

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 888**

51 Int. Cl.:

**A01K 61/00** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2014 PCT/KR2014/005206**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2014 WO14200305**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2014 E 14811085 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3008993**

54 Título: **Procedimiento para inducir ovulación artificial y desove de anguilas de agua dulce**

30 Prioridad:

**15.06.2013 KR 20130068687**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**17.06.2019**

73 Titular/es:

**GOOGOL HOLDINGS CO., LTD (100.0%)  
Okcheon-dong 65 Seobudaeseong-ro  
Chuncheon-si, Gangwon-do 200-010, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, SOUNG HO**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 716 888 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

Procedimiento para inducir ovulación artificial y desove de anguilas de agua dulce

### [Campo técnico]

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para inducir la ovulación artificial y el desove de anguilas de agua dulce, y más en particular a un procedimiento para inducir la ovulación artificial y el desove de anguilas de agua dulce con el fin de inducir la ovulación artificial en un baño para cultivo de anguilas de agua dulce, incluyendo agua de cultivo a la que se añaden secuencialmente en cantidades adecuadas un material inductor de la feminización y una sustancia inductora de la ovulación extraídos de lisas de cabeza plana como peces catádmomos similares a las anguilas de agua dulce.

### 10 [Técnica antecedente]

En el caso de las anguilas japonesas de agua dulce criadas en un entorno de alimentación artificial, la capacidad de síntesis de la hormona gonadotropina (GTH) de la glándula pituitaria es insuficiente y, por lo tanto, las gónadas no se desarrollan (Nagahania y Yamamoto, 1973). Tal GTH tipo glicoproteína es esencial para la formación de las gónadas y el desarrollo de los peces y vertebrados (Kumar et al., 1997; y Ma et al., 2004).

En este sentido, se informó que, en el caso de anguilas hembra de agua dulce, la vitelogénesis se completó mediante inyecciones repetidas de un extracto de pituitaria de salmón (SPE) como una especie de GTH exógena en la cavidad peritoneal, y  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -dihidroprogesterona (DHP) indujo la maduración final y la ovulación (Yamamoto y Yamauchi, 1974; Ohta et al., 1996; y Adachi et al., 2003), y, en el caso de anguilas macho de agua dulce, la espermatida se indujo mediante inyecciones repetidas de gonadotropina coriónica humana (HCG) en la sangre.

En la presente invención, con referencia a los resultados de la inducción de la ovulación artificial de anguilas de agua dulce, la frecuencia de inyección de SPE depende del tiempo de inyección de SPE. Tal resultado se puede producir por diferente reactividad de GTH por el ovario de acuerdo con las estaciones y una tasa de reproducción (tasa de ovulación, tasa de fertilización y tasa de eclosión) debido a la diferencia.

Además, cuando SPE se añade repetidamente a los reproductores de anguilas de agua dulce con el fin de inducir la ovulación artificial, una cantidad de administración para cada individuo se convierte en excesiva o deficiente. Como resultado, la calidad de los ovarios ovulados artificialmente se ve afectada.

30 Además, los salmones son peces anádmomos mientras que las anguilas de agua dulce son peces catádmomos. De acuerdo con ello, el salmón se mueve al agua dulce para el desove mientras que las anguilas de agua dulce se mueven al agua de mar para el desove, con lo que el salmón y la anguila de agua dulce exhiben características ecológicas completamente diferentes. Dado que la especificidad de especie de los peces, tal como la anguila de agua dulce, no es en gran medida única, un extracto de glándula pituitaria (SPE) de salmón se utiliza para promover la ovulación. Sin embargo, existe la necesidad de investigación de un procedimiento de aplicación de un extracto de pituitaria de lisas de cabeza plana que tienen características ecológicas similares a las anguilas de agua dulce a fin de promover la ovulación y el desove en condiciones de ovulación y desove establecidas de manera similar al medio ambiente natural.

### 40 (Técnica anterior)

De General and Comparative Endocrinology 166 (2010) 1-11, se describe una expresión temporal de receptor de hepático de estrógeno 1 vitelogenina 1 y vitelogenina 2 en anguilas plateadas europeas.

### [Divulgación]

#### [Problema técnico]

45 Por lo tanto, la presente invención se ha realizado en vista de los problemas anteriores, y es un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento para inducir la ovulación artificial y el desove de anguilas de agua dulce, en el que un material inductor de feminización (por ejemplo,  $17\beta$ -estradiol) para inducir feminización se suministra a un baño de cultivo en el que se cultivan los reproductores como un objetivo de la ovulación artificial, por un período de tiempo predeterminado, y cuando llega el período de

inducción de la ovulación, el extracto de pituitaria de lisa de cabeza plana (FPE) de la lisa de cabeza plana, que son peces de ríos y arroyos amplios, como un agente inductor de la ovulación, se añade al baño de cultivo, promoviendo así la ovulación artificial, incluso sin el empleo de inyecciones intraperitoneales.

5 **[Solución técnica]**

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, los objetivos anteriores y otros se pueden lograr mediante la provisión de un procedimiento para inducir la ovulación artificial y el desove de los reproductores de anguilas de agua dulce en un baño de cultivo, incluyendo el procedimiento: controlar que el agua dulce, agua salobre y agua de mar se suministren secuencialmente al baño de cultivo, 10 inducir la feminización y maduración de los ovarios a los reproductores al alimentar un material inductor de la feminización en el baño de cultivo bajo una condición de agua dulce, realizar osmorregulación de los reproductores por el ajuste de agua de cultivo en el baño de cultivo a una condición de agua salobre después de la inducción, suministrar un material inductor de la ovulación recogido de peces catádmomos al agua de cultivo con el fin de inducir la ovulación de los reproductores mientras se ajusta el agua de 15 cultivo en el baño de cultivo a una condición de agua de mar, después de la realización, e inducir el desove natural después de la alimentación.

El material inductor de feminización puede ser 17 $\beta$ -estradiol.

En la inducción, la temperatura del agua de cultivo se puede aumentar gradualmente de 20°C a 26°C.

La luz puede encenderse por un ciclo de iluminación predeterminado mientras se aumenta la 20 temperatura del agua.

El ciclo de iluminación puede ser de 8 a 10 horas.

La inducción se puede realizar de tres a seis semanas.

La sustancia inductora de la ovulación para inducir la ovulación artificial puede extraerse de la lisa de cabeza plana como pez catádmomo.

25 Una concentración de sal puede aumentarse constantemente mediante el suministro de agua de mar o salmuera al baño de cultivo cuando se detiene el suministro del agua dulce.

En el suministro y la inducción del desove natural, la temperatura del agua de cultivo se puede disminuir gradualmente.

30 En el suministro y la inducción del desove natural, la temperatura del agua de cultivo se puede disminuir gradualmente de 20 $\pm$ 0,5°C a 16 a 17°C.

Cada procedimiento del proceso puede llevarse a cabo en un aparato con baño de cultivo, el aparato con baño de cultivo puede incluir un baño de cultivo, un calentador que incluye un calentador instalado en el mismo a fin de proporcionar agua de cultivo a alta temperatura al baño de cultivo, una unidad de refrigeración para suministrar agua de cultivo a baja temperatura al baño de cultivo, una fuente de luz 35 instalada en el baño de cultivo para encender periódicamente la luz, y un controlador para controlar la temperatura del agua de cultivo y la luz.

Un filtro de luz para matizar la luz natural puede instalarse en una parte superior del baño de cultivo, y la fuente de luz puede estar dispuesta bajo el filtro de luz.

La fuente de luz puede emitir luz azul que tiene una longitud de onda de 400 a 500 nm.

40 Una intensidad de iluminación de la fuente de luz puede ser de 150 a 200 lux.

El aparato con baño de cultivo incluye además un controlador de calentador para el accionamiento del calentador, un controlador de fuente de luz para el accionamiento de la fuente de luz, una unidad de ajuste de condiciones que incluye un botón de ajuste de la temperatura del agua y un botón de ajuste de las condiciones de la luz, una unidad de almacenamiento de datos de control para almacenar datos de 45 ciclo de cambio de temperatura y datos de ciclo de irradiación de luz, y una unidad de reloj para proporcionar datos horarios a fin de controlar los cambios de temperatura y un ciclo de irradiación de luz del agua de cultivo, en el que los datos de ciclo de cambio de temperatura y los datos de ciclo de

irradiación de luz se establecen, respectivamente, por el botón de ajuste de la temperatura del agua y el botón de ajuste de las condiciones de la luz.

5 Puede instalarse en el interior del baño de cultivo un sensor de detección de la temperatura del agua para detectar la temperatura del agua de cultivo y proporcionar información para la temperatura al controlador.

**[Efectos ventajosos]**

10 De acuerdo con un procedimiento para inducir la ovulación artificial y el desove de anguilas de agua dulce de la presente invención, un período de la ovulación se puede acortar mediante el ajuste de agua de cultivo en un baño de cultivo a las condiciones de agua dulce, agua salobre, y agua de mar y el ajuste de un período de irradiación de luz con el fin de inducir la maduración sexual y la ovulación de los reproductores de anguilas de agua dulce.

15 Además, se induce la ovulación artificial y el desove, sin inyección directa, permitiendo la osmorregulación a través de una zona de agua salobre después de agregar principalmente un material inductor de la feminización al baño de cultivo como pretratamiento con el fin de inducir la feminización completa de los reproductores, y después se ajusta una condición de agua de mar y se suministra una sustancia inductora de la ovulación artificial, que se extrae de la lisa de cabeza plana que tiene características de migración ecológicas similares a las de los reproductores de anguilas de agua dulce, al agua de cultivo. En consecuencia, el estresante deterioro de la calidad de los ovocitos en los reproductores se puede prevenir en gran medida.

20 **[Descripción de las figuras]**

La FIG. 1 ilustra un baño de cultivo para inducir la ovulación de anguilas de agua dulce de acuerdo con la presente invención; y

25 La FIG. 2 ilustra características morfológicas en el desarrollo de los huevos para describir un procedimiento para inducir la ovulación artificial y el desove de anguilas de agua dulce de acuerdo con la presente invención.

\*Descripción de símbolos\*

- 10: BAÑO DE CULTIVO,
- 14: FILTRO DE LUZ,
- 16: UNIDAD DE AJUSTE DE CONDICIONES,
- 30 18: CONTROLADOR,
- 20: UNIDAD DE ALMACENAMIENTO DE DATOS DE CONTROL,
- 22: UNIDAD DE RELOJ,
- 24: CALENTADOR,
- 26: CONTROLADOR DE CALENTADOR,
- 35 28: UNIDAD DE REFRIGERACIÓN,
- 30: FUENTE DE LUZ.

**[Mejor modo]**

En adelante, la presente invención se describe en detalle con referencia a las figuras adjuntas.

40 En primer lugar, de acuerdo con una realización preferida de la presente invención, un material inductor de la feminización (por ejemplo, 17β-estradiol) se suministra a un baño de cultivo (agua dulce como el agua de cultivo) en el que se crían reproductores de anguilas de agua dulce (por ejemplo, hembras), durante un período predeterminado.

Es decir, las anguilas de agua dulce cultivadas están masculinizadas por un motivo claro en muchos

casos y, por lo tanto, se requiere un procedimiento de pretratamiento de inducción de la feminización de los reproductores para asegurar reproductores hembra. De acuerdo con ello, un material inductor de la feminización se suministra al agua de cultivo en el baño de cultivo durante un período predeterminado (por ejemplo, de tres a seis semanas).

- 5 De acuerdo con la presente invención, una alimentación que incluye un material inductor de la feminización se suministra para asegurar que los reproductores son sometidos a inducción de ovulación artificial.

10 Cuando los reproductores hembra están asegurados de acuerdo con el procedimiento de pretratamiento, los reproductores hembra son criados en una zona de agua salobre por un período predeterminado. Con el fin de preparar el agua salobre, la cantidad de agua de mar añadida al agua de cultivo correspondiente se aumenta en 5 psu al día para adaptarse al agua de mar a través de la acción osmótica.

15 Después de que los reproductores de anguilas de agua dulce se adaptan totalmente al agua de mar como el agua de cultivo, se añade un extracto de pituitaria de lisa de cabeza plana (FPE) para inducir la ovulación artificial al agua de mar como el agua de cultivo. La cantidad de FPE se aumenta gradualmente por 20 a 120 mg con base en 1 kg de agua de cultivo cada día.

20 En este punto, durante el procedimiento de inducción de la ovulación artificial de acuerdo con la presente invención, la temperatura del agua de cultivo a  $20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  se reduce a 16 a  $17^{\circ}\text{C}$ . La temperatura del agua de cultivo se aumenta en 35% en cada una de las etapas de agua dulce, agua salobre, y agua de mar, con lo que se controla de manera similar a las condiciones naturales de desove de las anguilas de agua dulce.

25 Además, desde el momento en el que se añade el material inductor de la feminización a el momento en el que se induce la ovulación artificial, se proporciona una fuente de luz a un baño de cultivo correspondiente y un ciclo de luz de la fuente de luz se ajusta de tal manera que el ciclo de luz se enciende más rápido que una vez por día en un estado en el que la luz del sol está matizada (por ejemplo, 8 a 10 horas). Preferiblemente, la luz se apaga completamente en un momento del día 15 para inducir el desove natural.

La FIG. 1 ilustra un aparato con baño de cultivo para inducir la ovulación de anguilas de agua dulce. El aparato con baño de cultivo controla electrónicamente las condiciones de agua dulce, agua salobre y agua de mar, y, adicionalmente, la temperatura del agua y un ciclo de iluminación de una fuente de luz.

- 30 Es decir, con referencia a las figuras, un número de miembro "10" indica un baño de cultivo hecho de resina sintética transparente o un material de vidrio y que contiene los reproductores de anguilas de agua dulce. Una parte inferior de un baño de cultivo 10 está soportado de forma estable por un soporte, y un filtro de luz 14 para matizar luz natural está instalado en una parte superior del baño de cultivo 10.

35 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una unidad de ajuste de las condiciones 16 para establecer un ciclo de cambio de temperatura del agua de cultivo suministrada al baño de cultivo 10 y una condición de irradiación periódica de luz que se describe a continuación. Por consiguiente, la unidad de ajuste de las condiciones 16 incluye un botón de ajuste de la temperatura del agua de tipo arriba/abajo 16a para ajustar un ciclo de cambio de temperatura del agua de cultivo y un botón de ajuste de la condición de la luz de tipo arriba/abajo 16b para ajustar una condición de irradiación periódica de la luz.

40 Un controlador 18 controla la operación global del aparato de cultivo, el cambio de temperatura del agua de cultivo, y un ciclo de irradiación de luz. El cambio de temperatura y el ciclo de irradiación de luz se controlan de acuerdo con un ciclo de cambio de temperatura y un ciclo de irradiación de luz configurados por el botón de ajuste de la temperatura del agua 16a y el botón de ajuste de la condición de la luz 16b de la unidad de ajuste de las condiciones 16.

45 El controlador 18 está conectado a una unidad de almacenamiento de datos de control 20, en la que se almacenan los datos de ciclo de cambio de temperatura y los datos de ciclo de irradiación de luz configurados por el botón de ajuste de la temperatura del agua 16a y el botón de ajuste de la condición de la luz 16b de la unidad de ajuste de las condiciones 16, y a una unidad de reloj 22 para proporcionar datos horarios a fin de controlar el cambio de temperatura y un ciclo de irradiación de luz del agua de cultivo.

Además, una unidad de calentamiento 24 incluye un calentador 26a instalado en la misma a fin de proporcionar agua de cultivo a alta temperatura al baño de cultivo 10 dependiendo de la condición de cambio de temperatura. El calentador 26a eleva la temperatura del agua de cultivo mediante el controlador de calentador 26, cuya actividad es controlada por el controlador 18.

- 5 Una unidad de refrigeración 28 suministra agua de cultivo refrigerada al baño de cultivo 10 de manera tal que el agua de cultivo de baja temperatura se suministra dependiendo de la condición de cambio de temperatura.

Además, como un ejemplo de una fuente de luz 30 dispuesta en una parte inferior del filtro de luz 14, una lámpara de LED se aplica de manera tal que puede emitir luz azul que tiene una longitud de onda específica (es decir, de 400 a 500 nm). El encendido/apagado de la fuente de luz 30 se controla mediante un controlador de fuente de luz 32 de acuerdo con el control del controlador 18, y la iluminación directamente bajo la fuente de luz 30 es preferiblemente de 150 a 200 lux.

Preferiblemente, un sensor de detección de la temperatura del agua está instalado en el interior del baño de cultivo de acuerdo con la presente invención. El sensor de detección de la temperatura del agua detecta la temperatura actual del agua de cultivo y proporciona información al respecto al controlador.

De aquí en adelante, se describe un procedimiento de inducción de la ovulación y el desove de anguilas de agua dulce de acuerdo con la presente invención utilizando la configuración descrita anteriormente.

En primer lugar, con respecto al baño de cultivo 10, el agua de cultivo se ajusta en una condición de agua dulce por medio del botón de ajuste de la temperatura del agua 16a de la unidad de ajuste de las condiciones 16, y la temperatura inicial del agua de cultivo se ajusta en 20°C. Durante un período de inducción de la feminización (por ejemplo, 3 a 6 semanas) como un procedimiento de pretratamiento, la temperatura se ajusta de manera que se aumenta gradualmente hasta 26°C. Además, un ciclo de iluminación de la fuente de luz 30 se ajusta en 10 horas y se controla por el controlador 18. Reproductores salvajes o cultivados con una longitud corporal de 30 a 40 cm (o de 2,5 a 3 años) están contenidos en el baño de cultivo 10.

En este estado, el material de inducción de la feminización (por ejemplo, 17β-estradiol) se suministra al agua de cultivo suministrada al baño de cultivo 10 durante un período predeterminado, mediante el cual se lleva a cabo un procedimiento de pretratamiento para la feminización.

Durante el procedimiento de pretratamiento de acuerdo con la presente invención, se incluye una etapa de promoción de la velocidad de crecimiento de una alimentación que incluye hormona de crecimiento dos veces o tres veces al día.

La inducción de la feminización de los reproductores de anguilas de agua dulce sometidos al procedimiento de pretratamiento se confirma a través de un procedimiento conocido. Cuando se ha completado la inducción de la feminización, se implementan procedimientos de ovulación y desove.

Es decir, en los procedimientos de ovulación artificial y desove, el agua de cultivo se ajusta a una condición de agua salobre por medio del botón de ajuste de la temperatura del agua 16a de la unidad de ajuste de las condiciones 16 y una temperatura inicial se ajusta en 20°C. Un ciclo de iluminación de la fuente de luz 30 se ajuste en 8 a 9 horas y se controla por el controlador 18.

Por consiguiente, de modo que el baño de cultivo 10 tenga una condición de zona de agua salobre, el controlador 18 permite el suministro de agua de mar al agua de cultivo (en este caso, se suministra salmuera a la unidad de refrigeración 28) o el suministro por separado de salmuera al agua de cultivo. La cantidad de sal en el agua de cultivo se aumenta gradualmente por 5 psu al día de tal manera que los reproductores estén adaptados al agua de mar a través de la osmorregulación durante un período de aproximadamente siete días.

Posteriormente, el suministro de agua dulce al baño de cultivo 10 se detiene para ajustar una condición de agua de mar. Por último, una concentración de sal se ajusta para alcanzar 35%, y la temperatura del agua de cultivo se ajusta de modo que disminuya gradualmente de  $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$  a 16 a 17°C durante los procedimientos de ovulación e inducción del desove.

Además, se añade FPE en una cantidad de 20 a 120 mg con base en 1 kg de agua de cultivo con el fin de inducir la ovulación. La cantidad añadida de FPE se aumenta gradualmente cada día de acuerdo con

un ciclo de iluminación de la fuente de luz 30.

Además, se suministra suficiente oxígeno al baño de cultivo 10 y no se proporciona alimentación.

En este punto, se utiliza una solución extraída homogeneizada con una solución Eel Ringer, como FPE. Aunque induce la maduración sexual artificial, el aumento del peso se mide por un período predeterminado (por ejemplo, a intervalos de cinco días) y un grado de maduración se determina de la siguiente manera: (WG%, aumento de peso = [(peso corporal final - peso corporal inicial)]/peso corporal inicial x 100).

Durante el procedimiento de inducción de la ovulación de suministrar FPE al agua de cultivo, cuando un estado de maduración de ovarios de reproductores con abdómenes inflados es suficiente, se añade DHP en una concentración de 5 a 10 y/g de peso corporal al agua de cultivo de manera tal que la ovulación natural se lleva a cabo, o se añade DHP en una concentración de 2 µg/g de peso corporal a individuos para inducir la ovulación.

En este punto, con base en el informe de que las anguilas de agua dulce desovan antes y después del último día del mes, el controlador 18 controla de tal manera que la fuente de luz 30 se apague por completo antes y después de un momento correspondiente al último día del mes.

Mientras tanto, se inyecta a los reproductores macho HCG de alta concentración (1000 UI/g de peso corporal) cuando las anguilas hembra ovulan, y las hembras y los machos están contenidos en una proporción de 1:2 en el recipiente, para inducir el desove natural y la fertilización.

Con el fin de recoger los huevos flotantes de huevos naturalmente desovados y fertilizados a través de este procedimiento, un recipiente para la recogida de los huevos (no mostrado) se conecta a través de un tubo al baño de cultivo 10. Los huevos recogidos se someten a eclosión en un recipiente de eclosión (no mostrado) al que se suministra una cantidad muy pequeña de oxígeno.

La FIG. 2 ilustra características morfológicas durante el desarrollo de los huevos para describir el procedimiento para inducir la ovulación artificial y el desove de anguilas de agua dulce de acuerdo con la presente invención.

Es decir, en la FIG. 2, "A" ilustra las yemas de huevo de los reproductores de anguilas de agua dulce y una etapa de desarrollo embrionario. En particular, se observa que la división se inicia desde un punto germinal cerca de un polo animal una hora después de la fertilización, "B" ilustra un estado de etapa de cuatro células aproximadamente una hora y media después de la fertilización (diámetro de los huevos:  $1,39 \pm 0,07$  mm), y "C" ilustra etapas de 16 células tres horas después de la fertilización.

Además, con referencia a "D", un óvulo fertilizado se compone de una gran gotita y dos o tres gotitas medianas y pequeñas cinco horas después de la fertilización, y se observa en una etapa de blástula. Con referencia a "E", una etapa de gástrula comienza ocho horas después de la fecundación, y una etapa de mitad de gástrula se observa 14 horas después de la fecundación. En este momento, 15 o más gotitas pequeñas se observan cerca de una gran gotita en el centro de un huevo.

Con referencia a "F", la formación del embrión comienza 21 horas después de la fertilización y las gotitas se funden en una 24 horas después de la fertilización y, por lo tanto, se observa la formación de 12 a 15 miotomas.

Además, con referencia a "G", se forma una vesícula óptica y se observa un estatocisto en una parte trasera de la vesícula óptica, 27 horas después de la fertilización. 30 horas después de la fertilización, se observa morfogénesis cardíaca bajo una cabeza, y se observan los vasos sanguíneos de un corazón, que rodean una yema anterior. En este caso, se observan 24 a 30 miotomas.

Con referencia a "H", 33 horas después de la fertilización, se observan 28 a 35 miotomas, una cola se separa de una yema, se conforma una forma de cola, y se puede observar un ritmo cardíaco. Con referencia a "I", 38 horas después de la fertilización, la eclosión de la penetración de una membrana del huevo y el escape comienza con un movimiento feroz. Directamente después de la eclosión, las longitudes del cuerpo de larvae pre-leptocephalus son de aproximadamente 3 mm, las formas de los mismos son ligeramente curvadas, y están presentes de 40 a 44 miotomas. Una hora después, se observa que las formas del cuerpo de las larvae están horizontalizadas.

Aunque las realizaciones preferidas de la presente invención se han desvelado con fines ilustrativos, aquellos con experiencia en la técnica apreciarán que diversas modificaciones, adiciones y sustituciones son posibles, sin apartarse del alcance de la presente invención como se desvela en las reivindicaciones adjuntas.

- 5 Es decir, adicionalmente se proporciona un tanque de salmuera en el baño de cultivo 10 de tal manera que la salmuera se suministre al baño de cultivo 10, mientras la concentración de la salmuera se controla por medio del controlador 18.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para inducir la ovulación artificial y el desove de los reproductores de anguilas de agua dulce en un baño de cultivo, el procedimiento comprende:
- 5 controlar que el agua dulce, agua salobre y agua de mar se suministren secuencialmente al baño de cultivo,
- inducir la feminización y maduración de los ovarios de los reproductores mediante el suministro de un material inductor de la feminización al baño de cultivo bajo una condición de agua dulce,
- realizar osmorregulación de los reproductores por el ajuste del agua de cultivo en el baño de cultivo bajo una condición de agua salobre después de la inducción,
- 10 suministrar un material inductor de la ovulación recogido de peces catádomos al agua de cultivo con el fin de inducir la ovulación de los reproductores mientras se ajusta el agua de cultivo en el baño de cultivo a una condición de agua de mar, después de la realización, e
- inducir el desove natural después del suministro.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el material inductor de la feminización es 17β-estradiol.
- 15 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que, en la feminización inducida y la maduración de los ovarios, la temperatura del agua de cultivo se aumenta gradualmente de 20 a 26°C.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que desde el momento en que se añade el material inductor de la feminización al momento en el que se induce la ovulación artificial, se proporciona una fuente de luz a un baño de cultivo correspondiente y se establece un ciclo de luz de la fuente de iluminación de tal manera que el ciclo de iluminación sea más rápidamente conmutado que una vez por día en un estado en el que la luz del sol es matizada, preferentemente el ciclo de iluminación es de 8 a 10 horas.
- 20 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que un material inductor de la feminización se suministra al agua de cultivo en el baño de cultivo durante un período predeterminado, preferentemente la inducción se lleva a cabo de tres a seis semanas.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la sustancia inductora de la ovulación para inducir la ovulación artificial se extrae de la lisa de cabeza plana como pez catádomo.
- 30 7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que, en la realización, una concentración de sal se aumenta gradualmente por 5 psu al día de manera tal que los reproductores estén adaptados al agua de mar a través de la osmorregulación durante un período de aproximadamente 7 días mediante el suministro de agua de mar o salmuera al baño de cultivo cuando se detiene el suministro del agua dulce.
- 35 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que, en el suministro y la inducción del desove natural, la temperatura del agua de cultivo se disminuye gradualmente de  $20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  a  $16 - 17^{\circ}\text{C}$ .
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que cada proceso del procedimiento se lleva a cabo en un aparato con baño de cultivo, el aparato con baño de cultivo comprende un baño de cultivo, una unidad de calentamiento que comprende un calentador instalado en el mismo a fin de proporcionar agua de cultivo a alta temperatura al baño de cultivo, una unidad de refrigeración para el suministro de agua de cultivo a baja temperatura al baño de cultivo, una fuente de luz instalada en el baño de cultivo para encender periódicamente la luz, y un controlador para controlar la temperatura del agua de cultivo y la luz.
- 40 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que se instala un filtro de luz para matizar la luz natural en una parte superior del baño de cultivo, y la fuente de luz se dispone debajo del filtro de luz.
- 45

11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la fuente de luz emite luz azul que tiene una longitud de onda de 400 a 500 nm.
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que una intensidad de iluminación de la fuente de luz es de 150 a 200 lux.
- 5 13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el aparato con baño de cultivo comprende además un controlador del calentador para el accionamiento del calentador, un controlador de fuente de luz para el accionamiento de la fuente de luz, una unidad de ajuste de condiciones que incluye un botón de ajuste de la temperatura del agua y un botón de ajuste de las condiciones de la luz, una unidad de almacenamiento de datos de control para almacenar datos de ciclo de cambio de temperatura y datos de ciclo de irradiación de luz, y una unidad de reloj para proporcionar datos horarios a fin de controlar los cambios de temperatura y un ciclo de irradiación de luz del agua de cultivo, en el que los datos de ciclo de cambio de temperatura y los datos de ciclo de irradiación de luz se establecen, respectivamente, por el botón de ajuste de la temperatura del agua y el botón de ajuste de las condiciones de la luz.
- 10

15

FIG. 1

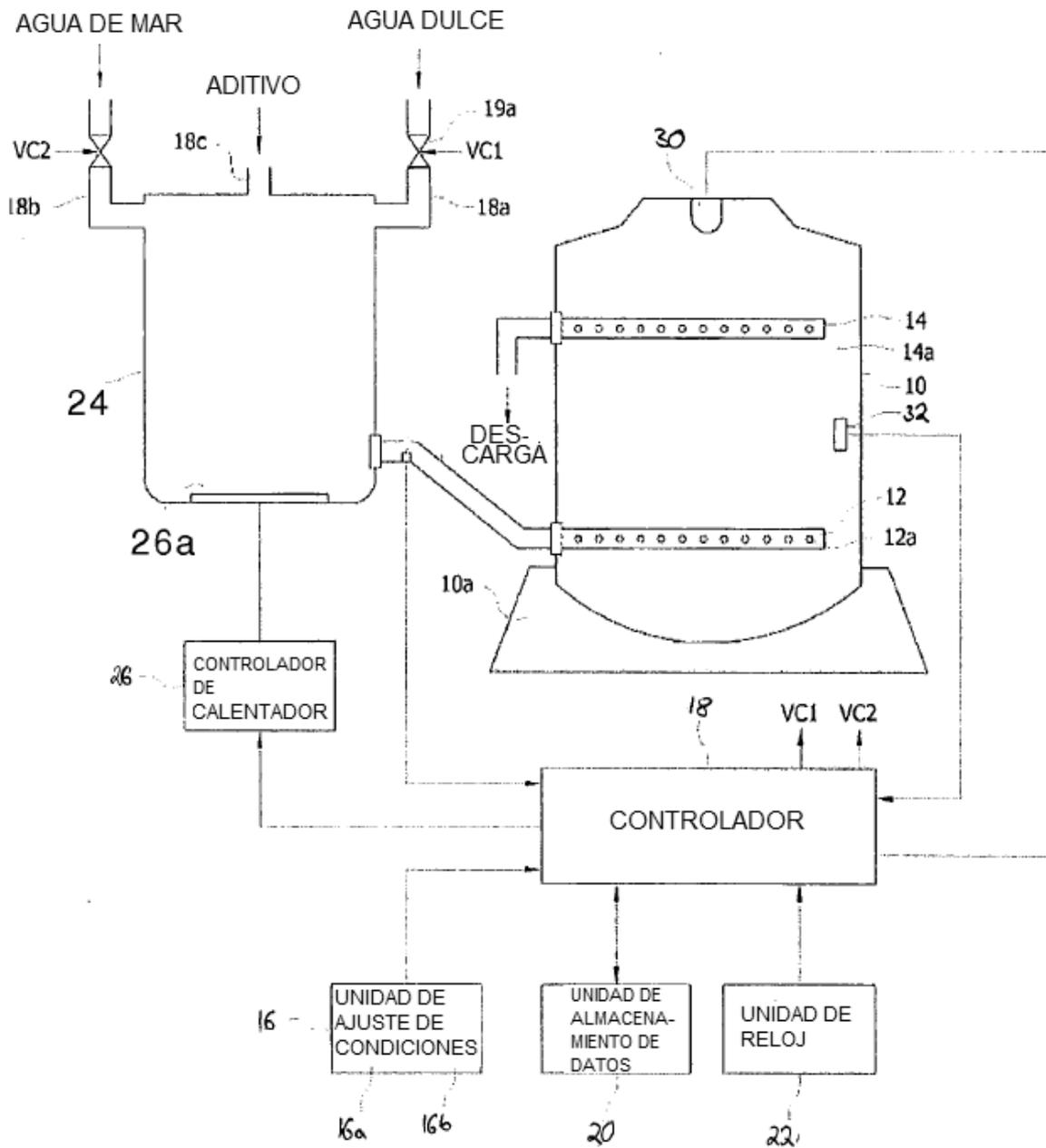


FIG. 2

