



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 624**

51 Int. Cl.:
A01K 67/033 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08787815 .3**

96 Fecha de presentación : **19.03.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2146569**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.01.2010**

54 Título: **Obtención de moluscos bivalvos tetraploides a partir de progenitores diploides.**

30 Prioridad: **23.03.2007 FR 07 02123**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.11.2011

73 Titular/es: **Institut Francais de la Recherche pour
l'Exploitation de la Mer (IFREMER)
155, rue Jean-Jacques Rousseau
92130 Issy les Moulineaux, FR**

72 Inventor/es: **Benabdelmouna, Abdellah y
Ledu, Christophe**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

ES 2 367 624 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Obtención de moluscos bivalvos tetraploides a partir de progenitores diploides.

5 La presente invención se refiere a la producción de moluscos bivalvos tetraploides viables.

La producción de bivalvos poliploides es en la actualidad objeto de un gran interés, en particular en lo que se refiere a las ostras.

10 En efecto, las ostras triploides, denominadas igualmente "ostras de las 4 estaciones", presentan varias ventajas. Debido a su número impar de cromosomas, normalmente son estériles, lo que les permite por una parte tener un crecimiento más rápido (al usarse su energía para el crecimiento más que para la reproducción), y por otra parte no producir lechaza durante los meses de verano, lo que les asegura una calidad constante durante todo el año.

15 Las ostras triploides pueden obtenerse por cruzamiento de progenitores diploides, seguido de la retención del primer o del segundo glóbulo polar por tratamiento químico, generalmente con citocalasina B (CB) o en su caso con 6-dimetil-aminopurina (6-DMAP), o por tratamiento físico (sobre todo choque térmico o de presión). Estas dos técnicas presentan sin embargo un cierto número de inconvenientes. Se citará sobre todo una falta de homogeneidad del nivel de ploidía; en efecto, los tratamientos que inducen la retención de los glóbulos polares conducen a poblaciones

20 larvarias mezcladas, que poseen niveles de ploidía variados. Al final del desarrollo larvario, la población obtenida contiene generalmente como máximo el 90% de individuos triploides, estando constituido el resto de la población por diploides. Además, en el caso de los tratamientos químicos, estos, que usan productos muy tóxicos, son mal recibidos por el público, y necesitan implantar constantemente precauciones importantes para evitar todo peligro para los manipuladores.

25

Por esta razón el procedimiento privilegiado actualmente para la producción de ostras triploides consiste en cruzar ostras tetraploides con ostras diploides. Este procedimiento presenta además la ventaja de que no necesita el recurso repetido a tratamientos químicos, la de conducir a una población homogénea cuya totalidad de individuos son triploides. El principal inconveniente de este procedimiento proviene de la dificultad de obtener progenitores

30 tetraploides viables.

La producción de larvas tetraploides, en proporciones variables, se ha observado en el curso de las experimentaciones de producción de triploides por cruzamiento de progenitores diploides y retención de la expulsión del primer glóbulo polar por tratamiento con citocalasina B (CB). Sin embargo, esta producción de larvas tetraploides

35

parece transitoria; sólo se ha descrito durante las primeras 24 horas después de la fecundación (STEPHENS & DOWNING, J. Shellfish Res, 7, 550-51, 1988; GUO y col., Biol. Bull., 183, 381-93, 1992). Las larvas tetraploides detectadas ven caer a continuación su proporción drásticamente, de tal forma que no se detecta ninguna larva tetraploide ni durante el resto de la cría larvaria ni en el momento de la fijación y a fortiori durante las crías en microcriadero o en criadero.

40

Se han emitido dos hipótesis con el fin de explicar el fracaso de todos los planteamientos usados con el fin de obtener tetraploides viables directamente a partir de progenitores diploides:

De acuerdo con la primera de estas hipótesis, la tetraploidía conllevaría una carga genética incompatible con la supervivencia de las larvas debido a la expresión de ciertos alelos letales recesivos cuyo número de copias se encuentra cambiado después de la tetraploidización (hipótesis de los alelos letales recesivos). Sin embargo, las experiencias de ginogenia que usan líneas consanguíneas y silvestres tienden a mostrar que la expresión de los alelos letales recesivos no puede explicar por sí sola la totalidad de la mortalidad de tetraploides durante el estado larvario (GUO, Ph.D. Dissertation: Studies on tetraploid induction in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, University of Washington, Seattle 1991).

45

De acuerdo con la segunda de estas hipótesis (hipótesis de la relación núcleo-citoplasma), los ovocitos producidos por los progenitores diploides hembras poseen un tamaño demasiado bajo para sustentar un núcleo cuyo material genético se encuentra duplicado después de la tetraploidización. Es esta segunda hipótesis la que se ha privilegiado, y sobre esta base se han desarrollado los procedimientos propuestos hasta la actualidad para obtener ostras tetraploides viables.

50

El primer procedimiento que se ha aplicado con éxito consiste en cruzar progenitores hembra triploides con progenitores macho diploides, y en bloquear la primera fase de la meiosis (MI) induciendo retención del primer glóbulo polar (Solicitud PCT WO-95/19.703; GUO & ALLEN, Mol Mar Biol Biotechnol 3, 42-50, 1994). Este procedimiento se basa en el hecho de que las raras hembras triploides que no son estériles producen ovocitos cuyo tamaño es muy superior al de los ovocitos producidos por las hembras diploides, lo que le permite sustentar un núcleo tetraploide.

60

Recientemente, se ha descrito igualmente la producción de ostras tetraploides viables a partir de un cruzamiento de machos tetraploides con hembras diploides, seleccionadas previamente por el gran tamaño de sus ovocitos, seguido de la retención del segundo glóbulo polar (MCCOMBIE y col., *Mar Biotechnol* (NY), 7, 318-30, 2005). Sin embargo, en el momento actual, el único procedimiento de producción de tetraploides usado en la práctica es el consistente en implantar el cruzamiento de hembras triploides con machos diploides. Este procedimiento presenta sin embargo dos inconvenientes importantes:

1) Al haberse obtenido estos tetraploides a partir de triploides que presentan una fertilidad no despreciable, el uso de estos mismos tetraploides con el fin de producir nuevas generaciones de triploides puede conllevar un aumento de la fertilidad de los triploides obtenidos de generaciones sucesivas. Así, se ha observado que la fertilidad media pasaba del 2% para los triploides de primera generación (triploides "químicos" obtenidos después de la retención del segundo GP después de un tratamiento con CB) al 13,4% para los triploides de segunda generación, obtenidos de un cruzamiento de progenitores macho tetraploides con hembras diploides (GUO & ALLEN, *Biol. Bull.*, 187, 309-18, 1994). Este aumento de fertilidad en el curso de las generaciones corre el riesgo de conllevar la aparición a plazo más o menos largo de una población de triploides cuya fertilidad sería creciente, lo que hace correr el riesgo de una esterilización progresiva del medio, y de contaminación de las reservas de ostras diploides autóctonas después de la reproducción de las ostras triploides cuya descendencia es mayoritariamente aneuploide.

2) La necesidad de pasar por triploides hace especialmente difícil y molesta la introducción, en el nivel tetraploide, de todo avance genético realizado de forma normal y general en el nivel diploide. En efecto, las líneas diploides mejoradas después de programas de selección genética deben usarse en primer lugar para producir triploides mediante procedimientos clásicos de inducción química. Sólo a continuación los pocos triploides que llegan a entrar en la madurez y a producir ovocitos pueden usarse como progenitores hembra con el fin de producir tetraploides.

Así pues, parece especialmente deseable disponer de un procedimiento de producción de ostras tetraploides que permita el paso directo del estado diploide al estado tetraploide sin pasar por el estado triploide.

Los autores de la invención han propuesto la hipótesis de que la no supervivencia, más allá del estado larvario, de los tetraploides producidos durante el cruzamiento de progenitores diploides podría tener causas distintas que un tamaño demasiado bajo del ovocito diploide con respecto al núcleo tetraploide, y que entre estas causas podría figurar en especial un descenso del valor adaptativo general (es decir, de la aptitud global para la supervivencia) resultante de la tetraploidía. Este descenso del valor adaptativo podría deberse a la expresión de ciertos alelos negativos que se encuentran normalmente reprimidos en los diploides y los triploides y que no estarían reprimidos, o lo estarían sólo parcialmente en los tetraploides.

Esto tendría como resultado una baja competitividad de las larvas tetraploides, y así pues su rápida desaparición cuando se crían en combinación con larvas diploides y triploides, que están presentes igualmente en las poblaciones larvarias resultantes del cruzamiento de progenitores diploides seguido de la retención del primer glóbulo polar.

A partir de esta hipótesis, los autores de la invención han postulado que la clasificación de las larvas, con el fin de aislar los tetraploides y de permitirles superar la competición muy intensa ejercida por las larvas diploides y triploides permitiría conducir a la obtención de tetraploides viables, a partir de un cruzamiento que implica únicamente progenitores diploides silvestres.

Así pues se ha desarrollado un procedimiento basado en la detección de las larvas tetraploides, conteniendo el aislamiento de una subpoblación larvaria un alto porcentaje de larvas tetraploides, y la cría de esta subpoblación, repitiéndose estas etapas tantas veces como sea necesario en el transcurso del desarrollo.

Se ha constatado así que las larvas tetraploides se distinguían especialmente por un desarrollo menos rápido y, así pues, por un tamaño más bajo que el de las larvas diploides y triploides en el mismo estado de desarrollo. Esta observación confirma la hipótesis formulada por los autores de la invención, del descenso del valor adaptativo de las larvas tetraploides. Además permite simplificar la clasificación de las larvas para la obtención de poblaciones enriquecidas en larvas tetraploides, ya que esta clasificación puede realizarse sobre la base del tamaño larvario.

La presente invención tiene por objeto, en consecuencia, un procedimiento de obtención de bivalvos tetraploides, caracterizado porque comprende:

a) la fecundación de ovocitos de hembras diploides por espermatozoides de machos diploides, seguida de la inducción de la retención del primer cuerpo polar de los huevos fecundados;

b) el cultivo de las larvas obtenidas después de esta fecundación;

c) el aislamiento, a partir de la población de larvas cultivadas de la etapa b), de una subpoblación enriquecida en tetraploides, que comprende al menos el 20%, preferentemente al menos el 30% de larvas tetraploides;

d) el cultivo de la subpoblación de larvas aislada en la etapa c).

La retención del primer cuerpo polar puede ser inducida, de manera clásica, por cualquier tratamiento que induzca la inhibición del ensamblaje de microtúbulos, realizado generalmente entre el 5° y el 25° minuto después de la
5 fecundación, y cuya duración puede variar de 10 a 20 minutos. Puede tratarse, por ejemplo, de un tratamiento mediante un agente químico, como colchicina, cafeína, nocodazol, citocalasina B o 6-DMAP, o de un tratamiento físico como un choque térmico moderado o un choque hiperbárico.

De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, la retención del primer cuerpo polar es
10 inducida por tratamiento con citocalasina B. El tratamiento con citocalasina B puede realizarse entre el 5° y el 25° minuto después de la fecundación, durante 10 a 20 minutos. Preferentemente se realiza a partir del 10° minuto después de la fecundación, durante 15 minutos aproximadamente. De manera especialmente ventajosa, la citocalasina B se usa en una concentración final por litro de medio de tratamiento comprendida entre 0,3 y 0,7 mg, preferentemente del orden de 0,5 mg. Estas concentraciones, que son dos veces más bajas que las usadas
15 habitualmente para la inducción de la retención del primer cuerpo polar en el marco de la producción de ostras triploides, permiten limitar el efecto tóxico de la citocalasina B, sin reducir no obstante la eficacia de la inducción.

Igualmente se puede usar, en lugar de citocalasina B, otro agente químico, como colchicina, cafeína, nocodazol o 6-DMAP (300 a 500 μ M), o un tratamiento físico como un choque térmico moderado (30 a 40°C) o un choque
20 hiperbárico. Para cada uno de estos tratamientos, las condiciones elegidas serán preferentemente más moderadas que cuando se aplica el mismo tratamiento para inducir la retención del primer cuerpo polar en el marco de la producción de ostras triploides.

De manera especialmente ventajosa, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende las etapas
25 adicionales siguientes:

e) el aislamiento, a partir de la subpoblación de larvas cultivadas de la etapa precedente, de una subpoblación rica en tetraploides que comprende al menos el 20%, ventajosamente al menos el 30%, de larvas tetraploides;

30 f) el cultivo de la subpoblación de larvas aislada en la etapa e).

Generalmente, el cultivo de la etapa b) se realiza durante 6 a 10 días, preferentemente durante 8 días aproximadamente, y el cultivo de las etapas d) y f) se realiza durante 2 a 3 días.

35 Estas etapas de aislamiento de una subpoblación rica en tetraploides y de cultivo de la subpoblación aislada pueden repetirse varias veces, hasta que las larvas hayan alcanzado el estado pedivelígero (tamaño comprendido entre 220 y 250 μ m). Ventajosamente se repiten al menos 3 veces, preferentemente al menos 4 veces, en intervalos de 2 a 3 días.

40 De acuerdo con una forma de realización preferida especialmente del procedimiento de acuerdo con la invención, la clasificación de las larvas para aislar una subpoblación enriquecida en tetraploides se realiza sobre la base de su tamaño.

En efecto, como se indica anteriormente, las larvas tetraploides tienen un tamaño más reducido que las larvas
45 diploides y triploides en el mismo estado de desarrollo. Generalmente, el tamaño medio de las larvas tetraploides es inferior en el 20 al 30% al de las larvas diploides, y en el 25 al 35% al de las larvas triploides de la misma especie en el mismo estado de desarrollo, y cultivadas en las mismas condiciones.

Esto permite clasificar fácilmente las larvas, por paso simple a través de un tamiz que tiene un tamaño de malla
50 apropiado, elegido en función de la especie concernida, del estado de desarrollo larvario y de las condiciones de cultivo.

De manera ventajosa, pueden realizarse etapas adicionales de aislamiento de una subpoblación enriquecida en
55 tetraploides y de cultivo de la subpoblación aislada después del estado pedivelígero, en las huevas fijadas. A partir de este estado, se repetirán preferentemente en intervalos menos cercanos que antes, por ejemplo, cada 8 a 15 días.

En este caso, para realizar la clasificación por cribado, el soporte de fijación suministrado a las larvas pedivelígeras está constituido por partículas de tamaño aproximadamente igual al de las larvas durante la fijación, lo que permite
60 la fijación de una única larva por partícula. Especialmente se puede usar como soporte de las partículas de material microfragmentado, obtenido por trituración de conchas de ostras.

Después de cada una de las etapas de aislamiento de una subpoblación, el porcentaje de tetraploides en la subpoblación seleccionada puede, si se desea, verificarse mediante procedimientos clásicos de determinación de
65 nivel de ploidía. Por ejemplo, se puede usar citometría de flujo, en una muestra, de al menos 100 individuos,

obtenida a partir de dicha subpoblación.

El procedimiento de acuerdo con la invención puede usarse para todas las especies de bivalvos (por ejemplo, pectínidos, mejillones (*Mytilus edulis* y *Mytilus galloprovincialis*), almejas, etc.) en las que se desea producir tetraploides (especialmente con vistas a usarlos para la producción de triploides). Es interesante muy especialmente para la producción de ostras tetraploides, y puede usarse, por ejemplo, no sólo en ostras de la especie *Crassostrea gigas*, como se ilustra mediante los ejemplos mostrados a continuación, sino igualmente en cualquier otra especie del género *Crassostrea* (especialmente *Crassostrea virginica*), *Saccostrea* (por ejemplo, *Saccostrea commerciales*), o en especies del género *Ostrea*, como *Ostrea edulis*.

10

El procedimiento de acuerdo con la invención permite obtener bivalvos tetraploides viables, y especialmente ostras, a partir de cualquier progenitor diploide. En particular, no necesita ninguna selección de progenitores hembra en lo que se refiere al tamaño de sus ovocitos.

15 Permite producir progenitores tetraploides, directamente a partir de progenitores silvestres diploides y ello sin pasar por una etapa triploide. Estos progenitores tetraploides pueden usarse a continuación para la producción de triploides sin correr los riesgos, mencionados anteriormente, relacionados con un aumento de la fertilidad de los triploides en el curso de las generaciones.

20 El procedimiento de acuerdo con la invención permite igualmente introducir directamente en los tetraploides mejoras genéticas obtenidas en diploides. En efecto, para ello basta con usar como material de partida para la aplicación de este procedimiento ovocitos y esperma obtenidos a partir de animales de una línea diploide seleccionada. Los tetraploides obtenidos pueden usarse a continuación para la obtención de triploides que integran igualmente la misma mejora.

25

La presente invención se comprenderá mejor con ayuda del complemento de descripción que se ofrece a continuación, que se refiere a ejemplos que ilustran la aplicación de la presente invención para la obtención de ostras tetraploides viables.

30 EJEMPLO 1: INDUCCIÓN DE LA POLIPLOIDÍA Y CRÍA LARVARIA

Los progenitores diploides usados para las experimentaciones provienen de una captación natural en la cuenca de Marennes Oléron de hueva diploide silvestre. Se han usado seis progenitores hembra y cuatro progenitores macho para la recolección de los gametos por escarificación de las gónadas. Se han usado 15 millones de ovocitos y 3 mil millones de espermatozoides obtenidos de los diez progenitores para realizar el cruzamiento en 1 l de agua de mar filtrada a 25°C. La retención del primer glóbulo polar se ha realizado usando citocalasina B (CB), disuelta en DMSO, y a la concentración final de 0,5 mg/l. La CB se ha administrado durante 15 minutos y esto a partir del 10º minuto después de la fecundación.

40 Este protocolo de inducción de poliploidía es similar a los ya publicados en la literatura especializada en el marco de la obtención de triploides (GUO y col., Biol. Bull., 183, 381-93, 1992; GÉRARD y col., Aquaculture, 174, 229-42 1999). Sin embargo, la concentración final de CB se ha reducido (0,5 mg/l en lugar de 1 mg/l), con el fin de limitar el efecto tóxico de este producto sin reducir, sin embargo, la tasa de inducción de poliploidía.

45 A continuación se elimina la CB después de cribado de los embriones a través de un filtro de nailon de 10 µm de tamaño de mallas y un lavado de 15 minutos en agua de mar filtrada que contiene el 0,1% de DMSO.

Como control se han usado 15 millones de ovocitos y 5 mil millones de espermatozoides obtenidos de los mismos progenitores para realizar un cruzamiento en las mismas condiciones, con excepción del tratamiento con CB.

50

A continuación, los embriones de cada uno de los dos grupos (grupo de control y grupo tratado con CB) se ponen en cultivo en cajones cilindro-cónicos que contienen 150 l de agua de mar filtrada a 22°C y aireada gracias a un burbujeador incorporado en el cajón de cría.

55 Con el fin de poder estimar las tasas de eclosión y una posible mortalidad de las larvas, estas últimas se criban después de 24 horas tras la fecundación, a través de un filtro de 45 µm de diámetro, se recogen en una probeta graduada que contiene 1 o 2 l de agua de mar filtrada y se estima el número total de larvas a partir de un recuento en una muestra de 50 µl.

60 Por otra parte, la ploidía de las larvas se determina por citometría de flujo. Después de cada cribado, se toma una muestra de larvas (100 larvas como mínimo) y se introduce en un tubo de 1,5 ml. Después de la eliminación del agua de mar mediante un breve centrifugado, se vuelven a colocar las larvas en 1 ml de tampón de lisis (5 mM MgCl₂, 85 mM NaCl, 10 mM Tris, Triton X-10C al 0,1%, pH 7). A continuación, se trituran las larvas con ayuda de un pistón de plástico y los núcleos liberados se filtran a través de un filtro de nailon de 30 µm de tamaño de malla

65 (Partec Celltrics) y se recogen en un tubo de análisis de citometría, y después se marcan con DAPI (diclorhidrato de

4',6-diamidino-2-fenilindol) a la concentración final de 1 µg/ml, por adición de 1 ml de tampón de lisis que contiene DAPI a 2 µg/ml y 2 µl de control interno de ploidía (eritrocitos de trucha, TRBC, Coulter DNA Reference Calibrator, 629972).

- 5 Después de una incubación mínima de 30 min en hielo y en oscuridad, se realizan los análisis citométricos usando un citómetro Partec PAll. Cada análisis (canal FL4, escala lineal de 1.024 canales) se hace sobre un mínimo de 2.000 partículas. Los resultados obtenidos se presentan en forma de histogramas de frecuencias con una distribución gaussiana de los acontecimientos dentro de cada pico. Los picos se denominan "pico x" cuando su identificación se ha realizado de forma automática mediante el software FloMax™, o "RN/PK x" cuando su
- 10 identificación se ha realizado manualmente por parte del operador (siendo x el número del pico).

En el grupo tratado con CB, la tasa de larvas D en el d1 se estima en el 16,5% (frente al 42% para el control no tratado), lo que representa una población de larva D de 2,5 millones de larvas aproximadamente.

- 15 A partir del segundo día después de la fecundación, se procede a renovar el agua cada dos días después de cribado. Hasta el d6 después de la fecundación, las larvas se han cribado a través de un filtro de 45 µm. En cada renovación se cuentan las larvas y se determina su nivel de ploidía por citometría de flujo, según se describe anteriormente.
- 20 A continuación, las larvas se vuelven a poner en sus recipientes de cría cilindro-cónicos respectivos respetando una densidad máxima de 10.000 larvas/l en el d4 después de la fecundación y de 6.500 larvas/l en el d6 después de la fecundación.

Las larvas se alimentan todos los días con una mezcla de algas de forraje cultivadas en el laboratorio y que contiene

25 el 70% de *Isochrysis galbana* cepa Tahití y el 30% de *Chaetoceros gracilis* a una concentración de 25 células/µl/día.

- El seguimiento de la tasa de supervivencia en el transcurso de los primeros días de la cría muestra una clara disminución de la supervivencia de las larvas entre d1 y d6 después de la fecundación (fig. 1). Esta disminución puede explicarse al mismo tiempo por el efecto nocivo del tratamiento con CB y sobre todo por el efecto de la alta
- 30 densidad de larvas en el cajón de cría.

Entre d1 y d6 después de la fecundación, los análisis citométricos realizados a partir de las larvas tratadas o no con CB muestran que:

- 35 - El cruzamiento de control presenta una población de núcleos exclusivamente diploide (fig. 2, "pico 1"),
- Las muestras de larvas obtenidas de la inducción de retención de GPI muestran (fig. 3 y 4) tres tipos de poblaciones nucleares que corresponden a los niveles de ploidía siguientes: diploide (aproximadamente el 20% en promedio, "pico 1"), triploide (aproximadamente el 40% en promedio, "pico 2") y tetraploide (aproximadamente el
- 40 40% en promedio, "pico 3").

Después del d6 tras la fecundación, la población de larvas se estabiliza y la cría larvaria continúa sin mortalidad notable hasta la fijación de las larvas.

- 45 Los cribados se realizan por la mañana y cada dos o tres días. Hasta el sexto día después de la fertilización, las larvas se han cribado, de manera no selectiva, a través de un tamiz de 45 µm.

A continuación, se han realizado cribados selectivos, adaptando el tamaño de los tamices a la población de larvas diana, y se han constituido diferentes poblaciones de larvas, basándose en su velocidad de crecimiento (estimada

50 por los diferentes tamaños de los tamices), y sus niveles de ploidía (verificados por citometría de flujo).

- De esta manera, se han constituido poblaciones de alto desarrollo denominadas "cabeza de lote", de desarrollo medio denominadas "cuerpo de lote" y de desarrollo lento denominadas "cola de lote" en función de estos dos criterios, y se han puesto en cría en recipientes separados. Este procedimiento de clasificación selectivo en función
- 55 del tamaño y de la ploidía tiene como finalidad favorecer al máximo el crecimiento y la supervivencia de las larvas tetraploides y elevando con ello al máximo, en el seno de las diferentes partes diferentes del lote de cría, su eficacia relativa con respecto a las larvas diploides y triploides.

- * Así, en el d8 después de la fecundación, se ha realizado el primer cribado selectivo sobre el tamaño de las larvas y
- 60 se han criado dos poblaciones de larvas por separado: la población "cabeza de lote I" que tiene un crecimiento normal y un tamaño mínimo de 80 µm y una población "cola de lote I" con un crecimiento más lento, y un tamaño comprendido entre 65 µm y 80 µm.

Los cribados siguientes se han realizado en los días d11, d13, d15, d18, d20, d23, d25, d27 y d29 después de la

65 fecundación.

* En el d11 después de la fecundación, los análisis citométricos realizados en el grupo de control, así como en las dos poblaciones de larvas tratadas con CB muestran que:

5 - El cruzamiento de control presenta siempre una población de núcleos exclusivamente diploide (fig. 5, "pico 1", correspondiendo el pico "pico 2" al control interno TRBC),

- Las muestras de larvas tratadas obtenidas de la población "cabeza de lote I" que tiene un tamaño mínimo de 80 μm ($T \geq 80 \mu\text{m}$) muestran que esta población está constituida únicamente por larvas diploides (al 57%, "PK1") y de 10 larvas triploides (al 43%, "PK 2"). No se ha detectado ninguna proporción de larvas tetraploides (fig. 6, correspondiendo el pico "PK 3" al control interno TRBC).

- Las muestras de larvas tratadas obtenidas de la población "cola de lote I" que tiene un tamaño inferior a 80 μm ($65 \mu\text{m} < T < 80 \mu\text{m}$) muestran que esta población presenta una constitución radicalmente diferente, ya sea en términos 15 de clases de ploidía o en término de proporción de estas clases de ploidía. Los análisis citométricos muestran que esta población está constituida por el 15% de larvas diploides (pico 1), el 40% de larvas triploides (pico 2) y sobre todo el 45% de larvas tetraploides (pico 3) (fig. 7, en la que el pico "pico 4" corresponde al control interno TRBC).

Este resultado muestra que la fracción tetraploide de la población total de larvas en cría está confinada en la parte 20 "cola de lote" de la cría larvaria, confirmando así la hipótesis de los autores de acuerdo con la cual existe un desarrollo diferencial de las larvas que tienen diferentes niveles de ploidía cuando se crían en combinación. Así, el nivel de ploidía tetraploide se revela como el que confiere la menor velocidad de crecimiento cuando está en competencia con los niveles diploides y triploides.

25 Después de la cría, se ha prestado un cuidado especial a la población "cola de lote I", la única que contiene tetraploides, y se han realizado dos cribados selectivos en esta misma población "cola de lote I" con el fin de poder aislar dos subpoblaciones cada vez más ricas en larvas tetraploides, y ello después del cribado a través de los tamices de 60 y 80 μm .

30 Así, la primera subpoblación (denominada "cola de lote I") está constituida por larvas cuyo tamaño es superior a 65 μm , e inferior a 80 μm , mientras que la segunda subpoblación (denominada "cuerpo de lote I") está constituida por las larvas cuyo tamaño es superior o igual a 80 μm , y va generalmente hasta 100 μm .

* En el d13 después de la fecundación, los análisis citométricos realizados a partir de larvas tratadas o no con CB 35 muestran que:

- El control no tratado sigue mostrando núcleos exclusivamente diploides (pico "RN 1" de la fig. 8, correspondiendo el pico "RN 2" al control interno TRBC).

40 - La población de las larvas tratadas "cabeza de lote I" sigue estando constituida exclusivamente por larvas diploides (45%, pico 1) y triploides (55%, pico 2), (fig. 9, en la que "pico 3" corresponde al control interno TRBC). Esta población está compuesta por larvas que presentan un crecimiento normal y que han alcanzado un tamaño mínimo de 100 μm .

45 - Las poblaciones de las larvas tratadas "cuerpo de lote I" y "cola de lote I" son las dos únicas que siguen mostrando una alta proporción de larvas tetraploides (del 40 al 50% representados por los picos "pico 3" de la fig. 10 y "RN 3" de la fig. 11). Los picos "pico 1-2-4" y "RN 1-2-4" corresponden respectivamente a los núcleos diploides, triploides y al control interno TRBC de las fig. 10 y 11).

50 * En el d15 después de la fecundación, los esfuerzos de los autores de la invención se han concentrado en la conducción de la cría de las poblaciones "cuerpo de lote I" y "cola de lote I" de las larvas tratadas (las que contienen tetraploides). Se realizan cribados selectivos en estas poblaciones, usando los tamices de 65, 100 y 125 μm de tamaño de mallas, con el fin de constituir nuevas subpoblaciones:

55 - de alto crecimiento denominada "cabeza de lote II" con un tamaño comprendido entre 125 y 150 μm ;

- de crecimiento medio denominada "cuerpo de lote II" con un tamaño comprendido entre 100 y 125 μm ;

- de bajo crecimiento denominada "cola de lote II" con un tamaño comprendido entre 65 y 100 μm .

60

Los análisis citométricos realizados a partir de larvas tratadas o no con CB muestran que:

- El control no tratado sigue mostrando núcleos exclusivamente diploides ("pico 1", fig. 12; el "pico 2" corresponde al control interno TRBC).

- La población de las larvas tratadas “cabeza de lote I” sigue constituida exclusivamente por larvas diploides (de altura del 45%) y triploides (de altura del 55%).

- Las poblaciones de las larvas tratadas con CB “cabeza de lote II” ($150 \mu\text{m} > T \geq 125 \mu\text{m}$), “cuerpo de lote II” ($125 \mu\text{m} > T \geq 100 \mu\text{m}$) y “cola de lote II” ($100 \mu\text{m} > T \geq 65 \mu\text{m}$) siguen mostrando una proporción notable de larvas tetraploides (fig. 13, 14, 15 en las que los picos “RN 1-2-3-4” corresponden respectivamente a los núcleos diploides, triploides, tetraploides y el control interno TRBC). Sin embargo, la importancia de esta población tetraploide es muy diferente de una parte del lote de cría a otra. Esta proporción de larvas tetraploides es la más baja (15%) en la “cabeza de lote II” (fig. 13, pico “RN3”), y la más alta (50%) en la “cola de lote II” (fig. 15, pico “RN3”). En la parte

10 “cuerpo de lote II”, esta proporción de larvas tetraploides presenta un valor intermedio (28%, fig. 14, pico “RN3”). Así pues, parece claramente que los lotes de cría que presentan más larvas tetraploides son los que se cruzan con menor rapidez, lo que subraya una vez más la diferencia de valor de adaptación general de los tres niveles de ploidía y la necesidad de realización de clasificaciones selectivas con el fin de mantener las larvas tetraploides.

15 * En el d18 después de la fecundación, una parte de las larvas tratadas de la población “cabeza de lote I” ($T \geq 250 \mu\text{m}$) son pedivelígeras y comienzan a fijarse, dos días antes que las larvas de control no tratadas. Los análisis citométricos realizados en el d18 siguen mostrando un nivel exclusivamente diploide en el control (fig. 16, “pico 1”; el “pico 2” corresponde al control interno TRBC), y una mezcla de diploides (al 30%, “pico 1”) y de triploides (al 70%, pico 2”) en la población “cabeza de lote I” (fig. 17 en la que el “pico 3” corresponde al control interno TRBC).

20 * En los d20 y d23 después de la fecundación, mientras que el control no tratado sigue mostrando un nivel exclusivamente diploide (fig. 18 y 22, “pico 1”), los lotes de cría que contienen larvas tetraploides (cabeza de lote II ($T \geq 180 \mu\text{m}$); cuerpo de lote II ($180 \mu\text{m} > T \geq 150 \mu\text{m}$) y cola de lote II ($150 \mu\text{m} > T \geq 100 \mu\text{m}$)) muestran sustancialmente las mismas proporciones de larvas tetraploides que en el d15 después de la fecundación

25 (respectivamente el 20, el 35 y el 45% de tetraploides representados por los picos “RN/pico 3” de las fig. 19 a 21 y 23 a 25, en las que los otros picos “pico/RN 1-2-4” corresponden respectivamente a los diploides, triploides y el control interno TRBC). Además, aun cuando su crecimiento parezca manifiestamente más lento que el del control no tratado, a pesar de todo estas larvas han visto aumentar su tamaño mínimo (tamaños mínimos respectivos de 180, 150 y $100 \mu\text{m}$ en el d23 frente a 125, 100 y $65 \mu\text{m}$ en el d15 después de la fecundación).

30 * En el d25 después de la fecundación, una primera cohorte de larvas pedivelígeras ($T \geq 250 \mu\text{m}$) que contiene el 30% de larvas tetraploides (pico “RN3” de la fig. 26, correspondiendo los otros picos “RN 1-2-4” respectivamente a los diploides, triploides, y al control interno TRBC)) se ha puesto en fijación en material microfragmentado de conchas de ostras. Esta primera fijación de larvas tetraploides se ha seguido en los d27 y d29 de otras tres puestas

35 en fijaciones de larvas pedivelígeras que contienen proporciones variables de larvas tetraploides que van del 20 al 40% (picos “pico 3” de las fig. 27, 28 y 29. Los otros picos “pico 1-2-4” corresponden respectivamente a los núcleos diploides, triploides y al control interno TRBC).

EJEMPLO 2: FIJACIÓN Y DESARROLLO DE HUEVAS TETRAPLOIDES

40

1 meses después de la fijación

El control de la presencia de huevas tetraploides en el seno de la población de larvas que han conseguido metamorfosearse y fijarse se ha realizado un mes después de la fijación, por citometría de flujo. A causa del

45 pequeño tamaño de la hueva en este estado, este control se ha realizado en modo destructivo en una muestra de varias huevas a la vez. Las huevas se ponen en un tubo de 1,5 ml. A continuación, se incuban en 1 ml de tampón de lisis y se trituran con ayuda de un pistón de plástico. Finalmente, los núcleos liberados se filtran a través de un filtro de nailon de $30 \mu\text{m}$ de tamaño de malla (Partec Celltrics) y se recogen en un tubo de análisis de citometría, se marcan con DAPI, y se analizan como se describe en el Ejemplo 1 anterior.

50

Los resultados citométricos han permitido a los autores de la invención confirmar la presencia, junto a poblaciones triploides y diploides, de una población notable de huevas tetraploides (29%) (“pico 3” de la fig. 30; los picos “pico 1-2-4” corresponden respectivamente a los núcleos diploides, triploides y el control interno TRBC). Esta población de huevas tetraploides ha conseguido por tanto fijarse y proseguir su desarrollo en microcriadero.

55

Este resultado demuestra la obtención, directamente a partir de progenitores diploides, de hueva tetraploide que ha sobrevivido a la fase de cría larvaria y a la metamorfosis que permite la fijación. Además la hueva tetraploide obtenida sigue desarrollándose incluso después de la fijación.

60 2 meses después de la fijación

Dos meses después de la fijación, el control de la presencia de las huevas tetraploides en el seno de la población de huevas de tres meses de vida se ha realizado, siempre por citometría de flujo, en modo destructivo aunque en huevas individualizadas.

Los resultados de los autores de la invención les ha permitido mostrar la presencia de huevas tetraploides de tres meses de vida (fig. 31). Como se demuestra durante la cría larvaria, la relación durante la cría en microcriadero del nivel de ploidía de un individuo con su tamaño revela también un desarrollo diferencial. En efecto, la población de huevas tetraploides que tiene un crecimiento lento parece confinarse más bien en las partes de "cola de lote" y "cuerpo de lote" de la cría mientras que la parte de "cabeza de lote" parece constituida por huevas diploides y triploides que se desarrollan más rápidamente.

A continuación, y con el fin de favorecer el crecimiento de los tetraploides, los autores de la invención han adoptado por tanto el mismo enfoque que el adoptado durante la cría larvaria: a saber, un sistema de clasificación de las huevas en función de su tamaño y de su nivel de ploidía de forma que se constituyan lotes de cría con el máximo posible de huevas tetraploides y que experimenten la menor concurrencia posible por parte de las huevas triploides y diploides.

En la práctica, las huevas individualizadas han experimentado cribados selectivos sucesivos a través de tamices rectangulares (45 x 35 x 12 cm) cuyo tamaño de abertura de las mallas se escalonaba entre 150 μm y 2 mm pasando por los tamaños intermedios de 350, 500 y 1.000 μm .

Estos cribados selectivos se han realizado en intervalos regulares de 15 días. De acuerdo con un enfoque similar al seguido durante la etapa de la cría larvaria, se han constituido poblaciones "cabeza de lote", "cuerpo de lote" y "cola de lote" y se han criado por separado.

6 meses después de la fijación

Seis meses después de la fijación, las huevas de 7 meses de vida comienzan a ser accesibles para un marcado individual y para un control no destructivo de su nivel de ploidía a partir de biopsias branquiales. Así, cada individuo ha sido identificado por una etiqueta de plástico adherida con cola epoxídica en su concha. A continuación, los individuos objeto de análisis son anestesiados en un baño de 3 litros de agua de mar que contiene 150 g de MgCl_2 , lo que permite así la toma de la biopsia branquial en la que se realizará la medida de la ploidía del animal. En este estado, los análisis citométricos realizados en un total de 600 individuos han permitido a los autores de la invención clasificar más de 90 jóvenes ostras tetraploides que han confirmado una tasa media del 15% de las ostras tetraploides inducidas directamente a partir de progenitores diploides silvestres (fig. 32).

8-9 meses después de la fijación

Ocho meses después de la fijación, los análisis citométricos de los autores de la invención les han permitido realizar una clasificación de más de 200 individuos tetraploides encontrados sobre todo en las poblaciones de "cola de lote" y "cuerpo de lote".

Por causa de los lugares disponibles, la clasificación de los individuos se ha interrumpido en este estado.

Nueve meses después de la fijación, se ha puesto en acondicionamiento una veintena de individuos cuyo tamaño medio era de 6 cm permitiendo el desencadenamiento de la maduración y la producción de gametos. Estos futuros progenitores se han acondicionado en un agua de mar a 20°C, que contiene $2 \cdot 10^9$ células de fitoplancton por día y por individuo. Al término de este periodo de acondicionamiento a la maduración, los progenitores tetraploides han sido sometidos a varios choques (térmicos y de exondación) con el fin de desencadenar su puesta. En la treintena de progenitores puestos en maduración, 18 han puesto con una proporción por sexos claramente favorable a los machos (17 machos y 1 hembra) lo que está perfectamente de acuerdo con la naturaleza protandra de la ostra hueca *C. gigas*. Con el fin de probar los gametos producidos por estos progenitores tetraploides, los autores de la invención han realizado dos tipos de cruzamientos:

El primero fecundando los ovocitos tetraploides, obtenidos de la única hembra tetraploide, por la mezcla del esperma tetraploide, producido por los 17 machos tetraploides.

El segundo fecundando ovocitos obtenidos de seis hembras diploides silvestres por el esperma obtenido de los 17 machos tetraploides.

Los resultados de los autores de la invención muestran claramente que los gametos producidos por los progenitores sometidos a prueba son plenamente viables y fecundantes. Así, cruzados entre sí, los nuevos tetraploides producen larvas únicamente tetraploides (fig. 33, 100% de tetraploides representados por el pico "RN1", con el pico "RN2" representando el control interno TRBC), y cruzados con hembras diploides, los machos tetraploides producen una descendencia únicamente triploide (fig. 34, 100% de triploides representados por el pico "pico 1", con el pico "pico 2" representando el control interno TRBC). Actualmente, estas nuevas generaciones de tetraploides y de triploides se metamorfosean y se fijan y se crían en microcriadero (tamaño entre 500 y 1.000 μm).

En conclusión, los autores de la invención han conseguido producir ostras tetraploides obtenidas de progenitores

diploides. Estos mismos tetraploides, después de un tratamiento de acondicionamiento de la maduración gamética, consiguen entrar en gametogenia y producir gametos machos y hembras tetraploides plenamente viables y fecundantes. Cuando estos tetraploides se han cruzado entre sí, consiguen producir una nueva generación de tetraploides plenamente viables. Finalmente, cuando se han usado como progenitores macho que sirven para fecundar hembras diploides, estos mismos tetraploides producen una nueva generación de triploides también plenamente viables lo que abre así la vía para el uso de estos tetraploides como posibles progenitores que suministran la red triploide.

Más de 9 meses después de la fijación (febrero de 2007 – marzo de 2008)

El nivel de ploidía de las ostras tetraploides de primera generación obtenidas del cruzamiento de machos y hembras diploides (ostras tetraploides directas denominadas en lo sucesivo "TM1") se confirma mediante análisis citométricos y también después de recuento cromosómico a partir de tejido branquial usando las técnicas de cariotipo clásicas. Comparativamente con las ostras tetraploides clásicas (es decir, las obtenidas de hembras triploides) de la misma edad y criadas en las mismas condiciones, las ostras tetraploides directas "TM1" de primera generación han mostrado una gran robustez y un crecimiento ponderal bastante más importante (fig. 35). Así, al cabo de veinte meses de cría, los tetraploides de primera generación (TM1) son 1,86 veces más pesados que los tetraploides clásicos (2006-01). Además, el conjunto TM1 se muestra especialmente resistente ya que no se manifiesta ninguna mortalidad a diferencia del conjunto de tetraploides clásicos (2006-01) que ha conocido varios episodios de mortalidad, sobre todo estival.

A principios de 2007, las ostras tetraploides directas de primera generación "TM1" se han usado como progenitores macho y hembra con el fin de producir, después de una puesta natural, una segunda generación de ostras tetraploides directas denominada en lo sucesivo "G2TM1". La tetraploidía de las larvas y huevos G2TM1 se ha confirmado también al mismo tiempo por análisis citométricos y también después de recuento cromosómico usando las técnicas de cariotipo clásicas. Las huevas G2TM1 son todas tetraploides y su cría, ya sea en estado larvario, en microcriadero o criadero, no difiere en absoluto de una cría clásica. Durante su cría, las huevas G2TM1 han mostrado un comportamiento muy bueno sobre todo en términos de robustez, de crecimiento y de estabilidad del nivel de tetraploidía. En efecto, comparativamente con las huevas tetraploides (2007-01) clásicas (es decir, obtenidas de hembras triploides) de la misma edad y criadas en las mismas condiciones, y aun cuando su nivel de reversión hacia los niveles de ploidía inferiores no parezca diferente del presentado por las huevas tetraploides clásicas, las huevas G2TM1 presentan un crecimiento y una robustez muy superiores. En efecto, al cabo de 9 meses de cría, el conjunto G2TM1 se compone de individuos tetraploides cuyo peso total medio oscila en torno a 75 gramos mientras que el de los tetraploides clásicos estaba solamente en 27 gramos aproximadamente lo que quiere decir que los individuos G2TM1 eran en promedio 2,7 veces más pesados que los tetraploides clásicos de la misma edad (fig. 36). Además, el conjunto G2TM1 se muestra especialmente robusto ya que no ha aparecido ninguna mortalidad, al contrario que en el conjunto 2007-01.

A partir del mes de noviembre de 2007, los tetraploides G2TM1 de 9 meses de vida después de la fijación han sido acondicionados a la maduración, y dos meses y medio más tarde, se han usado como progenitores con el fin de producir, por puesta inducida, gametos que se han usado con el fin de producir en febrero de 2008 la tercera generación de tetraploides directos denominada en lo sucesivo "G3TM1". La proporción por sexos de los progenitores tetraploides G2TM1 así como su fecundidad no difieren de las de los progenitores diploides. Las larvas G3TM1 producidas son tetraploides. Paralelamente, los machos G2TM1 se han usado también eficazmente con el fin de fecundar ovocitos productos por hembras diploides con el fin de producir triploides.

Los resultados anteriores muestran que los tetraploides obtenidos de acuerdo con la invención son muy eficaces para producir triploides. Al igual que las diploides, las ostras tetraploides alcanzan la madurez en el curso de su primer año de vida. Estas ostras (*Crassostrea gigas* Thunberg) tetraploides maduras presentan una proporción por sexos normal y una fecundidad comparable a la de las diploides. Los cruzamientos entre tetraploides y diploides se realizan de forma fácil y normal. Todos los cruzamientos tetraploides x diploides (y a la inversa) producen huevas exclusivamente triploides después de controles de la ploidía por citometría de flujo.

EJEMPLO 3: OBTENCIÓN DE TETRAPLOIDES EN EL MEJILLÓN

Se han obtenido tetraploides eficazmente en el mejillón (*M. edulis* y *Mytilus galloprovincialis*) usando el procedimiento detallado en los ejemplos 1 y 2.

En el mejillón, los resultados citométricos han permitido a los autores de la invención confirmar la presencia, junto a poblaciones triploides y diploides, de una población mayoritaria de huevas tetraploides. Así,

- El cruzamiento de control presenta una población de núcleos exclusivamente diploides (fig. 37, pico "RN 1"),

- Las muestras obtenidas de la inducción de retención de GPI muestran tres tipos de poblaciones nucleares (fig. 38) que corresponden a los niveles de ploidía siguientes: diploide (aproximadamente el 10% en promedio, pico "RN 1"),

triploide (aproximadamente el 20% en promedio, pico "RN 2") y tetraploide (aproximadamente el 70% en promedio, pico "RN 3"). Los individuos tetraploides obtenidos están en curso de cría.

De una manera general y de la misma forma que en la ostra hueca y el mejillón, pueden producirse tetraploides
5 viables en todos los moluscos bivalvos usando el procedimiento detallado en los ejemplos anteriores.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de moluscos bivalvos tetraploides, **caracterizado porque** comprende:
 a) la fecundación de ovocitos de hembras diploides por esperma de machos diploides, seguida de la inducción de la retención del primer cuerpo polar de los huevos fecundados;
- 5 b) el cultivo de las larvas obtenidas después de esta fecundación;
 c) el aislamiento, a partir de la población de larvas cultivadas de la etapa b), de una subpoblación enriquecida en tetraploides, que comprende al menos el 20% de larvas tetraploides;
 d) el cultivo de la subpoblación de larvas aislada en la etapa c).
- 10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la retención del primer cuerpo polar es inducida por un tratamiento con citocalasina B, realizado entre el minuto 5° y 25° después de la fecundación, durante 10 a 20 minutos.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** la citocalasina B se usa en
 15 una concentración final por litro de medio de tratamiento comprendida entre 0,3 y 0,7 mg.
4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** el cultivo de la etapa b) se realiza durante 6 a 8 días.
- 20 5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** el cultivo de la etapa d) se realiza durante 2 a 3 días.
6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** comprende las etapas adicionales siguientes:
 25 e) el aislamiento, a partir de la subpoblación de larvas cultivadas de la etapa precedente, de una subpoblación rica en tetraploides, que comprende al menos el 20% de larvas tetraploides;
 f) el cultivo de la subpoblación de larvas aislada en la etapa e).
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado porque** el cultivo de la etapa f) se
 30 realiza durante 2 a 3 días.
8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** el aislamiento de las subpoblaciones enriquecidas en tetraploides se realiza clasificando las larvas sobre la base de su tamaño.
 35
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado porque** el aislamiento de las subpoblaciones enriquecidas en tetraploides se realiza por el paso en un tamiz de tamaño de malla apropiado, y selección de las larvas que no son retenidas por el tamiz.
- 40 10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** dichos moluscos bivalvos son ostras.
11. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** dichos moluscos bivalvos son mejillones.

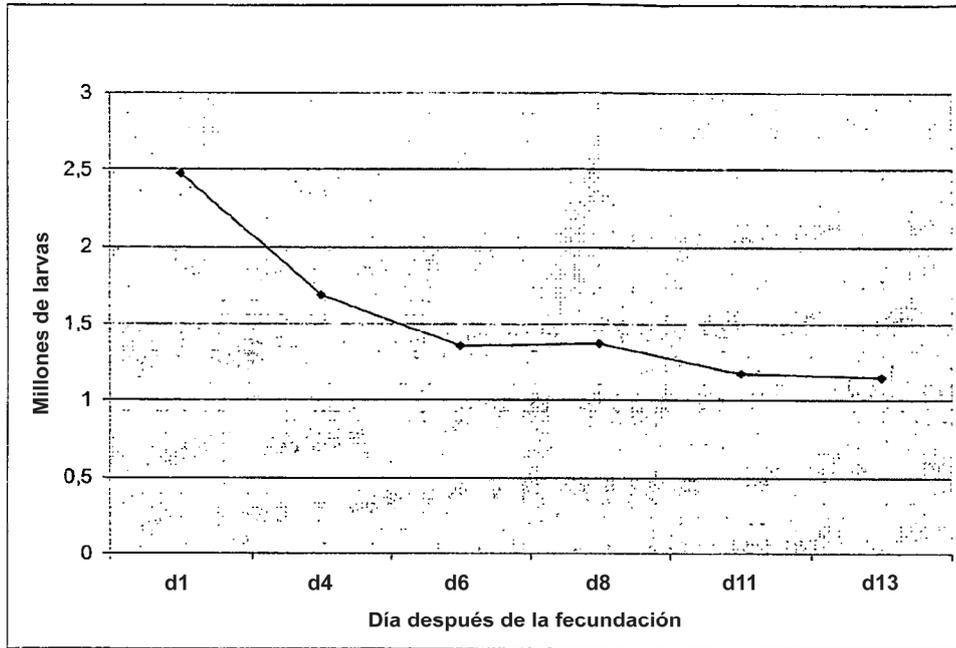


Figura 1

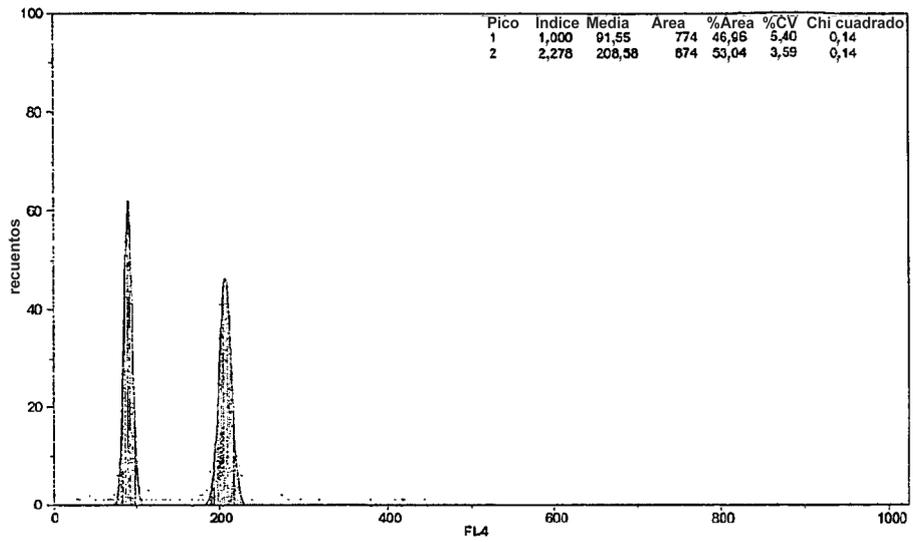


Figura 2

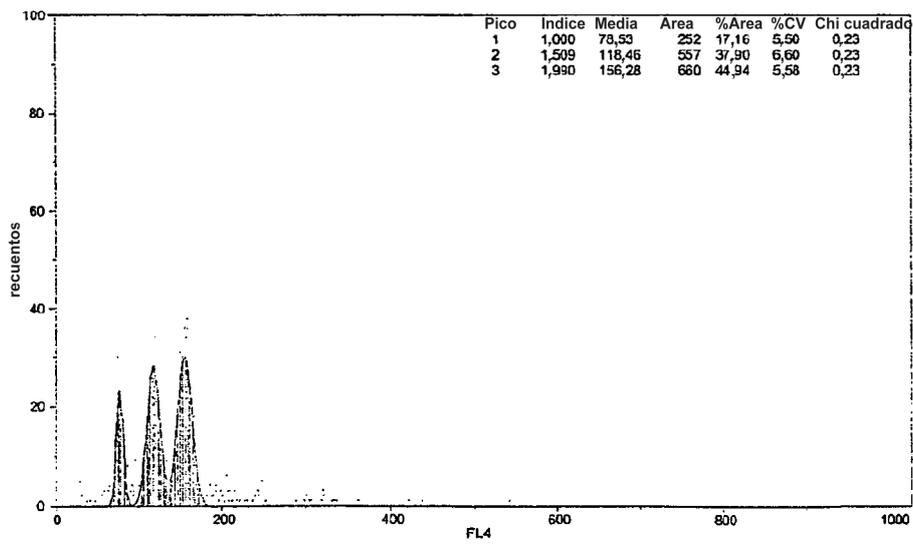


Figura 3

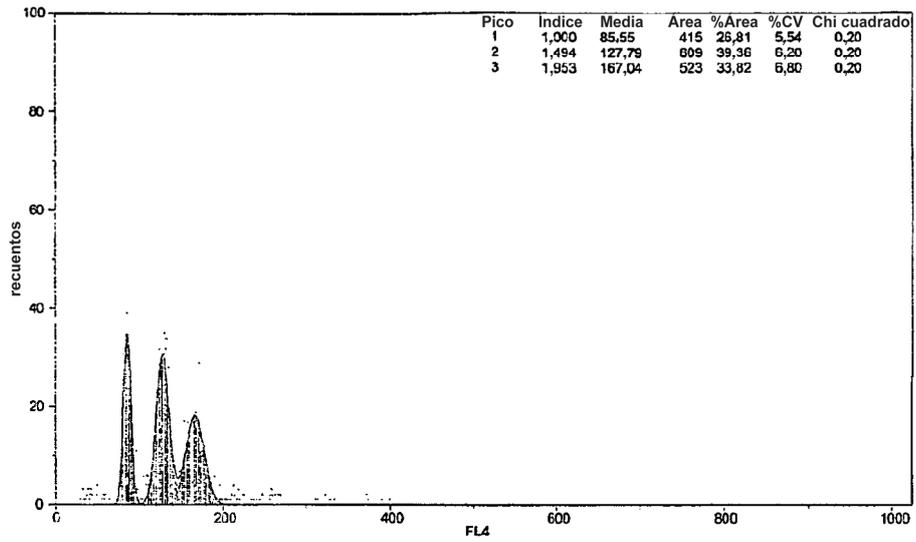


Figura 4

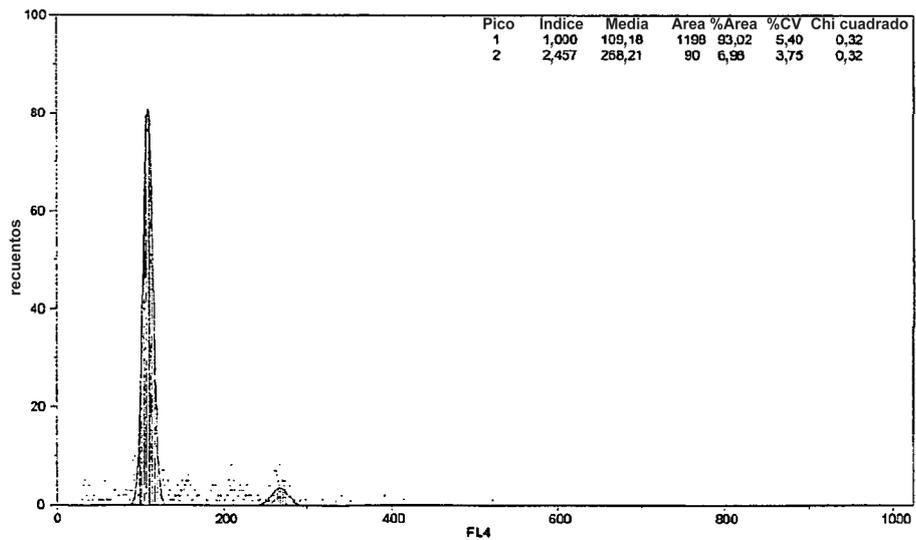


Figura 5

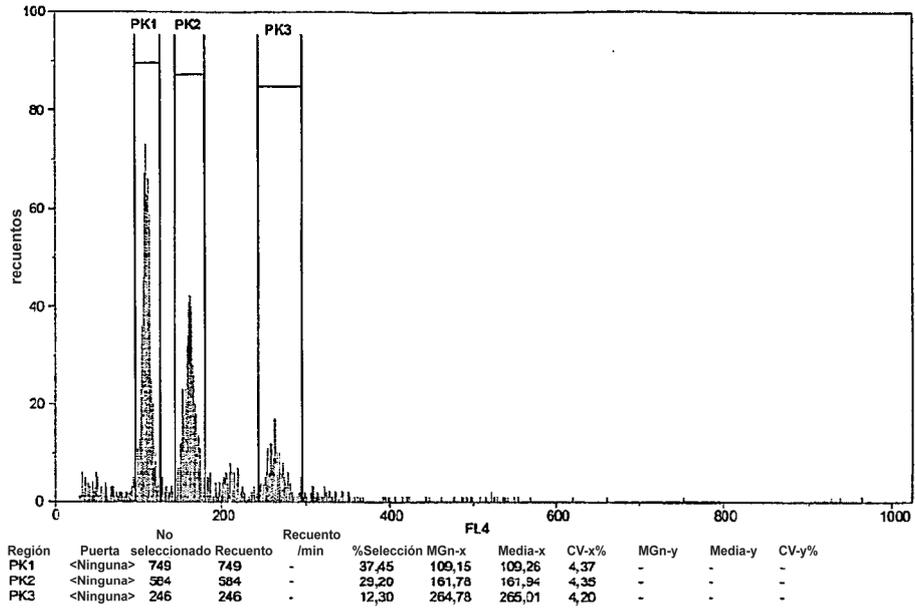


Figura 6

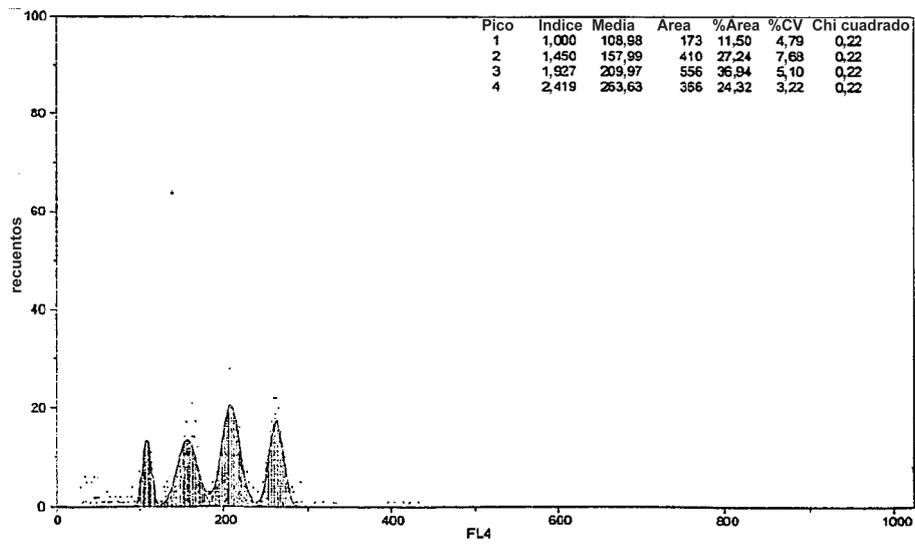


Figura 7

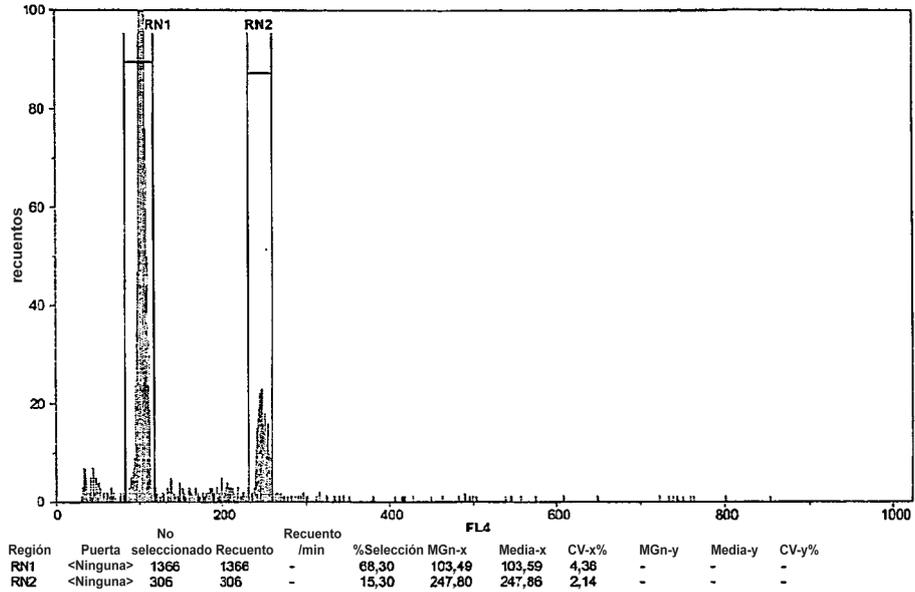


Figura 8

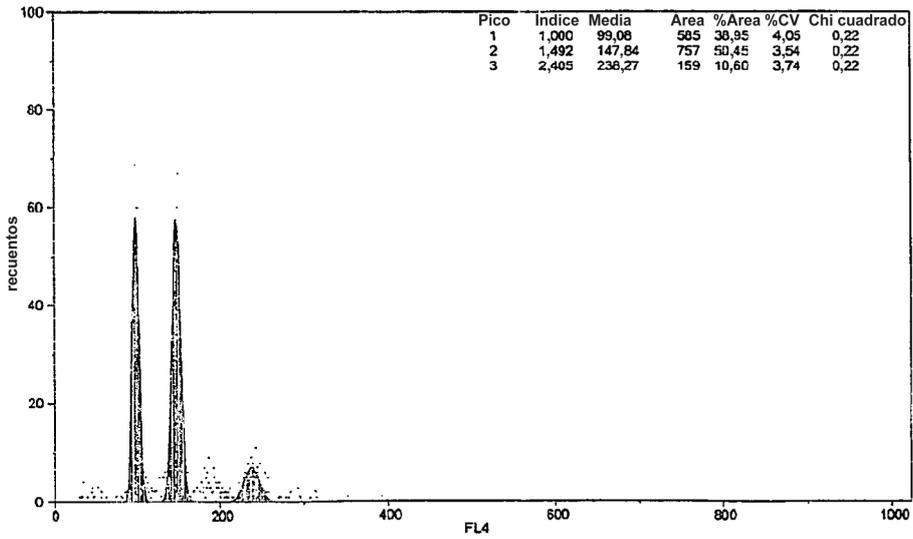


Figura 9

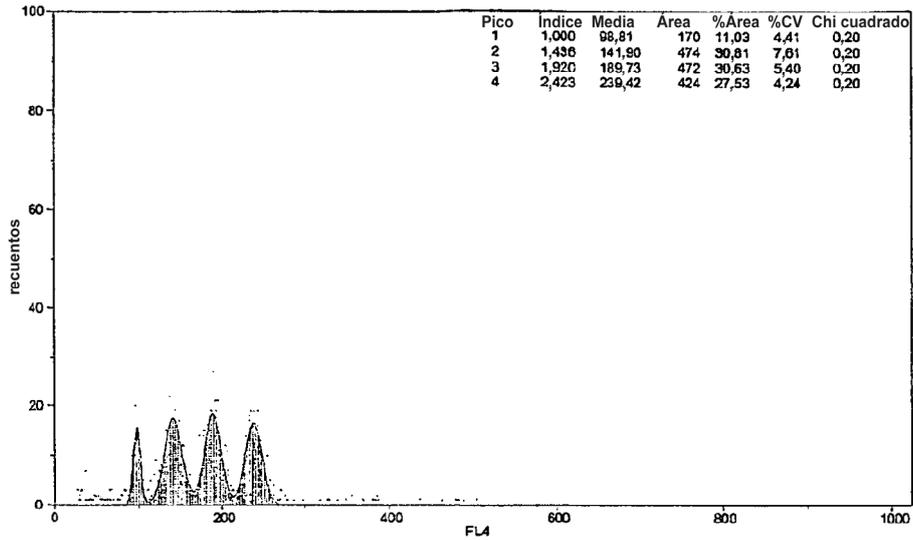


Figura 10

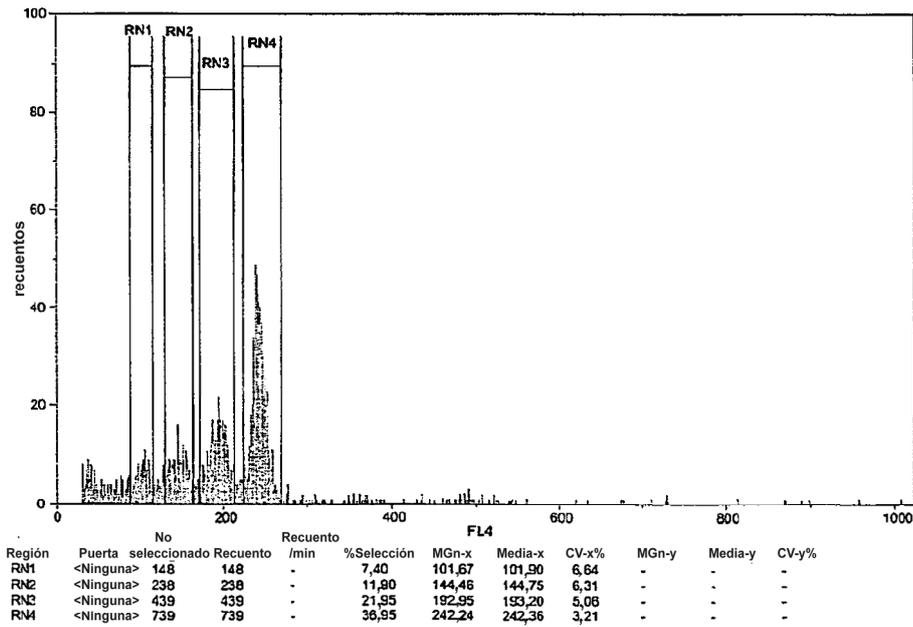


Figura 11

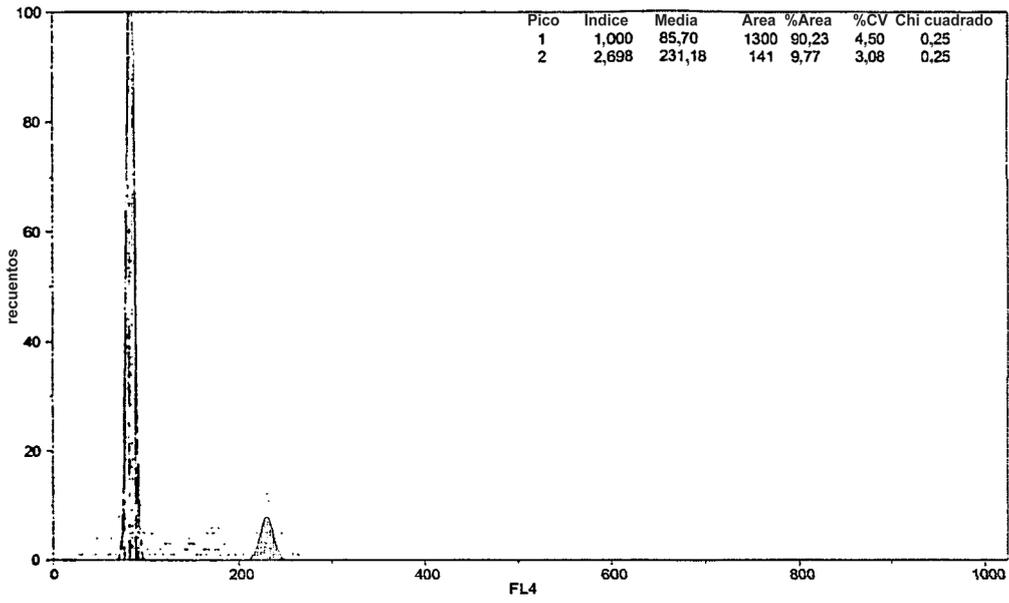


Figura 12

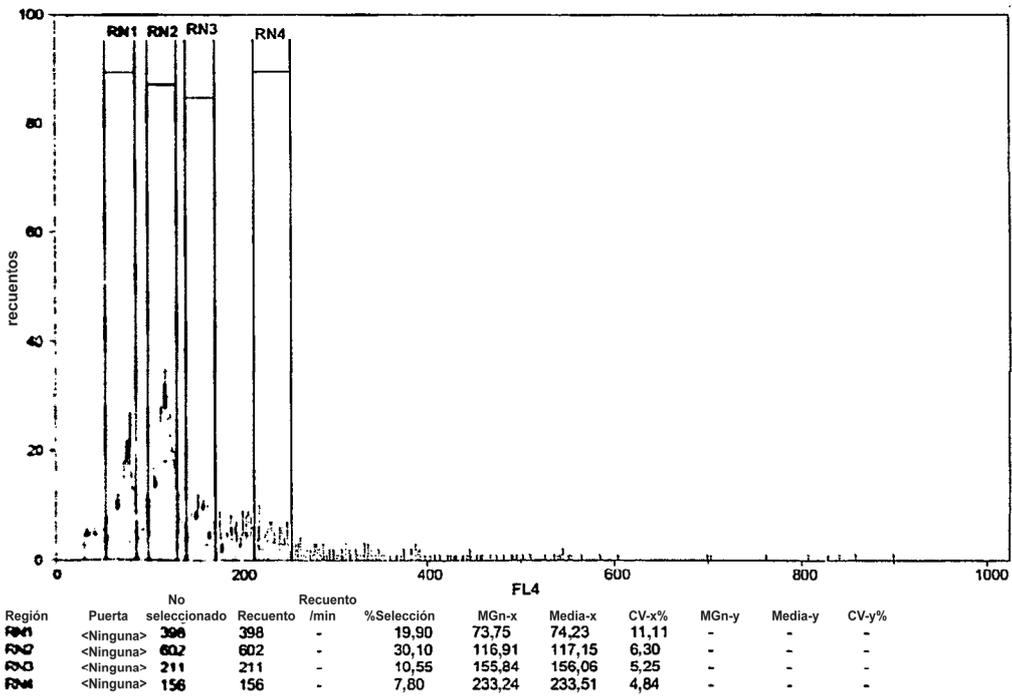


Figura 13

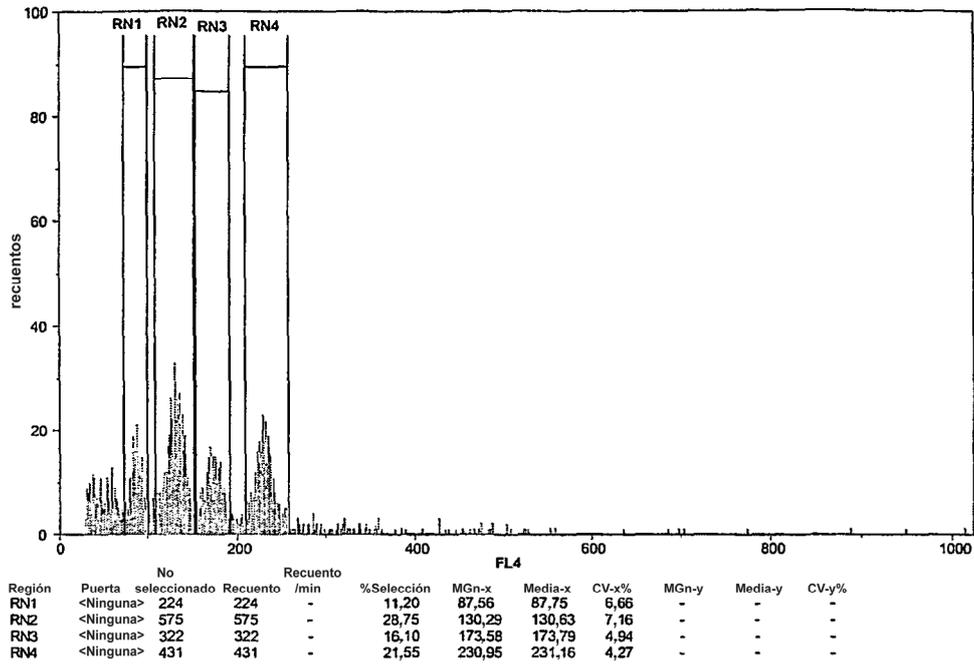


Figura 14

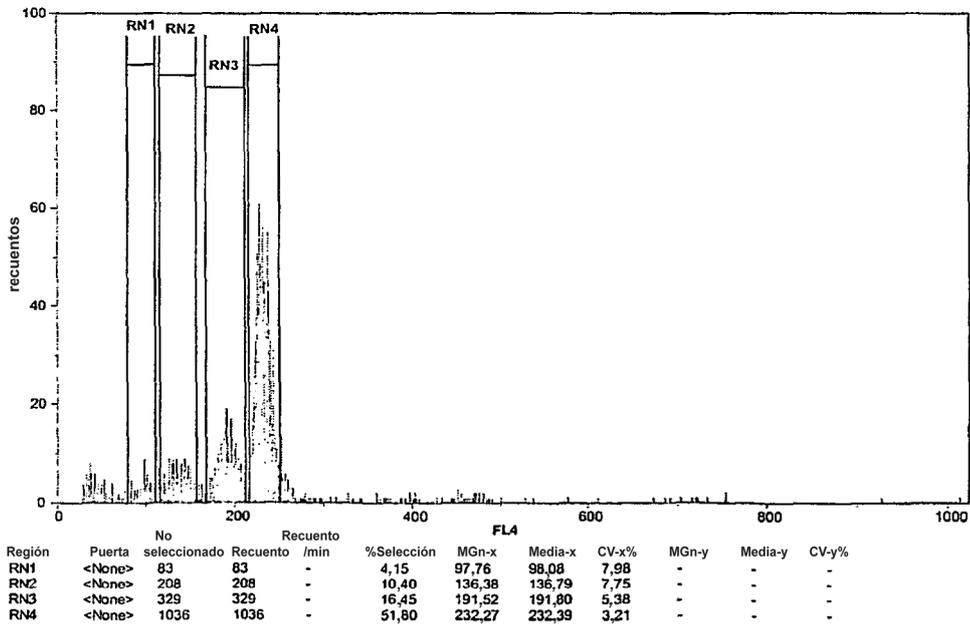


Figura 15

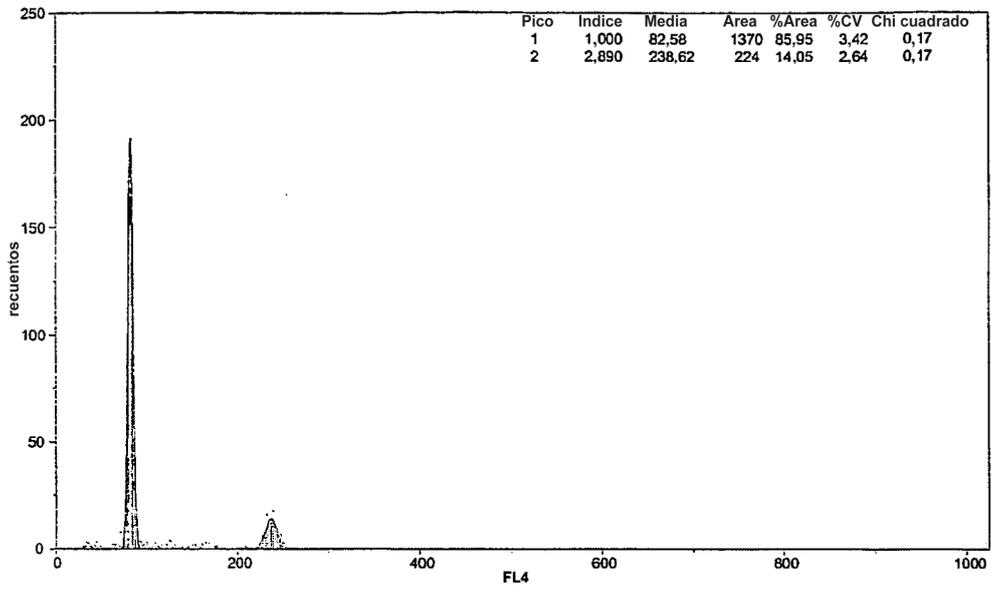


Figura 16

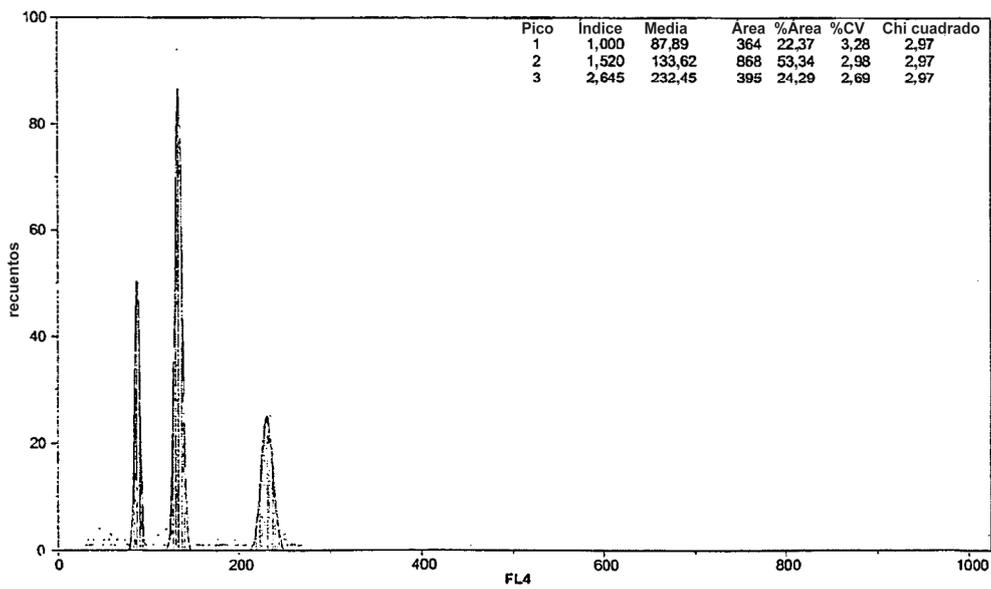


Figura 17

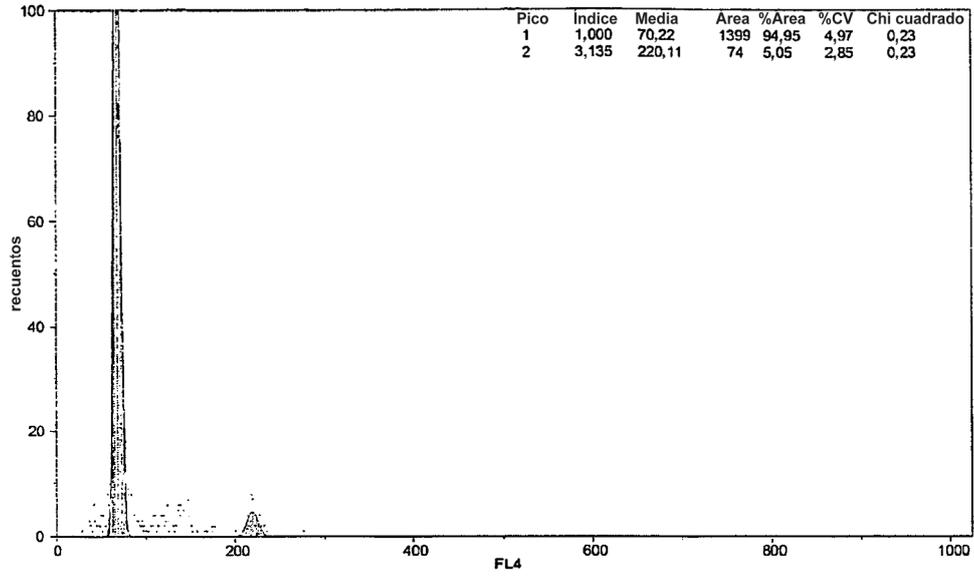


Figura 18

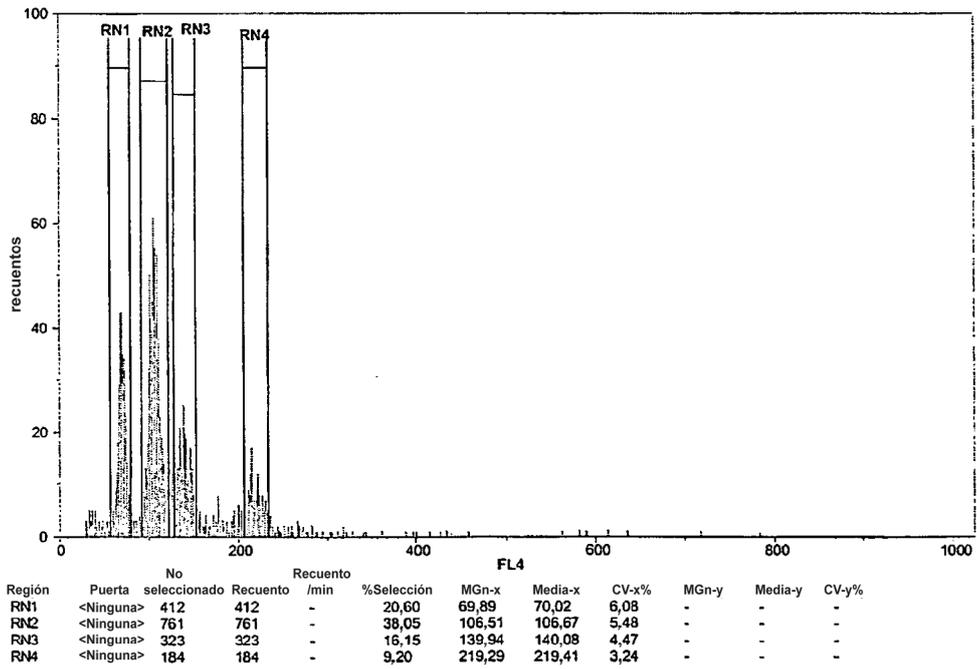


Figura 19

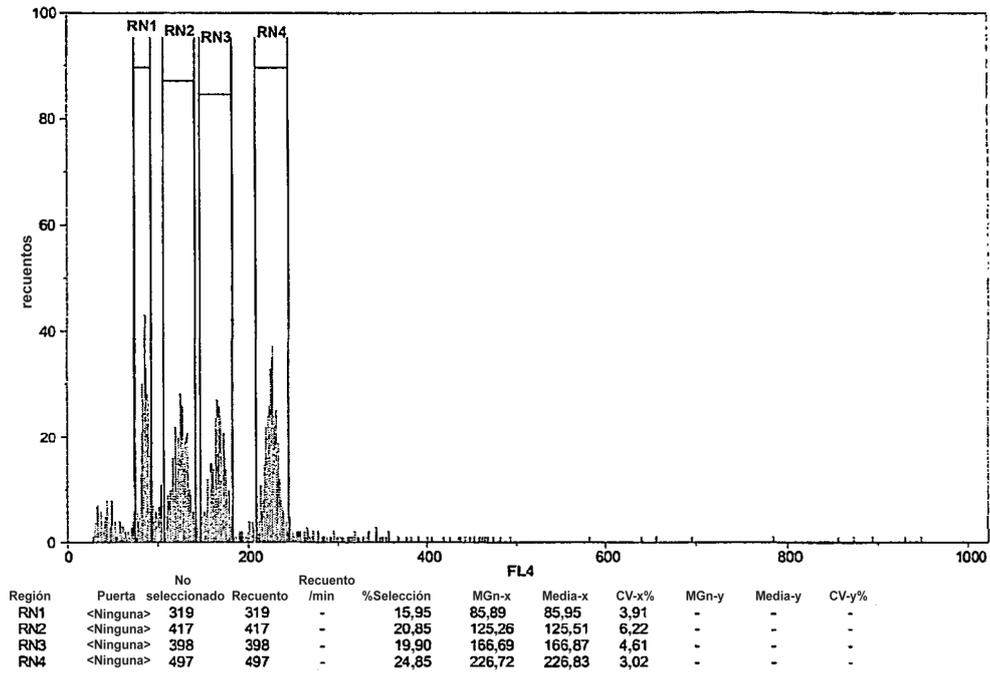


Figura 20

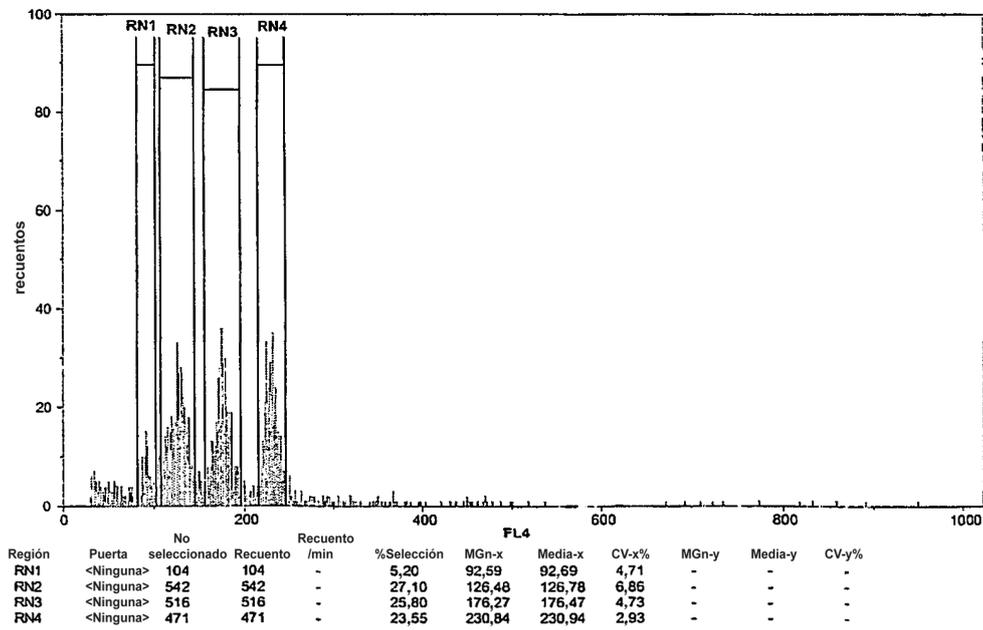


Figura 21

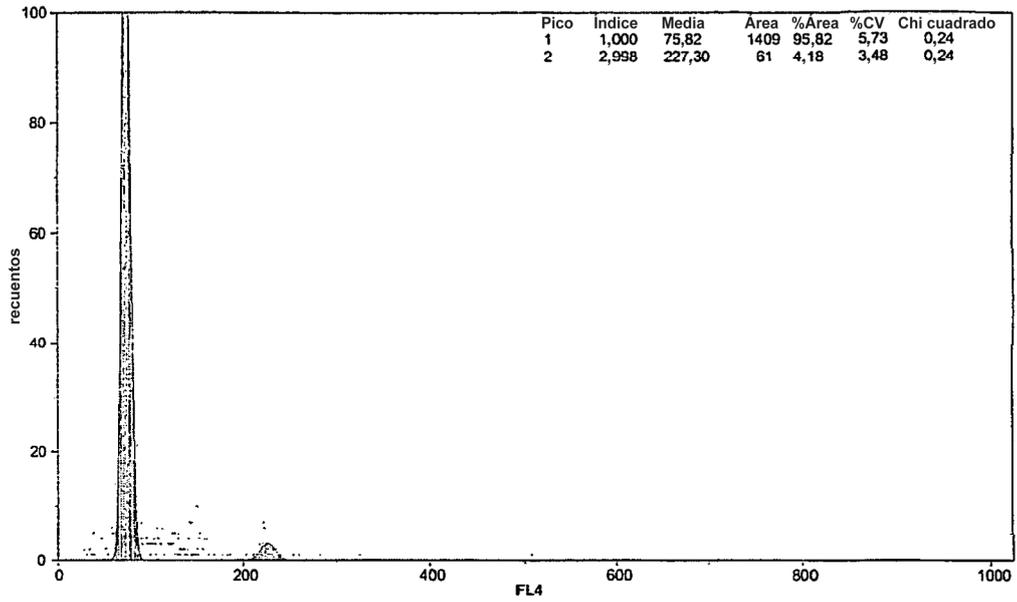


Figura 22

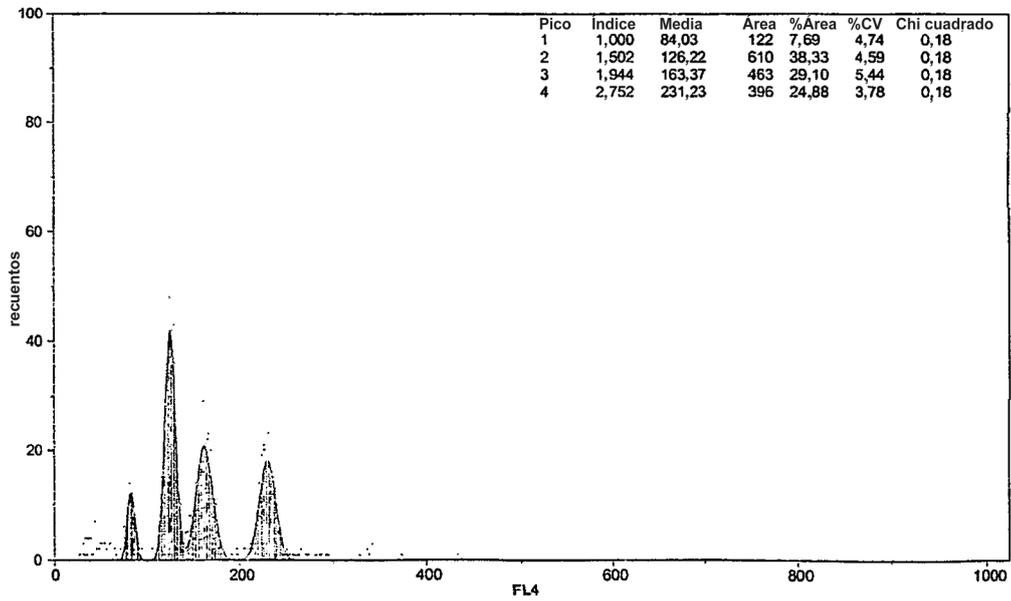


Figura 23

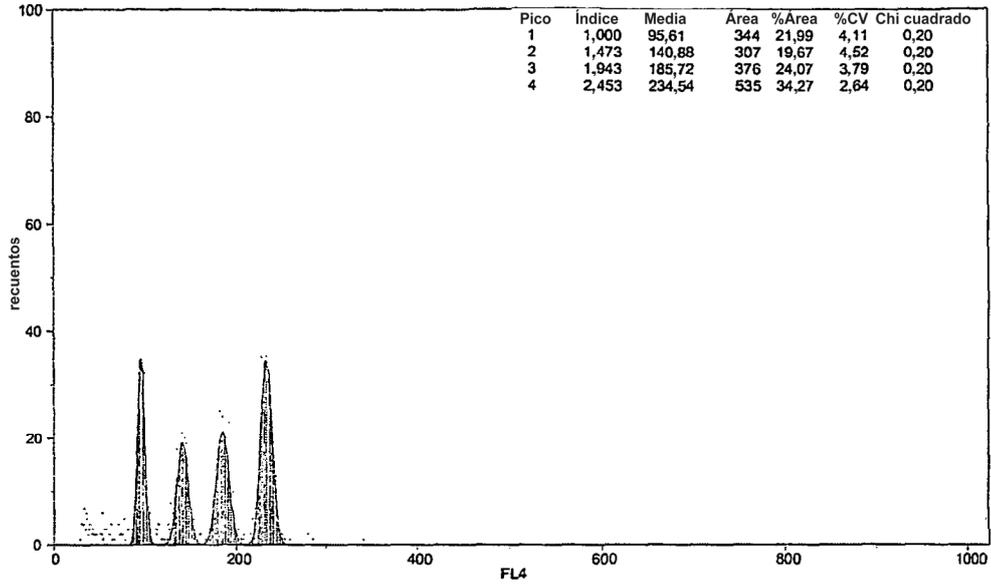


Figura 24

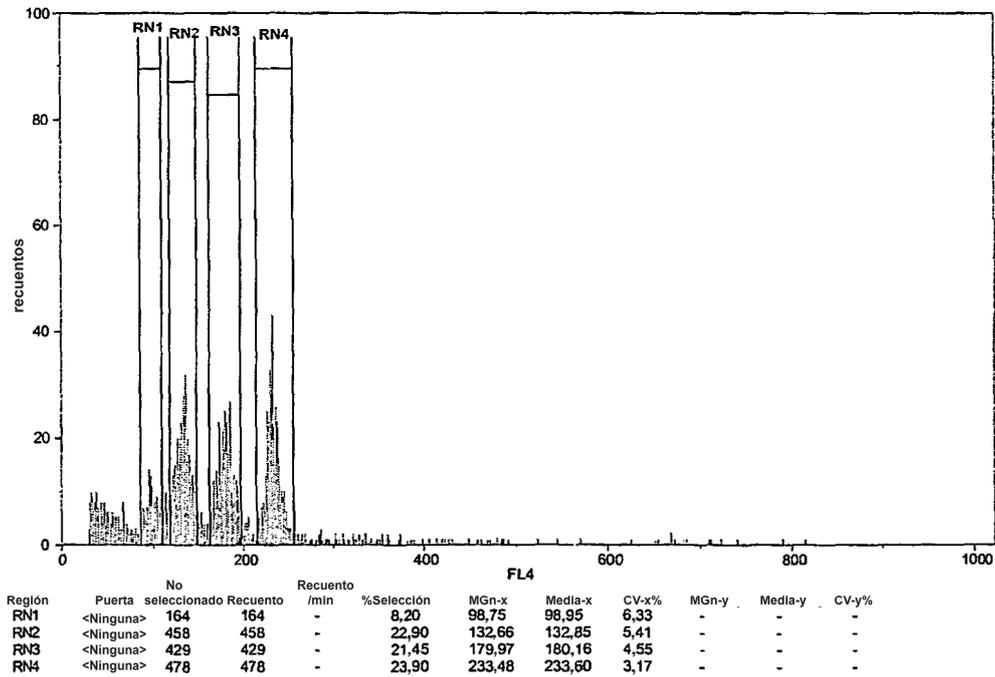


Figura 25

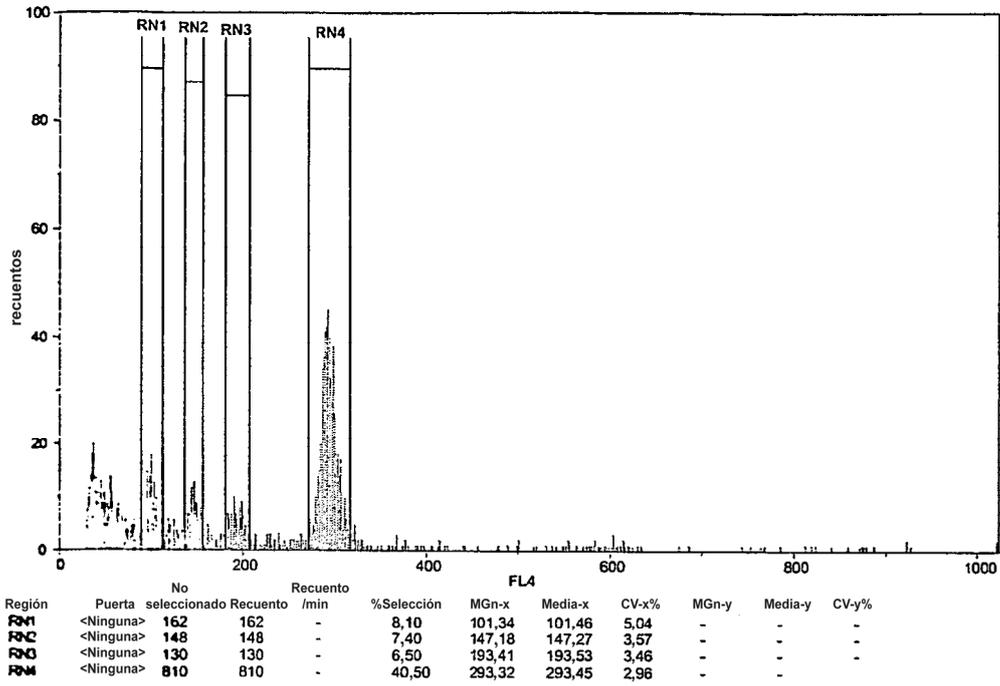


Figura 26

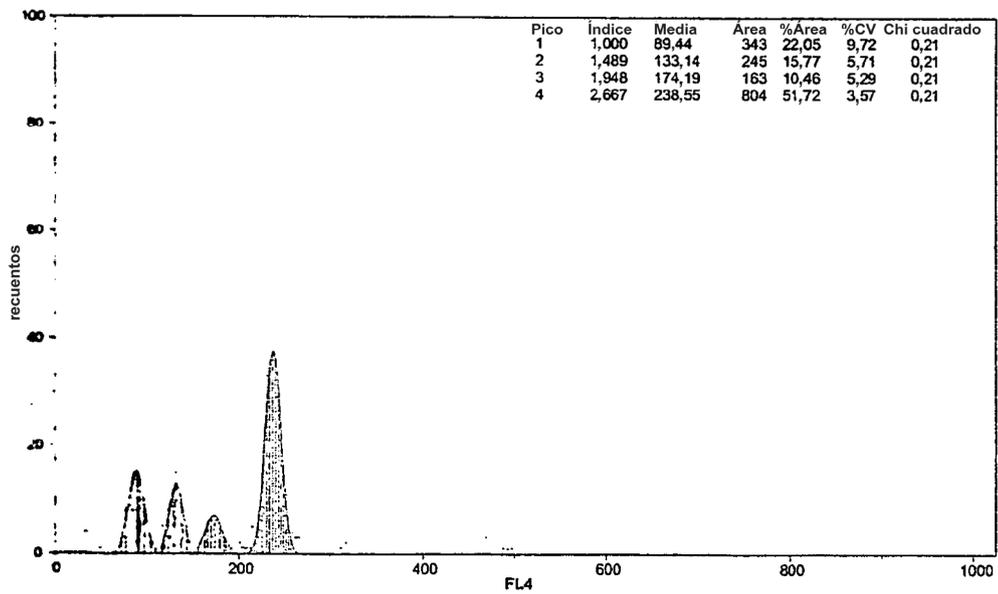


Figura 27

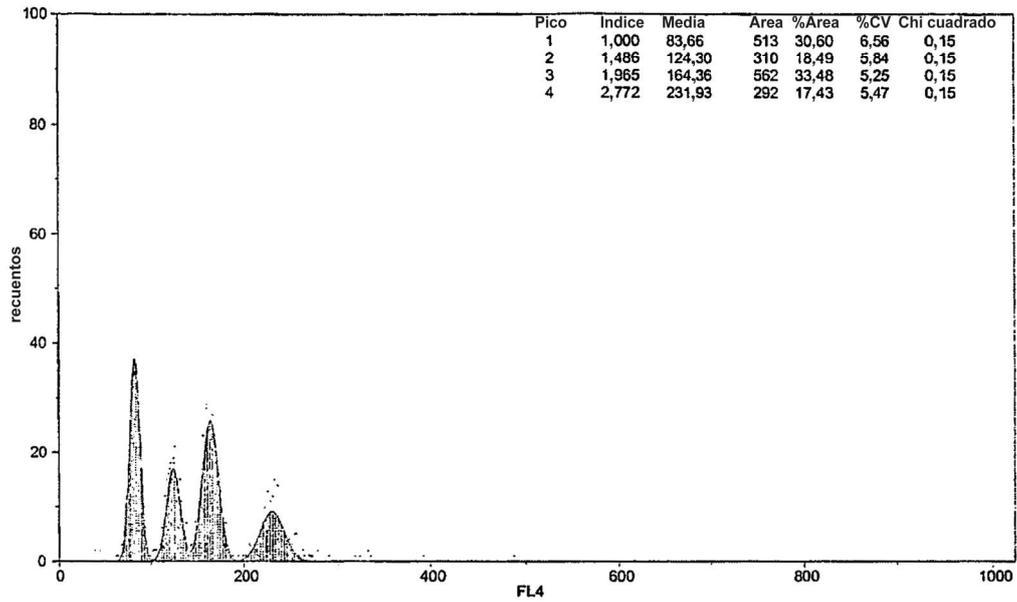


Figura 28

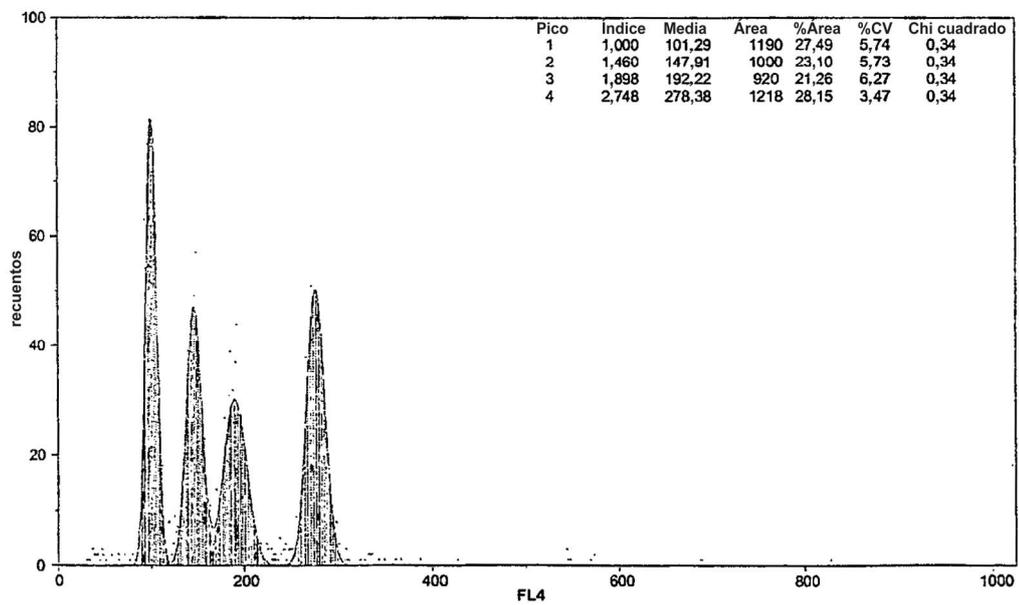


Figura 29

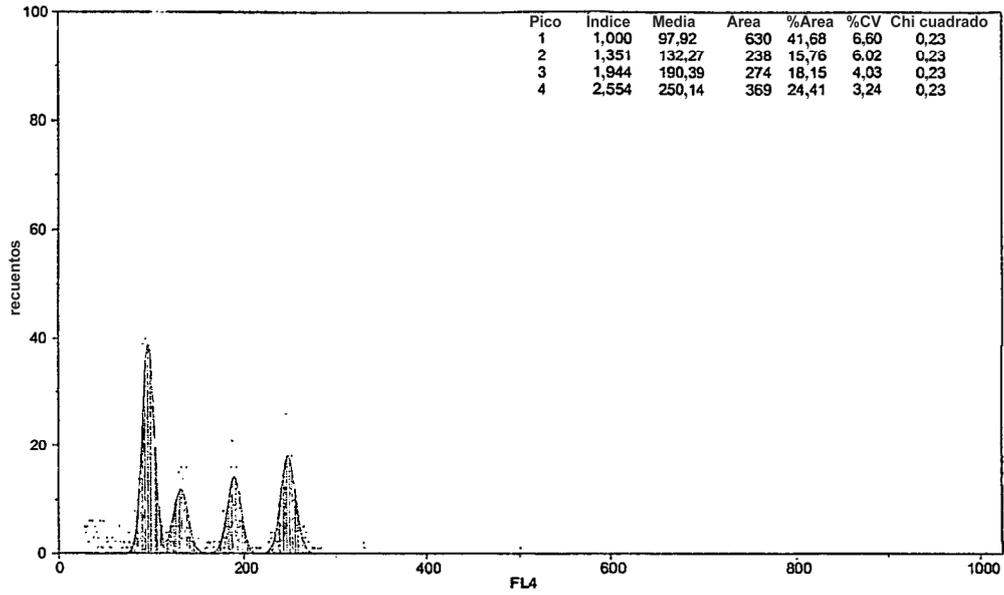


Figura 30

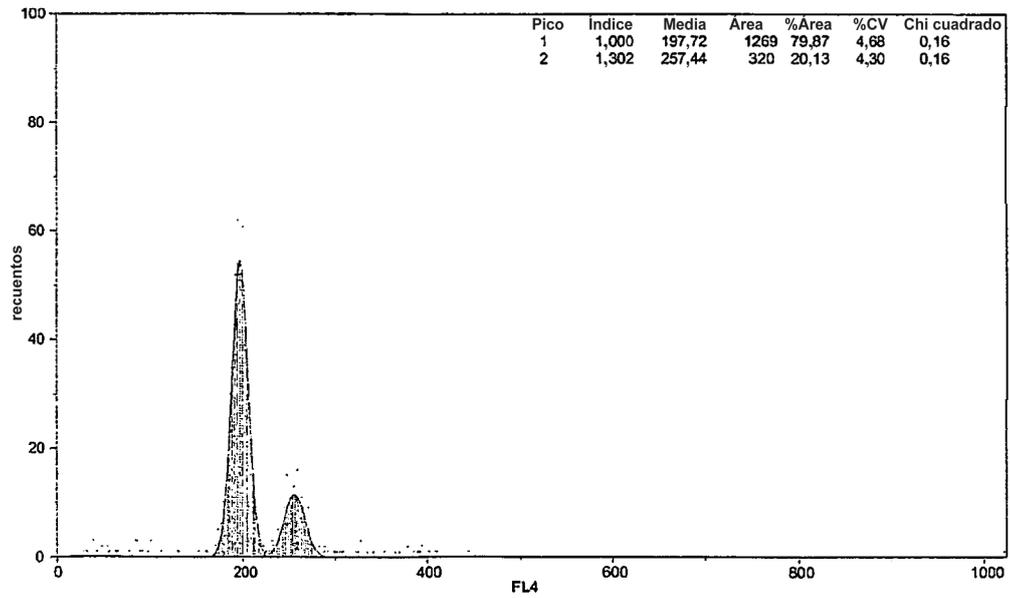


Figura 31

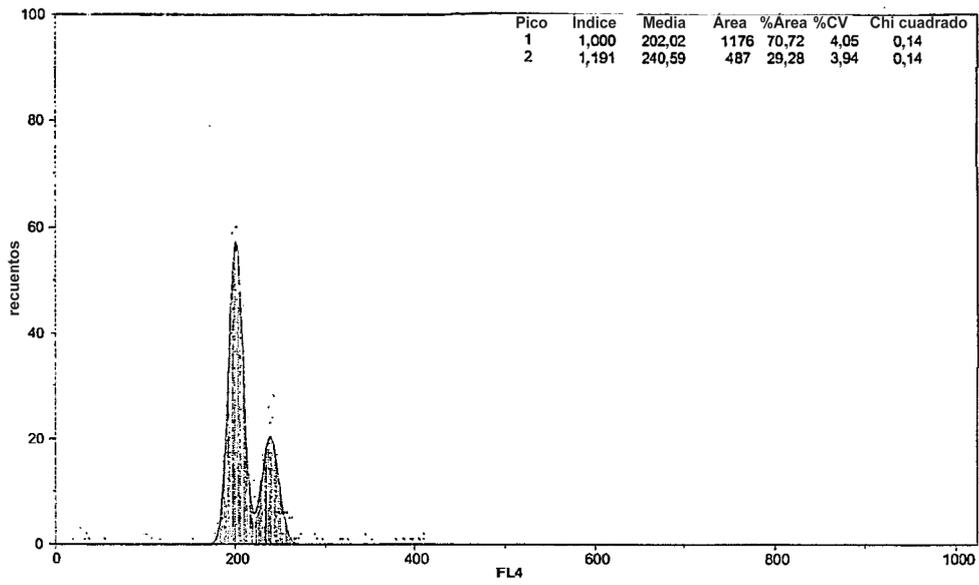


Figura 32

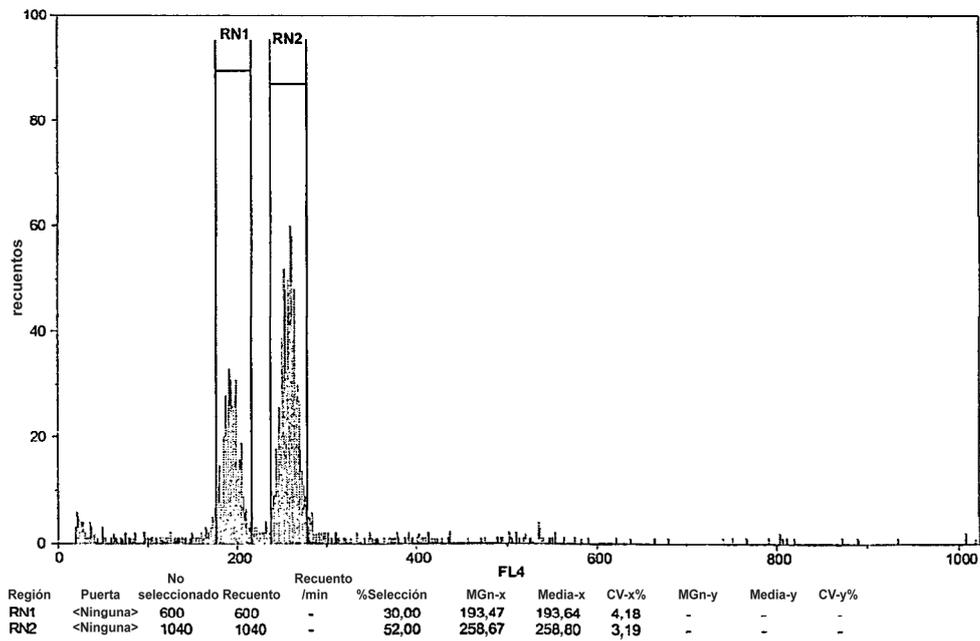


Figura 33

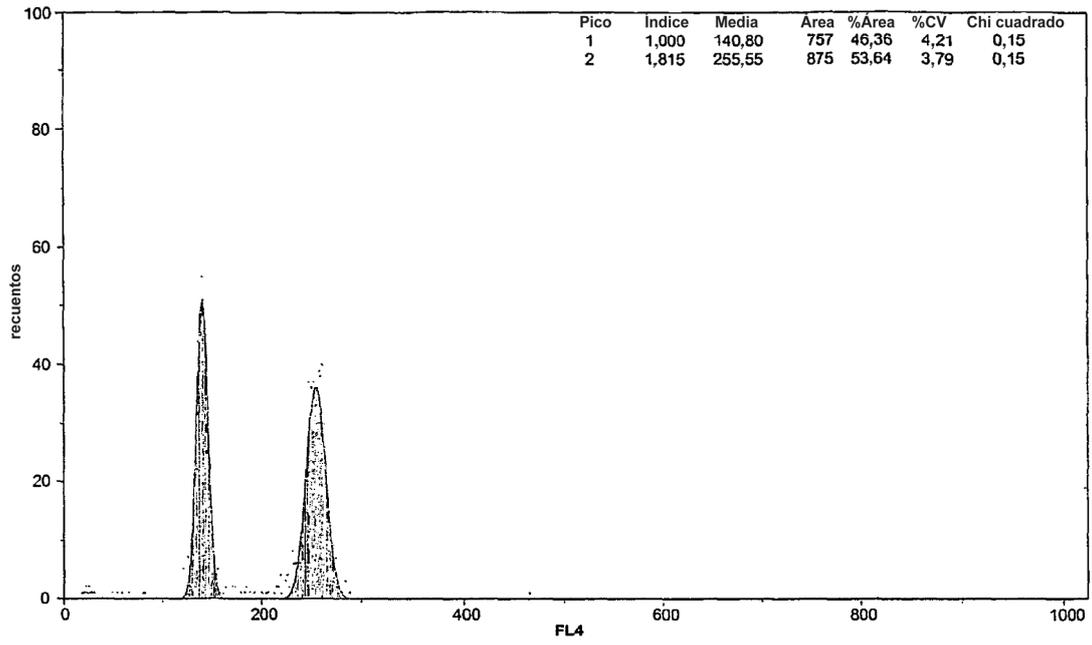


Figura 34

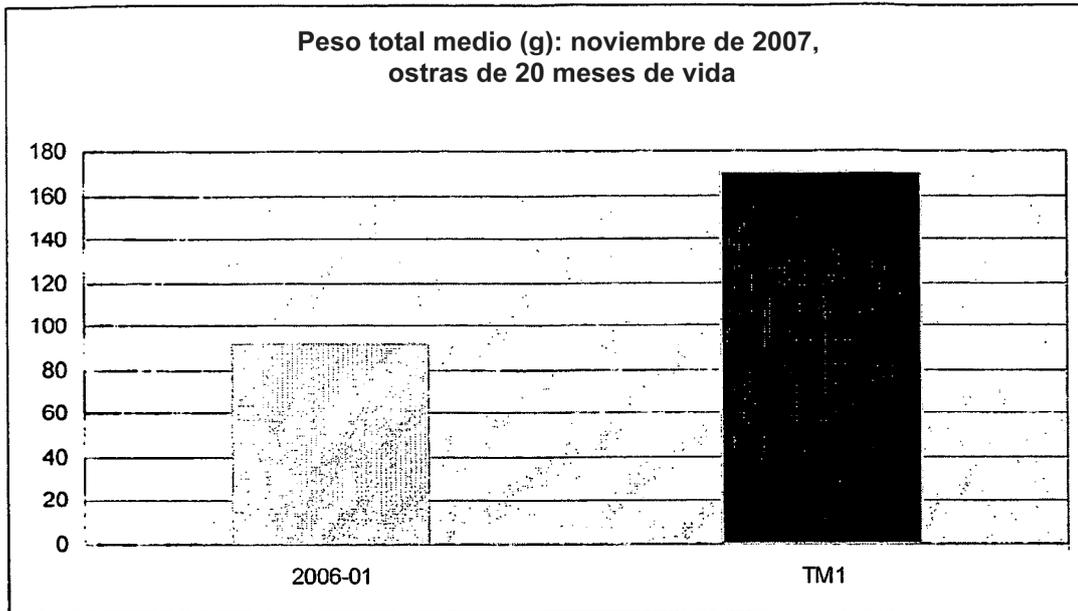


Figura 35

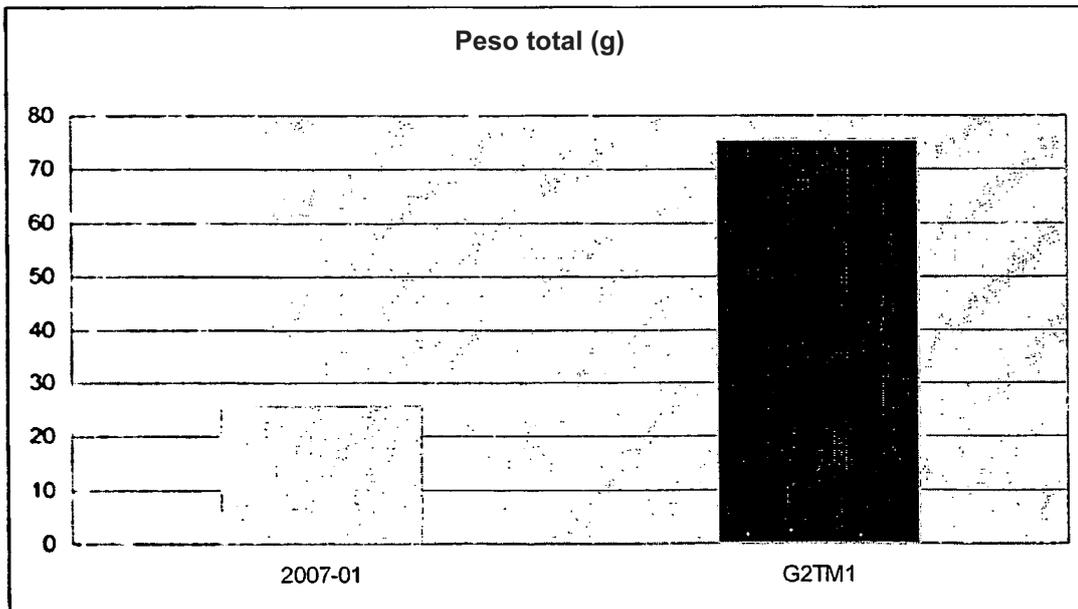


Figura 36

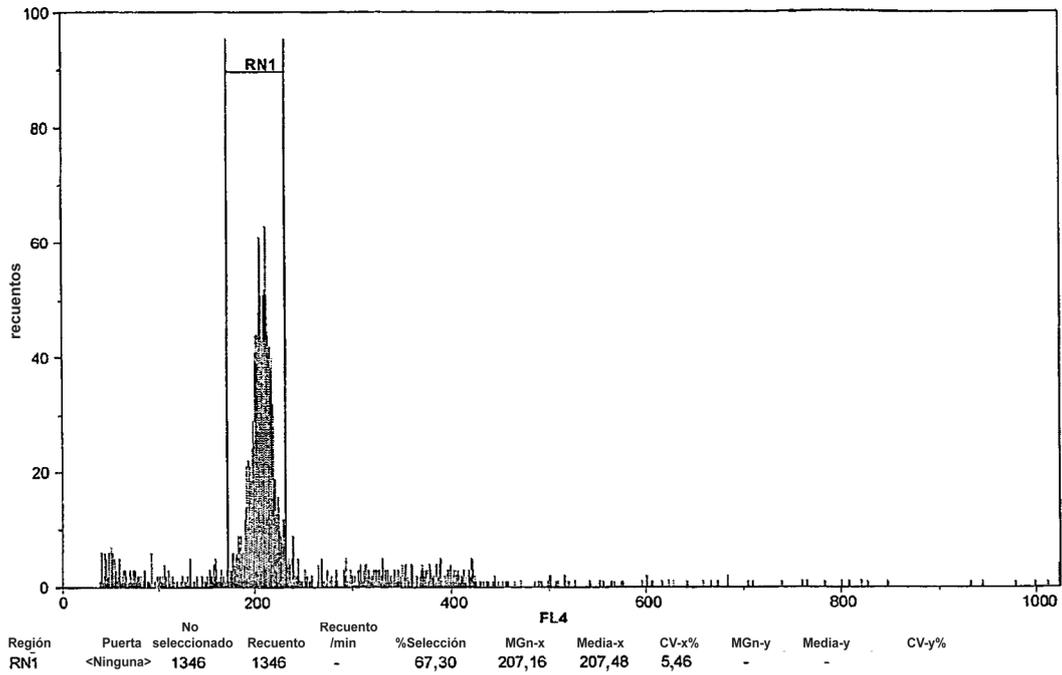


Figura 37

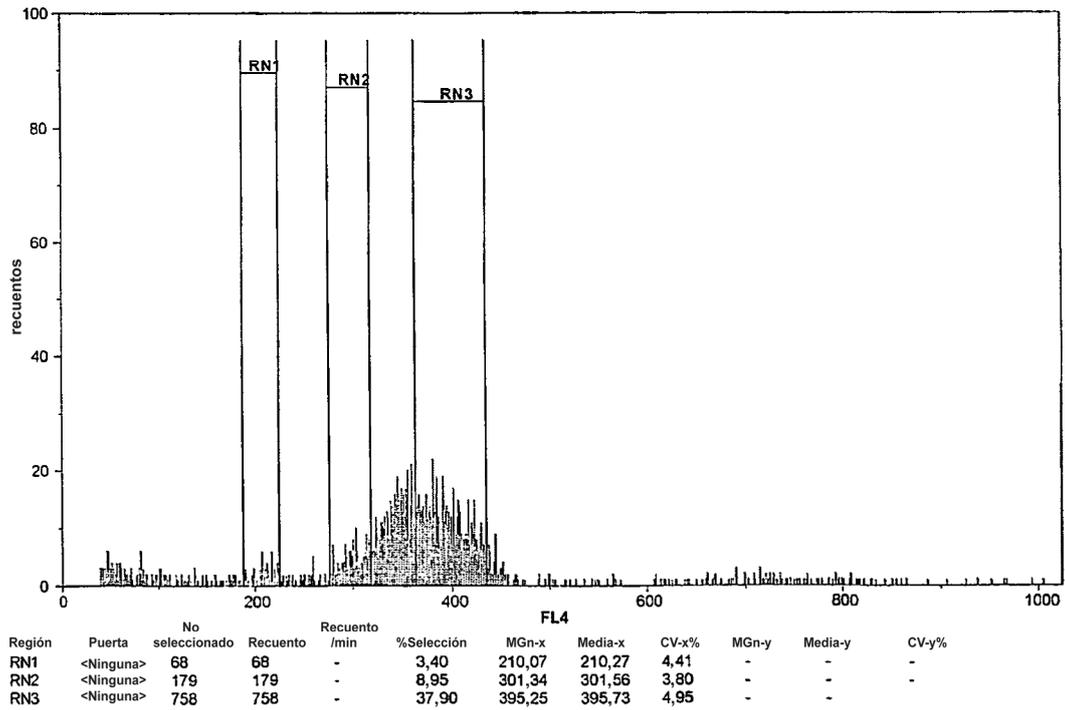


Figura 38