación e seguimento do vibrio patóxeno. Transmisión vertical de *Vibrio europaeus* de ovo a larvas.

É a primeira descrición dunha infección en criadeiro causada por *V. europaeus* mostrando a súa progresión desde o ovo (transmisión vertical) e durante o cultivo larvario, tanto nas larvas como na auga do cultivo. Constatouse unha vez máis a ineficacia do tratamento rutineiro/preventivo con antibiótico.

Actividade 5. Deseño de experimentos para coñecer a relación do fitoplancto cos vibrios patóxenos, para avaliar tanto o efecto destas bacterias sobre os cultivos microalgais, como a súa supervivencia neste medio.

Deseñáronse experimentos escalados para estudar as interaccións fitoplancto-patóxenos.

Chequeouse in vitro a actividade inhibidora das diferentes microalgas (8) fronte aos patóxenos, mediante un ensaio en placa seguindo o método de acúmulos modificados (Prado 2006), con discos impregnados con células e sobrenadante de cultivos activos de todas as especies de fitoplancto. En ningún caso se observou inhibición.

A parte principal do traballo realizouse *in vivo* e *in situ*. O primeiro estudo avaliou simultaneamente supervivencia dos patóxenos (5) en cultivos de microalgas (7) a pequena escala en tubos mantidos na cámara de fitoplancto, mostrando *Tetraselmis suecica* o maior potencial inhibidor e *V. ostreicida* a maior sensibilidade.

Na seguinte fase estudáronse individualmente as interaccións de *T. suecica* e *Isochrysis galbana* cos patóxenos, en ensaios en condiciones reais en botellóns de cultivo na cámara isoterma. Non só se confirmaron os resultados obtidos nos ensaios en tubo, senón que se demostrou un maior potencial inhibidor por parte dos cultivos activos de microalgas. Constatouse que os vibrios patóxenos non afectan a ningún dos cultivos fitoplanctónicos ensaiados.

Dentro dos traballos deste apartado púxose a punto un método de sementeira en placa que permitira o procesado

rápido do gran número de mostras, modificación do método Miles & Misra (1938).

É o primeiro estudo en condicións reais en criadeiro da complexa interacción fitoplancto-vibrios patóxenos, demostrando o potencial inhibidor dos cultivos activos de microalgas, a non patoxenicidade dos vibrios para estas microalgas e a capacidade de supervivencia dalgúns patóxenos nestas condicións.

Actividade 6. Experimentos de co-inoculación en cultivos larvarios de cepas patóxenas e *V. splendidus-like* (VSL) para dilucidar se existe algún tipo de interacción que explique presenza excluínte de vibrios patóxenos coñecidos e VSL, en episodios de mortalidades larvarias.

É o primeiro estudo que aborda a interacción competitiva entre vibrios patóxenos coñecidos, causantes de mortalidades rápidas e masivas, e *V. splendidus-like*, asociados a cultivos en criadeiro que se desenvolven con taxa de supervivencia baixa.

Actividade 7. Avaliación do uso alternativo de liñas celulares de cultivo continuo, fronte ao método tradicional (inóculo in vivo), para establecer a patoxenicidade de illados *Vibrio* spp.

Os resultados supoñen unha base sólida para a implementación dunha nova metodoloxía alternativa para os ensaios de virulencia de patóxenos larvarios de bivalvos.

A análise conxunta dos datos de virulencia e citotoxicidade permitiu detectar illados patóxenos VSL.

Actividade 8. Mecanismos de persistencia dos patóxenos na instalación: Estudo da formación de biopelículas no sistema de cultivo.

Os ensaios leváronse a cabo no criadeiro (nunha zona acondicionada para minimizar riscos) utilizando fragmentos dos propios tanques de cultivo larvario que se mantiveron nas condicións de cultivo e se inocularon cos patóxenos.

Durante os traballos púxose a punto un protocolo de procesado das pezas que permitiu a súa análise mediante microscopía electrónica de varrido. Púidose así observar a formación de biopelículas en zonas das pezas incubadas coas diferentes bacterias, e a súa persistencia durante o período máximo ensaiado de tres semanas.

En paralelo, un aspecto tecnolóxico que se desenvolveu dentro desta actividade foi o deseño de placas de medio de cultivo específicas para a toma de mostras de superficies no criadeiro.

Despois de múltiples axustes, elaboráronse placas de contacto cos medios TCBS e AM, coa superficie convexa e da consistencia axeitada para exercer a presión necesaria sobre a superficie a estudar. O seu uso en criadeiro resultou satisfactorio.

O deseño experimental permitiu optimizar a obtención de información práctica no criadeiro, minimizando os riscos para a instalación e posibilitando a observación directa. Demostrouse a capacidade de todos os patóxenos para formar biopelículas persistentes nas superficies dos tanques de cultivo en condicións de criadeiro. As placas de contacto deseñadas permiten a obtención de mostras directas e comparables dos tanques de cultivo ou calquera outra superficie do criadeiro.

Actividade 9. Estudo da influencia da carga bacteriana inicial no éxito/fracaso do cultivo larvario.

Os traballos centráronse en estandarizar un protocolo para a recollida de mostras iniciais do cultivo larvario das diferentes especies de bivalvos. Inicialmente focalizouse o esforzo na fase de larva D, unha vez completada a transformación, dada a dificultade de obter mostras regulares de ovos, principalmente a causa das postas espontáneas. Isto permitiu identificar o patóxeno *V. europaeus* nas mostras iniciais de desoves de diferentes especies que sufriran mortaldades do 100% en menos de dúas semanas, postulando así unha ampliación do seu espectro de patoxenicidade coas especies: *Ensis magnus* e *Polititapes rhomboides*.

Dada a recorrencia deste patóxeno na instalación, e vistos os achados sobre biopelículas, planeouse un novo enfoque: a comparativa entre a carga bacteriana de ovo e larva D inmediatamente despois da transformación, para clarificar o papel da transmisión vertical.

Este novo estudio, iniciado aquí, é un dos obxectivos do novo proxecto, xa que hai que resolver o problema das mostras de ovos en postas espontáneas.

Demostrouse a presenza recorrente de *V. europaeus* na instalación e o risco que implica para os cultivos larvarios dun amplo espectro de especies de bivalvos. Os resultados abren o camiño para a busca de indicadores de éxito/fracaso nas fases iniciais do cultivo, dada a imposibilidade de calquera tratamento efectivo.

Actividade 10. Ensaios de patoxenicidade de *V. mediterranei* (‘*V. shiloi*’) en *Ruditapes philippinarum* como modelo biolóxico alternativo de *Pinna nobilis*.

No estudo de mortaldades do bivalvo *P. nobilis* en medio natural, obtivéronse 20 illados de *V. mediterranei* (‘*V. shiloi*’), seleccionándose tres, tanto para secuenciar o seu xenoma como para realizar ensaios de patoxenicidade. Foi necesario un modelo biolóxico alternativo, polo que se usou ameixa xaponesa, co resultado de mortalidades á temperatura máis alta ensaiada (23ºC).

Actividade 11. Estudo do cambio de pigmentación en cultivos de *Chaetoceros spp*.

Ante a reiteración de cambios de pigmentación espontáneos en cultivos de Chaetoceros, abordouse o estudo da microbiota presente. As mostras en medio Algal de incubación longa permitiron establecer a presenza de cianobacterias nos cultivos, que foron illadas para futuros estudios que esclarezan o seu papel.

Actividade 12. Aplicación dos coñecementos á xestión de criadeiro.

Os achados do proxecto, grazas á orientación eminentemente práctica, foron na súa maioría directamente aplicables en criadeiro. O coñecemento do proceso de infección sustenta a imposibilidade dun tratamento efectivo e a necesidade de alternativas innovadoras.

As biopelículas apuntan a unha vía de persistencia e obrigan a avaliar e actualizar os protocolos de limpeza. O fitoplancto resulta ser máis que alimento, xogando un papel na interacción cos patóxenos larvarios.

Os controis microbiolóxicos mellorados, xunto coa implementación de novas metodoloxías e técnicas, axudan a achegar información útil para minimizar perdas y optimizar esforzos. Todos os resultados que se foron obtendo ao longo do proxecto aplicáronse de seguido para mellorar os protocolos de traballo do criadeiro, igual que todas as melloras metodolóxicas e tecnolóxicas desenvolvidas, co obxectivo global de actualizar estas instalacións e optimizar o seu rendemento.

En relación aos reprodutores utilizados, realizáronse controles histopatolóxicos de diferentes especies de ameixa.

Estes controles efectuáronse sobre un total de 6 lotes de 30 exemplares cada un: 3 de ameixa babosa (V*enerupis corrugata*) procedentes das rías de Ferrol, Arousa e Muros, 2 lotes de ameixa fina (*Ruditapes decussatus*) procedentes das rías de Foz e Aveiro (Portugal), e un lote de ameixa xaponesa (*Ruditapes philippinarum*) procedente da ría de Arousa.

O principal problema patolóxico detectado foi *Perkinsus* spp, con prevalencias nalgúns casos que alcanzan o 30%. A pesar de que esta parasitoloxía pode ocasionar mortaldades, ditas mortaldades non se deron nestes reprodutores, debido probablemente a que a intensidade de parasitación era baixa e as condicións de aclimatación as adecuadas.

Outra parasitoloxía destacable, só detectada de forma estritamente puntual, son os organismos tipo *Rickettsia*, que tanto por ser casos esporádicos, como pola súa baixa intensidade de infección, non ocasionaron problemas no acondicionamento dos reprodutores.

| Proxecto – Acrónimo – Código CIMA | |
|---|---|
| **Poboacións microbianas e control de patóxenos en criadeiro de bivalvos. Cara ao criadeiro do futuro.** BAPOLABinHATCH. | |
| **Investigador/a Principal** | |
| USC: Dr. Juan L. Barja Pérez | |
| **Outros/as investigadores/as participantes** | |
| CIMA: Jaime Montes Pérez; Susana Nóvoa Vázquez; Justa Ojea Martínez | USC: Susana Prado Plana |
| **Técnicos/as** | **Bolseiros/as** |
| CIMA: Elena Penas Pampín; Mª José Brianes Beiras; Victoria Bouzamayor Yáñez; Mª Josefa Cotarelo Jardón; Francisco Javier Páez Pérez.<br>USC: Soledad Núñez García; Gabriel Arcos Vilanova | CIMA: Sonia Castilla del Río; Eduardo Granjel Piñeiro; Nerea Fontán Valdivia; Bibiana Viñas Camiña<br>USC: Néstor Fabián Galvis Serrano |
| **Entidade que financia**: Ministerio de Economía, Industria y Competitividad | |
| **Data de inicio**: Xaneiro de 2018 | **Data de finalización**: Decembro de 2020 |


**RESUMO**

BAPOLABinHATCH é un proxecto de investigación translativo que pretende achegar a investigación microbiolóxica ao criadeiro de bivalvos para achegar ferramentas que axuden a solucionar a súa problemática.

O obxectivo xeral é integrar os coñecementos científicos resultantes dos proxectos BAPOHATCH, en especial acerca dos patóxenos do xénero *Vibrio*, causantes de mortaldades que comprometen a produción, e a súa dinámica no criadeiro. Complementaranse con novas investigacións (*in vitro, in vivo* e *in silico*) para facilitar o deseño rápido de novas achegas diagnósticas ou terapéuticas.

Os traballos articularanse en catro liñas:

1. Estudo das interaccións fitoplancto-bacterias.
2. Reprodutores - ovos - larvas: Metaanálise e procura de indicadores microbianos.
3. Estudo dos vibrios patóxenos larvarios: Factores de virulencia e biopelículas bacterianas.
4. Melloras no criadeiro: implementación de protocolos e ensaio de novas tecnoloxías.

A relacións fitoplancto-bacterias estudaranse nos dous sentidos. Por unha banda, avaliarase a capacidade de inhibición "*in vivo*" das distintas especies de microalgas sobre os vibrios patóxenos. Por outra banda, farase unha análise metaxenómica da poboación bacteriana destas especies de fitoplancto, para coñecer os seus compoñentes e as posibles actividades metabólicas de interese.

Respecto aos bivalvos, os resultados obtidos ata o momento indican que o mellor enfoque para tratar de evitar as mortaldades larvarias por vibriosis, e erradicar o uso de antibióticos, é considerar a secuencia reprodutores - ovos – larvas.

Compilaranse os datos, microbiolóxicos e de cultivo, xerados nestes anos de estudo dos reprodutores e cultivos larvarios de diferentes especies. O conxunto de datos será obxecto dunha metaanálise para identificar patróns que axuden a avaliar posibles indicadores microbianos para predicir o éxito/fracaso dos cultivos, con especial atención a aqueles que resulten de aplicación doada no criadeiro polo seu persoal.

Afondarase no coñecemento dos vibrios patóxenos, grazas á secuenciación dos seus xenomas, completada en BAPOHATCH.

Continuaranse os estudos de factores de virulencia e formación de biopelículas. Esta bagaxe debe achegar ferramentas para, en diálogo co criadeiro, desenvolver protocolos de manexo e limpeza que axuden a controlar a proliferación destes patóxenos.

Será transversal ao proxecto o labor de melloras no criadeiro, implementando os protocolos e medidas de actuación derivados dos traballos realizados. Dentro deste apartado, enmárcase o esforzo por modernizar o criadeiro, explorando a aplicabilidade, utilidade e rendibilidade das novas tecnoloxías para realización de analíticas.

O reto deste proxecto é tender unha ponte entre dous ámbitos tan separados actualmente como a investigación e a produción en criadeiros de bivalvos, para lograr que os grandes avances científicos dos últimos anos se reflictan en solucións prácticas a problemas do sector.

A relación fitoplancto-bacterias estudarase nos dous sentidos. Por unha banda, avaliarase a capacidade de inhibición *in vivo* das distintas especies de microalgas sobre os vibrios patóxenos. Por outra banda, farase unha análise metaxenómica da poboación bacteriana destas especies de fitoplancto, para coñecer os seus compoñentes e as posibles actividades metabólicas de interese.

| Proxecto | |
|---|---|
| **Contribución xenética para a recuperación dos bancos naturais de cadelucha (*Donax spp.*) en Galicia..** | |
| **Investigador/a Principal** | |
| UDC: Dra. Josefina Méndez Felpeto | |
| **Outros/as investigadores/as participantes** | |
| CIMA: Dorotea Martínez Patiño | UDC: CIMA: Dorotea Martínez Patiño<br>UDC: Ana Insua Pombo, Ana Nantón Varela; Jenyfer Fernández Pérez; Fernando Avecilla Porto |
| **Técnicos/as** | **Bolseiros/as** |
| Victoria Bouzamayor Yáñez.; Mª Josefa Cotarelo Jardón; Francisco Javier Páez Pérez.; Beatriz Rodríguez Álvarez; Mercedes Ruíz Misioné | Sonia Castilla del Río, Sonia; Eduardo Granjel Piñeiro; Nerea Fontán Valdivia; Bibiana Viñas Camiña |
| **Entidade que financia**: Ministerio de Economía, Industria y Competitividad | |
| **Data de inicio**: Xuño de 2017 | **Data de finalización**: Decembro de 2019 |


**RESUMO**

INFORME XENÉTICO

A coquina máis abundante nas localidades galegas é a pertencente á especie *Donax trunculus*. Con todo, durante as mostraxes de anos anteriores da Acción, detectamos a presenza de polo menos dúas especies do xénero Donax nalgúns dos bancos naturais. Este feito fai necesaria a autentificación dos exemplares recolleitos para identificar taxonómicamente a cada un de eles e comprobar a existencia de máis dunha especie do xénero *Donax* nas costas da comunidade galega. Esta tarefa é relevante xa que permitirá identificar as mostras procedentes do medio natural que se utilizarán como reprodutores no criadeiro para a obtención de semente e que, posteriormente, empregarase para repoboar os bancos naturais. Os resultados obtidos axudarán a coñecer mellor a área de distribución das especies deste xénero de cara a conseguir unha produción sustentable das especies *Donax* no sector da acuicultura.

A continuación, detállase o protocolo desenvolto polo noso grupo para a autentificación dos individuos e os resultados obtidos.

MATERIAL E MÉTODOS:

1. Material biolóxico:

No mes de xullo, recibimos un total de 82 exemplares dun banco natural de Vilarrube (Táboa 1). Todas as mostras atopábanse conservadas en etanol ao 96%.

**Táboa 1**. Características das mostra

| GRUPO | PROFUNDIDADE | IDENTIDADE INDIVIDUOS |
|---|---|---|
| 1 | Submareal 2 - 5m | 1 – 34 |
| 2 | Submareal 3 – 5,5m | 34 – 45 |
| 3 | Submareal 5,5 - 6m | 46 – 64 |
| 4 | Submareal 5,5 – 6m (gónada laranxa) | 65 – 78 |
| 5 | Submareal 6m | 79 – 82 |

2. Extracción de ADN:

Para a extracción de ADN empregouse unha porción de tecido de músculo do pé e seguiuse un método baseado na utilización de Chelex-100 (Walsh et al., 1991).

3. Identificación taxonómica dos exemplares:

A identificación taxonómica realizouse seguindo un protocolo descrito por Pereira et al. (2012), baseado na amplificación por PCR do marcador nuclear 5S ADNr que permite a identificación de *Donax trunculus* fronte a outras especies do mesmo xénero presentes na Península Ibérica (*Donax semistriatus*, *Donax variegatus* e *Donax vittatus*). Este protocolo foi desenvolto polo grupo XENOMAR.

A amplificación por PCR levouse a cabo nun volume final de 25 µl que contiña 150 ng de ADN xenómico extraído a partir de tecido muscular, 0,75 U de Taq ADN polimerasa, tampón da polimerasa 1x, 0,25 mM de dNTPs, 0,6 µM de cada cebador e auga milliQ estéril. Os cebadores utilizados foron os deseñados por Fernández-Tajes e Méndez (2007) (5SF: – 5' CGTCCGATCACCGAAGTTAA 3'– e 5SR: – 5' ACCGGTGTTTTCAACGTCAT 3'–). Tamén se amplificaron individuos control das especies *D. semistriatus, D. vittatus e D. variegatus*, dispoñibles no laboratorio.

As reaccións de PCR realizáronse nun termociclador MyCycler™ (Bio-Rad). O programa de amplificación utilizado consistiu nunha desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, seguida de 34 ciclos de 94°C durante 30 s, 55°C durante 30 s e 72°C durante 40 s, e unha extensión final de 7 min a 72°C.

Os produtos de PCR analizáronse mediante electroforese horizontal en xeles de agarosa ao 2% en tampón 1x TAE aplicando 5 µl de produto de PCR e 1 µl de tampón de carga. A lonxitude dos fragmentos determinouse por comparación co marcador XIV de Roche de peso molecular coñecido (100 – 1500 pb).

O progreso de migración da electroforese observouse mediante o colorante azul de bromofenol e xileno cianol

incluídos no tampón de carga. A electroforese realizouse a 90-120 V e deixouse correr ata que o azul de bromofenol alcanzou os 2/3 do xel. Posteriormente, tinguiuse por inmersión en bromuro de etidio (0,5 µg/ml en 1xTAE) durante 30 min e visualizouse nun transiluminador Xel Doc XR (Bio-Rad).

**RESULTADOS**:

O método de PCR descrito por Pereira et al. (2012), baseado na amplificación do marcador nuclear 5S ADNr, permitiu corroborar unicamente a identidade de 25 dos individuos estudados. Estes individuos identificáronse como *D. trunculus*, pois ao realizar o xel de agarosa o fragmento amplificado presentou un tamaño comprendido entre 275-300 pb, mentres que o tamaño esperado para as outras especies do xénero está comprendido entre 400-500 pb.

O resto de individuos da mostraxe non foi posible a súa identificación taxonómica debido á baixa calidade e cantidade do ADN extraído. É probable que a presenza de areas dentro dalgúns exemplares e a existencia de individuos que tiñan as cunchas pechadas, dificulte a conservación do tecido en etanol e que facilite, polo tanto, a degradación do ADN. Aínda que se utilizou outro método de extracción de ADN (Fernández-Tajes e Méndez, 2007) nestes individuos para tratar de mellorar os índices de calidade e cantidade do mesmo, non foi posible a súa amplificación por PCR.

| **Título do proxecto** | |
|---|---|
| **Co-operation for restoring cockle shellfisheries and its ecosystem-services in the Atlantic Area (AA)**. COCKLES. | |
| **Investigador/a Principal** | |
| CETMAR: Rosa Fernández Otero | |
| **Outros/as investigadores/as participantes** | |
| M. Asunción Cao Hermida; M. Jesús Carballal Durán; David Iglesias Estepa; Silvia Lorenzo Abalde; Antonio Villalba García | |
| **Técnicos/as** | **Bolseiros/as** |
| M. José Brianes Beiras; Ana Isabel González Fontela; Gemma Martínez Verde; M. Isabel Meléndez Ramos; Elena Penas Pampín; Patricia Rúa Santervas | Jenifer Fernández González, J.; Guadalupe Pena Thomas; Raquel Viturro García |
| **Entidade que financia**: Entidade que financia: Unión Europea, Programa INTERREG Atlantic Area (EAPA_458/2016) | |
| **Data de inicio**: Outubro de 2017 | **Data de finalización**: Setembro de 2020 |


**RESUMO**

Os berberechos proporcionan beneficios ambientais, socioeconómicos e culturais significativos ás comunidades costeiras dos países implicados no proxecto (España, Portugal, Francia, Irlanda e Reino Unido) pero están ameazados por enfermidades e unha xestión incorrecta. O propósito deste proxecto é recuperar e aumentar a produción de berberecho así como os servizos que este molusco proporciona nas rexións do Espazo Atlántico da UE, a través dos obxectivos seguintes: (1) Avaliar a saúde, diversidade e interrelacións das poboacións de berberecho ao longo do Espazo Atlántico caracterizando a dinámica de poboacións; diversidade xenética e transporte larvario; ameazas por enfermidades, contaminación, especies invasoras e cambio climático. (2) Cuantificar os beneficios económicos, sociais e culturais dos servizos ecosistémicos que aportan os berberechos (marisqueo, acuicultura, biodiversidade, alimento para aves, turismo, servizos sociais) realizando enquisas, entrevistas e análises socioeconómicas. (3) Prover técnicas de xestión novas desenrolando procedementos e tecnoloxías de recuperación de bancos de berberecho, cultivo en criadeiro, programas de mellora xenética para producir estirpes resistentes a enfermidades e de crecemento rápido e conservación da estrutura e diversidade xenética. (4) Proporcionar orientación e asesoramento sobre boas prácticas a produtores, administracións, axencias ambientais e ONGs avaliando e poñendo en común os mellores procedementos ao longo do Espazo Atlántico e optimizando a xestión mediante ensinanzas mutuas. Todo elo redundará na mellora da produción de berberecho, unha industria robusta, viable e sostible, con patentes beneficios sociais e de biodiversidade.

**Grupos de tarefas do proxecto**:

1. Coordinación. O obxectivo é facilitar un desenrolo fluído das actividades, xestionar a coordinación global do equipo de persoas e os recursos implicados e garantir unha implementación eficiente e responsable e a emisión en tempo e forma dos informes pertinentes.

2. Comunicación. Preténdese promover un diálogo aberto entre todos os estamentos afectados: científicos, mariscadores, ONGs e outros implicados no uso de berberechos e sensibilizar a todos sobre a pluralidade e valor dos servizos e beneficios aportados polos berberechos. Como instrumentos usarase unha páxina web, actos públicos, talleres de traballo e unha conferencia final na que se presentarán e discutirán os logros do proxecto. A súa diseminación continuará a través da web, artigos científicos e de divulgación, reunións técnicas e congresos e un taller de traballo específico transcorrido un ano desde a conclusión do proxecto

3. Capitalización. Accións orientadas a asegurar que os resultados continuarán xerando impacto máis alá da duración do proxecto, de forma que todos aos que lles incumbe (produtores, administracións, ONGs, comunidades costeiras) incorporen os resultados e produtos do proxecto e os utilicen nos seus ámbitos respectivos, con capacitación e pericia optimizadas xunto coa creación de redes de cooperación a largo prazo.

4. Avaliación da situación de partida: caracterización das poboacións, capacidade reprodutiva e estrutura xenética. Avaliación exhaustiva e integradora da situación das poboacións de berberecho no Espazo Atlántico, incluíndo distribución xeográfica, abundancia, dinámica de poboacións e influencia de factores xeográficos, con vistas a predicir tendencias futuras en escenarios diferentes. Incluirase a avaliación da capacidade reprodutiva e da estrutura e diversidade xenéticas.

5. Identificación das ameazas principais. Análises das enfermidades que padecen as poboacións de berberecho en cada país, avaliación de riscos e determinación de procedementos específicos de loita. Caracterización do sistema inmunitario do berberecho e da súa microbiota como vías do berberecho para superar condicións de estrés, con énfases en patóxenos e cambio climático. Avaliación da ameaza por especies invasoras.

6. Modelado de fluxos: transporte larvario e cascadas tróficas. Desenrolo de modelos biofísicos e ecolóxicos integrados que simulen as conexións entre bancos de berberecho vía dispersión larvaria. Desenrolo de modelos

ecolóxicos que, estimando o fluxo de materia/enerxía entre ecosistemas a través de organismos filtradores (berberechos e outros), permitan predicir a capacidade de carga e os efectos do berberecho sobre produción primaria e cascadas tróficas. O uso destes modelos preditivos mellorará a xestión dos bancos de berberecho.

7. Procedementos de cultivo de berberecho e mellora xenética para producir estirpes resistentes á marteiliose. Desenvolvemento de procedementos de cultivo: produción de semente en criadeiro e engorde no medio natural. Para producir estirpes de berberecho resistentes á marteiliose estudaranse as bases moleculares da resposta do berberecho a esta enfermidade e buscaranse marcadores moleculares de resistencia. Deseñarase un protocolo de selección xenética para resistencia á marteiliose. Os protocolos de cultivo e de selección xenética e toda a información sobre demografía e estrutura xenética das poboacións de berberecho e a súa dispersión larvaria integraranse para deseñar procedementos para recuperar bancos de berberecho esgotados ou en declive.

8. Cuantificación dos beneficios socioeconómicos e para a biodiversidade proporcionados polo berberecho. Análise exhaustiva dos beneficios que proporcionan os berberechos para manter a saúde do ecosistema así como dos beneficios socioeconómicos. Cos resultados da análise crearase unha ferramenta para cuantificar todos estes beneficios que será moi útil para a xestión dos bancos.

Traballo desenvolto polo equipo do CIMA

O equipo do CIMA participa en tódolos grupos de tarefas salvo no 6. En 2018 os seus traballos de investigación se centraron fundamentalmente nos grupos de tarefas (GT) 5 e 7. Unha das cuestións abordadas no GT5 é a caracterización das alteracións patolóxicas que afectan aos berberechos nos países implicados. En Galicia escolléronse dous bancos para abordar esta tarefa, o de Lombos do Ulla na ría de Arousa e a área de Noia na ría de Muros. En ambas localizacións tomáronse mostras en dous momentos, febreiro de 2018 (antes do período de posta) e novembro de 2018 (tralo período de posta), considerando dous grupos de idade, xuvenís e adultos, e dúas condicións diferentes dos berberechos, enterrados e desenterrados. Para cada combinación lugar/data/idade/condición se recolleron e procesaron 15 individuos. Estase a realizar o exame histopatolóxico das mostras e as alteracións patolóxicas máis relevantes xa detectadas son infeccións polo protozoo Marteilia cochillia e un protozoo de tipo haplospórido pendente de análise molecular para a súa identificación, infestacións por diferentes estadios larvarios de tremátodos, neoplasia diseminada e casos de granulomatose (Fig. 1), ademais doutros simbiontes e alteracións de menor transcendencia patolóxica.

A outra cuestión abordada polo grupo do CIMA no seo do GT5 é a caracterización do sistema inmunitario do berberecho, con énfase nos hemocitos pois son células con papel transcendental na resposta inmunitaria ante patóxenos. Desde abril de 2018, mensualmente estase a recoller mostras de ao redor de 30 berberechos adultos da área de Noia, o que se manterá ata completar dous anos, para caracterizar os diferentes tipos e subtipos celulares presentes na hemolinfa e estimar a variación temporal do conteo hemocitario total (CHT) e o conteo hemocitario diferencial (CHD) e que factores (variables ambientais, condición gonadal, sexo, estado de saúde) inflúen na súa variación. A Fig. 2. mostra a evolución do CHT no período de estudo de 2018. A caracterización dos tipos hemocitarios non se rematou ao final de 2018, polo que a estimación do CHD nas mostras recollidas en 2018 está pendente

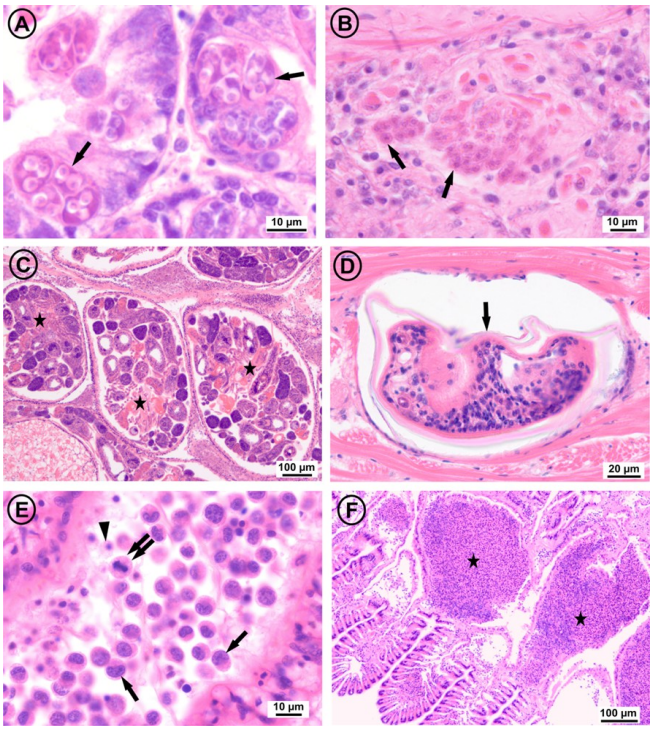



**Fig. 1**. Micrografías de cortes histolóxicos de berberecho cos parasitos e alteracións patolóxicas máis relevantes. A: Corte da glándula dixestiva na que se observan plasmodios de Marteilia cochillia (frechas) no epitelio dos túbulos dixestivos. B: Células uninucleadas e plasmodios dun parasito de tipo haplospórido (frechas) nun área do tecido conxuntivo da masa visceral con infiltración hemocitaria. C: Esporoquistes (estrelas) dun tremátodo, que conteñen cercarias con distintos graos de diferenciación, no tecido conxuntivo da masa visceral. D: Metacercaria (frecha) dun trematodo enquistada na musculatura do pé. E: Corte dun vaso branquial dun individuo con neoplasia diseminada; obsérvanse numerosas células cancerosas (frechas), algúns hemocitos normais (cabeza de frecha) e unha célula en mitose (frecha dobre). F: Corte branquial dun individuo afectado por granulomatose no que se observan granulomas de grande tamaño (estrelas).

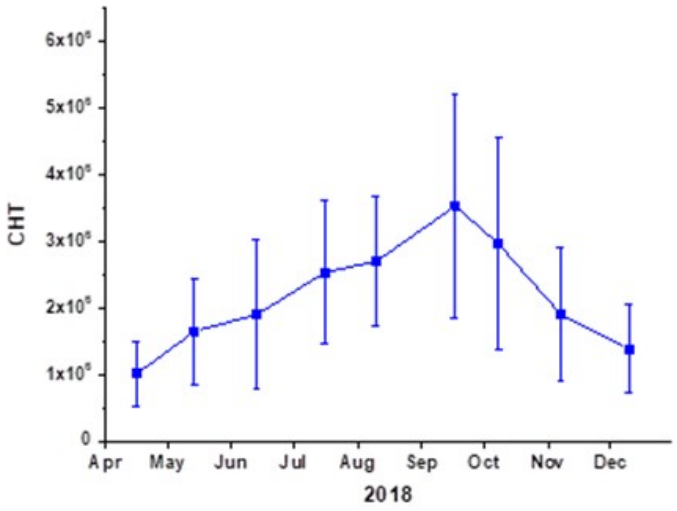



**Fig. 2**. Evolución temporal do conteo hemocitario total (CHT) na hemolinfa de berberechos de Noia, expresado como o número total de hemocitos por ml de hemolinfa. As barras verticais corresponden á desviación estándar

En 2018 iniciouse a posta a punto de procedementos de análise dos tipos hemocitarios e dunha serie de parámetros hemocitarios funcionais mediante citometría de fluxo. Ao longo de 2019, tras completar a posta a punto dos protocolos pertinentes, abordaranse os estudos funcionais para caracterizar a capacidade de implicación nas reaccións inmunes de cada tipo hemocitario do berberecho.

En relación co GT7, o obxectivo dos traballos planificados polo equipo do CIMA é identificar marcadores moleculares de resistencia á marteiliose mediante a comparación do proteoma e do transcriptoma de berberechos antes de enfrontarse á marteiliose con proteoma e transcriptoma dos berberechos superviventes tras un brote de marteiliose. Na comparación tamén se incluirá o transcriptoma de individuos sans e individuos con diferentes grados de intensidade de marteiliose durante un brote de marteiliose.

Os estudos previos do equipo do CIMA no período 2012-2017 demostraran a existencia dun patrón anual na dinámica temporal da marteiliose en bancos afectados da ría de Arousa; dito patrón supoñía a detección en cada verán dos primeiros casos de infección temperá en individuos recen recrutados, aumento progresivo da prevalencia e da mortalidade acumulada na cohorte recrutada ese mesmo ano, alcanzándose preto do 100% de mortalidade acumulada no outono ou no inverno seguintes, de forma que tralo inverno non quedaban superviventes que alcanzasen o estado adulto.

En 2018 iniciáronse os traballos de campo necesarios para obter o material biolóxico co que abordar as comparacións de proteoma e de transcriptoma mencionadas. Tendo en conta que os hemocitos son as células especializadas na resposta inmune e que o órgano no que prolifera o parasito causante da marteiliose, M. cochillia, é a glándula dixestiva, considerouse oportuno incluír nas análises proteoma e transcriptoma de hemocitos e glándula dixestiva por separado.

Para obter de forma fiable mostras puras de hemocitos en número suficiente é necesario utilizar individuos adultos, con tamaño suficientemente grande. Sen embargo, nas zonas afectadas por marteiliose non era posible contar con individuos adultos antes do inicio de cada brote de marteiliose pois a cohorte recrutada cada ano desaparece antes de alcanzar o estado adulto polo efecto letal da enfermidade.

Considerando as dificultades experimentais deseñáronse dous plans, A e B, o primeiro tratando de satisfacer a condición máis favorable (uso de adultos) pero con risco de non poder completarse por falta de superviventes ao brote, e o segundo utilizando a cohorte recrutada dunha zona afectada (uso de xuvenís) con maior probabilidade de conseguir superviventes tralo brote.

O plan A supuxo transplantar 200 berberechos adultos recollidos na área de Noia (sen brotes de marteiliose) ao banco de Lombos do Ulla (afectado por brotes de marteiliose) en abril de 2018, antes do inicio dun brote novo.

O material biolóxico (mostras de glándulas dixestivas e de hemolinfa pura) do que obter proteoma e transcriptoma antes do brote recolleuse en maio (para proteoma) e xullo (para transcriptoma). Mensualmente recolléronse mostras para detectar mediante histopatoloxía cando comezaría o brote de marteiliose e avaliar a súa evolución. Tras detectar os primeiros casos de marteiliose en xullo, a prevalencia e a mortalidade aumentaron progresivamente no lote de berberechos transplantados, de forma que en outubro a mortalidade acumulada superaba o 95% e a prevalencia entre os superviventes era do 90%, o que obrigou a refugar o plan A ante a baixísima probabilidade de encontrar un número suficiente de superviventes tralo brote de marteiliose.

O plan B supuxo centrarse na cohorte recrutada de forma natural no banco de Lombos do Ulla no verán de 2018. No inicio de xullo recolleuse o material biolóxico (mostra de

tecidos brandos sen separación diferencial de órganos) co que obter proteoma e transcriptoma antes do brote. O primeiro caso de marteiliose detectouse na segunda quincena de xullo. En outubro, cunha prevalencia do 25%, recolleuse o material biolóxico co que obter o transcriptoma de individuos con diferente grado de afectación por marteiliose (nula, lixeira, moderada, intensa e regresión) durante o brote. En 2019 recollerase o material biolóxico co que obter proteoma e transcriptoma dos superviventes tralo brote de marteiliose e realizaranse as análises e comparacións proteómicas e transcriptómicas.

# 7 ASESORAMENTO Á ADMINISTRACIÓN E AO SECTOR

## 7.1. INFORMES

Título: Informe de resultados correspondentes ás actividades do WP12. “Nutrición da cherna (*Polyprion americanus*)” para o informe anual do proxecto (4th Period Report).

Autor/a: Fátima Linares Cuerpo

Título: Informe final para o proxecto DIVERSIFY: elaboración como responsable do WP12 da parte correspondente a “Nutrición da cherna” e colaboración na elaboración dos informes finais do WP6, “Reprodución da cherna” e WP18, “Cultivo larvario da cherna”.

Autor/a: Fátima Linares Cuerpo

## 7.2. REUNIÓNS

Reunión: Reunión de coordinación do proxecto de investigación “Co-Operation for Restoring Cockle Shelfiseries and its Ecosystem Services in the Atlantic Area (COCKLES)”.

Asistente/s: Asunción Cao Hermida, Mª Jesús Carballal Durán, David Iglesias Estepa, Antonio Villalba García

Reunión: Reunións de planificación e coordinación de actividades cos participantes de Galicia no proxecto: Exploring the biological and socio-economic potential of new/emerging candidate fish species for the expansión of the European aquaculture industry. “DIVERSIFY”.

Asistente/s: Fátima Linares Cuerpo.

Reunión: Reunión final dos responsables das institucións participantes no proxecto de investigación “Exploring the biological and socio-economic potential of new/emerging candidate fish species for the expansión of the European aquaculture industry“(DIVERSIFY) celebrada en Bruxelas do 22 ó 25 novembro de 2018

Asistente/s: Fátima Linares Cuerpo.

Reunión: Asistencia á reunión “La I+D+i en Sanidade Animal en el CSIC”, organizada pola Fundación Vet e o CSIC.

Asistente/s: Antonio Villalba García

Reunión: Participación na reunión do comité executivo do consorcio de socios implicados no do proxecto de investigación “Co-Operation for Restoring Cockle Shellfiseries and its Ecosystem Services in the Atlantic Area (COCKLES)”.

Asistente/s: Antonio Villalba García

Reunión: Participación na reunión de membros do Consorcio Internacional do Xenoma do Berberecho.

Asistente/s: Antonio Villalba García

Reunión: Asistencia a unha reunión informativa sobre a transferencia de coñecemento e innovación, organizada polo Ministerio de Ciencia, Innovación e Universidades.

Asistente/s: Antonio Villalba García

# 8 ACTIVIDADES CIENTÍFICAS

## 8.1. ORGANIZACIÓN, PRESIDENCIA DE SESIÓNS E PARTICIPACIÓN EN FOROS CIENTÍFICOS

| | |
|---|---|
| Congreso: | IMMR'18 \| International Meeting on Marine Research |
| Investigadores/as: | de la Ballina, N. R., Villalba, A., Cao, A. |
| Actividade: | Coautores |
| Título da comunicación: | *Shotgun analysis to look for differences in immune ability between granulocytes and hyalinocytes of the European flat oyster.* |

| | |
|---|---|
| Congreso: | VI International Symposium on Marine Sciences ISC |
| Investigadores/as: | de la Ballina, N. R., Villalba, A., Cao, A. |
| Actividade: | Coautores |
| Título da comunicación: | *Differential proteomic profiles between granulocytes and hyalinocytes from Ostrea edulis.* |

| | |
|---|---|
| Congreso: | VI International Symposium on Marine Sciences. XIII Reunión Ibérica de Fitoplancton Tóxico 2018 |
| Investigadores/as: | Juan Blanco Pérez |
| Actividade: | Comité científico. Moderador sesión 4 |
| Título da comunicación: | Mesa de debate "*Métodos de detección de toxinas*" |

| | |
|---|---|
| Congreso: | VI International Symposium on Marine Sciences. XIII Reunión Ibérica de Fitoplancton Tóxico 2018 |
| Investigadores/as: | Juan Blanco Pérez |
| Actividade: | Ponente |
| Título da comunicación: | *Atypical okadaic acid derivatives in cockle*. |

| | |
|---|---|
| Congreso: | Wreckfish workshop |
| Investigadores/as: | Fátima Linares Cuerpo |
| Actividade: | Ponente |
| Título da comunicación: | *Wreckfish broodstock nutrition* |

| | |
|---|---|
| Congreso: | Mass Mortality event of the pen shell *Pinna nobilis* and emergency response —Time to elevate from the anecdotal. |
| Investigadores/as: | Grau, A., Valencia, J.M., Catanese, G, Villalba, A. |
| Actividade: | Ponente |
| Título da comunicación: | *The agent of the mass mortality of the fan mussel in the Mediterranean Sea*. |

| | |
|---|---|
| Congreso: | 18th International Conference on Harmful Algae |
| Investigadores/as: | Juan Blanco Pérez |
| Actividade: | Presentación |
| Títulos das comunicacións: | *Prorocentrum lima, a new diarrhetic shellfish toxins producer in northern Chile.*<br>*Depuration and anatomical distribution of domoic acid in the scallop Argopecten purpuratus.*<br>*First detection of domoic acid produced by Pseudo-nitzschia multistriata in Peruvian waters.*<br>*Association of Alexandrium ostenfeldii with spirolide accumulation in cultured mussels (Mytilus galloprovincialis) from northwest Mexico*. |

| | |
|---|---|
| Congreso: | Xornada COCKLES – Reunión con beneficiarios do proxecto. |
| Investigadores/as: | Villalba, A. |
| Actividade: | Ponente |
| Título da comunicación: | *Ameazas máis destacadas que afectan aos bancos de berberecho con énfase nos seus patóxenos*. |

| | |
|---|---|
| Congreso: | Workshop COCKLES Stakeholders. |
| Investigadores/as: | Villalba, A. |
| Actividade: | Presentación |
| Títulos da comunicación: | *The scientific approach of COCKLES to stakeholders issues*. |

| | |
|---|---|
| Congreso: | Business2Sea 2018: Desafios do Mar – 2030. |
| Investigadores/as: | Villalba, A., Magalhães, L. |
| Actividade: | Ponente |
| Título da comunicación: | *Cockles project: Cooperation for restoring cockle shellfisheries and its ecosystem services in the Atlantic Area* |

| | |
|---|---|
| Congreso: | VII Jornades del Medi Ambient de les Illes Ballears. |
| Investigadores/as: | Grau, A., Valencia, J.M., Villalba, A., López-Sanmartín, M., Navas, J.I., Catanese, G. |
| Actividade: | Ponente |
| Título da comunicación: | *Comprenent l'etiologia de l'esdeveniment de mortalitat massiva de la nacra (Pinna nobilis) a la Mediterrània* |

| | |
|---|---|
| Congreso: | Xornada COCKLES – Reunión con beneficiarios do proxecto. |
| Investigadores/as: | Villalba, A. |
| Actividade: | Ponente |
| Título da comunicación: | *Ameazas máis destacadas que afectan aos bancos de berberecho con énfase nos seus patóxenos.* |

**8.2. FORMACIÓN DE BOLSEIROS/AS**

| | |
|---|---|
| Titor/a: | Mª del Carmen López Gómez |
| Bolseiro/a: | Oscar Grande Ocampo |
| Especialidade: | Técnico Superior Anatomía Patolóxica e Técnico Superior en Produción Acuícola |

| | |
|---|---|
| Titor/a: | Mª Asunción Cao Hermida |
| Bolseiro/a: | Raquel Viturro García |
| Especialidade: | Técnico Superior en Análise e Control de Calidade |

| | |
|---|---|
| Titor/a: | Mª Asunción Cao Hermida |
| Bolseiro/a: | Guadalupe Pena Thomas |
| Especialidade: | Técnico Superior en Análise e Control de Calidade |

| | |
|---|---|
| Titor/a: | Mª Asunción Cao Hermida |
| Bolseiro/a: | Patricia Díaz Cedillo |
| Especialidade: | Técnico Superior en Análise e Control de Calidade |

| | |
|---|---|
| Titor/a: | Mª Asunción Cao Hermida |
| Bolseiro/a: | Alba Pérez Caamaño |
| Especialidade: | Técnico Superior en Análise e Control de Calidade |

| | |
|---|---|
| Titor/a: | María Jesús Carballal Durán |
| Bolseiro/a: | Jenifer Fernández Gonzaléz |
| Especialidade: | Técnico especialista en Anatomía Patolóxica e Citoloxía |

| | |
|---|---|
| Titor/a: | María Jesús Carballal Durán |
| Bolseiro/a: | Irene López Maneiro |
| Especialidade: | Técnico especialista en Anatomía Patolóxica e Citoloxía |

| | |
|---|---|
| Titor/a: | Fátima Linares Cuerpo |
| Bolseiro/a: | Alexis Araujo Sendín |
| Especialidade: | Técnico Superior en Produción Acuícola |

| | |
|---|---|
| Titor/a: | Fátima Linares Cuerpo |
| Bolseiro/a: | Noelia Fuentes Villar |
| Especialidade: | Técnico Superior en Produción Acuícola |

| | |
|---|---|
| Titor/a: | Fátima Linares Cuerpo |
| Bolseiro/a: | Sonia Díaz Carballal |
| Especialidade: | Técnico Superior en Produción Acuícola |

| | |
|---|---|
| Titor/a: | Ana Alonso Martínez |
| Bolseiro/a: | Alba Ameal Romero |
| Especialidade: | Técnico Superior en Produción Acuícola |

| | |
|---|---|
| Titor/a: | Susana Nóvoa Vázquez |
| Bolseiro/a: | Sonia Castilla del Río |
| Especialidade: | Técnico Superior en Produción Acuícola |

| | |
|---|---|
| Titor/a: | Justa Ojea Martínez |
| Bolseiro/a: | Eduardo Granjel Piñeiro |
| Especialidade: | Técnico Superior en Produción Acuícola |

| | |
|---|---|
| Titor/a: | Susana Nóvoa Vázquez |
| Bolseiro/a: | Bibiana Viñas Camiña |
| Especialidade: | Técnico Superior en Produción Acuícola |

| | |
|---|---|
| Titor/a: | Justa Ojea Martínez |
| Bolseiro/a: | Nerea Fontán Valdivia |
| Especialidade: | Técnico Superior en Produción Acuícola |

### 8.3. PRÁCTICAS DE MÁSTER. TRABALLOS FIN DE MÁSTER (TFM) PRESENTADOS

| | |
|---|---|
| Autor: | Pablo Fernández Pena |
| Directoras do TFM: | Dorotea Martínez Patiño e Susana Novoa Vázquez |
| Máster: | Máster Interuniversitario de Acuicultura (UDC/USC/UVIGO) |

| | |
|---|---|
| Autor: | Daniel Prieto Sierra |
| Directoras do TFM: | Dorotea Martínez Patiño |
| Máster: | Máster Interuniversitario de Acuicultura (UDC/USC/UVIGO) |

### 8.4. DIRECCIÓN DE TESES DOUTORAIS. PRESENTACIÓN DE TESES DOUTORAIS

| | | |
|---|---|---|
| Tema: | Estudio proteómico del sistema inmune de la ostra plana europea (*Ostrea edulis*) y su interacción con parásitos *Bonamia* spp. | |
| Doutorando/a: | Nuria Rodríguez de la Ballina | Licenciada en Bioloxía |
| Titor/a e Director/a da Tese: | Villalba García, A. (tutor y codirector), Cao Hermida, A. (codirectora), Hermida Prieto, M. (codirector). | |
| Data e lugar de presentación: | 23/10/2018. Instituto de Acuicultura. Universidade de Santiago de Compostela. | |

| | | |
|---|---|---|
| Tema: | Optimización del cultivo intensivo de la almeja fina Ruditapes decussatus (Linnaeus, 1758) en criadero. | |
| Doutorando/a: | José Andrés Aranda Burgos | Licenciado en Bioloxía |
| Titor/a e Director/a da Tese: | Sánchez López, José Luis (director), Martínez Patiño, Dorotea (Codirectora), da costa Gonzalez, Fiz (codirector) | |
| Data e lugar de presentación: | 11/01/2018. Instituto de Acuicultura. Universidade de Santiago de Compostela. | |

| | | |
|---|---|---|
| Tema: | Consideracións biolóxicas, ecolóxicas e produtivas relativas ao cultivo de ostra rizada *Crassostrea gigas* (Thunberg) nas rías galegas. | |
| Doutorando/a: | Luis Rodríguez González | Licenciado en Bioloxía |
| Titor/a e Director/a da Tese: | Jaime Montes Pérez e David Iglesias Estepa | |
| Data e lugar de presentación: | | |

### 8.5. PARTICIPACIÓN EN TRIBUNAIS DE TESES DOUTORAIS.

| | |
|---|---|
| Membros do tribunal | María Jesús Carballal Durán. Vogal<br>David Iglesias Estepa. Vogal. |
| Doutorando/a: | Nuria Rodríguez de la Ballina |
| Tema: | Estudio proteómico del sistema inmunitario de la ostra plana Ostrea edulis y su interacción con parásitos Bonamia spp. |
| Data e lugar de presentación: | 23/10/2018. Instituto de Acuicultura. Universidade de Santiago de Compostela. |

**8.6. CURSOS IMPARTIDOS.**

| | |
|---|---|
| Investigador/a | Juan Carlos Blanco Pérez |
| Tema: | Práctica sobre el uso de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas para el análisis de toxinas marinas |
| Lugar: | CICESE, Ensenada, Baja California, México |

| | |
|---|---|
| Investigador/a | Dorotea Martínez Patiño; Susana Novoa Vázquez; Justa Ojea Martínez |
| Tema: | Master Interuniversitario de Acuicultura (UDC/USC/UVIGO). Prácticas de cultivo de moluscos. |
| Lugar: | CIMA – RIBADEO (Lugo) |

| | |
|---|---|
| Investigador/a | Antonio Villalba García |
| Tema: | Master Interuniversitario de Acuicultura (UDC/USC/UVIGO).<br>Tema 4 "Enfermidades neoplásicas",<br>Tema 5 "Estratexias de loita fronte a enfermidades en invertebrados"<br>Sesión de prácticas da materia "Enfermidades en Invertebrados" |
| Lugar: | CIMA – CORÓN (Pontevedra) |

| | |
|---|---|
| Investigador/a | Antonio Villalba García |
| Tema: | Máster Universitario en Investigación en Ciencias, Especialidade en Bioloxía Animal.<br>“Epidemias de cáncer en moluscos bivalvos” |
| Lugar: | Universidad del País Vasco (Estación Marina de Plentzia) |

| | |
|---|---|
| Investigador/a | Antonio Villalba García |
| Tema: | European Master of Science In Marine Environment and Resources.<br>12th International Postgraduate Course - Histology and Histopathology of Aquatic Animals<br>“General Histopathology of molluscs",<br>"Neoplastic lesions in molluscs",<br>"Practical session 2: Microscopical observations on general molluscan histopathology“<br>"Practical session 3: Microscopical observations on general molluscan histopathology (cont.) and identification of neoplastic lesions“ |
| Lugar: | Universidad del País Vasco (Estación Marina de Plentzia) |

| | |
|---|---|
| Investigador/a | Antonio Villalba García |
| Tema: | Curso de Posgrado Propio da Universidade de Santiago de Compostela<br>Curso Básico. Teórico-Práctico de Diagnóstico Histopatolóxico e Manexo das Principais Enfermidades de Moluscos Bivalvos |
| Lugar: | Facultade de Veterinaria, Campus de Lugo |

### 8.7. EDICIÓN DE PUBLICACIÓNS CIENTÍFICAS.

| | |
|---|---|
| Editores/as: | Juan Carlos Blanco Pérez e Beatriz Reguera Ramírez |
| Título: | Toxins. Special Issue: Dinophysis<br>Toxins: Distribution, Fate in Shellfish and Impacts |
| Editores/as: | Antonio Villalba García (Revisor do Comité Editorial) |
| Título: | “Diseases of Aquatic Organisms” |

### 8.8. REVISIÓN DE ARTIGOS EN PUBLICACIÓNS CIENTÍFICAS.

| | |
|---|---|
| Investigador/a: | Juan Carlos Blanco Pérez |
| Revistas: | Chemosphere<br>Science of the total environment<br>Toxins (2)<br>Aquatic toxicology (2)<br>Journal of Sea Research<br>Harmful Algae |
| Investigador/a: | Mª del Carmen López Gómez |
| Revistas: | Marine Environmental Research |
| Investigador/a: | Antonio Villalba García |
| Revistas: | Aquaculture<br>Journal of Invertebrate Pathology |

### 8.9. CONFERENCIAS.

| | |
|---|---|
| Investigador/a: | Juan Carlos Blanco Pérez |
| Título das conferencias | Efectos del fitoplancton nocivo sobre los organismos marinos.<br>Esquemas de atención a FAN en sistemas de producción de moluscos bivalvos en España.<br>Uso de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas para el análisis de toxinas nas s marinas. |
| Lugar: | CICESE, Ensenada, Baja California, México |
| Investigador/a: | Juan Carlos Blanco Pérez |
| Revistas: | Acumulación de ficotoxinas en moluscos bivalvos |
| Lugar: | Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada (México) |

# 9 FORMACIÓN DO PERSOAL DO CIMA

### 9.1. ASISTENCIA A CURSOS

| | |
|---|---|
| Investigador/a: | Fernando Manuel Febrero Mayor, Pedro Cuiñas Olmedo |
| Curso: | Xestión de pesqueiras con datos limitados: aplicación á pesqueira da navalla e outros recursos sedentarios. |
| Profesor/a: | Ana Parma, do Centro Nacional Patagónico (CENPAT-CONICET, Arxentina) |
| Datas: | 2 e 3 de maio de 2018 |

| | |
|---|---|
| Investigador/a: | Fernando Manuel Febrero Mayor |
| Curso: | I Obradoiro sobre a bioloxía da navalla e a súa aplicación á xestión pesqueira |
| Profesor/a: | Alba Hernández Otero (ECIMAT de Toralla da Universidade de Vigo) |
| Datas: | 18 outubro de 2018 |

# 10 CONVENIOS DE COLABORACIÓN

Convenio de colaboración entre a Xunta de Galicia a través da Consellería do Mar e a Asociación de Acuicultores “Illa do Santo” de Bueu (Pontevedra), para o cultivo de peixes en gaiolas.

Convenio de colaboración entre a Consellería do Mar, a Universidade de Vigo e ANFACO – Cecopesca para a realización da Acción de investigación: “Estudo da bioloxía, status poboacional e diversidade xenética da holoturia (Holothuria forskali) na Ría de Vigo”.

Convenio de colaboración entre a Consellería do Mar e a Universidade de Vigo para a realización da acción de investigación “Estudo da variabilidade espacial do ciclo reprodutivo da navalla na ría de Vigo e a súa aplicación á xestión pesqueira”.

# 11 PUBLICACIÓNS

**11.1. ARTIGOS EN REVISTAS INCLUÍDAS NO SCI**.

BLANCO, J. Accumulation of Dinophysis Toxins in Bivalve Molluscs. Toxins.

BLANCO, J.; MARTIN-MORALES, E.; ALVAREZ, G. Stability of okadaic acid and 13-desmethyl spirolide C in seawater and sediment. Marine Chemistry.

BLANCO, J.; ALVAREZ, G.; RENGEL, J.; DIAZ, R.; MARINO, C.; MARTIN, H.; URIBE, E. Accumulation and Biotransformation of Dinophysis Toxins by the Surf Clam *Mesodesma donacium*. Toxins.

CATANESE, C. ; GRAU, A.; VALENCIA, J. M.; GARCÍA-MARCH, J. R.; VÁZQUEZ-LUIS, M.; ALVAREZ, E.; DEUDERO, S.; DARRIBA, S.; CARBALLAL, M.J.; VILLALBA, A. *Haplosporidium pinnae sp*. nov., a haplosporidian associated mass mortalities of the fan mussel, Pinna nobilis, in the Western Mediterranean Sea. Journal Invertebrate Pathology, 157: 9-24.

CONDE-SIEIRA, M.; GESTO, M.; BATISTA, S.; LINARES, F.; R. VILLANUEVA, J.L.; MÍGUEZ, J.M.; SOENGAS, J.L.; VALENTE, L.M.P. Influence of vegetable diets on physiological and immune responses to thermal stress in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). PLOS ONE | https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194353

DE LA BALLINA, N.R. ; VILLALBA, A. ; CAO, A. Proteomic profile of the European flat oyster *Ostrea edulis* haemoymph in response to bonamiosis and identification of candidate proteins as markers of resistance. Diseases of Aquatic Organisms 128. 127-145.

GARCIA-PORTELA, M.; RIOBO, P.; REGUERA, B.; GARRIDO, J.L.; BLANCO, J.; RODRIGUEZ, F. Comparative ecophysiology of *Dinophysis acuminata* and *D. acuta* (DINOPHYCEAE, DINOPHYSIALES): effect of light intensity and quality on growth, cellular toxin content, and photosynthesis. Journal of Phycology.

KERR, R.; WARD, G.M.; STENTIFORD, G.D.; ALFJORDEN, A.; MORTENSEN, S.; BIGNELL, J.P.; FEIST, S.W.; VILLALBA, A.; CARBALLAL, M.J.; CAO, A.; ARZUL, I.; RYDE, D.; BASS, D. *Marteilia refringens* and *Martelia pararefringens* sp. nov. are distinct parasites of bivalves and have different european distributions. Parasitology, 145(11): 1483-1492.

HASANUZZAMAN, A.F.M.; RUBIOLO, J.A.; ROBLEDO, D.; GÓMEZ-TATO, A.; ALVAREZ DIOS, J.A.; FERNÁNDEZ-BOO, S.; CAO, A.; VILLALBA, A.; PARDO, B.G.; MARTÍNEZ, P. Gene Expression Analysis of *Ruditapes philippinarum* haemocytes after experimental *Perkinsus olseni* zoospore challenge and infection in the wild. Fish and Shellfish Immunology 72:611-621.

Hasanuzzaman, A.F.M.; Rubiolo, J.A.; Robledo, D.; Gómez-Tato, A.; Alvarez Dios, J.A.; Fernández-Boo, S.; Cao, A.; Villalba, A.; Pardo, B.G.; Martínez, P. Gene Expression Analysis of *Ruditapes philippinarum* haemocytes after experimental *Perkinsus olseni* zoospore challenge and infection in the wild. Fish and Shellfish Immunology 72:611-621.

Moutinho, S.; Linares, F.; Rodríguez, J.L.; Sousa, V.; Valente, L.M.P. Inclusion of 10% seaweed meal in diets for juvenile and on-growing life stages of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Journal of Applied Phycology https://doi.org/10.1007/s10811-018-1482-6.

Papadaki, M.; Peleteiro, J.B.; Alvarez-Blázquez, B.; Rodríguez Villanueva, J.L.; Linares, F.; Vilar, A.; Pérez Rial, E.; Lluch, N.; Fakriadis, I.; Sigelaki, I.; Mylonas, C. Description of the Annual Reproductive Cycle of Wreckfish *Polyprion americanus* in Captivity. Fishes 3, 43.

PAREDES-BANDA, P.; GARCÍA-MENDOZA, E.; PONCE-RIVAS, E.; BLANCO, J.; ALMAZÁN-BECERRIL, A.; GALINDO-SÁNCHEZ, C.; CEMBELLA, A. Association of the Toxigenic Dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* With Spirolide Accumulation in Cultured Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) From Northwest Mexico. Frontiers in Marine Science.

Pazos, G.; Fernandez, J.; Linares, F.; Sanchez, J.; Otero, J.J.; Iglesias, J.; Domingues, P. The complete life cycle in captivity of the spider crab, *Maja brachydactyla*, Herbst 1788. Aquaculture Research, 49; 2440-2445.

Ronza, P.; Cao, A.; Robledo, D.; Gómez-Tato, A.; Álvarez-Dios, J.A.; Hasanauzzaman, A.F.M.; Quiroga, M.I.; Villalba, A.; Pardo, B.G.; Martínez, P. Long-term affected flat oyster (*Ostrea edulis)* haemocytes show differential gene expression from naïve oysters in response to Bonamia ostreae. Genomics, 110:390-398.

**11.2. ARTIGOS EN REVISTAS NON INCLUÍDAS NO SCI.**

Bravo, I., Blanco, J. e outros (13). XIII Iberian meeting on harmful algae and biotoxins (REDIBAL). Harmful Algae News.

Mylonas, C.C.; Rodríguez, J.L.; Linares, F.; Pazos, G.; Pérez-Rial, E., Lluch, N.; Perez, M.; Álvarez- Blázquez, B.; Vilar, A.; Robles, R. Breakthrough in the reproduction and larval rearing of wreckfish in the DIVERSIFY project. Aquaculture Europe AE 2018. vol.43. 14-16.

**11.3. CONTRIBUCIÓNS EN LIBROS.**

Grau, A.; Valencia, J.M.; Villalba, A.; López-Sanmartín, M.; Navas, J.I.; Catanese, G.
Comprenent l'etiologia de l'esdeveniment de mortalitat massiva de la nacra (Pinna nobilis) a la Mediterrània.

Pons, G.X., del Valle, L. Vicens, D., Pinya, S., McMinn, M., Pomar, F., (Eds.)
VII Jornades del Medi Ambient de les Illes Balears – Ponències i resums, Societat d'História Natural de les Balears y Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca. pp. 200-203. ISBN 978-84-09-06632-2.

# 12 OUTRA INFORMACIÓN

ASUNCIÓN CAO HERMIDA

Co-titora do Traballo Fin de Grao de Tania Varela Chorén titulado "*Análisis proteómico de la respuesta de la ostra Magallana gigas a la infección por la microvariante del virus herpes 1 de ostreidos*". Lectura febreiro 2018. Facultad de Biología, Ciencias Ambientales y Química. Universidad de Alcalá.

Membro do "International Common Cockle Genome Consortium" para a secuenciación e anotación do xenoma do berberecho Cerastoderma edule, financiado a través do proxecto SCUBA CANCER (ERC Starting Grant, 716290), cuxo investigador principal é José Manuel Castro Tubío (Universidade de Vigo), quen tamén preside o consorcio.

FÁTIMA LINARES CUERPO

Participación na elaboración do "Technical Manual- wreckfish (Polyprion americanus)" dirixido o sector da acuicultura

Elaboración dos "Deliverables Report" do proxecto DIVERSIFY: D12.1.:"*Effect of live prey enrichment products on wreckfish larval performance*" e D12.2: "*Influence of broodstock feeding regimes for fecundity and spawn quality*"

JAIME MONTES PÉREZ

Membro do Tribunal de selección de persoal laboral temporal para a contratación de Titulado/a Superior Licenciado/a ou Graduado/a en Bioloxía (Grupo 1, Categoría 10).

CARLOS GABIN SÁNCHEZ (Director do CIMA)

MARTEC 2018: Conferencia final do proxecto LIFE Iseas 2

VI Simposio Internacional de Ciencias del Mar.

Annual Event – Interreg Area Atlantica (22 de outubro – Vigo).

Caravana de Acuicultura 2018 – Cambados (Ría de Arousa).

"*Programa formativo en xestión estratéxica e operativa de centros e unidades de investigación de excelencia*". Sede FEUGA

*Guía de Boas Prácticas do cultivo de mexillón en Galicia para a redución dos lixos mariños*. Consello Regulador do Mexillón de Galicia.

Business2SEA – Forum OCÉANO (Porto-Portugal).

DIVERSIFY: Wreckfish aquaculture state of the art and perspectives. IEO (Xullo 2018 – Vigo) .

Presentación da publicación LEMGAL, resultado da Acción de investigación CIMA 16/03 "Listado de especies mariñas de Galicia". Dito acto tivo lugar nas instalacións do CIMA Corón, con presenza da Conselleira do Mar, Rosa Quintana; a Directora Xeral de Desenvolvemento Pesqueiro, Susana Rodríguez; o Director do CIMA, Carlos Gabín e o autor coordinador dos traballos, Rafael Bañón.

FORO DOS RECURSOS MARIÑOS E DA ACUICULTURA DAS RÍAS GALEGAS, 10 e 11 de outubro – O Grove

# 13 ORZAMENTOS

**I.- Distribución do orzamento por capítulos**

| Capítulo | CANTIDADE (€) |
|---|---|
| Capítulo I: Gastos de persoal | 2.920.389,98€ |
| Capítulo II: Gastos correntes en bens e servizos | 182.001,00€ |
| Capítulo IV: Transferencias correntes | 82.200,00€ |
| Capítulo VI: Inversións reais | 1.139.446,00€ |
| Capítulo VII: Transferencias de capital | |
| Total | **4.324.036,98**€ |

| Orixe dos fondos | CANTIDADE (€) |
|---|---|
| Consellería do Mar. Xunta de Galicia<br>a)Accións de Investigación que desenvolve o CIMA<br>b)Convenios con ENTIDADES externas | 4.187.214,36€ |
| I+D da Xunta de Galicia | |
| Administración Xeral do Estado | |
| Unión Europea (INTERREG, VI Programa Marco,...) | 136.827,62€ |
| Total | **4.324.036,98**€ |

Xacobeo 2021

galicia

XUNTA
DE GALICIA