

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2010/043739 A1**

(43) Fecha de publicación internacional  
22 de abril de 2010 (22.04.2010)

PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes:  
A01K 61/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2009/070407

(22) Fecha de presentación internacional:  
29 de septiembre de 2009 (29.09.2009)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P200802927  
16 de octubre de 2008 (16.10.2008) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):  
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES];  
C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):  
**PIFERRER CIRCUNTS, Francesc** [ES/ES]; Instituto De Ciencias Del Mar (icm), Passeig Maritim, 37-49, E-08003 Barcelona (ES). **BLÁZQUEZ PEINADO, Mercedes** [ES/ES]; Instituto De Ciencias Del Mar (icm), Passeig Maritim, 37-49, E-08003 Barcelona (ES). **NAVARRO MARTÍN, Laia** [ES/ES]; Instituto De Ciencias Del Mar (icm), Passeig Maritim, 37-49, E-08003 Barcelona (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: METHOD FOR INCREASING THE PROPORTION OF FEMALE BASS PRODUCED IN FARMING

(54) Título : MÉTODO PARA AUMENTAR LA PROPORCIÓN DE HEMBRAS DE LUBINA PRODUCIDAS EN CULTIVO

(57) Abstract: Method for increasing the proportion of female bass produced in farming that involves maintaining the water temperature between 13 and 17°C from fertilisation until between 50 and 65 dpf [LN1] (days post fertilisation). [LN1]sic

(57) Resumen: Método para aumentar la proporción de hembras en lubinas producidas en cultivo que comprende mantener los valores de temperatura del agua entre 13 y 17°C desde la fertilización hasta un día comprendido entre los 50 y 65 dpf (días post fertilización).



WO 2010/043739 A1

Método para aumentar la proporción de hembras de lubina producidas en cultivo

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

#### ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

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

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

- Determinación sexual ambiental (ESD ó *environmental sex determination*), en cuyo caso es el valor de una variable ambiental quien determina el sexo. Dentro de los factores ambientales, uno de los más influyentes es la temperatura del agua donde crecen los peces y es el

30 mejor estudiado de ellos, siendo otros el pH del agua y la densidad de cultivo (Baroiller *et al.*, 1999. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55: 910-

931). Cuando la temperatura es el factor ambiental determinante del sexo, entonces se habla de determinación sexual por temperatura (TSD ó *temperature-dependent sex determination*). En especies con TSD no se puede hablar de sexo genético propiamente, puesto que no existe como tal. Un individuo sólo determina su sexo al cabo de un tiempo de vida en respuesta a un estímulo ambiental.

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

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

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

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

posible usar esteroides sexuales para la inversión sexual de peces, que pueden producir gametos monosexo.

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

La lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) es la segunda especie en importancia en la piscicultura marina en España y en la que se han estudiado más aspectos relativos a la reproducción (Zanuy *et al.*, 2001. *Aquaculture* 202: 187-203). En condiciones de cultivo en países Mediterráneos la proporción machos:hembras es de aproximadamente 3:1, lo cual es una desventaja puesto que las hembras crecen alrededor de un 30% más que los ejemplares del sexo masculino, y estos últimos muchas veces alcanzan la madurez antes de conseguir un peso adecuado para el mercado, lo que a su vez disminuye aún más la tasa de crecimiento a partir del segundo año

de vida e incrementa la mortalidad y una mayor predisposición a ciertas enfermedades (Carrillo *et al.*, 1995. N.R. Bromage and R.J. Roberts (Editors). *Broodstock Management and Egg Larval Quality*. Blackwell Science, Oxford, pp. 138-168).

5

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

Puesto que en la lubina, las hembras crecen aproximadamente un 30% más que los machos (Saillant *et al.*, 2001. *Aquaculture* 202: 371-387), y alcanzan la talla comercial (~400 g) más de 100 días antes que los  
25 machos, un cultivo con una mayor proporción de hembras supone un claro aumento de la producción para las empresas dedicadas su cultivo. Ello se puede conseguir mediante feminización directa (Blázquez *et al.*, 1998. *Fish Physiology and Biochemistry* 18: 37-47) con tratamiento con esteroides sexuales. Éstos, aunque permitidos por la legislación vigente, en según  
30 que circunstancias (método indirecto de feminización) no se usan debido tanto a las lógicas reticencias de los productores a mezclar sus productos

con estas prácticas como el más que probable rechazo de los consumidores a consumir pescado tratado con hormonas. La estrategia más aconsejable es a través de selección genética de los reproductores (Vandeputte *et al.*, 2007. *Genetics* 176: 1049-1057), estrategia que puede tener limitaciones en cuanto a su aplicación a largo plazo. Existe por tanto, un notable interés en la obtención de un método que permita incrementar la proporción de hembras en esta especie en condiciones de cultivo.

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

10

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

20

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

30

Aunque los resultados muestran que no hay un régimen térmico capaz de inducir la completa feminización en la lubina, el cultivo a <17°C durante 60

dpf da lugar a un balance óptimo entre las ventajas del incremento en la proporción de hembras y las desventajas de un crecimiento inicial más lento.

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

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

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

Temperaturas de 13 – 15°C serían óptimas para la puesta de los huevos, mientras que para acelerar el crecimiento serían más adecuadas  
25 temperaturas próximas a los 17°C. Por tanto, tras la eclosión de todos los huevos (inicio de la fase larvaria), resulta adecuado subir la temperatura hasta 16 grados a 0.5 grados/día (lo que llevaría un mínimo de 4 días y máximo de 6). Así pues, en otra realización preferida el método de la invención comprende:

30

- a) incubar los huevos tras ser fertilizados a unos valores de

temperatura comprendidos entre 13 y 15 °C, los habituales durante la época de puesta, hasta la eclosión de los mismos, que ocurre normalmente alrededor de los 4 días posteriores a la fertilización (dpf).

b) cultivar las larvas tras la eclosión de los huevos, a una temperatura comprendida entre 14 y 16°C, desde el día de la eclosión hasta un rango máximo de 53–64 dpf, dependiendo si la temperatura ha sido de 16°C o de 14°C, respectivamente

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

c) incrementar la temperatura a razón de 0.5°C/día, desde una temperatura comprendida entre 14 y 16°C a una temperatura comprendida entre 20 y 22°C, hasta el final de la fase de destete (que se alcanza entre el día 61 al 72 post fertilización dependiendo de la temperatura),

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

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

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

30

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

- a) puesta y fertilización de huevos,
- b) eclosión y desarrollo larvario,
- c) crecimiento de juveniles hasta adultos.

5 Las fases de cultivo correspondientes son las siguientes:

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

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

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

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

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

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la alimentación durante la fase larvaria es con Artemia. En otra realización preferida, la alimentación durante la fase de destete con Artemia + Pienso destete 150-200  $\mu\text{m}$  a demanda. En otra realización preferida, la alimentación durante la fase de nursery es de pienso 250-500  $\mu\text{m}$  a demanda. En otra realización preferida, la alimentación durante la fase de preengorde es de pienso 800-1200  $\mu\text{m}$  a demanda.

En otra realización preferida, la densidad en la fase de incubación de huevos es de 2000 huevos.  $\text{l}^{-1}$ . En otra realización preferida, la densidad en la fase de cultivo larvario e inicio del destete es de 100 larvas.  $\text{l}^{-1}$ . En otra realización preferida, la densidad en la fase de destete es de 20 larvas.  $\text{l}^{-1}$ . En otra realización preferida, la densidad en la fase de nursery es de un máximo de 20 juveniles.  $\text{m}^3$ . En otra realización preferida, la densidad en la fase de preengorde es de 10 Kg.  $\text{m}^{-3}$ .

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

10

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

El protocolo del método descrito en la invención, tal y como se recoge en los ejemplos, replicado 8 veces, ha dado lugar a una proporción de hembras (media  $\pm$  S.E.M.): 50.1. Rango: 17.4–95.0. En comparación, por el protocolo actualmente utilizado por la industria se obtuvo una proporción de hembras (7 réplicas, media  $\pm$  S.E.M): 26.1%. Rango: 10.5–65.5.

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

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

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

**Fig. 3. Peso corporal (BW) en las lubinas durante los tres primeros años de vida. A** Porcentaje de variación en BW relativo a G10 a tres tiempos diferentes de muestreo durante el primer año: 1) al final de cada periodo de cultivo con agua fría (ECW) a  $15^\circ\text{C}$ , i.e., a 30, 60, 90 y 120 dpf en G30, G60, G90 y G120, respectivamente; 2) Al final del periodo de preengorde o nursery (ENP; 150 dpf), cuando los peces tienen un BW medio de alrededor de 5 g (rango de 2-10 g); y 3) Al final del primer año (EFY; 330 dpf), cuando los peces se encontraron sexualmente diferenciados. Los datos representan el promedio de las cuatro familias

con el promedio de tamaño muestral de 15, 120 y 35 para ECW, ENP y EFY, respectivamente. Los asteriscos indican las diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) entre cada grupo y el grupo G10. Las abreviaturas de los grupos como en la FVig. 1. **B** Crecimiento relacionado con el sexo durante el segundo y tercer año. BW de 21 machos y 53 hembras fue monitorizado desde 330 a 1055 dpf. Diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) entre sexos en cada punto de muestreo se simboliza por \*\*\*. El BW (en gramos) en función de la edad se muestran para machos (BWm) y hembras (BWf). Para las correlaciones lineales, el tiempo de comercialización (400 g) se estimó que era de 505 dpf para las hembras y de 725 dpf para los machos y se indica por flechas verticales. Los tamaños muestrales fueron de 21 y 53 para machos y hembras, respectivamente. Los datos se muestran como

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

**Fig. 5. Efecto de la temperatura en la proporción de sexos de las lubinas. A)** Efecto observado del cultivo a bajas temperaturas ( $< 17^{\circ}\text{C}$ ) para diferentes tiempos dentro del periodo termolábil empezando en la fertilización. Los datos son de estudios previos así como del presente estudio, y se muestran en un diagrama de cajas. La línea fina, márgenes de la caja, las patillas y el círculo abierto representan la media, el cuartil superior e inferior, el rango, y un valor extremo, respectivamente. Grupos con diferentes letras fueron estadísticamente diferentes (ANOVA;  $P < 0.05$ ). **B)** Ilustración de la interacción genotipo (parental) y medioambiente (temperatura) en la proporción de sexos en las lubinas. La influencia del genotipo es evidenciada por una amplia variación en la proporción de

sexos entre los parentales, compatible con un mecanismo de determinación sexual polifactorial. Cuando muchos parentales de diferentes poblaciones se toman juntos, el número medio de hembras genotípicas debería ser de ~50%, hembras que se podría esperar que se desarrollaran como ~50% en hembras fenotípicas, probando que no hay una influencia de la temperatura. El régimen térmico empleado corrientemente, por ejemplo, < 15 días a temperaturas < 17°C, masculiniza alrededor de la mitad de las hembras fenotípicas en machos fenotípicos. Esto aumenta ~25% la proporción de machos fenotípicos de ~50% a ~75% y da lugar, en promedio, a una proporción de sexos de 3:1 que se observa habitualmente en las piscifactorías. h indica las hembras insensibles a la temperatura. i indica alrededor de la mitad de las hembras masculinizadas por la elevada temperatura. Las flechas finas de la parte superior de la Fig. 5B indican la tasa de variación en la proporción de sexos debido a influencia de los parentales. Las flechas finas de la parte inferior de la Fig. 5B indican la tasa de variación en la proporción de sexos debido a las interacciones genética – medio ambiente (de media, aproximadamente el 25% de las hembras fenotípicas).

## 20 EJEMPLOS

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

### **Animales y condiciones de cultivo**

Cuatro grupos de huevos recientemente fertilizados (< 1 día post fertilización; dpf) fueron recolectados de dos localidades diferentes, una hatchery comercial (St. Pere Pescador, Girona, España; 3 grupos) y el

Instituto de Acuicultura (Castellón, España, 1 grupo) en diferentes fechas durante la estación de desove de dos años consecutivos. Los huevos fueron inmediatamente transportados a las instalaciones del Instituto de Ciencias del Mar (CSIC) usando contenedores de PVC con una mezcla 1:3  
5 de agua y oxígeno puro. La incubación de los huevos y las condiciones de cultivo larvario y juvenil se llevaron a cabo como en Moretti *et al.* 1999 (Manual on Hatchery Production of Seabass and Gilthead Seabream. FAO, Roma, 194 pp.). Los huevos (200-2000 huevos·l<sup>-1</sup>, dependiendo del número total de huevos en cada grupo) fueron incluidos en containers  
10 cilíndricos de PVC de 19 litros recubiertos con una malla de nylon de 400 µm (etapa de incubación y hatchery) o de 250 µm (etapa de cultivo larvario). Los huevos y las larvas recién eclosionadas se mantuvieron en total oscuridad hasta su primera alimentación. El fotoperiodo fue progresivamente incrementado desde 4 a 16 horas de luz a una tasa de 1  
15 hora al día para aclimatar a las larvas a la luz para el alimento. Después de la mitad de la metamorfosis (Longitud estándar, SL > 18mm), se transfirieron los juveniles a tanques de fibra de vidrio de 650 l y se mantuvieron bajo fotoperiodo natural y condiciones estándar de pH (~7.9), salinidad (~37.8 ppt), oxígeno disuelto (85–100%), y renovación del agua  
20 (30% vol·h<sup>-1</sup>) hasta el final de este estudio. Para mantener condiciones similares en todos los grupos, y evitar posibles efectos que distorsionen el ensayo, se ajustó el número de peces por tanque a 195 dpf, quitando los ejemplares extra con el fin de evitar el posible efecto de la densidad en el tamaño y proporción de sexos. Las larvas fueron alimentadas  
25 primeramente con Artemia AF y posteriormente con Artemia EG (INVE Aquaculture, Belgium). Los juveniles se alimentaron con pellets de comida deshidratada (ProAqua S.A., Spain) *ad libitum* y las raciones de comida fueron adaptadas a las diferentes tasas de crecimiento causadas por los regímenes térmicos.

### Grupos experimentales

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

**Muestras gonadales: ratio sexual, porcentaje de maduración y GSI.**

El muestreo se llevó a cabo cuando los ejemplares alcanzaron un tamaño mínimo de 12 cm, cuando tenían alrededor de un año (330 dpf) en las familias 1, 3 y 4, y a 400 dpf en la familia 2, cuando la diferenciación sexual es completa e irreversible en la lubina. El sexo fenotípico fue histológicamente determinado con una media de 36 ejemplares por tanque. Las gónadas fueron fijadas en 2% de paraformaldehído en PBS, incluidas en parafina, cortadas a 7  $\mu$ m, y teñidas con hematoxilina-eosina.

Además, los testículos fueron clasificados de acuerdo a su estado de desarrollo. Brevemente, los machos en el estado I/II poseen testículos inmaduros dispuestos en túbulos seminíferos conteniendo esencialmente sólo espermatogonias A; machos en el estado III tienen los testículos dominados por espermatoцитos primarios y secundarios. Machos en el estado IV tienen los testículos en recrudescencia, con todos los tipos de células germinales desde espermatoгонias a espermatozoides, pero con el esperma no dominando completamente los testículos. Finalmente, los machos en el estado V tienen testículos maduros, conteniendo esperma listo para la inseminación. Machos con los testículos en los estados II y III de alrededor de 2 años fueron considerados no precoces, mientras que machos de alrededor de los dos años de edad con testículos en el estado IV y V fueron considerados precoces.

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

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

## Crecimiento

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

15

Peso corporal Relativo (BW)<sub>i</sub> = 100 - [100\*(BW Gi (g)/ BW G10 (g))], siendo i=30, 60, 90 ó 120.

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

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

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

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

## 10 Deformidades y supervivencia

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

## Análisis por microsatélites

Se determinó la variabilidad genética y el test de diferenciación genética entre las cuatro familias en muestras de 26, 39, 48, y 33 peces de las familias 1, 2, 3, y 4, respectivamente. Se aisló el ADN total a partir de recortes de aletas deshidratadas, usando el protocolo de extracción fenol cloroformo levemente modificado. Los genotipos de seis loci de microsatélites (*Dla11*, *labrax-3*, *labrax-6*, *labrax-8*, *labrax-13*, *labrax-17*) (Garcia De Leon, *et al.*, 1997. *Molecular Ecology* 6, 51-62; Castilho and McAndrew, 1998. *Animal Genetics* 29, 151-152) fueron determinados en dos reacciones multiplex con las siguientes combinaciones *Dla11/ labrax-3/labrax-6* (MicrosA) y *labrax-8/labrax-13/labrax-17* (MicrosB). El cóctel de reacción para ambas multiplex se llevó a un volumen final de 20 µl

conteniendo: 1 µl del ADN extraído, 1X PCR buffer, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 500 nmol de cada dNTP y 0.5 U de Hot start Polymerase (Quiagen). Para la combinación de primers MicrosA, 1 pmol de los primers Dla11 y labrax-3 se añadieron a la reacción, mientras que se empleó 1.4 pmol del primer labrax-6. Para la combinación de primers MicrosB, 1 pmol de todos los primers fue añadido a la reacción. Todas las reacciones PCR tuvieron el mismo programa térmico: una etapa de desnaturalización inicial a 95°C durante 15 min, seguido por 25 ciclos de 95°C durante 1 min, hibridación a 58°C durante 30 s y extensión a 72°C durante 30 s, con una etapa de extensión final de 5 min a 72°C. Después de la amplificación, los productos de PCR fueron diluidos 1/10 con formamida hasta un volumen final de 10 µl y se determinaron los genotipos por la longitud del polimorfismo en un secuenciador Applied Biosystems ABI 377 DNA. Los alelos fueron determinados por el software GeneMapper 3.7 software.

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

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

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

### **Análisis de los datos**

La normalidad de los datos fue chequeada con el test de Kolmogorov-Smirnov y se aplicó una transformación logarítmica cuando fue necesario. La homocedasticidad de las varianzas fue verificada por el test de Levené. Se empleó un análisis ANOVA con un grado de libertad para testar las diferencias estadísticas en longitud, peso y GSI. Con el tratamiento de temperatura y la familia como variables independientes y el sexo como una variable dependiente se llevó a cabo una ANOVA de dos vías. Los datos de las tasas d sexos fueron transformados (arcoseno) antes de realizar cualquier análisis estadístico. Para propósitos computacionales, la proporción de sexos para una réplica perdida en una combinación familia-tratamiento particular (5 tanques de un total de 40) se calcularon de acuerdo con el método de diseño de bloques al azar (Berenson, *et al.*, 1983. Pretince-Hall (Ed.), *Intermediate Statistical Methods and Applications. A computer Package Approach*, Englewood Cliffs, New Jersey, pp. 118-130). Para comparaciones múltiples post hoc se empleó el test de Turkey (para todos los grupos de comparación) y el test bilateral de Dunnett (para comparación frente al grupo de control G10) y así chequear las diferencias estadísticas entre los tratamientos de temperatura o las

familias. Por otro lado, el test de Student se empleó para determinar las diferencias entre el crecimiento de machos y hembras durante el segundo y tercer año de vida. La precocidad masculina, la supervivencia y la incidencia de deformidades se analizaron con el test de la Chi-cuadrado.

5 Todos los análisis estadísticos se llevaron acabo empleando el programa SPSS v11.5. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar (SEM). En todos los test, las diferencias fueron consideradas significativas cuando  $P < 0.05$ .

## 10 **Proporciones de sexos**

El porcentaje de hembras de acuerdo a la familia y al tratamiento al final del primer año se muestra en la tabla 1. La media del porcentaje de hembras se incrementa significativamente ( $P < 0.05$ ) al incrementar la  
15 duración del tratamiento inicial a 15 °C, duplicando sus valores de 30.6 $\pm$ 8.0% (G10) a 59.1 $\pm$ 12.8% (G120). Cuando las medias fueron promediadas, el mayor porcentaje de hembras obtenido en este estudio (90 $\pm$ 5%) fue observado en el grupo G60 de la familia 3. La ANOVA con dos grados de libertad, con la familia, la temperatura de tratamiento y la  
20 réplica como factores independientes indicaron que la familia y la temperatura tuvieron una influencia significativa ( $P < 0.001$ ) en la proporción de sexos resultante, mientras que la réplica no. Estos factores explicaban el 65.8, 25.2 y el 9.0% de la varianza, respectivamente. Más aún, una interacción significativa entre el sexo y la temperatura ( $F = 2.67$ ;  
25  $P < 0.05$ ) evidenció la existencia de interacciones genotipo-ambiente en las lubinas empleadas para este estudio. Por tanto, para las familias 1-4, la diferencia entre el porcentaje de hembras máximo y mínimo dentro de cada familia fue 26.8, 24.3, 33.7 y 46.4%, respectivamente (media 28.5  $\pm$  4.9%), indicando las diferencias de sensibilidad a la temperatura entre las  
30 familias.

**Desarrollo gonadal y maduración sexual precoz masculina**

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

10

15

20

25

Grupo de tratamiento	Familia 1		Familia 2		Familia 3		Familia 4		Todas las familias
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	
G10	10.5 (19)	13.9 <sup>1</sup>	10.7 (28)	35.7 (14)	67.5 (40)	45.0 (40)	31.6 (38)	35.3 <sup>1</sup>	31.3 ± 8.0 <sup>1</sup>
G30	34.1 (44)	30.0 (40)	25.0 (40)	41.5 (41)	70.0 (40)	65.0 <sup>1</sup>	24.3 (37)	33.3 (39)	40.4 ± 9.1 <sup>1ab</sup>
G60	44.0 (25)	31.6 (38)	17.4 (46)	25.9 <sup>1</sup>	85.0 (40)	95.0 (40)	48.7 (39)	53.2 (47)	50.1 ± 14.6 <sup>1b</sup>
G90	37.5 (40)	32.7 (49)	25.0 (40)	27.5 (40)	82.5 (40)	80.0 (40)	47.6 (21)	54.5 (33)	48.4 ± 12.1 <sup>1b</sup>
G120	35.0 (40)	43.0 <sup>1</sup>	40.0 (40)	30.0 (40)	85.0 (40)	80.0 (40)	82.6 (23)	76.9 (13)	59.1 ± 12.8 <sup>1</sup>

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

Al 330 dpf, la proporción de machos precoces (machos en los estadios IV y V) en el grupo G10 de la familia 1 fue ~30% (Tabla 2). La exposición a bajas temperaturas durante 30, 90 ó 120 días (G30, G90 y G120) dio lugar a un descenso significativo en la proporción de machos precoces de la mitad o un tercio de los valores recogidos en G10. Más aún, el número de machos en el estadio III mostró un incremento continuo desde 5.9% en G10 a 42.3% en G120 ( $P < 0.05$ ). Independientemente del tratamiento de temperatura, la media de BW y de SL fue determinada para hembras (BW,  $83.0 \pm 2.88$  g; SL,  $169.6 \pm 1.86$  mm), machos precoces (BW,  $67.5 \pm 2.69$  g; SL,  $160.0 \pm 2.01$  mm) y machos no precoces (BW,  $55.0 \pm 1.22$  g; SL,  $150.8 \pm 1.02$  mm). Así pues, las hembras fueron significativamente mayores ( $P < 0.05$ ) que los machos precoces que, a su vez, fueron significativamente mayores que los machos no precoces ( $P < 0.05$ ) tanto en SL como en BW.

15

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

**Tabla 2.** Porcentaje de machos precoces y no precoces al 330 dpf.

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$  tras el test Chi-cuadrado.

20

El GSI al final del primer año en las familias 2, 3 y 4 se muestra en la Fig. 2. Independientemente del régimen térmico, las hembras exhibieron GSIs

significativamente mayores que los machos ( $P < 0.001$ ). Además, las hembras de G60, G90 y G120 tuvieron un menor GSIs que las hembras de G10 y G30 ( $P < 0.01$ ), mientras que los machos G10 tuvieron un mayor GSIs que los machos G30, G90 y G120 ( $P < 0.01$ ).

5

### **Crecimiento dependiente del sexo y la temperatura y estimación de la biomasa.**

Bajas temperaturas durante fases de desarrollo temprano dieron lugar a un retardo en el crecimiento, con los peces en los grupos G30, G60, G90 y G120 alcanzando el final del estado larvario (17-18 mm) de 15 a 30 días más tarde que los peces en G10. Hacia el final de sus periodos respectivos de cultivo a 15°C, todos los grupos ya exhibieron menores valores de BW cuando se comparaban con el BW del grupo G10 al mismo tiempo de muestreo ( $P < 0.001$ ) (Fig. 3A). Al final del periodo de preengorde o nursery (rango de BW de 2-10 g; edad alrededor de 150 dpf) mientras G30 tuvo un BW significativamente mayor ( $P < 0.001$ , 36.9%) que el grupo G10, en contraste G60, G90 y G120 mostraron un BW significativamente menor ( $P < 0.001$ ) respecto a G10. Por consiguiente, el crecimiento compensatorio sólo se observó en G30. Sin embargo, esta ventaja en el tamaño y en BW fue reducida al 9.4% al final del primer año, con valores no significativamente diferentes de los de G10. A este tiempo, el crecimiento en G60, G90 y G120 fue todavía significativamente menor ( $P < 0.001$ ) (15.2%, 35.4%, 32.4%, respectivamente) que G10 (Fig. 3A). Durante el segundo y tercer año de vida, el crecimiento fue monitorizado considerando sólo el sexo del pez, independientemente del tratamiento previo de temperatura (Fig. 3B). Se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) entre los sexos a todos los tiempos de muestreo. Se observó también una correlación positiva lineal robusta entre la edad y BW durante este tiempo para ambos sexos ( $r^2 = 0.99$ ;  $P < 0.001$ ). Usando esta correlación, fue estimado el tiempo al que el pez alcanza el tamaño de

comercialización (400 g de acuerdo con las prácticas comunes de producción de lubinas), y se encontró que era de alrededor del 605 dpf para las hembras y 725 dpf para los machos. Por tanto, para el tiempo en el que las hembras alcanzaron 400 g, se estimó que el peso de los machos fue sólo de 292 g. Basándose en la media mínima observada y en la media máxima alcanzable en el porcentaje de machos y hembras, se calculó la biomasa resultante con y sin manipulaciones térmicas en base a las proporciones entre sexos finales de cada grupo y el peso de los machos cuando las hembras alcanzaron los 400 g (tabla 3). Un incremento de la biomasa del 6.1 % podría conseguirse con un régimen térmico como el del grupo G60, mientras que con el grupo G120 podría alcanzarse un incremento del 9.2%.

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

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

20

**Tabla 3.** Media del peso corporal y biomasa estimada cuando las hembras alcanzan el tamaño de comercialización. El porcentaje de sexos

corresponden a los promedios de los grupos G10, G60 y G120 de todas las familias. <sup>1</sup>Biomasa en kg por 100 peces.

### **Supervivencia y teratología**

5

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

15

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

30

### Variabilidad genética

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

15

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

**Tabla 4.** Diversidad genética por locus. K, número de alelos por locus. He, heterocigosidad esperada. PIC, contenido polimórfico (*polymorphism information content*). HW, valor del test de Hardy-Weinberg. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). ns= diferencias no significativas.

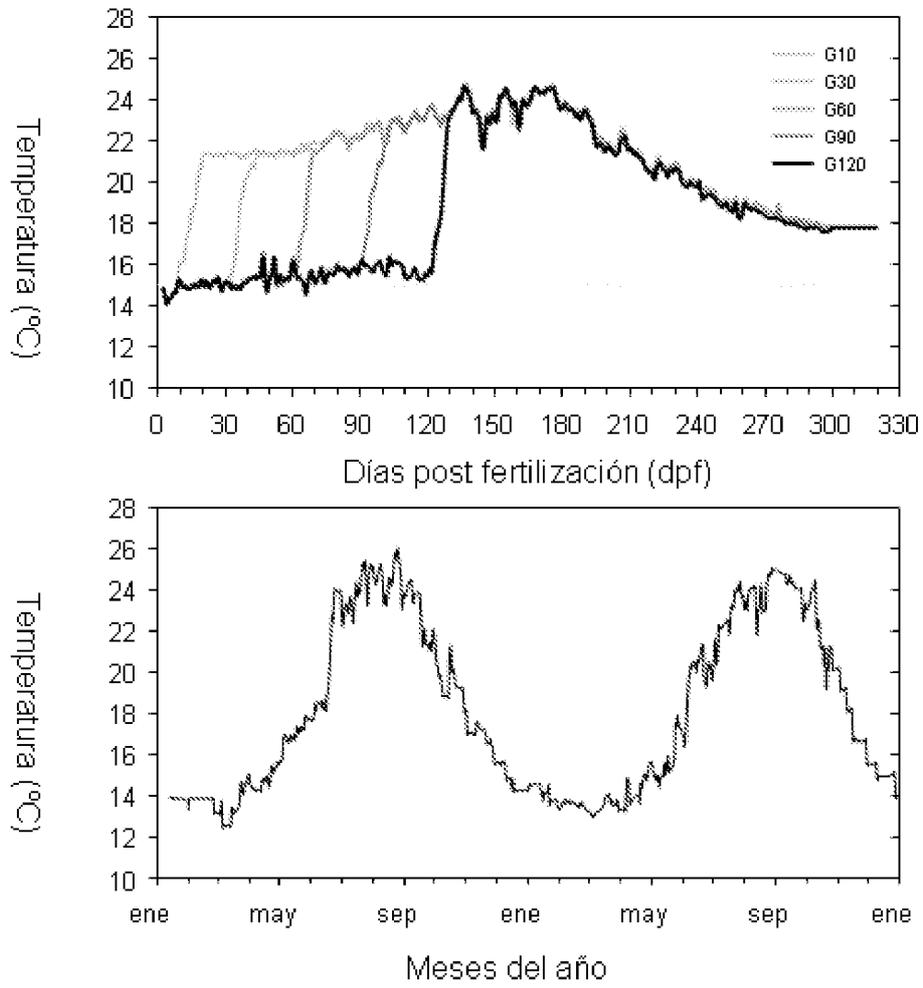
20

## REIVINDICACIONES

1. Método para aumentar la proporción de hembras en lubinas producidas en cultivo que comprende mantener los valores de temperatura del agua entre 13 y 17°C desde la fertilización hasta un día comprendido entre los 53 y 64 dpf.  
5
2. Método según la reivindicación anterior que comprende:
  - a. incubar los huevos tras ser fertilizados a unos valores de temperatura comprendidos entre 13 y 15°C hasta la eclosión de los mismos, y  
10
  - b. cultivar las larvas tras la eclosión de los huevos, a una temperatura comprendidos entre 14 y 16°C, desde el día de la eclosión hasta un día comprendido entre el 53–64 dpf.  
15
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 que además comprende:
  - c. incrementar la temperatura a razón de 0.5°C/día, desde una temperatura comprendida entre 14 °C y 16 °C a una temperatura comprendida entre 20 y 22°C, durante la fase de destete (desde el día 61 al 72 post fertilización),  
20
  - d. mantener la temperatura a un intervalo comprendido entre 20°C y 22°C durante la fase final del destete (desde el día 73 al 75 post fertilización), y  
25
  - e. mantener una temperatura comprendida entre 20°C y 22°C durante la fase de nursery y preengorde (hasta un día comprendido entre 150 y 180 dpf).  
30
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 donde el incremento de temperatura, desde una temperatura comprendida entre

14 °C y 16 °C a una temperatura comprendida entre 20 y 22°C, se produce desde el día 61 al 75 post fertilización.

- 5 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el que la fase de incubación (paso a.) se realiza en penumbra.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en el que el fotoperiodo durante la fase de destete (pasos c. y d.) es de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.
- 10 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en el que el fotoperiodo durante la fase de nursery (paso e.) es de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.
- 15 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 donde la densidad en la fase de incubación de los huevos (paso a.) es de entre 1800 y 2200 huevos/l.
- 20 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 donde la densidad en la fase de cultivo larvario e inicio del destete (paso b.) es de entre 80 y 120 larvas/l.
- 25 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 donde la densidad en la fase de destete (paso c.) es de entre 18 y 22 larvas/l.
- 30 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 donde la densidad en la fase de nursery (paso e.) es de máximo 20 juveniles/m<sup>3</sup>.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la densidad en la fase de preengorde (paso e.) es de entre 8 y 12 Kg /m<sup>3</sup>.



**FIG. 1**

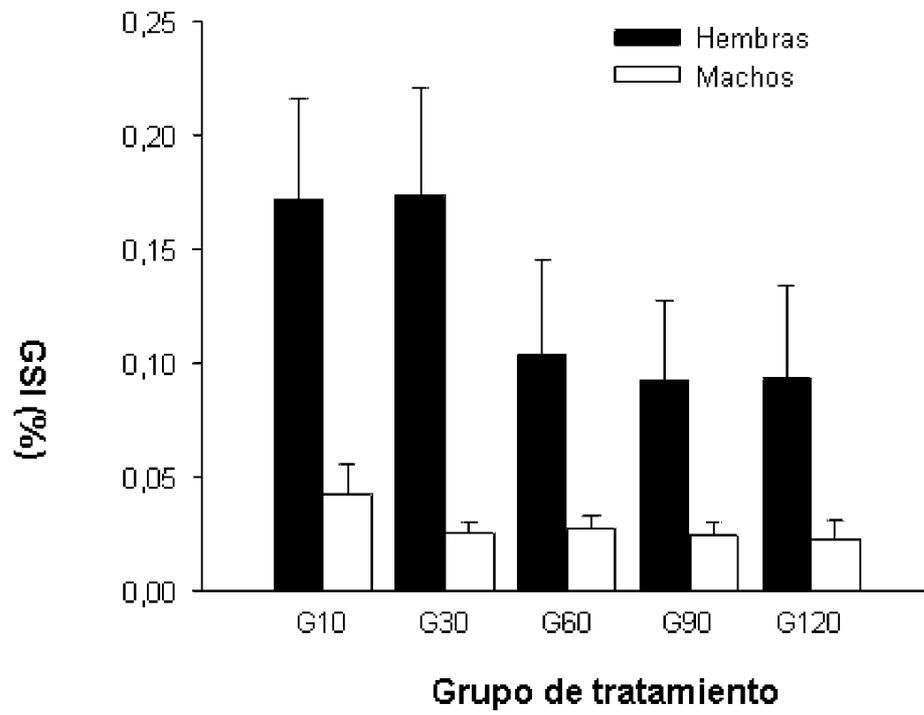
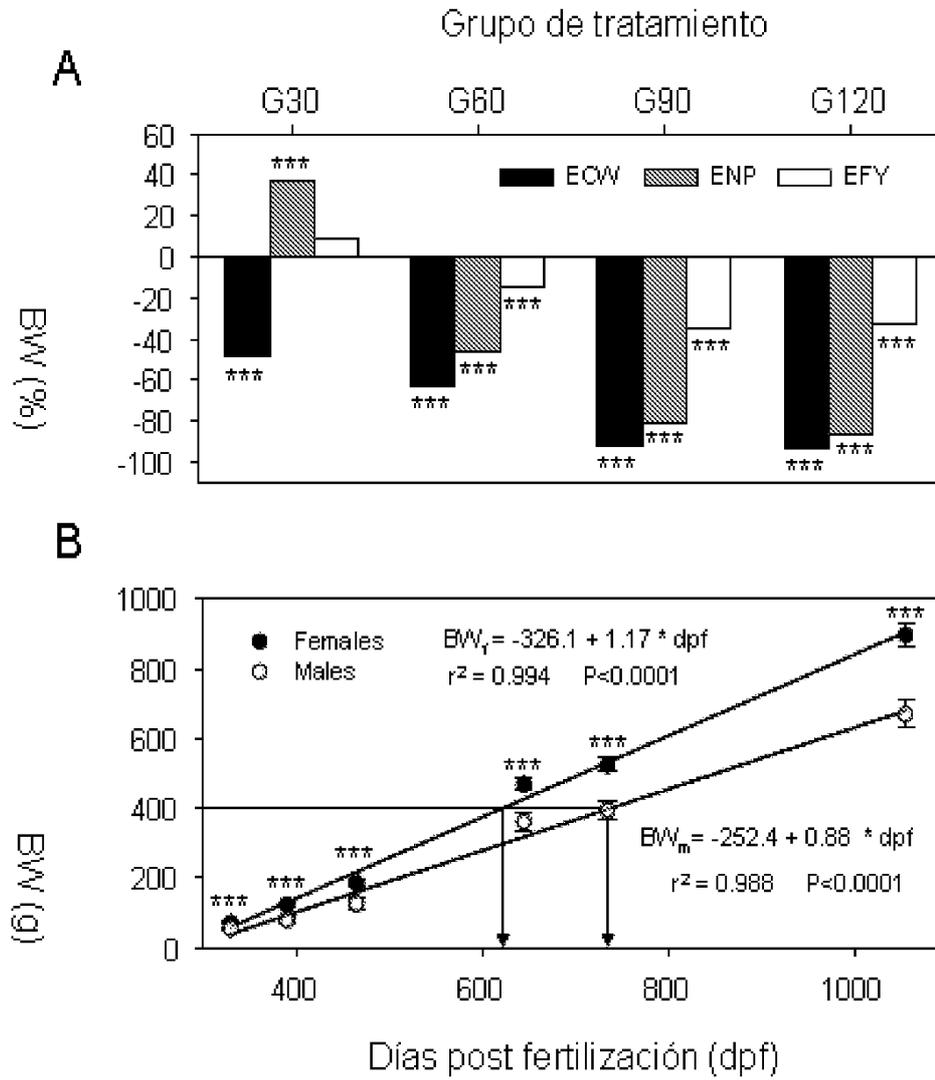
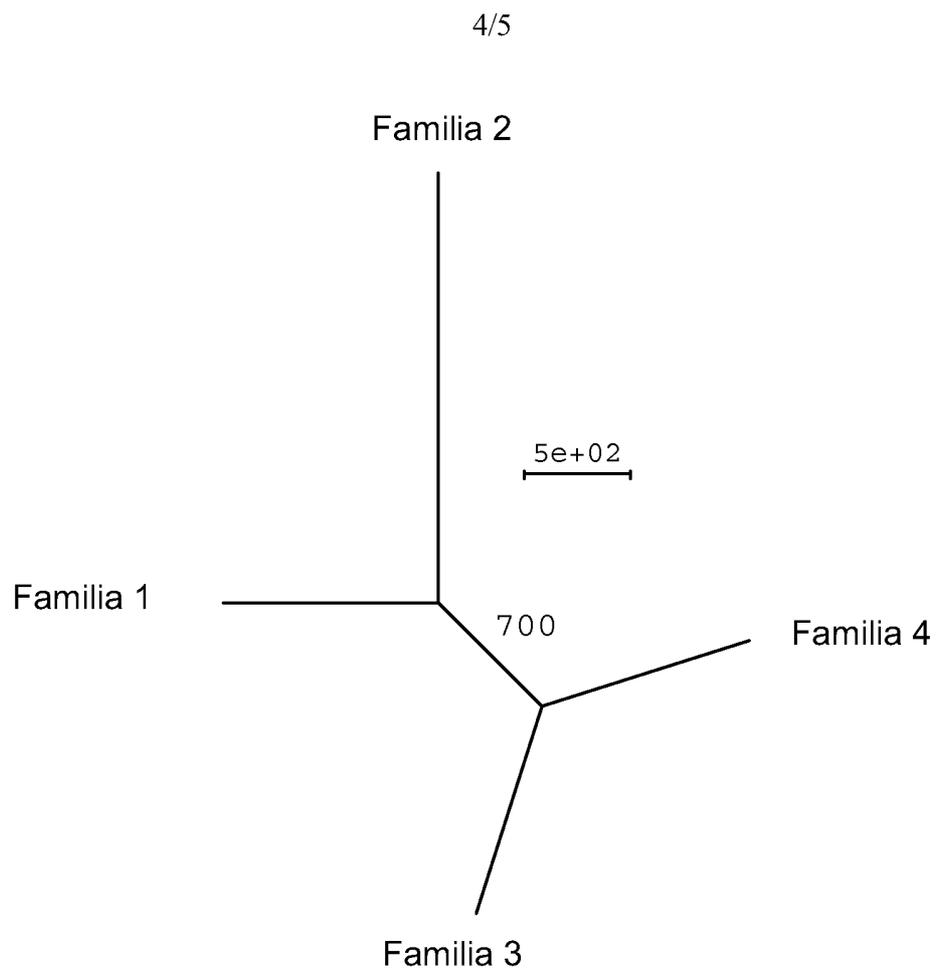


FIG. 2



**FIG. 3**



**FIG. 4**

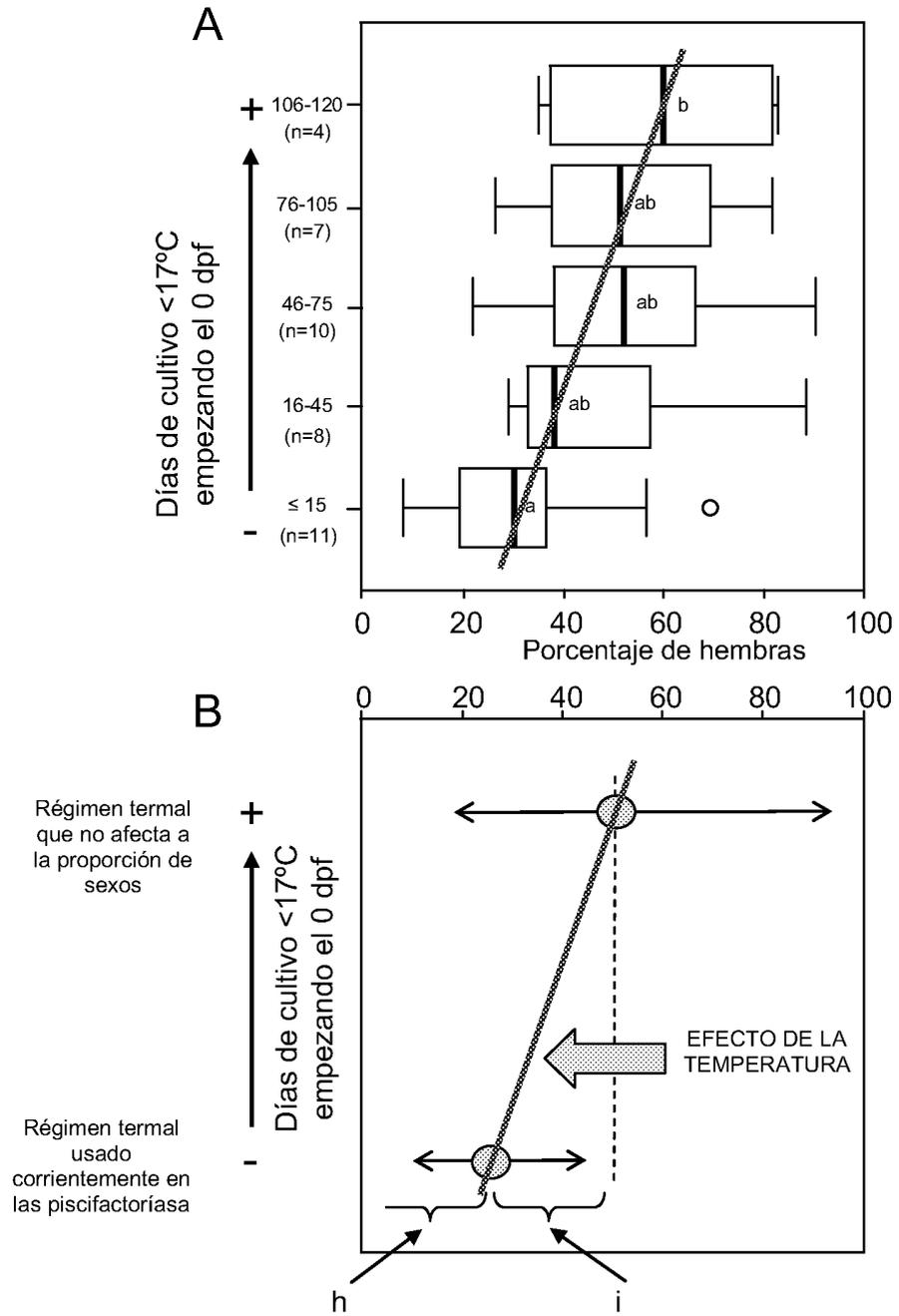


FIG. 5

**Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)**

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1.  Las reivindicaciones N<sup>os</sup>.  
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
  
2.  Las reivindicaciones N<sup>os</sup>. 4  
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

La duración del periodo en el cual se produce el incremento de la temperatura de la reivindicación 4 no está dentro de los límites que se establecen en el paso c de la reivindicación 3 de la que depende. En la reivindicación 3, el incremento de la temperatura se da entre los días 61 al 72 dpf y en la reivindicación 4 entre los días 61 al 75 dpf

3.  Las reivindicaciones N<sup>os</sup>.  
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

**Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)**

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1.  Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2.  Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3.  Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N<sup>os</sup>.
4.  Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N<sup>os</sup>.

- Indicación en cuanto a la protesta**
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
  - Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento.
  - El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ ES 2009/070407

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**A01K 61/00** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>KOUMOUNDOUROS, G. et al. Temperature sex determination in the European sea bass, <i>Dicentrarchus labrax</i> (L., 1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae): Critical sensitive ontogenic phase. <i>Journal of Experimental Zoology</i>, 2002, vol. 292, pages 537-579.</p>	1,2
Y		3-12
Y	<p>MORETTI, A. et al. Manual on hatchery production of Seabass and Gilthead Seabram. 1999. Volumen 1, parte 3: Hatchery production and procedures, page 33-189. Roma: FAO.</p>	3-12
X	<p>PAVLIDIS, M. et al. Evidence of temperature-dependant sex determination in the European sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.). <i>Journal of Experimental Zoology</i>, 2000, vol. 287, pages 225-232.</p>	1,2,5

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

“E” earlier document but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 December 2009 (15.12.2009)

Date of mailing of the international search report

**(13/01/2010)**

Name and mailing address of the ISA/  
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.  
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

A. Polo Díez

Telephone No. +34 91 349 55 24

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/ES 2009/070407

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MORETTI, A. et al. Manual on hatchery production of Seabass and Gilthead Seabram. 2005. Volumen 2, parte 1: Hatchery design and construction, page 1-32. Roma. FAO.	5-12
A	PIFERRER, F. et al. Genetic, endocrine and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass ( <i>Dicentrarchus labrax</i> L.). General and comparative Endocrinology, 2005, vol. 142, pages 102-110.	1-4
A	VANDEPUTTE, M. et al. A polygenic hypothesis for sex determination in the European Sea bass <i>Dicentrarchus labrax</i> . Genetics, 2007, vol. 176, pages 1049-1057.	1-4

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
Claim 4  
  
The duration of time in which the increase in temperature takes place as specified in claim 4 does not fall within the limits indicated in step c of claim 3, on which claim 4 is dependent. In claim 3, the increase in temperature takes place between days 61 and 72 after fertilisation and in claim 4 between days 61 and 75 after fertilisation.
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

## Claim 4

The duration of time in which the increase in temperature takes place as specified in claim 4 does not fall within the limits indicated in step c of claim 3, on which claim 4 is dependent. In claim 3, the increase in temperature takes place between days 61 and 72 after fertilisation and in claim 4 between days 61 and 75 after fertilisation.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°  
PCT/ ES 2009/070407

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**A01K 61/00** (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A01K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

INVENES, EPODOC, WPI

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	KOUMOUNDOUROS, G. et al. Temperature sex determination in the European sea bass, <i>Dicentrarchus labrax</i> (L., 1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae): Critical sensitive ontogenic phase. <i>Journal of Experimental Zoology</i> , 2002, vol. 292, páginas 537-579.	1,2
Y		3-12
Y	MORETTI, A. et al. Manual on hatchery production of Seabass and Gilthead Seabram. 1999. Volumen 1, parte 3: Hatchery production and procedures, página 33-189. Roma: FAO.	3-12
X	PAVLIDIS, M. et al. Evidence of temperature-dependant sex determination in the European sea bass ( <i>Dicentrarchus labrax</i> L.). <i>Journal of Experimental Zoology</i> , 2000, vol. 287, páginas 225-232.	1,2,5

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos  Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	“&” documento que forma parte de la misma familia de patentes.
“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

15 Diciembre 2009 (15.12.2009)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

**13-ENERO-2010 (13/01/2010)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.  
N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

A. Polo Díez

N° de teléfono +34 91 349 55 24

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/070407

## Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1.  Las reivindicaciones N<sup>os</sup>.  
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
  
2.  Las reivindicaciones N<sup>os</sup>. 4  
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

La duración del periodo en el cual se produce el incremento de la temperatura de la reivindicación 4 no está dentro de los límites que se establecen en el paso c de la reivindicación 3 de la que depende. En la reivindicación 3, el incremento de la temperatura se da entre los días 61 al 72 dpf y en la reivindicación 4 entre los días 61 al 75 dpf

3.  Las reivindicaciones N<sup>os</sup>.  
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

## Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1.  Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2.  Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3.  Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N<sup>os</sup>.
4.  Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N<sup>os</sup>.

### Indicación en cuanto a la protesta

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070407

C (continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	MORETTI, A. et al. Manual on hatchery production of Seabass and Gilthead Seabram. 2005. Volumen 2, parte 1: Hatchery design and construction, página 1-32. Roma. FAO.	5-12
A	PIFERRER, F. et al. Genetic, endocrine and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass ( <i>Dicentrarchus labrax</i> L.). General and comparative Endocrinology, 2005, vol. 142, páginas 102-110.	1-4
A	VANDEPUTTE, M. et al. A polygenic hypothesis for sex determination in the European Sea bass <i>Dicentrarchus labrax</i> . Genetics, 2007, vol. 176, páginas 1049-1057.	1-4