



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 346 122**

② Número de solicitud: 200802927

⑤ Int. Cl.:
A01K 61/00 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **16.10.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **08.10.2010**

Fecha de la concesión: **21.07.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **03.08.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
03.08.2011

⑰ Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Piferrer Circuns, Francesc;
Blázquez Peinado, Mercedes y
Navarro Martín, Laia**

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉑ Título: **Método para el control térmico de la proporción de sexos en la lubina.**

㉒ Resumen:

Método para el control térmico de la proporción de sexos en la lubina.

Método para aumentar la proporción de hembras en lubinas producidas en cultivo que comprende mantener los valores de temperatura del agua entre 13 y 17°C desde la fertilización hasta un día comprendido entre los 53 y 64 dpf (días post fertilización).

ES 2 346 122 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Método para el control térmico de la proporción de sexos en la lubina.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento útil en acuicultura, que permite obtener un mayor porcentaje de lubinas hembra, en comparación con los métodos de producción actualmente empleados en piscifactorías, sin necesidad de recurrir al tratamiento hormonal. Se trata de un método que se aprovecha de la labilidad gonadal a los efectos de la temperatura durante ciertos periodos del desarrollo y la posibilidad que la temperatura tiene de influir sobre la proporción de sexos.

10 **Estado de la técnica anterior**

15 En condiciones naturales, la proporción de sexos, es decir, el número de machos y hembras de una población, tiende a ser aproximadamente 1:1 (50% machos, 50% hembras). La proporción de sexos es el resultado de la concurrencia del proceso de determinación sexual seguido del de diferenciación sexual. La determinación sexual es el proceso genético o ambiental mediante el cual se establece el género o sexo del cigoto tras la fertilización, y este proceso puede ser básicamente, al menos por lo que concierne a peces gonocoristas (con sexos separados), de dos tipos (Devlin y Nagahama, 2002. *Aquaculture* 208: 191-364; Penman y Piferrer, 2008. *Reviews in Fisheries Science*, 16 (S1), 16-34):

20 - Determinación sexual genotípica (comúnmente referida como GSD ó *genotypic sex determination*).

- Determinación sexual ambiental (ESD ó *environmental sex determination*), en cuyo caso es el valor de una variable ambiental quien determina el sexo. Dentro de los factores ambientales, uno de los más influyentes es la temperatura del agua donde crecen los peces y es el mejor estudiado de ellos, siendo otros el pH del agua y la densidad de cultivo (Baroiller *et al.*, 1999. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55: 910-931). Cuando la temperatura es el factor ambiental determinante del sexo, entonces se habla de determinación sexual por temperatura (TSD ó *temperature-dependent sex determination*). En especies con TSD no se puede hablar de sexo genético propiamente, puesto que no existe como tal. Un individuo sólo determina su sexo al cabo de un tiempo de vida en respuesta a un estímulo ambiental.

30 Sin embargo, en muchas especies con GSD la temperatura puede influir también en la proporción de sexos. Esta influencia puede ser muy leve, en cuyo caso el ambiente influye sólo modulando la expresión del sexo genético en muy pocos individuos o sólo bajo condiciones ambientales extremas, o muy potente, de forma que el ambiente determina el sexo de todos o la mayor parte de los individuos. En estos casos, la determinación sexual inicial sigue siendo genética, pero la temperatura influye en el resultado final, de forma que el sexo resultante no coincide necesariamente con el sexo genético. Un ejemplo muy estudiado de estas especies (llamadas GSD +TE) es la lubina.

40 La diferenciación sexual es el proceso mediante el cual un conjunto de mecanismos moleculares, genéticos, embriológicos, fisiológicos y morfológicos producen un macho o una hembra a partir de un cigoto originado por unos padres concretos y de un genotipo específico en un ambiente dado (Bull, 1993). La diferenciación sexual en los peces es muy dependiente de los esfereoides sexuales (“masculinos”: andrógenos y “femeninos”: estrógenos), de tal forma que, en general, los andrógenos masculinizan y los estrógenos feminizan cuando actúan sobre una gónada sexualmente indiferenciada (Piferrer, 2001. *Aquaculture* 197, 229-281). Es en esta propiedad en la que se basa la terapia endocrina o tratamiento hormonal para conseguir el sexo deseado.

45 En acuicultura, para determinadas especies de peces y en algunos crustáceos, son preferidos los animales de un determinado sexo, pues poseen mejores características productivas que los del otro sexo. Estas características pueden incluir, por ejemplo, un crecimiento más acelerado o una maduración sexual tardía. Un crecimiento acelerado permite obtener peces de mayor peso en un tiempo menor, con las ventajas económicas que conlleva una puesta en el mercado más rápida y menos costosa. En cuanto a los tiempos de maduración sexual, por ejemplo, los machos de muchas especies de peces, entre las que se encuentran varios salmónidos, la lubina, el rodaballo, etc., maduran en promedio un año antes que las hembras. Los cambios secundarios causados por la maduración reducen el valor de mercado y obligan al productor a cosechar el producto antes de que haya logrado su crecimiento potencial completo. Por tanto, el control de la proporción de sexos puede llevar asociadas importantes ventajas de cara a aumentar la rentabilidad en acuicultura (Piferrer, F. 2001. *Aquaculture* 197: 229-281). Prueba de ello es que se aplica de forma rutinaria en el cultivo comercial de varias especies (Hulata, 2001. *Genetica* 111:155-173), principalmente de salmónidos.

60 Actualmente, el control del sexo en organismos acuáticos cultivados se logra usando métodos endocrinos y de manipulación genética (principalmente seleccionando el número y origen de juegos enteros de cromosomas), o una combinación de los dos. Los métodos endocrinos implican el uso de compuestos androgénicos (testosterona, 11-beta hidroxandrostenediona, y 17-alfa-metiltestosterona, principalmente), o estrogénicos (estradiol 17-beta y 17-alfa-etinilestradiol, principalmente) durante las primeras etapas de desarrollo, que permiten obtener peces de un determinado sexo, sobrepasando la determinación sexual genética (por ejemplo, Piferrer & Donaldson 1987 *Aquaculture* 77 (2-3):251-262; Piferrer & Donaldson 1992. *Aquaculture* 106(2):183-193). En ciertas especies con determinación genotípica monofactorial (por ejemplo, XX/XY) es también posible usar esteroides sexuales para la inversión sexual de peces, que pueden producir gametos monosexo.

Entre las técnicas de manipulación de juegos de cromosomas, se encuentran la inducción de la ginogénesis y de la triploidía. La inducción de ginogénesis es una técnica por la que se obtienen individuos en los que todos sus cromosomas han sido heredados de la madre. El procedimiento general consiste en que antes de la fertilización artificial se somete al esperma a radiación ultravioleta para eliminar su carga genética. Una vez que el esperma ha fecundado al óvulo se le aplica un choque térmico para retener el segundo corpúsculo polar y restaurar la diploidía (2n). De esta forma se obtienen individuos diploides con carga genética procedente solamente de la madre. Estos individuos son viables y a nivel externo son idénticos a los diploides. Sin embargo, si el sistema de determinación del sexo es del tipo XX/XY todos los individuos ginogenéticos deberían ser hembras. La triploidía es otra herramienta al servicio de la acuicultura por la que se obtienen individuos totalmente estériles, que no van a invertir energía en la maduración sexual por lo que no habrá pérdidas de peso en su crecimiento. Es un método parecido a la inducción a la ginogénesis, con la diferencia de que no se aplica la radiación al esperma, pero sí el choque térmico al óvulo, con lo que se obtienen individuos 3n que serán estériles (Felip *et al.*, 1997. *Aquaculture* 152: 287-298).

La lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) es la segunda especie en importancia en la piscicultura marina en España y en la que se han estudiado más aspectos relativos a la reproducción (Zanuy *et al.*, 2001. *Aquaculture* 202: 187-203). En condiciones de cultivo en países Mediterráneos la proporción machos:hembras es de aproximadamente 3:1, lo cual es una desventaja puesto que las hembras crecen alrededor de un 30% más que los ejemplares del sexo masculino, y estos últimos muchas veces alcanzan la madurez antes de conseguir un peso adecuado para el mercado, lo que a su vez disminuye aún más la tasa de crecimiento a partir del segundo año de vida e incrementa la mortalidad y una mayor predisposición a ciertas enfermedades (Carrillo *et al.*, 1995. N.R. Bromage and R.J. Roberts (Editors). *Broodstock Management and Egg Larval Quality*. Blackwell Science, Oxford, pp. 138-168).

La lubina no posee cromosomas sexuales propiamente dichos y la proporción de sexos depende tanto de los progenitores usados como de la interacción del genotipo con el ambiente (Saillant *et al.*, 2002. *Journal of Experimental Zoology* 292: 494-505.; Piferrer, *et al.*, 2005. *General and Comparative Endocrinology* 142: 102-110; Saillant, *et al.*, 2006. *Aquaculture* 254, 139-147; Vandeputte *et al.*, 2007. *Genetics* 176, 1049-1057). Es una especie gonocorista y recientemente, se ha sugerido que la determinación sexual es del tipo poligénico con influencias ambientales, concretamente de la temperatura del agua durante las primeras fases del desarrollo (Vandeputte *et al.*, 2007. *Genetics* 176, 1049-1057). Este es uno de los sistemas de determinación sexual más complejos que existen, e incluso incrementos de pocos grados pueden alterar significativamente la proporción de sexos hacia un mayor número de machos, siguiendo el patrón común para todos los peces (Ospina-Álvarez & Piferrer 2008. *PLoS ONE* 3 (7): e2837).

Puesto que en la lubina, las hembras crecen aproximadamente un 30% más que los machos (Saillant *et al.*, 2001. *Aquaculture* 202: 371-387), y alcanzan la talla comercial (~400 g) más de 100 días antes que los machos, un cultivo con una mayor proporción de hembras supone un claro aumento de la producción para las empresas dedicadas su cultivo. Ello se puede conseguir mediante feminización directa (Blázquez *et al.*, 1998. *Fish Physiology and Biochemistry* 18: 37-47) con tratamiento con esferoides sexuales. Éstos, aunque permitidos por la legislación vigente, en según que circunstancias (método indirecto de feminización) no se usan debido tanto a las lógicas reticencias de los productores a mezclar sus productos con estas prácticas como el más que probable rechazo de los consumidores a consumir pescado tratado con hormonas. La estrategia más aconsejable es a través de selección genética de los reproductores (Vandeputte *et al.*, 2007. *Genetics* 176: 1049-1057), estrategia que puede tener limitaciones en cuanto a su aplicación a largo plazo. Existe por tanto, un notable interés en la obtención de un método que permita incrementar la proporción de hembras en esta especie en condiciones de cultivo.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un método que permite aumentar la proporción de hembras hasta el 90% en el cultivo de lubinas, frente al 25% promedio actual (porcentaje a veces incluso nulo), el sexo que crece más y que, por tanto, es más deseado por los productores de pescado de piscifactoría, sin necesidad de recurrir al tratamiento hormonal. Este método se aprovecha de la labilidad gonadal a los efectos de la temperatura durante ciertos periodos del desarrollo y la posibilidad que la temperatura tiene de influir la proporción de sexos.

El método se basa en el empleo de bajas temperaturas que, aunque se ha visto que retardan el crecimiento en lubinas expuestas durante más de 60 días, cuando las poblaciones son expuestas durante 30-60 días muestran un crecimiento compensatorio hacia el día 150 post fertilización (dpf). Las hembras alcanzan un tamaño comercial (400 g) durante el segundo año, unos 100 días antes que los machos, y a pesar del lento crecimiento inicial, la biomasa del grupo tratado con bajas temperaturas durante 60 días fue un 6,1% mayor que en el control en el momento de comercialización.

Aunque los resultados muestran que no hay un régimen térmico capaz de inducir la completa feminización en la lubina, el cultivo a <17°C durante 60 dpf da lugar a un balance óptimo entre las ventajas del incremento en la proporción de hembras y las desventajas de un crecimiento inicial más lento.

En el método de la invención se presentan unos valores óptimos y unos rangos en los que el equilibrio entre ventajas (feminización) e inconvenientes (mayor tiempo para llegar al final del preengorde debido al uso de temperaturas más bajas) se combinan de tal forma que el resultado final (mayor biomasa producida debido a un mayor número de hembras y crecimiento compensatorio) es positivo.

ES 2 346 122 B1

Así pues, en un primer aspecto de la invención se proporciona un método para aumentar la proporción de hembras en lubinas producidas en cultivo, de ahora en adelante método de la invención, que comprende mantener los valores de temperatura del agua entre 13 y 17°C desde la fertilización hasta un día comprendido entre los 53 y 64 dpf.

Una temperatura de 14°C resulta adecuada para la puesta, mientras que a 13°C ya se registra una disminución de la supervivencia. Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención la temperatura del agua se mantiene entre 14 y 17°C.

Temperaturas de 13-15°C serían óptimas para la puesta de los huevos, mientras que para acelerar el crecimiento serían más adecuadas temperaturas próximas a los 17°C. Por tanto, tras la eclosión de todos los huevos (inicio de la fase larvaria), resulta adecuado subir la temperatura hasta 16 grados a 0.5 grados/día (lo que llevaría un mínimo de 2 días y máximo de 6). Así pues, en otra realización preferida el método de la invención comprende:

a) incubar los huevos tras ser fertilizados a unos valores de temperatura comprendidos entre 13 y 15°C, los habituales durante la época de puesta, hasta la eclosión de los mismos.

b) cultivar las larvas tras la eclosión de los huevos, a una temperatura comprendida entre 14 y 16°C, desde el día de la eclosión hasta un día máximo comprendido entre el 64 y el 53 post fecundación, de manera que un cultivo a menor temperatura requiere mayor tiempo de incubación.

Preferiblemente, puesto que a una mayor temperatura aumenta la velocidad del crecimiento, el método de la invención comprende además:

c) incrementar la temperatura a razón de 0.5°C/día, desde una temperatura comprendida entre 14 y 16°C a una temperatura comprendida entre 20 y 22°C,

d) mantener una temperatura constante comprendida entre 20°C y 22°C durante la fase de nursery y preengorde (hasta el día 150-180 post fertilización).

En otra realización preferida del método de la invención, el incremento de temperatura, desde una temperatura comprendida entre 14°C y 16°C a una temperatura comprendida entre 20 y 22°C, se produce desde el día 61 al 72 post fertilización, y posteriormente se mantiene la temperatura a un intervalo comprendido entre 20°C y 22°C desde el día 73 al 75 post fertilización.

En esta memoria se incluyen dentro del término "lubina" a organismos de la especie *Dicentrarchus labrax* L. que pertenecen al Superreino *Eukaryota*, Reino *Metazoa*, Subreino *Dikarya*, Phylum *Chordata*, Subphylum *Craniata*, Superclase *Gnathostomata* Clase *Actinopterygii*, Superorden *Acanthopterygii*, Orden *Perciformes*, Suborden *Percoidei*, Familia *Moronidae* y Género *Dicentrarchus*.

El ciclo de vida de los peces marinos comprende varias fases:

a) puesta y fertilización de huevos,

b) eclosión y desarrollo larvario,

c) crecimiento de juveniles hasta adultos.

Las fases de cultivo correspondientes son las siguientes:

a) criadero o *hatchery*. Corresponde a la producción de larvas y su mantenimiento, desde el huevo hasta la alimentación inerte. Comprende el mantenimiento de reproductores, la obtención de huevos viables y todo el desarrollo embrionario hasta la eclosión y, por último, el cultivo larvario que incluye la siembra de larvas en tanques, la alimentación viva (fitoplancton y zooplancton) y la adaptación a la alimentación inerte. El periodo de incubación de huevos va normalmente hasta el día 4 post fertilización, y la fase de *hatchery* con el cultivo larvario, va desde el día 5 hasta el final del destete. Dependiendo de la temperatura de cultivo, éste final se alcanza entre los días 61-75 post fertilización donde se deja de alimentar con comida viva.

b) *Nursery*. Esta etapa comprende el mantenimiento y alimentación de los alevines desde que comen exclusivamente alimento inerte hasta que alcanza una talla adecuada para iniciar la fase de preengorde. Su duración es de unos 100 días (hasta aproximadamente el día 150 ó 180 post fertilización, dependiendo de la temperatura usada en la fase anterior).

ES 2 346 122 B1

c) *Engorde*. Es la continuación de la etapa anterior y finaliza cuando los peces alcanzan la talla comercial. El engorde se realiza, generalmente, en un entorno natural y puede ser intensivo o extensivo.

5 Junto con la temperatura, el fotoperiodo es uno de los principales factores ambientales que inciden directamente sobre el sistema nervioso central (SNC) y, en particular, sobre el eje hipotálamo - hipófisis - gónada (HHG) de los peces, influyendo sobre los procesos madurativos de las gónadas de ambos sexos, como el control hormonal de los mismos.

10 Así pues, en una realización preferida de este aspecto de la invención, la fase de incubación de los huevos se realiza en penumbra. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el fotoperiodo durante la fase larvaria es natural. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el fotoperiodo durante la fase de destete es de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el fotoperiodo durante la fase de nursery y preengorde es de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

15 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la alimentación durante la fase larvaria es con Artemia. En otra realización preferida, la alimentación durante la fase de destete con Artemia + Pienso destete 150-200 μm a demanda. En otra realización preferida, la alimentación durante la fase de nursery es de pienso 250-500 μm a demanda. En otra realización preferida, la alimentación durante la fase de preengorde es de pienso 800-1200 μm a demanda.

20 En otra realización preferida, la densidad en la fase de incubación de huevos es de entre 1800 y 2200 huevos/l. En una realización particular, la densidad en la fase de incubación de huevos es de 2000 huevos. I^{-1} . En otra realización preferida, la densidad en la fase de cultivo larvario e inicio del destete es de entre 80 y 120 larvas I^{-1} . En una realización particular es de 100 larvas. I^{-1} . En otra realización preferida, la densidad en la fase de destete es de entre 18 y 22 larvas I^{-1} . En una realización particular es de 20 larvas. I^{-1} . En otra realización preferida, la densidad en la fase de nursery es de un máximo de 20 juveniles. m^3 . En otra realización preferida, la densidad en la fase de preengorde es de entre 8 y 12 Kg/m^3 . En una realización particular es de 10 Kg/m^3 .

25 El tipo de tanques utilizado para el cultivo no es determinante para el éxito del método, así como el uso de un tipo de alimento de una marca u otra no es relevante para los resultados. Obviamente, los animales deben comer en cada momento presas acorde con el tamaño de su boca. Otras variables como el fotoperiodo o la salinidad han sido también estudiadas para determinar su posible efecto sobre la proporción de sexos en la lubina con resultados negativos. Por lo tanto, la temperatura de cultivo del agua es la única variable ambiental conocida capaz de alterar la proporción de sexos en la lubina.

30 Aunque se han realizado pruebas en una cepa de lubina del Mediterráneo Oriental originaria de Egipto viendo que puede tener una menor respuesta a la influencia de la temperatura sobre la proporción de sexos, este método tiene aplicación a todas las lubinas conocidas de la especie *Dicentrarchus labrax*, independiente de su origen geográfico, que se agrupan en tres grandes poblaciones: Atlántico, Mediterráneo Occidental y Mediterráneo Oriental.

35 El protocolo del método descrito en la invención, tal y como se recoge en los ejemplos, replicado 8 veces, ha dado lugar a una proporción de hembras (media \pm S.E.M.): 50.1. Rango: 17.4-95.0. En comparación, por el protocolo actualmente utilizado por la industria se obtuvo una proporción de hembras (7 réplicas, media \pm S.E.M): 31.3%. Rango: 10.5-67.5.

40 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

45 Fig. 1. *Régimen de temperaturas empleadas en el presente estudio*. A Diseño experimental. Cinco grupos de lubinas fueron cultivados a bajas temperaturas ($15 \pm 1^\circ\text{C}$) durante los primeros 10, 30, 60, 90 o 120 dpf (grupos G10, G30, G60, G90 y G120, respectivamente). Al final de cada tratamiento, se elevó la temperatura del agua a $\approx 21^\circ\text{C}$, y se dejó seguir las fluctuaciones naturales hasta el final del otoño, cuando se mantuvo la temperatura a $18 \pm 1^\circ\text{C}$. B Temperatura natural típica del agua del mar, de enero a diciembre, registrada en las instalaciones donde se realizaron los ensayos. La línea recta indica la estación natural de desove.

50 Fig. 2. *Índice gonadosomático (GSI) de lubinas de un año de edad de diferentes grupos experimentales*. Los datos corresponden a las familias 2-4 y se muestran como media + desviación estándar (SEM) de tres familias con dos réplicas por grupo. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre distintos grupos dentro de un sexo dado (hembras, caso inferior; machos, caso superior). Tamaño de muestra prorrateado: $n = 31$ peces por grupo y por sexo. Abreviaturas de los grupos como en la Fig. 1. Hembras barras negras, machos barras blancas.

Fig. 3. *Peso corporal (BW) en las lubinas durante los tres primeros años de vida.* A Porcentaje de variación en BW relativo a G10 a tres tiempos diferentes de muestreo durante el primer año: 1) al final de cada periodo de cultivo con agua fría (ECW) a 15°C, i.e., a 30, 60, 90 y 120 dpf en G30, G60, G90 y G120, respectivamente; 2) Al final del periodo de preengorde o nursery (ENP; 150 dpf), cuando los peces tienen un BW medio de alrededor de 5 g (rango de 2-10 g); y 3) Al final del primer año (EFY; 330 dpf), cuando los peces se encontraron sexualmente diferenciados. Los datos representan el promedio de las cuatro familias con el promedio de tamaño muestral de 15, 120 y 35 para ECW, ENP y EFY, respectivamente. Los asteriscos indican las diferencias significativas ($P < 0.001$) entre cada grupo y el grupo G10. Las abreviaturas de los grupos como en la Fig. 1. B Crecimiento relacionado con el sexo durante el segundo y tercer año. BW de 21 machos y 53 hembras fue monitorizado desde 330 a 1055 dpf. Diferencias significativas ($P < 0.001$) entre sexos en cada punto de muestreo se simboliza por ***. El BW (en gramos) en función de la edad se muestran para machos (BWm) y hembras (BWf). Para las correlaciones lineales, el tiempo de comercialización (400 g) se estimó que era de 505 dpf para las hembras y de 725 dpf para los machos y se indica por flechas verticales. Los tamaños muestrales fueron de 21 y 53 para machos y hembras, respectivamente. Hembras puntos negros (BWf = $-326.1 + 1.17 * dpf$; $r_2 = 0.994$ $P < 0.0001$), machos puntos blancos (BWm = $-252.4 + 0.88 * dpf$; $r_2 = 0.988$ $P < 0.0001$).

Fig. 4. *Árbol no enraizado construido empleando el método Neighbour-Joining basado en la distancia de Nei's entre las cuatro familias de lubinas empleadas en este estudio.* Solo se indican los valores de bootstrap (tras 1000 réplicas) superiores a 60%. La barra indica la distancia genética y el número en los nodos indica el valor de bootstrap.

Fig. 5. *Efecto de la temperatura en la proporción de sexos de las lubinas.* A) Porcentaje de hembras frente a los días de cultivo $< 17^\circ\text{C}$ empezando el 0 dpf. Efecto observado del cultivo a bajas temperaturas ($< 17^\circ\text{C}$) para diferentes tiempos dentro del periodo termolábil empezando en la fertilización. Los datos son de estudios previos así como del presente estudio, y se muestran en un diagrama de cajas. La línea fina, márgenes de la caja, las patillas y el círculo abierto representan la media, el cuartil superior e inferior, el rango, y un valor extremo, respectivamente. Grupos con diferentes letras fueron estadísticamente diferentes (ANOVA; $P < 0.05$). B) Ilustración de la interacción genotipo (parental) y medioambiente (temperatura) en la proporción de sexos en las lubinas. La influencia del genotipo es evidenciada por una amplia variación en la proporción de sexos entre los parentales, compatible con un mecanismo de determinación sexual polifactorial. Cuando muchos parentales de diferentes poblaciones se toman juntos, el número medio de hembras genotípicas debería ser de ~50%, hembras que se podría esperar que se desarrollaran como ~50% en hembras fenotípicas, probando que no hay una influencia de la temperatura. El régimen térmico empleado corrientemente, por ejemplo, < 15 días a temperaturas $< 17^\circ\text{C}$, masculiniza alrededor de la mitad de las hembras fenotípicas en machos fenotípicos. Esto aumenta ~25% la proporción de machos fenotípicos de ~50% a ~75% y da lugar, en promedio, a una proporción de sexos de 3:1 que se observa habitualmente en las piscifactorías, h indica las hembras insensibles a la temperatura, i indica alrededor de la mitad de las hembras masculinizadas por la elevada temperatura. Las flechas finas de la parte superior de la Fig. 5B indican la tasa de variación en la proporción de sexos debido a influencia de los parentales. Las flechas finas de la parte inferior de la Fig. 5B indican la tasa de variación en la proporción de sexos debido a las interacciones genética - medio ambiente (de media, aproximadamente el 25% de las hembras fenotípicas). (-) Régimen termal usado corrientemente en las piscifactorías. (+) Régimen termal que no afecta a la proporción de los sexos.

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad del método de la invención para obtener una mayor proporción de hembras en cultivos de lubina.

Animales y condiciones de cultivo

Cuatro grupos de huevos recientemente fertilizados (< 1 día post fertilización; dpf) fueron recolectados de dos localidades diferentes, una *hatchery* comercial (St. Pere Pescador, Girona, España; 3 grupos) y el Instituto de Acuicultura (Castellón, España, 1 grupo) en diferentes fechas durante la estación de desove de dos años consecutivos. Los huevos fueron inmediatamente transportados a las instalaciones del Instituto de Ciencias del Mar (CSIC) usando contenedores de PVC con una mezcla 1:3 de agua y oxígeno puro. La incubación de los huevos y las condiciones de cultivo larvario y juvenil se llevaron a cabo como en Moretti *et al.* 1999 (Manual on Hatchery Production of Seabass and Gilthead Seabream. FAO, Roma, 194 pp.). Los huevos (200-2000 huevos·I⁻¹, dependiendo del número total de huevos en cada grupo) fueron incluidos en containers cilíndricos de PVC de 19 litros recubiertos con una malla de nylon de 400 μm (etapa de incubación y hatchery) o de 250 μm (etapa de cultivo larvario). Después de la mitad de la metamorfosis (Longitud estándar, SL > 18 mm), se transfirieron los juveniles a tanques de fibra de vidrio de 650 l y se mantuvieron bajo fotoperiodo natural y condiciones estándar de pH (~ 7.9), salinidad (~ 37.8 ppt), oxígeno disuelto (85-100%), y renovación del agua (30% vol·h⁻¹) hasta el final de este estudio. Para mantener condiciones similares en todos los grupos, y evitar posibles efectos que distorsionen el ensayo, se ajustó el número de peces por tanque a los 195 dpf, quitando los ejemplares extra con el fin de evitar el posible efecto de la densidad en el tamaño y proporción de sexos. Las larvas fueron alimentadas primeramente con Artemia AF y posteriormente con Artemia EG (INVE Aquaculture, Belgium). Los juveniles se alimentaron con pellets de comida deshidratada (ProAqua S.A., Spain) *ad libitum* y las raciones de comida fueron adaptadas a las diferentes tasas de crecimiento causadas por los regímenes térmicos.

Grupos experimentales

Se hizo uso de un diseño multifactorial para testar el efecto de una posible interacción entre el genotipo y el medioambiente (temperatura) en la proporción de sexos en la lubina. Los reproductores que proporcionaron los gametos que fertilizaron los huevos empleados para los ensayos no eran conocidos. Sin embargo, puesto que los cuatro grupos empleados fueron el resultado del desove en diferentes fechas, obtenidos a partir de dos diferentes proveedores, y colocados en diferentes tanques, fueron denominados como familias. Por tanto, estas cuatro familias fueron usadas para testar la influencia del componente (parental) genético que se ha visto previamente en la lubina. La influencia de la temperatura se estudió como sigue: se incubaron los huevos hasta la eclosión (~3 dpf) se llevó a cabo a la misma temperatura a la que tuvo lugar la puesta, usualmente 14-15°C. La eclosión ocurrió en marzo (familias 1, 3 y 4) o en abril (familia 2). Las larvas se mantuvieron a $15 \pm 1^\circ\text{C}$, una temperatura "natural" que se considera que no tiene ninguna influencia en la proporción de sexos (Piferrer, *et al.*, 2005. *General and Comparative Endocrinology* 142, 102-110) durante cinco periodos de duración creciente: 10 (G10), 30 (G30), 60 (G60), 90 (G90) o 120 (G120) días. Posteriormente, los peces fueron mantenidos a $\approx 21^\circ\text{C}$ dejando que ocurran las fluctuaciones naturales hasta el final del otoño, donde la temperatura se mantuvo a $18 \pm 19^\circ\text{C}$ (Fig. 1 A). Los cambios de baja temperatura a alta temperatura fueron graduales y nunca excedieron los $0.5^\circ\text{C}\cdot\text{día}^{-1}$. Debido al pequeño tiempo a 15°C , el grupo G10 fue considerado el control de referencia del grupo, puesto que se cultivaron a una temperatura similar a las que se emplean en las hatcheries, mientras que el resto de los grupos se consideraron como grupos experimentales con tratamientos térmicos. Cada combinación de familia-tratamiento de temperatura se llevó a cabo por duplicado (4 familias x 5 regímenes de temperatura o tratamientos térmicos x 2 réplicas = 40 tanques).

Muestras gonadales: ratio sexual, porcentaje de maduración y GSI

El muestreo se llevó a cabo cuando los ejemplares alcanzaron un tamaño mínimo de 12 cm, cuando tenían alrededor de un año (330 dpf) en las familias 1, 3 y 4, y a 400 dpf en la familia 2, cuando la diferenciación sexual es completa e irreversible en la lubina. El sexo fenotípico fue histológicamente determinado con una media de 36 ejemplares por tanque. Las gónadas fueron fijadas en 2% de paraformaldehído en PBS, incluidas en parafina, cortadas a $7 \mu\text{m}$, y teñidas con hematoxilina-eosina. Además, los testículos fueron clasificados de acuerdo a su estado de desarrollo. Brevemente, los machos en el estado I/II poseen testículos inmaduros dispuestos en túbulos seminíferos conteniendo esencialmente sólo espermatogonias A; machos en el estado III tienen los testículos dominados por espermatozoides primarios y secundarios. Machos en el estado IV tienen los testículos en recrudescencia, con todos los tipos de células germinales desde espermatozoides a espermatozoides, pero con el esperma no dominando completamente los testículos. Finalmente, los machos en el estado V tienen testículos maduros, conteniendo esperma listo para la inseminación. Machos con los testículos en los estados II y III de alrededor de 2 años fueron considerados no precoces, mientras que machos de alrededor de los dos años de edad con testículos en el estado IV y V fueron considerados precoces.

Los efectos de los diferentes regímenes térmicos en el desarrollo gonadal se midieron en las familias 2, 3 y 4 (el peso de las gónadas no se registró en la familia 1), para el cálculo del índice gonadosómico (GSI) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{GSI} = (\text{peso gonadal (g)}/\text{peso corporal (g)}) * 100$$

Crecimiento

La longitud estándar (SL; precisión de 0.1 mm) y el peso corporal (BW; precisión de 0.01 g) se midió periódicamente en todos los grupos durante los primeros 3 años. Durante el primer año el muestreo tuvo lugar a tres tiempos diferentes: 1) al finalizar cada tratamiento de temperatura a 15°C i.e., a 10, 30, 60, 90 y 120 dpf en los grupos G10 y G30, G60, G90 y G120, respectivamente; 2) al final del periodo de preengorde o nursery, cuando el pez ha alcanzado los 2-10 g (alrededor de 150 dpf), coincidiendo con el tiempo en el que son transferidos a instalaciones de crecimiento en granjas comerciales; 3) al final del primer año, cuando la diferenciación sexual es completa. En todos los casos, se determinaron las diferencias en BW entre el grupo control (G10) y los grupos experimentales (G30, G60, G90, G120) mediante la fórmula:

$$\text{Peso corporal Relativo (BW)}_i = 100 - [100 * (\text{BW } G_i \text{ (g)}/\text{BW } G_{10} \text{ (g)})],$$

siendo $i=30, 60, 90$ ó 120 .

Al final del primer año se midió el crecimiento comparativo entre los machos no precoces, los machos precoces y las hembras. Más aún, se calculó el dimorfismo sexual en crecimiento (SGD) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{SGD} = [(\text{peso medio de las hembras} - \text{peso medio de los machos})/\text{peso medio de los machos}] * 100.$$

Además, para determinar las diferencias de crecimiento relacionadas con el sexo, el exceso de peces después del muestreo al final del primer año (45 peces de la familia 3 y 29 peces de la familia 4, un total de 21 machos y 53 hembras), fueron individualmente etiquetados y monitorizados durante el segundo y tercer año (de 330 al 1055 dpf).

Para determinar la ganancia en producción durante la fase de crecimiento reflejada por el incremento en la proporción de hembras como consecuencia del tratamiento térmico, la proporción media de hembras en G10 (práctica térmica utilizada normalmente en la industria), G60 (recomendada) y G120 (obtención del número máximo de hembras) y el peso de los machos cuando las hembras alcanzan el peso apto para la comercialización (400 g) se usaron para calcular la biomasa resultante (en gramos por 100 peces).

Deformidades y supervivencia

Deformidades en la columna vertebral, mandíbula u opérculo se midieron al final del primer año. La supervivencia a partir de la incubación de los huevos y hasta el final del periodo larvario se determinó comparando el número de peces al 90 dpf con el número inicial. La supervivencia durante el estado juvenil fue determinada por comparación del número de peces a 90 dpf con el número de peces al final del primer año.

Análisis por microsatélites

Se determinó la variabilidad genética y el test de diferenciación genética entre las cuatro familias en muestras de 26, 39, 48, y 33 peces de las familias 1, 2, 3, y 4, respectivamente. Se aisló el ADN total a partir de recortes de aletas deshidratadas, usando el protocolo de extracción fenol cloroformo levemente modificado. Los genotipos de seis loci de microsatélites (*Dla11*, *labrax-3*, *labrax-6*, *labrax-8*, *labrax-13*, *labrax-17*) (Garda De León, *et al.*, 1997. *Molecular Ecology* 6, 51-62; Castilho and McAndrew, 1998. *Animal Genetics* 29, 151-152) fueron determinados en dos reacciones multiplex con las siguientes combinaciones *Dla11/ labrax-3/labrax-6* (MicrosA) y *labrax-8/labrax-13/labrax-17* (MicrosB). El cóctel de reacción para ambas multiplex se llevó a un volumen final de 20 μ l conteniendo: 1 μ l del ADN extraído, 1X PCR buffer, 1.5 mM de MgCl₂, 500 nmol de cada dNTP y 0.5 U de Hot start Polymerase (Quiagen). Para la combinación de primers MicrosA, 1 pmol de los primers *Dla11* y *labrax-3* se añadieron a la reacción, mientras que se empleó 1.4 pmol del primer *labrax-6*. Para la combinación de primers MicrosB, 1 pmol de todos los primers fue añadido a la reacción. Todas las reacciones PCR tuvieron el mismo programa térmico: una etapa de desnaturación inicial a 95°C durante 15 min, seguido por 25 ciclos de 95°C durante 1 min, hibridación a 58°C durante 30 s y extensión a 72°C durante 30 s, con una etapa de extensión final de 5 min a 72°C. Después de la amplificación, los productos de PCR fueron diluidos 1/10 con formamida hasta un volumen final de 10 μ l y se determinaron los genotipos por la longitud del polimorfismo en un secuenciador Applied Biosystems ABI 377 DNA. Los alelos fueron determinados por el software GeneMapper 3.7 software.

Los datos de microsatélites, los índices de variabilidad genética por locus y familia, y el contenido de información en polimorfismo fue calculado usando Cervus 3.0.3 (Kalinowski, *et al.*, 2007. *Molecular Ecology* 16, 1099-1106). Las expectativas Hardy-Weinberg en cada locus y para cada familia y la diferenciación genética entre pares de familias fueron estimadas con GENEPOP 3.4 (<http://genepop.curtin.edu.au/>). Las comparaciones de pares de bases multilocus entre muestras se calcularon usando la distancia de Nei (Nei, 1972. *American Naturalist* 106: 283 -292) y se construyó el árbol Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425) con 1000 réplicas de bootstrap usando el programa PHYLIP versión 3.67 (Felsenstein, 1989. *Cladistics* 5, 164-166).

Modelo de respuesta del ratio de sexos a la temperatura en la lubina

La información obtenida en estos ejemplos se combinó con estudios previos: Puesto que temperaturas superiores a 18°C son capaces de masculinizar algunas hembras genéticas en la lubina (Piferrer, *et al.*, 2005. *General and Comparative Endocrinology* 142, 102-110), se consideraron “bajas” temperaturas por debajo de 17°C para determinar la duración del tratamiento, sólo se llevaron a cabo estudios a una temperatura de 15°C comenzando 10 dpf y terminando, como máximo, el día 120 post fecundación, puesto que dio lugar a un incremento notable de la proporción de hembras para unificar los criterios de este estudio con los de estudios previos.

Análisis de los datos

La normalidad de los datos fue chequeada con el test de Kolmogorov-Smirnov y se aplicó una transformación logarítmica cuando fue necesario. La homocedasticidad de las varianzas fue verificada por el test de Levené. Se empleó un análisis ANOVA con un grado de libertad para testar las diferencias estadísticas en longitud, peso y GSI. Con el tratamiento de temperatura y la familia como variables independientes y el sexo como una variable dependiente se llevó a cabo una ANOVA de dos vías. Los datos de las tasas de sexos fueron transformados (arcoseno) antes de realizar cualquier análisis estadístico. Para propósitos computacionales, la proporción de sexos para una réplica perdida en una combinación familia-tratamiento particular (5 tanques de un total de 40) se calcularon de acuerdo con el método de diseño de bloques al azar (Berenson, *et al.*, 1983. Pretinice-Hall (Ed.), *Intermediate Statistical Methods*

ES 2 346 122 B1

and Applications. A computer Package Approach, Englewood Cliffs, New Jersey, pp. 118-130). Para comparaciones múltiples post hoc se empleó el test de Turkey (para todos los grupos de comparación) y el test bilateral de Dunnett (para comparación frente al grupo de control G10) y así chequear las diferencias estadísticas entre los tratamientos de temperatura o las familias.

5 Por otro lado, el test de Student se empleó para determinar las diferencias entre el crecimiento de machos y hembras durante el segundo y tercer año de vida. La precocidad masculina, la supervivencia y la incidencia de deformidades se analizaron con el test de la Chi-cuadrado. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando el programa SPSS v11.5. Los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar (SEM). En todos los test, las diferencias
10 fueron consideradas significativas cuando $P < 0.05$.

Proporciones de sexos

15 El porcentaje de hembras de acuerdo a la familia y al tratamiento al final del primer año se muestra en la tabla 1. La media del porcentaje de hembras se incrementa significativamente ($P < 0.05$) al incrementar la duración del tratamiento inicial a 15°C, duplicando sus valores de 31.3 \pm 8.0% (G10) a 59.1 \pm 12.8% (G120). Cuando las medias fueron promediadas, el mayor porcentaje de hembras obtenido en este estudio (95.0%) fue observado en el grupo G60 de la familia 3. La ANOVA con dos grados de libertad, con la familia, la temperatura de tratamiento y la réplica como
20 factores independientes indicaron que la familia y la temperatura tuvieron una influencia significativa ($P < 0.001$) en la proporción de sexos resultante, mientras que la réplica no. Estos factores explicaban el 65.8, 25.2 y el 9.0% de la varianza, respectivamente. Más aún, una interacción significativa entre el sexo y la temperatura ($F = 2.67$; $P < 0.05$) evidenció la existencia de interacciones genotipo-ambiente en las lubinas empleadas para este estudio. Por tanto, para las familias 1-4, la diferencia entre el porcentaje de hembras máximo y mínimo dentro de cada familia fue 26.8, 24.3,
25 33.7 y 46.4%, respectivamente (media 28.5 \pm 4.9%), indicando las diferencias de sensibilidad a la temperatura entre las familias.

Desarrollo gonadal y maduración sexual precoz masculina

30 Puesto que los huevos de las cuatro familias empleados en este estudio eclosionaron a diferentes tiempos, el muestreo al final del primer año coincidió con la estación de desove para la familia 1, pero pasada esta estación para la familia 2. Además, el bajo número de machos en la familia 3 y el lento crecimiento de la familia 4, sin machos en el estadio V, realizados por el cálculo del número de peces con testículos a diferentes estados con suficiente confianza
35 sólo es posible para la familia 1.

TABLA 1

40 *Porcentaje de hembras en las diferentes familias y regímenes de temperatura determinadas histológicamente en peces de al menos 12 cm (330-400 dpf). Se han realizado dos réplicas por familia (R1 y R2). Números entre paréntesis indican el tamaño de la muestra. ¹ Valores estimados basados en diseños en bloque randomizados. Diferentes letras en superíndice indican diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$)*

Grupo de tratamiento	Familia 1		Familia 2		Familia 3		Familia 4		Todas las familias
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	Media \pm SEM
G10	10.5(19)	13.0 ¹	10.7(28)	35.7(14)	67.5(40)	45.0(40)	31.6(38)	35.3 ¹	31.3 \pm 8.0 ^a
G30	34.1(44)	30.0(40)	25.0(40)	41.5(41)	70.0(40)	65.0 ¹	24.3(37)	33.3(39)	40.4 \pm 9.1 ^{ab}
G60	44.0(25)	31.6(38)	17.4(46)	25.9	85.0(40)	95.0(40)	48.7(39)	53.2(47)	50.1 \pm 14.6 ^{bc}
G90	37.5(40)	32.7(49)	25.0(40)	27.5(40)	82.5(40)	80.0(40)	47.6(21)	54.5(33)	48.4 \pm 12.1 ^{bc}
G120	35.0(40)	43.0	40.0(40)	30.0(40)	85.0(40)	80.0(40)	82.6(23)	76.9(13)	59.1 \pm 12.8 ^c

65 Al 330 dpf, la proporción de machos precoces (machos en los estadios IV y V) en el grupo G10 de la familia 1 fue ~30% (Tabla 2). La exposición a bajas temperaturas durante 30, 90 ó 120 días (G30, G90 y G120) dio lugar a un descenso significativo en la proporción de machos precoces de la mitad o un tercio de los valores recogidos en G10. Más aún, el número de machos en el estadio III mostró un incremento continuo desde 5.9% en G10 a 42.3% en G120

($P < 0.05$). Independientemente del tratamiento de temperatura, la media de BW y de SL fue determinada para hembras (BW, 83.0 ± 2.88 g; SL, 169.6 ± 1.86 mm), machos precoces (BW, 67.5 ± 2.69 g; SL, 160.0 ± 2.01 mm) y machos no precoces (BW, 55.0 ± 1.22 g; SL, 150.8 ± 1.02 mm). Así pues, las hembras fueron significativamente mayores ($P < 0.05$) que los machos precoces que, a su vez, fueron significativamente mayores que los machos no precoces ($P < 0.05$) tanto en SL como en BW.

TABLA 2

Porcentaje de machos precoces y no precoces al 330 dpf.
* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ tras el test Chi-cuadrado

Tratamiento de temperatura	Machos no precoces				Machos precoces
	Estadío I	Estadío II	Estadío III	Total	Estadíos IV y V
G10	52.9	11.8	5.9	70.6	29.4
G30	52.7	26.3	7.0	86.0	14.0**
G60	45.0	22.5	12.5	80.0	20.0
G90	51.7	22.4	15.5	89.7	10.3**
G120	26.9	15.4	42.3*	84.6	15.4*

El GSI al final del primer año en las familias 2, 3 y 4 se muestra en la Fig. 2. Independientemente del régimen térmico, las hembras exhibieron GSIs significativamente mayores que los machos ($P < 0.001$). Además, las hembras de G60, G90 y G120 tuvieron un menor GSIs que las hembras de G10 y G30 ($P < 0.01$), mientras que los machos G10 tuvieron un mayor GSIs que los machos G30, G90 y G120 ($P < 0.01$).

40 *Crecimiento dependiente del sexo y la temperatura y estimación de la biomasa*

Bajas temperaturas durante fases de desarrollo temprano dieron lugar a un retardo en el crecimiento, con los peces en los grupos G30, G60, G90 y G120 alcanzando el final del estado larvario (17-18 mm) de 15 a 30 días más tarde que los peces en G10. Hacia el final de sus periodos respectivos de cultivo a 15°C, todos los grupos ya exhibieron menores valores de BW cuando se comparaban con el BW del grupo G10 al mismo tiempo de muestreo ($P < 0.001$) (Fig. 3A). Al final del periodo de preengorde o nursery (rango de BW de 2-10 g; edad alrededor de 150 dpf) mientras G30 tuvo un BW significativamente mayor ($P < 0.001$, 36.9%) que el grupo G10, en contraste G60, G90 y G120 mostraron un BW significativamente menor ($P < 0.001$) respecto a G10. Por consiguiente, el crecimiento compensatorio sólo se observó en G30. Sin embargo, esta ventaja en el tamaño y en BW fue reducida al 9.4% al final del primer año, con valores no significativamente diferentes de los de G10. A este tiempo, el crecimiento en G60, G90 y G120 fue todavía significativamente menor ($P < 0.001$) (15.2%, 35.4%, 32.4%, respectivamente) que G10 (Fig. 3A). Durante el segundo y tercer año de vida, el crecimiento fue monitorizado considerando sólo el sexo del pez, independientemente del tratamiento previo de temperatura (Fig. 3B). Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los sexos a todos los tiempos de muestreo. Se observó también una correlación positiva lineal robusta entre la edad y BW durante este tiempo para ambos sexos ($r^2 = 0.99$; $P < 0.001$). Usando esta correlación, fue estimado el tiempo al que el pez alcanza el tamaño de comercialización (400 g de acuerdo con las prácticas comunes de producción de lubinas), y se encontró que era de alrededor del 605 dpf para las hembras y 725 dpf para los machos. Por tanto, para el tiempo en el que las hembras alcanzaron 400 g, se estimó que el peso de los machos fue sólo de 292 g. Basándose en la media mínima observada y en la media máxima alcanzable en el porcentaje de machos y hembras, se calculó la biomasa resultante con y sin manipulaciones térmicas en base a las proporciones entre sexos finales de cada grupo y el peso de los machos cuando las hembras alcanzaron los 400 g (tabla 3). Un incremento de la biomasa del 6.1% podría conseguirse con un régimen térmico como el propuesto, mientras que si, además, se combina con la selección genética de reproductores podría alcanzarse un incremento del 20.7%.

En este estudio, y con independencia del régimen de temperaturas, la SGD media fue de $40.5 \pm 3.68\%$. No se observaron diferencias en SGD entre los diferentes tratamientos, aunque se observó una tendencia a la baja en el grupo G120.

ES 2 346 122 B1

TABLA 3

Media del peso corporal y biomasa estimada cuando las hembras alcanzan el tamaño de comercialización. El porcentaje de sexos corresponden a los promedios de los grupos G10, G60 y G120 de todas las familias.

¹ *Biomasa en kg por 100 peces.*

	Tratamiento industrial corriente (21°C desde el dpf)			Tratamiento térmico recomendado (60 primeros días a 15°C)			Tratamiento con el mayor número de hembras (120 primeros días a 15°C)		
Sexo	%	B _w (g)	Biomasa ¹	%	B _w (g)	Biomasa ¹	%	B _w (g)	Biomasa ¹
Masculino	68.7	292	21.4	49.9	292	14.6	40.9	292	11.9
Femenino	31.3	400	10.6	50.1	400	20.0	59.1	400	23.6
Suma	100.0		32.0	100.0		34.6	100.0		35.6
Ganancia (%)						6.1			9.2

Supervivencia y teratología

En general, y con independencia del periodo de desarrollo considerado, la supervivencia no fue relacionada con el tratamiento de temperatura. Sin embargo desde la fertilización hasta el día 90 dpf, la supervivencia en las familias 1, 2 y 3 se incrementó tras periodos prolongados a 15°C, mientras no se observó esta tendencia en la familia 4. Considerando todas las familias y tratamientos, entre el 90 y 120 dpf el rango de supervivencia fue de entre 26.3 y 99.1. Desde el fin del tratamiento de temperatura más largo al día 120 dpf hasta el final del primer año, el rango de supervivencia fue de entre 59.2 y 99.0%.

Cuando se examinaron los peces al final del primer año, se encontró una tendencia creciente en la incidencia de malformaciones operculares con un incremento del tiempo de cultivo a 15°C (G10 = 6.6%; G30 = 3.3%; G60 = 17.3%; G90 = 15.9%; G120 = 24.5%), independientemente de la familia. Sin embargo, debido a variaciones entre las familias, no se registraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Por otro lado, las incidencias de malformaciones en la columna vertebral (lordosis, pero no escoliosis o cifosis) fue siempre muy baja y sólo presente en los grupos G10 (1.2%) y G30 (0.3%). La presencia de malformaciones en la mandíbula fue muy baja, con valores decrecientes con el tiempo de cultivo a 15°C (3.2% en G10, 0.9% en G30, 0.4% en G60, 1.0% en G90 y 0% en G120).

Variabilidad genética

Todos los microsatélites analizados fueron polimórficos con un número de alelos por loci cuando fueron analizadas las cuatro familias como una sola muestra que va desde 5 para el locus labrax-6 a 27 para el locus labrax-13, y una media de 14.5 alelos por locus (Tabla 4). Cuatro de los seis locus estudiados mostraron una desviación significativa del equilibrio Hardy-Weinberg, con una deficiencia general de heterocigotos. A pesar de esto, en todos los casos el contenido polimórfico (PIC) fue menor que la heterocigosidad esperada (He) (Tabla 4). Cuando se compararon las cuatro familias, el test de diferenciación genética dio valores de FST significativamente diferentes entre todas las familias y entre todos los grupos de comparación ($P < 0.001$), con distancias similares entre ellos (Fig. 4).

ES 2 346 122 B1

TABLA 4

Diversidad genética por locus. K, número de alelos por locus. He, heterozigosidad esperada. PIC, contenido polimorfito (polymorphism information content). HW, valor del test de Hardy-Weinberg. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0.05$). ns= diferencias no significativas

Locus	Todas las familias			
	k	He	PIC	HW
Dla11	9	0.820	0.799	ns
Labrax-3	18	0.877	0.862	*
Labrax-6	5	0.555	0.495	*
Labrax-8	15	0.903	0.892	ns
Labrax-13	27	0.926	0.918	*
Labrax-17	13	0.800	0.770	*
Media	14.5	0.813	0.789	*

ES 2 346 122 B1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para el control térmico de la proporción de sexos en lubinas producidas en cultivo que comprende mantener los valores de temperatura del agua entre 13 y 17°C desde la fertilización hasta un día comprendido entre los 53 y 64 dpf.
- 10 2. Método según la reivindicación anterior que comprende:
- 15 a. incubar los huevos tras ser fertilizados a unos valores de temperatura comprendidos entre 13 y 15°C hasta la eclosión de los mismos, y
 - b. cultivar las larvas tras la eclosión de los huevos, a unos valores de temperatura comprendida entre 14 y 16°C, hasta un día máximo comprendido entre el 64 y el 53 post fecundación, de manera que un cultivo a menor temperatura requiere mayor tiempo de incubación.
- 20 3. Método según la reivindicación 2, que además comprende:
- c. incrementar la temperatura a razón de 0.5°C/día hasta a una temperatura comprendida entre 20 y 22°C.
- 25 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que además comprende:
- d. mantener una temperatura comprendida entre 20°C y 22°C hasta un día comprendido entre 150 y 180 dpf.
- 30 5. Método según la reivindicación 3 donde el incremento de temperatura hasta una temperatura comprendida entre 20 y 22°C, se produce desde el día 61 al 72 post fertilización, y posteriormente se mantiene la temperatura a un intervalo comprendido entre 20°C y 22°C desde el día 73 al 75 post fertilización.
- 35 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en el que la fase de incubación de los huevos se realiza en penumbra.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en el que el fotoperiodo durante la fase del destete y fase de *nursery* es de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.
- 40 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en el que el fotoperiodo durante la fase de *nursery* es de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 donde la densidad en la fase de incubación de los huevos es de entre 1800 y 2200 huevos/l.
- 45 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 donde la densidad en la fase de cultivo larvario es de entre 80 y 120 larvas/l.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 donde la densidad en la fase del destete es de entre 18 y 22 larvas/l.
- 50 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 donde la densidad en la fase de *nursery* es de máximo 20 juveniles/m³.
- 55 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la densidad en la fase de preengorde es de entre 8 y 12 Kg /m³.

60

65

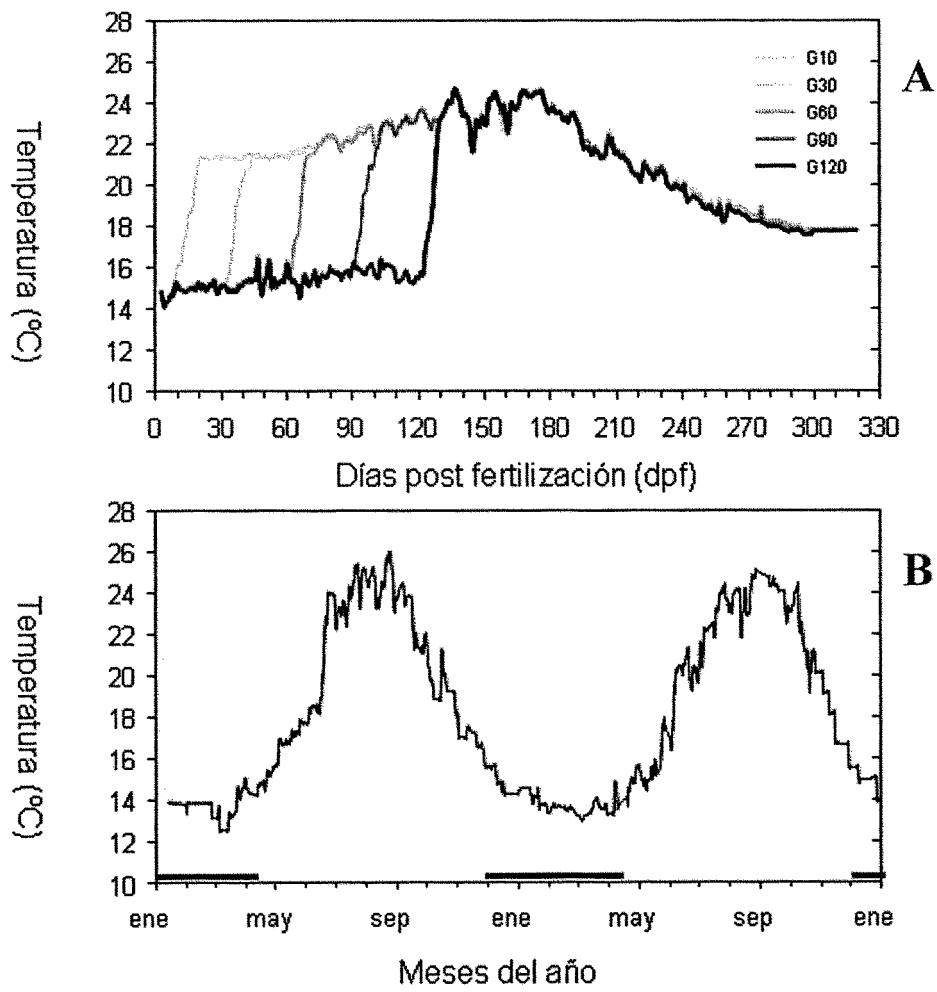


FIG. 1

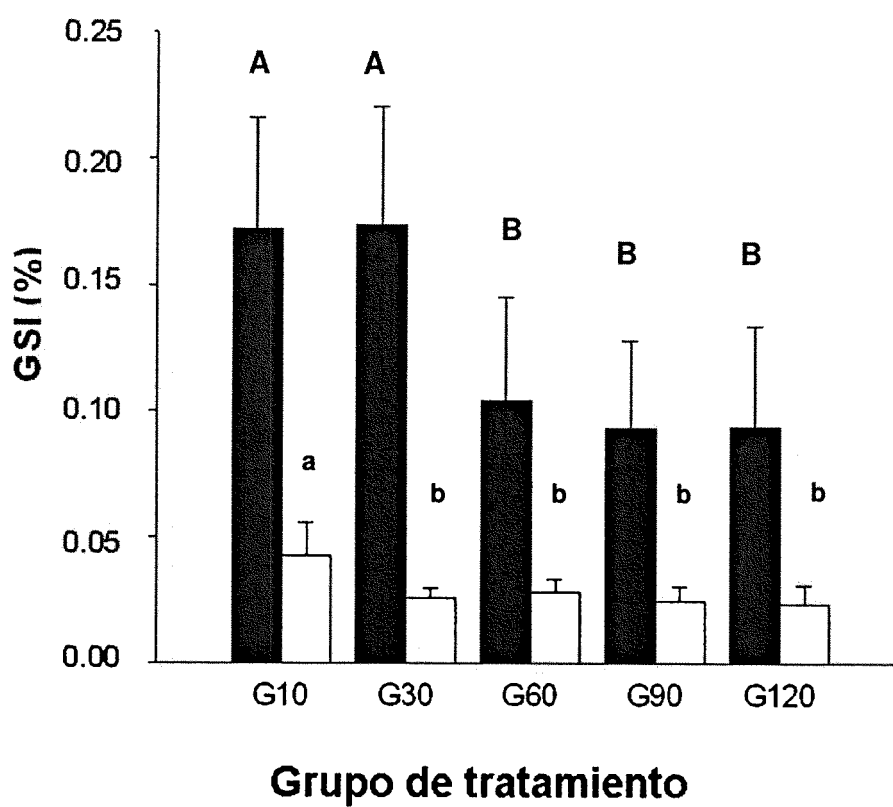


FIG. 2

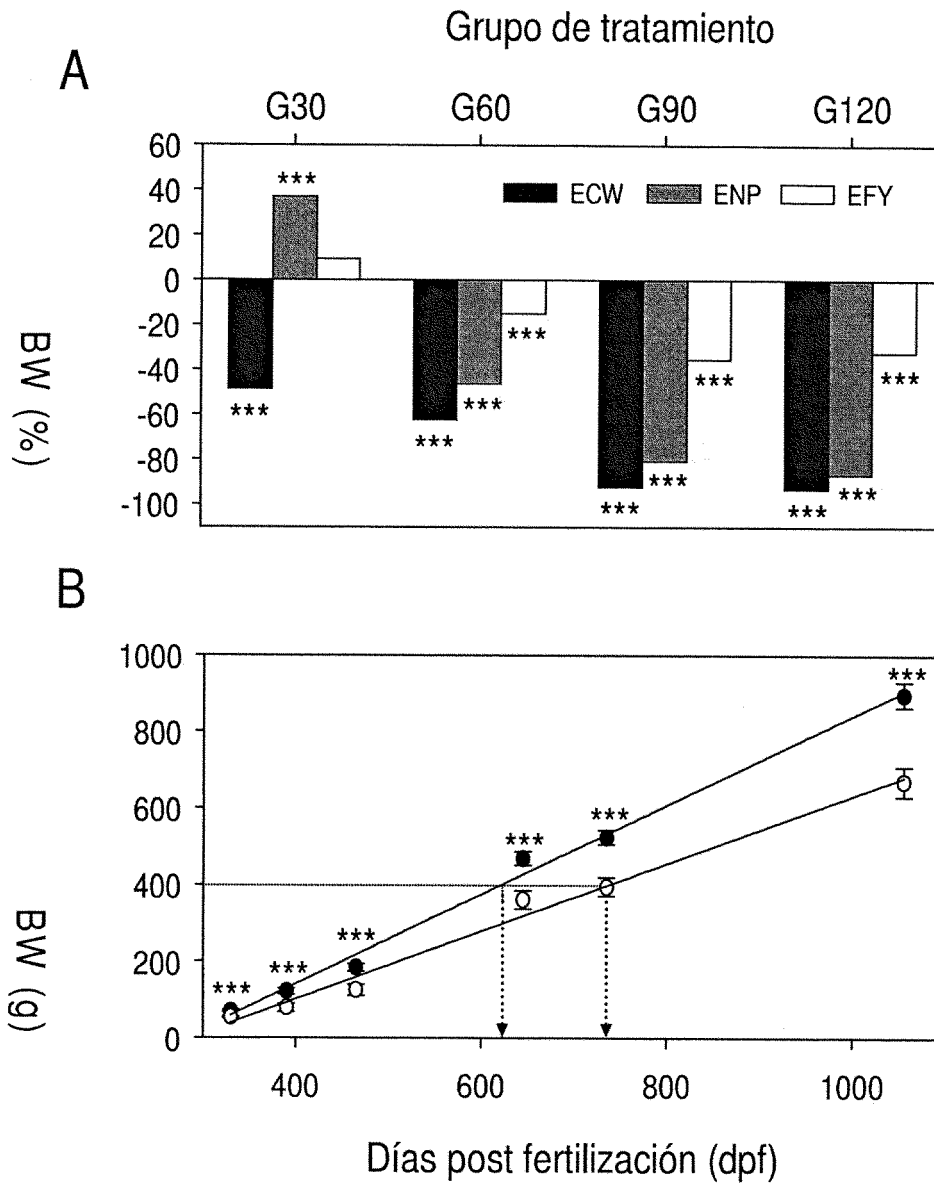


FIG. 3

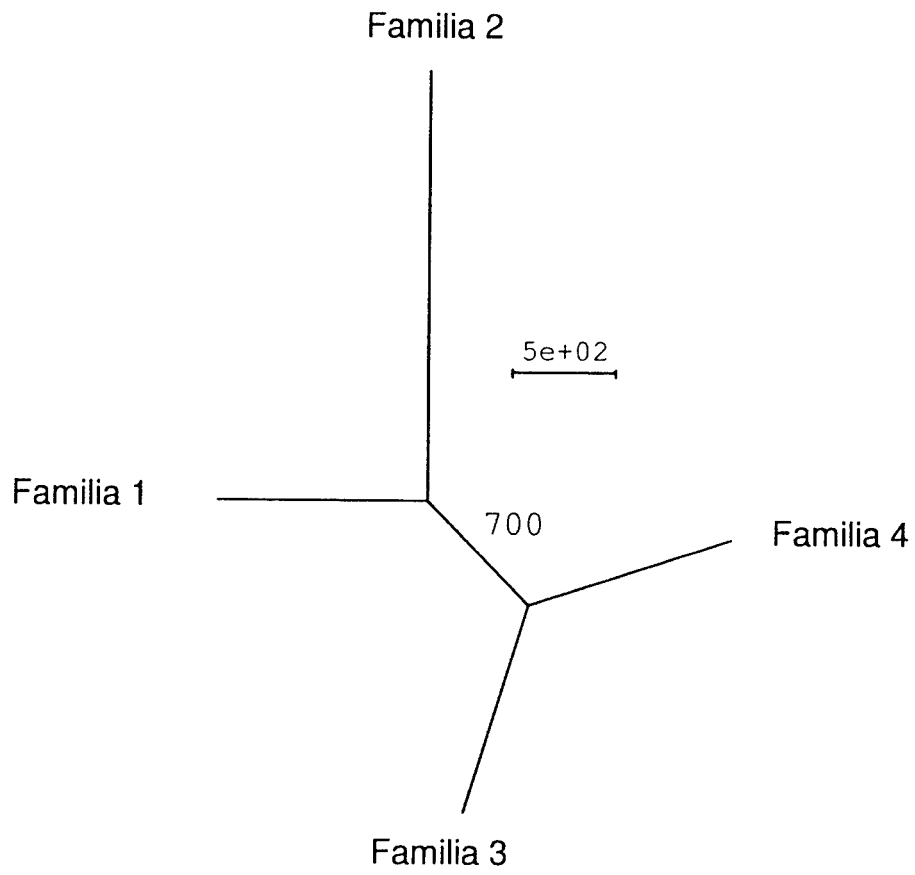


FIG. 4

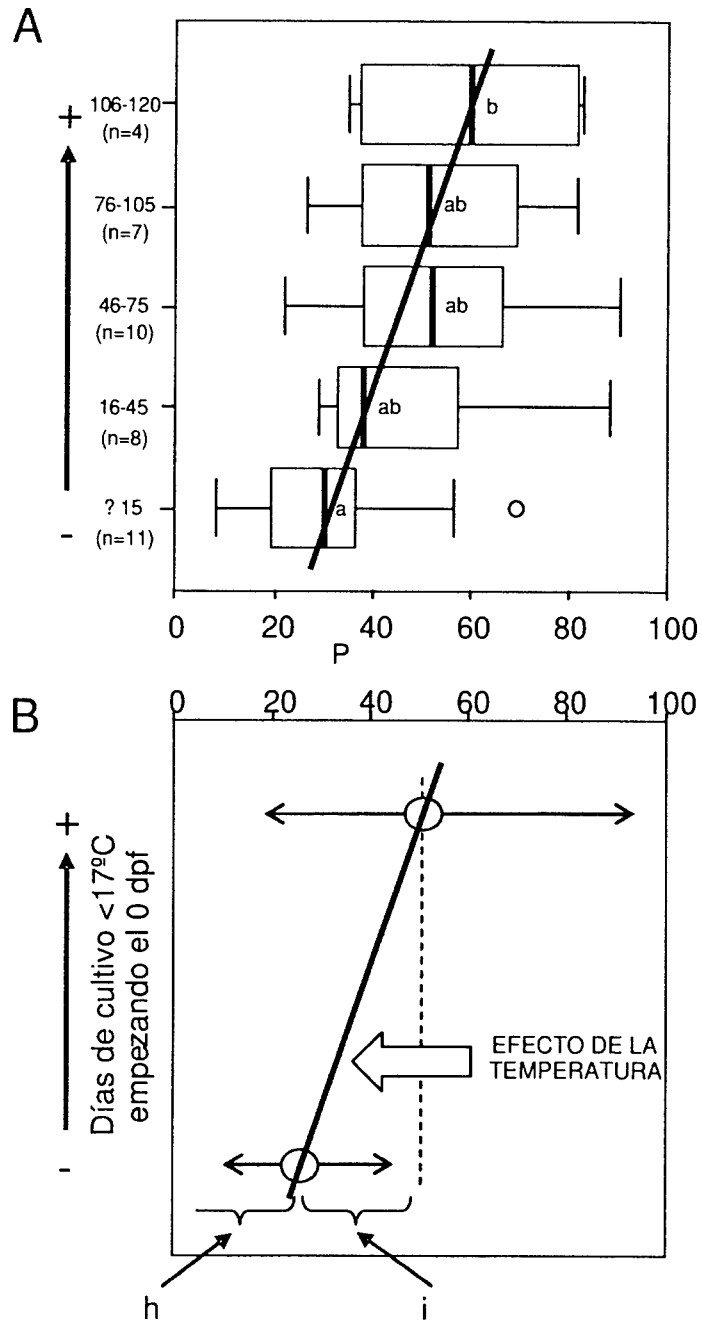


FIG. 5



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 346 122

② Nº de solicitud: 200802927

③ Fecha de presentación de la solicitud: 16.10.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A01K 61/00** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	KOUMOUNDOUROS, G. et al. Temperature sex determination in the European sea bass, <i>Dicentrarchus labrax</i> (L., 1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae): Critical sensitive ontogenic phase. <i>Journal of Experimental Zoology</i> , 2002, vol. 292, páginas 537-579.	1,2,4
Y		3,5-13
Y	MORETTI, A. et al. Manual on hatchery production of Seabass and Gilthead Seabram. 1999. Volumen 1, parte 3: Hatchery production and procedures, página 33-189. Roma: FAO.	3,5-13
X	PAVLIDIS, M. et al. Evidence of temperature-dependant sex determination in the European sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.) <i>Journal of Experimental Zoology</i> , 2000, vol. 287, páginas 225-232.	1,4,6
A	MORETTI, A. et al. Manual on hatchery production of Seabass and Gilthead Seabram. 2005. Volumen 2, parte 1: Hatchery design and construction, página 1-32. Roma. FAO.	6-13
A	PIFERRER, F. et al. Genetic, endocrine and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.). <i>General and comparative Endocrinology</i> , 2005, vol. 142, páginas 102-110.	1-5
A	VANDEPUTTE, M. et al. A polygenic hypothesis for sex determination in the European Sea bass <i>Dicentrarchus labrax</i> . <i>Genetics</i> , 2007, vol. 176, páginas 1049-1057.	1-5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

23.09.2010

Examinador

A. Polo Díez

Página

1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.09.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	3,5,7-13	SÍ
	Reivindicaciones	1,2,4,6	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		SÍ
	Reivindicaciones	1-13	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	KOUMONDOUROS, et al.	2002
D02	PAVLIDIS et al.	2000
D03	MORETTI et al.	1999
D04	MORETTI et al.	2005

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**1. Novedad (art 6 de la LP)**

La invención se refiere a un método de control térmico de la proporción de sexos en lubinas producidas en cultivo que comprende mantener la temperatura del agua entre los 13 y los 17°C desde la fertilización hasta un día comprendido entre los 53 y los 64 después de la fertilización (dpf) (reivindicación 1). El resto de las reivindicaciones dependientes dan detalles sobre el método.

Existen varios estudios sobre la influencia de la temperatura en la determinación sexual de la lubina (*Dicentrarchus labrax* L). Concretamente, dos de ellos (documentos D1 y D2) demuestran que la baja temperatura en los primeros estados del desarrollo aumenta la proporción de hembras con respecto a los cultivos donde la temperatura se mantiene más alta.

En el documento D1 se compara el efecto de diferentes tratamientos térmicos aplicados en diferentes fases de desarrollo embrionario y larvario de la lubina. El tratamiento que logra un mejor porcentaje de hembras (un 66%) es el de mantener una temperatura de 15°C hasta el día 60 después de la eclosión, tras lo cual se sube la temperatura (ver figuras 1 y 3, tabla 2).

Este documento afecta a la novedad de las reivindicaciones 1, 2 y 4.

En el documento D2 se aplican tres temperaturas diferentes en el cultivo de la lubina, desde huevo hasta la mitad de la metamorfosis (17 a 18 mm. de talla). Cuando la temperatura es de 13 o 15 °C, el porcentaje hembras es mayor que cuando la temperatura es de 20°C (ver material y métodos, resultados y discusión) llegando a valores de 74% de hembras.

A la vista de este documento, las reivindicaciones 1, 4 y 6 carecen de novedad.

2. Actividad inventiva (art. 8 de la LP)

En la reivindicación 3 de la invención se reivindica que la subida de temperatura se produzca a razón de 0,5°/día hasta los 20-22°C y en la reivindicación 5 se concreta que la subida se realice desde el día 61 dpf.

En el documento D1, considerado el documento más cercano del estado de la técnica, no se detalla cómo se lleva a cabo el aumento de temperatura. Sin embargo, el aumentar la temperatura gradualmente y, no de forma abrupta, es una práctica habitual en los cultivos de peces, con objeto de ir adaptándolos poco a poco. De hecho, el documento D3 (tabla 3.9, página 94) aconseja que las fluctuaciones nunca sobrepasen 0,5°C por día. Un experto en la materia que quisiera variar la temperatura en un tanque larvario, por cualquier motivo, lo haría de la manera que enseña el documento D3 con objeto de evitar daños debidos a los choques térmicos. En cuanto a que la subida de temperatura se produzca a partir del día 60 dpf se trata de una ligera variación respecto al día que se emplea en D1 (60 dph). En ausencia de un efecto técnico inesperado (comparando la tabla I de la solicitud y la tabla II de D1, el porcentaje de hembras 50,5% y 66,1% respectivamente) se considera que dicha variación en el día en que se comienza a variar la temperatura no implica actividad inventiva.

Se considera, por ello, que combinando los documentos D1 y D3, las reivindicaciones 3 y 5 carecen de actividad inventiva.

Finalmente, las reivindicaciones 7 a 13 no aportan ninguna característica que, en combinación con las reivindicaciones de las que dependen, les otorguen actividad inventiva. Se trata de opciones de cultivo habituales ya conocidas en el estado de la técnica (ver los documentos D3 y D4, manuales que recopilan diferentes aspectos y posibilidades en el cultivo de la dorada y de la lubina) y que, además, no parecen tener ningún efecto técnico en la consecución del objetivo final de la invención, que es incrementar el porcentaje de hembras en cultivo.

Hoja adicional

En consecuencia, se considera que las reivindicaciones 7-13 no cumplen el requisito de actividad inventiva.