



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2007 00774**

(22) Data de depozit: **09.11.2007**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29.06.2012** BOPI nr. **6/2012**

(41) Data publicării cererii:
29.05.2009 BOPI nr. **5/2009**

(73) Titular:
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE
ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ DIN
CLUJ-NAPOCA, CALEA MĂNĂȘTUR
NR.3-5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• PETRESCU-MAG IOAN VALENTIN,
STR.CEAHLĂU NR.54, CLUJ-NAPOCA, CJ,
RO;
• BUD IOAN, STR.MOGOȘOAI NR.7, SC.5,
AP.45, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• PETRESCU-MAG RUXANDRA MĂLINA,
STR.CEAHLĂU NR.54, CLUJ-NAPOCA, CJ,
RO;
• SISEA CRISTIAN, STR.LUPTI NR.29,
SIBIU, SB, RO;
• BURA MARIAN, STR.CIRCUMVALAȚIUNII
NR.28, AP.18, TIMIȘOARA, TM, RO;
• GROZEA ADRIAN, ALEEA BAGHETEI
NR.7, BL.A 8, SC.B, AP.3, TIMIȘOARA, TM,
RO;

• BOTHÁ MIKLOS, STR.MEHEDINȚI
NR.47-49, SC.1, AP.14, CLUJ-NAPOCA, CJ,
RO;
• COȘIER VIORICA, STR.IEZER NR.4,
BL.L 3, AP.21, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
Y. FUJIO, M. NAKAJIMA, Y. NAGAHAMA,
"DETECTION OF A LOW
TEMPERATURE-RESISTANT GENE IN THE
GUPPY (POECILIA RETICULATA), WITH
REFERENCE TO SEX-LINKED
INHERITANCE", JPN. J. GENET., VOL. 65,
PP. 201-207, 1990; T. J. PANDIAN, S. G.
SHEELA, "HORMONAL INDUCTION OF
SEX REVERSAL IN FISH",
AQUACULTURE, VOL. 138, NR. 1-4, PP.
1-22, 1995; P. H. JOHANSEN, J. A. CROSS,
"EFFECTS OF SEXUAL MATURATION
AND SEX STEROID HORMONE
TREATMENT ON THE TEMPERATURE
PREFERENCE OF THE GUPPY, POECILIA
RETICULATA (PETERS)", CANADIAN
JOURNAL OF ZOOLOGY, VOL. 58, PP.
586-588, 1980; WO 99/41979 A1; CN
101002546 A

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNEI LINII CRIOREZISTENTE
HOMOZIGOTE DE PEȘTI ORNAMENTALI GUPPY (*POECILIA
RETICULATA*) CU APLICABILITATE ÎN GUPPYCULTURĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei linii criorezistente de pești ornamentali guppy (*Poecilia reticulata*), această linie fiind utilă în crescătoriile de pești ornamentali, pentru reducerea costurilor de creștere și întreținere a stocurilor cu destinație acvariofilă. Femelele criorezistente de pești guppy, obținute prin procedeu conform invenției, ating dimensiunea de vânzare de 2,5...3,0 cm SL la vârsta de 65...67 zile, dacă sunt crescute la 17...19°C, supraviețuiesc câteva ore la 10...12°C, câteva zile la 14...16°C, și sunt tolerante la variația temperaturii, iar masculii criorezistenți

hemizigoți de pești guppy obținuți prin același procedeu ating dimensiunea de vânzare de 1,8...2,0 cm SL la vârsta de 65...67 zile, dacă sunt crescuți la 17...19°C, supraviețuiesc câteva ore la 10...12°C, câteva zile la 14...16°C, și sunt toleranți la variația temperaturii, iar linia de pești guppy formată din aceste femele și masculi pot da naștere unei descendențe criorezistente pure din punct de vedere genetic.

Revendicări: 1
Figuri: 1

Examinator: biochimist BABALIGEA IRINA



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

RO 123452 B1

1 Inventția se referă la un procedeu de obținere a unei linii criorezistente homozigote
de pești ornamentali guppy (*Poecilia reticulata*), bazat pe sex-likage, tratamente hormonale,
3 încrucișare și retroîncrucișare, cu aplicabilitate în guppycultură. Guppy este o specie de
interes economic, comercial și științific. Importanța lui se referă atât la numărul mare în care
5 este cerut pe piața acvariofilă, cât și la faptul că el este un organism model în ecologie,
etologie, ecotoxicologie, filogenie și genetică. Procedeu prezentat în cele ce urmează poate
7 fi folosit cu succes pentru obținerea unei linii de guppy rezistente la temperaturi scăzute ale
apei în doar două generații, fiind util crescătorilor de pești ornamentali pentru reducerea
9 costurilor de creștere și întreținere a stocurilor cu destinație acvariofilă.

„Peștele milionar”, cum mai este numit guppy, are un determinism al sexelor de tip
11 *Drosophila* (Winge 1922a, 1922b) cu heterogameție masculă (σXY) și homogameție femelă
($\text{♀} XX$). Același autor a arătat că, rareori, apar în populație masculi falși (σXX) sau femele
13 false ($\text{♀} XY$). Majoritatea genelor de culoare sunt localizate pe cromozomii sexului la guppy,
asfel încât cele mai multe tipare coloristice sunt sex-linkate (Lindholm & Breden 2002).
15 Totuși, Winge (1922b) a constatat multe cazuri de recombinare genetică prin crossing-over
între cei doi heterosomi. Mai mult decât atât, frecvența recombinării de pe X pe Y diferă
17 semnificativ de cele mai multe ori față de cea de pe Y pe X.

În 1947, Nybelin descria gena *Nigrocaudatus* I ca fiind o genă mutantă, X-linkată,
19 dominantă, care determină un melanism intens în regiunea posterioară a corpului. Această
descriere a rămas valabilă până azi în ciuda unor păreri conform cărora gena ar trebui să
21 existe și în formă Y-linkată (Lindholm & Breden 2002). O altă formă a genei, numită și
Nigrocaudatus II, mult mai frecventă astăzi decât prima, a fost descrisă pentru prima dată
23 de Dzwillo (1959). Ea era descrisă tot ca o genă dominantă și X-linkată. Ulterior, Nayudu
(1979) constată că gena *Nigrocaudatus* II poate exista și în formă Y-linkată, dar că ea este
25 semiletală, determinând o mortalitate ridicată și o rată de creștere foarte slabă. Totuși, din
rezultatele acestor autori rezultă o frecvență de recombinare de pe Y pe X de 4,00%, iar de
27 pe X pe Y de 0,00%, ceea ce denotă faptul că gena poate fi folosită pentru markarea
cromozomului X - lucru confirmat de cercetările noastre ulterioare (Mag et al. 2006). Pe
29 lângă observațiile lui Nybelin, s-au mai constatat încă două caractere exclusiv X-linkate la
guppy, și anume: *Lineatus* (un alt tipar coloristic, Winge 1927) și o genă a rezistenței la
31 temperaturi scăzute ale apei (Fujio et al. 1990).

În piscicultura ornamentală, o problemă importantă o constituie relația dintre
33 cheltuielile de întreținere și randamentul la vânzare, deoarece de acestea două depinde
profitul unei crescătorii. Creșterea peștilor guppy în condiții optime se face la temperaturi
35 cuprinse între 22 și 26°C (72-78°F). Problema tehnică pe care își propune să o rezolve
inventia constă în obținerea unei linii de pești de guppy criorezistente, care să aibă aceleași
37 performanțe de creștere la temperaturi mai scăzute decât temperatura optimă de creștere,
fără ca mortalitatea și rata de creștere a acestora să difere semnificativ față de cele obținute
39 la temperatura optimă.

Procedeu de obținere a unei linii criorezistente homozigote de pești ornamentali
41 guppy (*Poecilia reticulata*) formată din masculi și femele, conform invenției, cuprinde
următoarele etape:

43 - administrarea la puietul de o zi din varietatea Half-Black în primele trei zile de viață
de hrană care conține 100 mg Kg⁻¹ 17 α -metitestosteron, cu obținerea de femele Half-Black
45 de tip XX,

- administrarea la puietul de o zi din varietatea Red-Blond în primele trei zile de viață
47 de hrană care conține 100 mg Kg⁻¹ valerat de estradiol, cu obținerea de masculi Red Blond
de tip XY,

RO 123452 B1

- supunerea masculilor Red Blond de tip XY la scăderea treptată a temperaturii apei și selectarea masculilor rezistenți timp de 2-3 h la temperatura de 10-12°C, etapă finalizată cu obținerea de masculi Red Blond XY criorezistenți,	1
- opțional, supunerea femelelor Half-Black de tip XX la scăderea treptată a temperaturii apei și selectarea femelelor rezistente timp de 2-3 h la 10-12°C, etapă finalizată cu obținerea de femele Half-Black XX criorezistente testate,	3
- încrucișarea masculilor Red Blond de tip XY criorezistenți cu femelele Half-Black de tip XX testate sau nu pentru criorezistență, cu obținerea de indivizi cu fenotip Half-Black, dintre care o parte sunt masculi criorezistenți sau criosensibili, iar o parte sunt femele cu cel puțin un exemplar de alelă a criorezistenței,	5
- retroîncrucișarea femelelor cu cel puțin un exemplar de alelă a criorezistenței cu masculii Red Blond de tip XY criorezistenți și eliminarea alelelor recesive de la locusul criorezistenței cu obținerea liniei criorezistente homozigote la locusul criorezistenței.	7
Loturile obținute prin procedeul conform invenției fac posibilă obținerea aceluiași performanțe de creștere la 17-19°C ca și la 22-24°C, fără ca mortalitatea și rata de creștere dintre acestea să difere semnificativ. Astfel, se poate economisi energie prin reducerea cheltuielilor de curent electric sau gaz în crescătorii.	9
În cadrul proiectului CEEEX 140/2006 (finanțat de ANCS, monitorizat de CNMP-Biotech, coordonat de USAMV Cluj și condus de Petrescu-Mag I. Valentin), s-au desfășurat activități planificate în vederea obținerii unei linii criorezistente de guppy homozigote la locusul genei pentru rezistență la temperaturi scăzute ale apei. Pentru aceasta, a fost nevoie ca indivizii folosiți să aibă genotipuri ♀XX sau ♂XY cunoscute, să aparțină la două linii diferite - una dintre ele cu un colorit corporal de tip tuxedo (Half-Black sau <i>Nigrocaudatus</i>), iar cealaltă de tip hipomelanice. Bineînțeles, loturile inițiale trebuie să nu fie exagerat de consangvinizate, pentru a se avea certitudinea că gena criorezistenței există în genofondul populatelor măcar cu o frecvență redusă. Astfel s-a ales ca sursă de părinți masculi varietatea Red Blond (varietate hipomelanice ce prezintă un colorit roșu, relativ uniform, pe corp și pe înțotoare; melanina este aproape absentă în melanocitele de pe suprafața corpului și este vizibilă doar la ochi și rareori la caudală), iar ca sursă de părinți femeli, am folosit varietatea Half-Black Black (o varietate hipermelanice, aproape complet neagră atât datorită genei <i>Nigrocaudatus</i> II, cât și datorită unor poligene sau a genei Bcp - Black caudal peduncle).	11
Pentru a se avea certitudinea că femelele false nu vor apărea în lotul genitorilor Half-Black și că masculii falși nu vor apărea în lotul genitorilor Red Blond, s-a efectuat o deviere intenționată cu aproximativ 3% de la procentajele normale ale celor două sexe prin tratamente hormonale ușoare. A urmat identificarea genitorilor criorezistenți prin studiul fenotipului lor. Lotul de masculi Red Blond s-a supus scăderii treptate a temperaturii apei (2-4°C/zi). Aceasta s-a continuat până când indivizii criosensibili au manifestat semne de „oboseală”, moment în care ei au fost mutați într-un alt bazin în care valoarea temperaturii s-a crescut treptat până la cea de confort. Ultimii 10% din indivizii luați în studiu au fost considerați criorezistenți și au fost readuși treptat la temperatura de confort. Deși nu este necesară, operațiunea s-a aplicat și femelelor Half-Black Black, pentru o și mai mare precizie a tehnicii de lucru.	13
Masculii criorezistenți Red Blond $X_{ni}Y_0$ au fost încrucișați cu femelele Half-Black $X_{ni}X_{ni}$. În urma acestei încrucișări, conform legilor mendeliene, au rezultat din punct de vedere coloristic indivizi cu un singur fenotip: Half-Black (sau tuxedo; figura) - aproximativ jumătate fiind masculi (criorezistenți sau criosensibili) și cealaltă jumătate fiind femele cu cel puțin un exemplar al alelei criorezistenței.	15
	17
	19
	21
	23
	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

RO 123452 B1

1 Încrucișările au pornit cu indivizii criorezistenți identificați anterior. Deși lotul inițial de
2 reproducători a fost mai mare, din aceste loturi de indivizi s-au ales indivizii aflați în cele mai
3 bune condiții de sănătate și aspect comercial, mai precis: un număr de 21 masculi Red Blond
4 și 43 femele Half-Black Black. Întreținerea loturilor în bune condiții s-a făcut prin hrănirea de
5 trei ori pe zi *ad libitum* cu hrană vie (*Artemia spp*, *Tubifex spp*) și furaj de bună calitate - *Tetra*
6 *Rubin* și *Tetra Discus*. Iluminarea s-a făcut după modelul ciclului noapte-zi, aproximativ
7 jumătate din 24 h bazinele fiind iluminate cu lămpi Sun Glo și Power Glo. Bazinele de
8 întreținere au fost plantate cu *Cryptocorine spp*, iar calitatea apei a fost monitorizată prin
9 verificarea parametrilor la fiecare 3-4 zile și schimbarea periodică a apei. Apa folosită a fost
10 cea de la rețeaua de apă potabilă a Municipiului Cluj-Napoca. De cele mai multe ori, apa a
11 fost păstrată în tancuri de maturare pentru evitarea intoxicației peștilor cu oxigen activ, clor
12 sau alți dezinfectanți utilizați.

13 Încrucișarea s-a făcut simultan și panmictic pe cale naturală, prin păstrarea în același
14 bazin de creștere a tuturor indivizilor Red Blond masculi și Half-Black Black femeli din cele
15 două loturi de reproducători. După 28-30 zile de la împreunarea lor, au apărut relativ sincron
16 primele serii de pui hibridi, primul val însumând un număr de 546 indivizi care prezentau de
17 la naștere binecunoscutul caracter denumit de diferiți autori ca *Nigrocaudatus* II, Half-Black
18 sau tuxedo. Acest caracter este probabil singurul care își face apariția încă de la faza de
19 puiet, restul apărând mult mai târziu în ontogenia indivizilor la peștii guppy.

20 Puietul din generația F_1 a fost crescut în aceleași condiții de viață care au fost
21 descrise mai sus pentru generația parentală, cu mici deosebiri legate de dimensiunea
22 particulelor de hrană (tubifexul a fost tocat și spălat, furajul a fost măcinat mai mărunț etc.).
23 Dimensiunea bazinelor de creștere (200 litri) a conferit peștilor spațiu la discreție și un volum
24 mare de apă/individ. Dezvoltarea lor a fost rapidă, atingând maturitatea la aproximativ 60 zile
25 de la naștere/eclozare. Indivizii au fost sexați timpuriu, imediat ce caracterele sexuale
26 secundare și-au făcut apariția. Masculii au fost scoși unul câte unul, în fiecare zi, pentru
27 evitarea fecundării femelelor de către alți masculi decât cei prevăzuți de programul de
28 ameliorare. Fecundarea întâmplătoare a femelelor ar fi dus la imposibilitatea utilizării lor în
29 etapa următoare.

30 Următorul pas a fost retroîncrucișarea femelelor criorezistente cu masculii Red Blond
31 și eliminarea alelelor recesive de la locusul criorezistenței. Această etapă a avut ca scop
32 homozigotarea alelei criorezistenței la indivizii femeii $X_{ni}X_{ni}$ ai generației F_b și obținerea unui
33 lot nou de masculi criorezistenți hemizigoți $X_{ni}Y_0$ (figura).

34 Din generația F_1 s-a ales un număr de 40 femele virgine pentru încrucișarea cu forma
35 parentală de masculi Red Blond (20 indivizi). Întreținerea și împerecherea s-a desfășurat
36 conform celor descrise la încrucișarea inițială. În urma retroîncrucișării au rezultat în primul
37 val un număr de 632 indivizi, prezentând două fenotipuri coloristice diferite, dar patru
38 fenotipuri diferite, dacă ținem cont și de sexul indivizilor, respectiv, de dimorfismul sexual al
39 acestora. Repartiția indivizilor pe fenotipuri a indicat o segregare conform legilor mendeliene
40 și a confirmat valabilitatea proiectului de procedeu propus în cadrul acestui program de
41 ameliorare. Astfel, 150 indivizi masculi au prezentat un colorit al corpului de tip tuxedo, 158
42 indivizi masculi au prezentat un colorit al corpului de tip sălbatic, 157 indivizi femeli au
43 prezentat un colorit corporal de tip tuxedo, iar 167 indivizi femeli au manifestat un colorit
44 șters de tip sălbatic. Modul de segregare a fost verificat prin testul χ^2 (tabelul 1). Pentru χ^2
45 = 0,924, la 4-1 = 3 grade libertate, valoarea P arată că diferențele dintre frecvențele calculate
46 și cele observate sunt nesemnificative (0,90 > P > 0,80), deci modul ipotetic de segregare
47 1:1:1:1 este real.

RO 123452 B1

Utilizarea testului χ^2 pentru verificarea ipotezei modului de transmitere ereditară a tiparului coloristic tuxedo

Fenotipuri	Observate experimental (o)	Calculate/ așteptate (e)	Deviația (d=o-e)	d ²	d ² /e
Masculi tuxedo	150	158	-8	64	405
Masculi cu colorit sălbatic	158	158	0	0	0
Femele tuxedo	157	158	-1	1	0,006
Femele cu colorit sălbatic	167	158	9	81	0,513
Pentru $\chi^2=0,924$, la 3 grade libertate, valoarea P arată că diferențele sunt ne semnificative ($0,90>P>0,80$)					

Deci monitorizarea genei criorezistenței, mai precis a modului în care ea este transmisă descendenților, este facilitată de prezența genei *Nigrocaudatus* II (Ni), genă X-linkată care va servi drept genă de culoare marker. Procedeu elaborat prevede un număr de patru etape.

Etapa I - Alegerea genitorilor de tip Half-Black ♀XX și Red Blond ♂XY

Pentru a se avea certitudinea că femelele false nu vor apărea în lotul genitorilor Half-Black și că masculii falși nu vor apărea în lotul genitorilor Red Blond, se va efectua o deviere intenționată cu aproximativ 3% de la procentajele normale ale celor două sexe prin tratamente hormonale ușoare. Astfel, puietul de o zi din varietatea Half-Black va fi tratat oral în primele trei zile de viață cu 17α -metiltestosteron (Sigma), de trei ori pe zi *ad libitum*, după care se crește în condiții standard până la vârsta adultă. La fel se procedează cu puietul de o zi al varietății Red Blond, cu deosebirea că tratamentul hormonal se face cu valerat de estradiol - Cyclo-Progynova® (Schering AG, Germania; doar drajeurile albe). Doza/concentrația aplicată în cazul ambilor hormoni este de 100 mg valerat de estradiol/kg furaj (adică 100 mg kg^{-1}). Rețeta de preparare și administrare a furajului tratat cu hormon este redată în paragraful următor.

Se pun 2 ml alcool etilic 96% într-un mojar de sticlă, la care se adaugă cantitatea corespunzătoare cântărită de hormon pur. În cazul în care hormonul folosit se află sub formă de tablete sau drajeuri, acestea se mojarează cu atenție ca bucățile să nu sară din mojar în timpul zdrobirii lor. Se mojarează repede, pentru evitarea evaporării alcoolului, până la obținerea unui lichid omogen lăptos, la care se adaugă încă 2 ml alcool 96%, cu care se spală pereții mojarului. Se adaugă 20 g furaj de bună calitate, mărunț granulat (diametrul granulelor trebuie să fie mai mic sau egal cu 1 mm), în mojar și se omogenizează cu pistilul. Se golește conținutul din mojar pe o hârtie de filtru dublă și se lasă să se evapore alcoolul timp de 3 h. Hrana astfel impregnată cu hormon se împachetează și se păstrează la loc uscat, răcoros și ferit de lumina solară. Pentru obținerea unor cantități mai mari de furaj tratat cu hormon, se utilizează 100 ml etanol, cantitatea corespunzătoare de hormon și 1 kg furaj de bună calitate (mărunț granulat) și un mojar de sticlă de dimensiuni adecvate. Hrănirea se va face *ad libitum* de trei ori pe zi, fără administrarea altor tipuri de furaj, suplimente sau orice fel de hrană vie. Nu se amplasează în acvariile de creștere plante de consistență moale, care pot servi peștilor ca hrană alternativă și care pot diminua efectul tratamentului.

Astfel procedând, în loturile de interes nu vor exista „contaminări cromozomiale”, puștii indivizi labili sexual fiind împinși spre sexul care nu va servi ca genitor pentru obținerea generației F_1 . Ca urmare: toți masculii Red Blond obținuți sunt de tip XY și toate femelele

RO 123452 B1

1 Half-Black obținute sunt de tip XX. Acestea din urmă trebuie ferite de masculi și păstrate în
stare virgină, deoarece o singură inseminare poate face femela inutilizabilă pentru
3 încrucișare, datorită stocării spermatozoidelor în *receptaculum seminis*.

Etapa II - Identificarea genitorilor criorezistenți prin studiul fenotipului lor

5 Lotul de masculi Red Blond se supune scăderii treptate a temperaturii apei (2-4°C/zi).
Aceasta se va continua până când indivizii criosensibili vor manifesta semne de „oboseală”,
7 moment în care ei vor fi mutați într-un alt bazin în care valoarea temperaturii se va crește
treptat până la cea de confort. Ultimii 10% din cel puțin 40-50 indivizi luați în studiu, care
9 obligatoriu trebuie să reziste câteva ore la 10-12°C, pot fi considerați criorezistenți și vor fi
readuși treptat la temperatura de confort. Deși nu este necesară, operațiunea se poate aplica
11 și femelelor Half-Black Black, pentru o și mai mare precizie în munca de ameliorare.

Purtătorii genei de interes ar putea fi, în general, din punct de vedere genotipic, de
13 trei feluri: homozigoți, heterozigoți și hemizigoți. Un lucru pe care îl știm cert este acela că
masculii criorezistenți identificați nu pot fi decât hemizigoți. Având în vedere linkage-ul
15 acestei gene exclusiv cu cromozomul X, singurul cromozom X al acestor masculi posedă
gena criorezistenței.

17 Etapa III - încrucișarea masculilor criorezistenți Red Blond identificați cu femele Half-Black

19 În această etapă, masculii criorezistenți Red Blond $X_{ni}Y_0$ vor fi încrucișați cu femelele
Half-Black $X_{ni}X_{ni}$ - în urma acestei încrucișări vor rezulta din punct de vedere coloristic
21 indivizi cu un singur fenotip: Half-Black (figura) - aproximativ jumătate fiind masculi (crio-
rezistenți sau criosensibili) și cealaltă jumătate fiind femele cu cel puțin un exemplar al alelei
23 criorezistenței.

25 Etapa IV - Retroîncrucișarea femelelor criorezistente cu masculii Red Blond și eliminarea alelelor recesive de la locusul criorezistenței

Această etapă are ca scop homozigotarea alelei criorezistenței la indivizii femeli $X_{ni}X_{ni}$
27 ai generației F_B și obținerea unui lot nou de masculi criorezistenți hemizigoți $X_{ni}Y_0$ în F_B
(figura). Femelele utilizate în retroîncrucișare trebuie să fie în mod obligatoriu virgine. Indivizii
29 femeii homozigoți criorezistenți și masculii hemizigoți criorezistenți prin împerechere liberă
produc un număr consistent de indivizi care constituie o linie pură de guppy criorezistent.

31 Exploatarea liniei criorezistente în crescătorii aduce beneficii producătorilor de pești
guppy odată cu scăderea costurilor de încălzire a apei și previne mortalitatea în masă
33 cauzată de răcirea exagerată a apei în timpul transportului peștilor. Precizăm că linia
criorezistentă nu întâmpină dificultăți de creștere sau reproducere nici la temperaturi ridicate
35 precum 28°C și se adaptează bine la variația valorii temperaturii între limite largi.

Până în momentul de față, nu se cunoaște niciun procedeu biotehnologic de amelio-
37 rare a peștilor guppy pentru rezistența la temperaturi scăzute ale apei. Varietatea Red Blond
din descrierea noastră poate fi, în lipsă, înlocuită cu orice varietate care nu prezintă
39 caracterul Half-Black. Varietatea Half-Black Black nu este nici ea obligatorie spre utilizat în
procedeu, dar este obligatoriu ca varietatea care o înlocuiește să prezinte caracterul Half-
41 Black, adică una din genele *Nigrocaudatus* (exemple de varietăți: Half-Black Red, Half-Black
Blue, Half-Black Yellow, Half-Black White).

43 Procedeu elaborat de noi este redat schematic în figură, unde: P = părinți, G =
gameți, F_1 = prima generație rezultată în urma încrucișării, F_B = generație rezultată în urma
45 retroîncrucișării.

Linia criorezistentă obținută de noi folosind ca genitori varietățile Red Blond și Half-
47 Black Black se caracterizează prin următoarele trăsături coloristice masculine: are corpul de
tip sălbatic, colorat normal, incluzând cel mai frecvent nuanțe de roșu, albastru iridescent,

RO 123452 B1

galben, verde, negru și uneori alb metalizat. Acesta aduce mult cu tiparele coloristice observate la guppy sălbatic. Înotătoarele caudală și dorsală sunt puternic pigmentate și au o culoare roșie-cărămizie. Corpul masculilor are o lungime standard (SL) medie de 2,6 cm, iar înotătoarele caudală și dorsală au o lungime caracteristică varietăților ornamentale, prima reprezentând la maturitate 8/10 din lungimea standard a corpului. Femelele prezintă un colorit de tip sălbatic și o dimensiune corporală (SL) la maturitate de 5,0 cm.

Cele mai importante trăsături ale liniei sunt aspectele legate de toleranța la frig, astfel: linia este homozigotă la locusul pentru criorezistentă, se dezvoltă și se înmulțește fără probleme la temperaturi de 17-19°C, supraviețuiește câteva ore la 10-12°C și câteva zile la 14-16°C. De asemenea, ea se adaptează bine la variații în limite largi ale temperaturii apei, neîntâmpinând probleme de creștere sau reproducere la 28°C sau chiar mai mult.

Dacă formele parentale, crescute la 22-24°C, ating dimensiunea de vânzare (1,8-2,0 cm SL masculii și 2,5-3,0 cm SL femelele) la vârsta de 61-62 zile, linia criorezistentă crescută la 17-19°C atinge aceeași dimensiune de vânzare la vârsta de 65-67 zile. Specificăm că efectul heterozis se observă la indivizii din F_B doar dacă îi comparăm cu formele parentale pure inițiale și nu dacă se compară cu femelele mame din generația F₁. Restul caracteristicilor nu diferă față de majoritatea varietăților comune de pești guppy, așa cum nici cerințele lor față de parametri optimi de creștere nu diferă.

Trebuie menționat că temperatura apei trebuie ridicată obligatoriu la 28°C în situațiile când apar boli cauzate de agenți patogeni precum *Saprolegnia spp* (saprolegniaza) sau *Ichthyophthirius multifiliis* (ichtioftiriază). Pe lângă terapia prin hipertermie mai trebuie aplicată și unele cu sare de bucătărie, verde de malachit, albastru de metilen sau tripafavin.

RO 123452 B1

1

Revendicare

3

Procedeu de obținere a unei linii criorezistente homozigote de pești ornamentali guppy (*Poecilia reticulata*), formată din masculi și femele, **caracterizat prin aceea că acesta** cuprinde următoarele etape:

5

- administrarea la puietul de o zi din varietatea Half-Black, în primele trei zile de viață, de hrană care conține 100 mg kg^{-1} 17α -metitestosteron, cu obținerea de femele Half-Black de tip XX,

7

9

- administrarea la puietul de o zi din varietatea Red-Blond, în primele trei zile de viață, de hrană care conține 100 mg kg^{-1} valerat de estradiol, cu obținerea de masculi Red Blond de tip XY,

11

13

- supunerea masculilor Red Blond de tip XY la scăderea treptată a temperaturii apei și selectarea masculilor rezistenți timp de 2-3 h la temperatura de $10-12^\circ\text{C}$, etapă finalizată cu obținerea de masculi Red Blond XY criorezistenți,

15

17

- opțional, supunerea femelelor Half-Black de tip XX la scăderea treptată a temperaturii apei și selectarea femelelor rezistente timp de 2-3 h la $10-12^\circ\text{C}$, etapă finalizată cu obținerea de femele Half-Black XX criorezistente testate,

19

21

- încrucișarea masculilor Red Blond de tip XY criorezistenți cu femelele Half-Black de tip XX testate sau nu pentru criorezistență, cu obținerea de indivizi cu fenotip Half-Black dintre care o parte sunt masculi criorezistenți sau criosensibili, iar o parte sunt femele cu cel puțin un exemplar de alelă a criorezistenței,

23

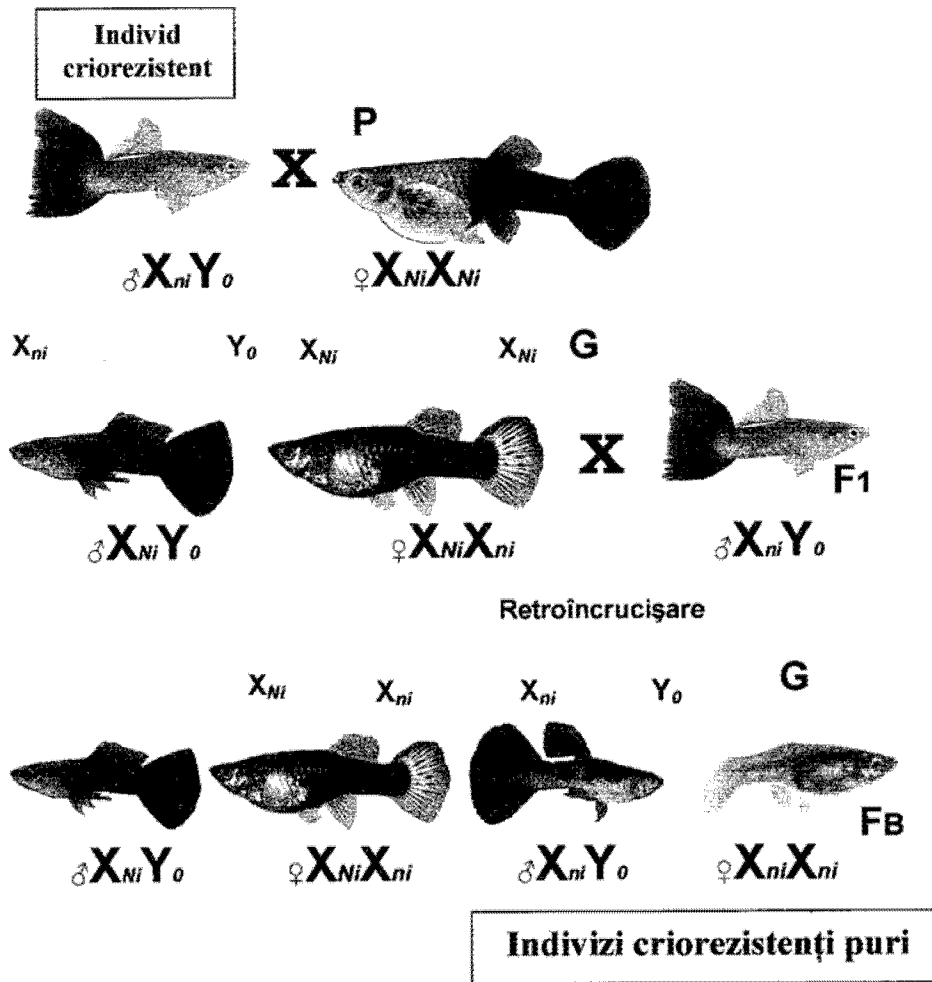
- retroîncrucișarea femelelor cu cel puțin un exemplar de alelă a criorezistenței cu masculii Red Blond de tip XY criorezistenți și eliminarea alelelor recesive de la locusul criorezistenței, cu obținerea liniei criorezistente homozigote la locusul criorezistenței.

(51) Int.Cl.

A01K 67/00 (2006.01);

A61D 19/00 (2006.01);

C07G 15/00 (2006.01)



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 304/2012