



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2007 00775**

(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 MĂNAȘTUR
NR.3-5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• PETRESCU-MAG IOAN VALENTIN,
STR. CEHLĂU NR.54, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• BUD IOAN, STR. MOGOȘOAI NR.7, SC.D,
AP.45, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• PETRESCU-MAG RUXANDRA MĂLINA,
STR. CEHLĂU NR.54, CLUJ-NAPOCA, CJ,
RO;
• PAMFIL DORU,
STR. BISERICII ORTODOXE NR.12,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• GORGAN DRAGOȘ LUCIAN,
STR. ANA IPĂTESCU NR.6, BLA 14, SC.D,
AP.78, PIATRA-NEAMȚ, NT, RO;
• PĂSĂRIN BENONE,
ALEEA MIHAIL SADOVEANU NR.8, IAȘI, IS,
RO;

• ȘTEFAN REKA,
STR. POET GRIGORE ALEXANDRESCU
NR.17, BLT 3, AP.9 CLUJ-NAPOCA, CJ,
RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
I. V. MAG, I. BUD, "NIGROCAUDATUS -
MARKER GENES ON THE X
CHROMOSOME IN THE GUPPY (POECILIA
RETICULATA, PETERS, 1859)",
REZUMATE LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE
ZOOTEHNIE ȘI BIOTEHNOLOGII,
VOL.XXXIX (1,2), TIMIȘOARA, 2006; US
5314882; K. KINNBERG, B. KORSGAARD,
P. BJERREGAARD, "EFFECTS OF
OCTYLPHENOL AND 17BETA-ESTRADIOL
ON THE GONADS OF GUPPIES (POECILIA
RETICULATA) EXPOSED AS ADULTS VIA
THE WATER OR AS EMBRYOS VIA THE
MOTHER", COMPARATIVE
BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY PART
C: TOXICOLOGY & PHARMACOLOGY,
VOL.134, NR.1, PP.45-55, 2003

(54) PROCEDEU PENTRU CREȘTEREA DIMENSIUNILOR CORPORALE LA MASCULII SPECIEI DE PEȘTI ORNAMENTALI GUPPY (*POECILIA RETICULATA*)

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu pentru creșterea dimensiunilor corporale la masculii speciei de pești ornamentali guppy (*Poecilia reticulata*), prin utilizarea valeratului de estradiol ca hormon feminizant. Loturile de masculi corpolenți din specia *Poecilia reticulata*, obținuți prin procedeu conform invenției, au dimensiuni corporale care le depășesc cu 20...40% pe cele ale masculilor din loturile martor, netratate hormonal; în primele 2...3 luni de viață se dezvoltă morfologic macroscopic asemenea femelelor, iar momentul diferențierii sexuale, mai precis colorarea intensă, apariția gonopodiumului și a comportamentului de curtare pot fi

hotărâte de crescător, acestea trei din urmă manifestându-se la masculii tratați în circa 8...20 de zile de la încetarea tratamentului hormonal; indiferent de varietatea sau linia lor, încep a se diferenția sexual la vârste ontogenice târzii, adică la 2,5...3,5 luni, fapt care permite dezvoltarea unei jumătăți posterioare a corpului și a unui peduncul caudal robust, specific femelelor, cu 30...40% mai groase decât în cazul loturilor netratate hormonal.

Revendicări: 1
Figuri: 1



Invenția se referă la un procedeu pentru creșterea dimensiunilor corporale la masculii speciei de pești ornamentali guppy (*Poecilia reticulata*). Aplicabilitatea procedurii are șanse foarte mari de succes în cadrul industriei peștilor ornamentali, mai precis în crescătoriile de pești guppy. Menționăm că *Poecilia reticulata* este considerată numărul unu în topul vânzărilor cu scop acvariofil a peștilor de apă dulce și una dintre cele mai populare și decorative specii (Tamaru & Ako 2000; Turan et al 2006).

Poecilia reticulata este o specie cu un determinism al sexelor de tip *Drosophila* (Winge 1922a, 1922b), cu masculul heterogametic (XY) și femela homogametică (XX). Studiile efectuate în vederea îmbunătățirii performanțelor de formă și culoare a peștilor nu sunt o noutate în guppycultură (Schmidt 1920; Blacher 1927, 1928; Goodrich 1944; Nybelin 1947; Winge & Ditlevsen 1947; Haskins & Haskins 1951, 1948; Haskins et al 1961; Haskins et al 1970; Dzwillo 1959; Schroder 1969a, 1969b; Horn 1972; Nayudu 1979; Farr 1983; Phang et al 1989a, 1989b, 1990, 1999; Phang & Fernando 1991; Fernando & Phang 1990; Khoo et al 1999a, 1999b, 1999c; Houde 1992; Brooks 2000; Brooks & Endler 2001; Karino & Hajima 2001). Pe lângă acestea, mărimea corpului (Reynolds & Gross 1992; Yamanaka et al 1995; Brooks & Endler 2001) sau a înotătoarei caudale (Dzwillo 1959; Schroder 1969a; Nayudu 1979) au fost multă vreme alți parametri vizați de către specialiști în vederea aducerii pe piață a unei mărfi de calitate înaltă. Datorită dimorfismului sexual al speciei, masculii sunt mult mai viu colorați decât femelele, ceea ce atrage după sine o cerere mai mare pe piață și o valorificare mai eficientă a masculilor decât a femelelor. Modificarea raportului dintre sexe prin variația factorilor de mediu a fost una din soluțiile găsite de cercetători și crescători (Mag-Mureșan & Bud 2004; Mag & Bud 2005; Karayucel et al 2006). Mult mai eficientă s-a dovedit, însă, inducerea artificială a masculinizării prin tratarea cu androgeni a puietului nou născut (Turan et al 2006) sau a mamelor gestante în vederea masculinizării embrionilor purtați de acestea (Kavumpurath & Pandian 1993a; Pifferer & Lim 1997; Mag & Bud 2006). O altă soluție foarte viabilă s-a dovedit a fi utilizarea supermasculilor (masculi cu doi cromosomi Y) în loturile de reproducători. Orice femele fertilizate de acești masculi produceau femele în proporție de aproape 100% (Kavumpurath & Pandian 1993b). Masculii YY erau obținuți în urma încrucișării pseudofemelelor XY cu masculi normali XY, iar pseudofemelele XY, la rândul lor, erau obținute prin inversiune sexuală în urma tratamentelor cu estrogeni. Estrogenii utilizați până în prezent pentru feminizarea completă sau aproape completă a loturilor sunt următorii: dietilstilbestrolul (300 mg kg^{-1}), β -estradiolul (400 mg kg^{-1}), 17α -etinilestradiolul (300 mg kg^{-1}), 3-benzoat estradiolul (800 mg kg^{-1}) și estrona (300 mg kg^{-1}) (Yamazaky 1983; Kavumpurath & Pandian 1993b; a se vedea și US 005314882 A). Ei sunt folosiți prin impregnarea cu hormon a furajului și administrarea acestuia femelelor gestante cu 5-10 zile înainte de parturiție. Uneori, inversiunea sexuală poate fi incompletă sau reversibilă, mai ales atunci când hormonul ales are o potență redusă sau perioada de tratament nu a fost aleasă corespunzător. Toate aceste cazuri de inversiune sexuală temporară au fost privite ca efecte secundare/nedorite ale tratamentului, obiectivul cercetătorilor/crescătorilor fiind inversiunea sexuală permanentă/definitivă.

Valeratul de estradiol, folosit în cadrul prezentei invenții, nu a mai fost utilizat până în prezent la pești, decât cu scopul inducerii artificiale a inversiunii sexuale la guppy (Petrescu-Mag 2007) sau al observării efectelor secundare generate de administrarea lui pe termen lung la femelele adulte ale aceleiași specii (Mag et al 2006).

Singurele procedee de creștere a dimensiunilor corporale la masculii de guppy cunoscute, până în prezent, sunt: procedeul selecției empirice (care nu necesită niciun fel de descriere, întrucât nu a fost descris științific) și cel al selecției artificiale care are la bază folosirea ca reproducători masculii corpolenți și femelele mai mari, aceștia fiind identificați în urma unor măsurători (morfometrie).

În prezent, pentru participarea la expoziții și competiții ale guppycultorilor, se aleg 1
aproximativ 5% din loturile marilor crescători, pești cu calități estetice deosebite, acești pești 3
având prețuri de vânzare exorbitant de ridicate.

Masculii de guppy prezintă un singur neajuns estetic și comercial, acesta fiind dimen- 5
siunea corporală redusă (lungime standard SL: 26 mm). Au existat, de-a lungul timpului, 7
eforturi în creșterea dimensiunii acestora prin metodele genetice ale selecției clasice, eforturi 9
justificate dacă ne gândim la faptul ca dimensiunile corporale sunt caractere cantitative, deci 11
determinate în mare parte poligenic. Rezultatele nu au întârziat să apară, însă dimensiunile 13
masculilor nu au crescut spectaculos prin această metodă.

Un fapt neobservat sau cel puțin nevalorificat de lumea științifică este acela că indivizii 15
masculi ai speciei au dimensiuni la maturitate cu atât mai mari cu cât diferențierea sexuală 17
intervine mai târziu în ontogenia individului. Astfel, problema tehnică pe care își propune să 19
o rezolve prezenta invenție este de a amâna pe o durată cât mai lungă această diferențiere, 21
dar suficient de scurtă, pentru ca indivizii să nu rămână femele pentru totdeauna.

Procedeul pentru creșterea dimensiunilor corporale la masculii speciei de pești 23
ornamentali guppy (*Poecilia reticulata*), conform invenției, cuprinde administrarea, la puietul 25
de o zi, de hrană care conține 300-500 mg kg⁻¹ valerat de estradiol, timp de 2-3 luni de zile. 27
Prin procedeul conform invenției, rezultă o proporție de 15-45% masculi în lotul tratat 29
care, la maturitate, prezintă dimensiuni corporale cu 20-40% mai mari decât loturile 31
varietăților respective în starea netratată hormonal, la maturitate.

Invenția realizată constă în creșterea dimensiunilor corporale ale masculilor tuturor 33
varietăților speciei *Poecilia reticulata*, prin folosirea valeratului de estradiol (figura), ca hormon 35
feminizant, sub forma produsului farmaceutic Cyclo-Progynova® (Schering AG, Germania; 37
doar drajeurile albe), în vederea amânării momentului în care juvenilii masculi din punct de 39
vedere genotipic (XY♂) devin adulți anatomic, morfologic, fiziologic și comportamental. Prin 41
administrarea orală a concentrațiilor/dozelor cuprinse între 300 și 500 mg valerat de 43
estradiol/kg furaj (adică 300-500 mg kg⁻¹), rezultă o proporție de 15-45% masculi, care, la 45
maturitate, prezintă dimensiuni corporale cu 20-40% mai mari decât loturile varietăților 47
respective în starea netratată hormonal, la maturitate. Evident, valeratul de estradiol se poate
administra și sub forma altor produse farmaceutice, atâta timp cât acestea pot fi solubilizate
în etanol concentrat și nu includ alte substanțe hormonale. 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 33
corespunzătoare cântărită de valerat de estradiol pur (figura). În cazul în care hormonul 35
folosit se află sub formă de tablete sau drajeuri, acestea se mojurează cu atenție ca bucățile 37
să nu sară din mojar în timpul zdrobirii lor. Se mojurează repede, pentru evitarea evaporării 39
alcoolului, până la obținerea unui lichid omogen lăptos, la care se adaugă încă 2 ml alcool 41
96%, cu care se spală pereții mojarului. Se adaugă 20 g furaj de bună calitate, mărunț 43
granulat (diametrul granulelor trebuie să fie mai mic sau egal cu 1 mm), în mojar și se 45
omogenizează cu pistilul. Se golește conținutul din mojar pe o hârtie de filtru dublă și se lasă 47
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
adequate. 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.

Prin administrarea orală a furajului astfel impregnat cu hormon, la puietul de o zi - până la vârsta de 2-3 luni, în funcție de viteza de creștere a varietății/liniei, precum și de dimensiunile urmărite a fi obținute la masculi, rezultă o proporție de 15-45% masculi, care, la maturitate, prezintă dimensiuni corporale cu 20-40% mai mari decât masculii loturilor varietăților respective în starea netratată hormonal, la maturitate. Diferențierea sexuală, mai precis coloritul, *gonopodium*-ul și comportamentul de curtare vor apărea la masculii tratați în circa 8-20 zile de la încetarea tratamentului hormonal. De-a lungul tratamentului aplicat, indivizii genotipic masculi se dezvoltă fenotipic, cel puțin morfologic/macrosopic, similar femelelor, dimensiunea corporală mare fiind un caracter sexual secundar feminin, care persistă după încetarea tratării cu estrogen. După 30-40 zile de la încetarea tratamentului hormonal, indivizii masculinizați încetează a mai crește semnificativ în dimensiuni corporale propriu-zise. Totuși, înotătoarele dorsală și caudală continuă să crească la toate varietățile cu înotătoare în formă de voal, în special la cele care prezintă gena codificatoare a caracterului *pigmentiert caudalis*.

Explicația acestui fenomen de inversiune sexuală temporară este aceea că valeratul de estradiol nu este atât de potent precum alți estrogeni utilizați în manipularea sexelor, iar perioada postnatală de tratament a puietului nu este cea mai potrivită pentru inducerea unei inversiuni sexuale definitive și complete.

Cele mai evidente îmbunătățiri fenotipice ale masculilor tratați se constată la nivelul jumătății posterioare a corpului și pedunculului caudal unde grosimea crește cu 30-40% comparativ cu masculii loturilor netratate. În timp ce masculii loturilor netratate, care prezintă caudale cu creștere continuă, întâmpină problema de a purta caudala ca pe o povară de la vârsta adultă până la senescență, masculii de același tip, dar tratați hormonal prin procedeul expus, dețin forța necesară unui înot elegant, datorită grosimii corpului și pedunculului caudal.

Trei doze/concentrații hormonale (din multele concentrații testate de noi) au dus la rezultatele descrise, acestea fiind: 300, 400 și 500 mg kg⁻¹. Folosirea oricărei doze/concentrații din cele trei menționate duce la aceleași rezultate, fără diferențe semnificative.

Aplicabilitatea tehnologiei la nivel industrial este evidentă: prin ineditul procedeu prezentat se pot obține, în industria peștilor ornamentali, masculi cu performanțe fenotipice (nu neapărat și genetice) calitative deosebite și care pot fi valorificați la prețuri mult mai mari decât prețul pieței. Potențialii cumpărători sunt, de această dată, nu doar amatori pasionați, ci profesioniști interesați de participarea la competiții și expoziții internaționale ale guppycultorilor sau posesorii unor acvarii de lux interesați de rarități. Femelele supra-numerare (55-85% din total) rezultate inevitabil în loturile tratate cu dozele menționate, nu sunt simple rebuturi, ci sunt femele care dețin potențialul producerii unor stocuri preponderent masculine în descendență, ca urmare a faptului că 5-35% din acestea sunt din punct de vedere genotipic masculi (XY♀) și doar funcționează ca femele.

Față de procedeul ameliorării speciei, din punctul de vedere al dimensiunilor corporale, prin procedeele empirice sau ale selecției clasice, procedeul de față aduce avantajul că indivizii de dimensiuni mari pot fi obținuți direct, într-o singură generație, comparativ cu selecția artificială care presupune un număr mai mare de generații, încrucișări sau retroîncrucișări. Al doilea argument al utilității procedeeului propus aici este acela că selecția artificială a indivizilor de dimensiuni mari nu poate fi decât complementară procedeeului nostru: aplicând tratamentul prezentat unei linii ameliorate de guppy pentru dimensiunea corporală, dimensiunile masculilor tratați vor fi cu 20-40% mai mari decât masculii aceleiași linii de pești netratați hormonal - martor.

RO 123451 B1

Revendicare

1

Procedeu pentru creșterea dimensiunilor corporale la masculii speciei de pești ornamentali guppy (*Poecilia reticulata*), **caracterizat prin aceea că** acesta cuprinde administrarea, la puietul de o zi, de hrană care conține 300-500 mg kg⁻¹ valerat de estradiol, timp de 2-3 luni de zile.

3

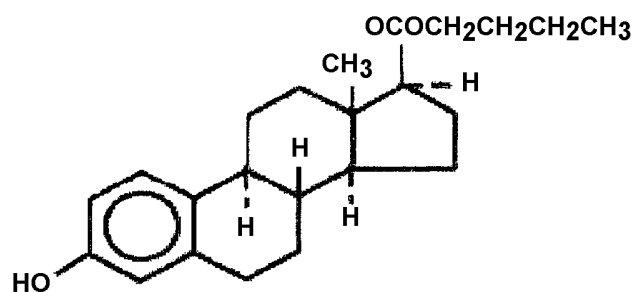
5

(51) Int.Cl.

A01K 61/00 (2006.01).

A23K 1/165 (2006.01).

C07G 15/00 (2006.01)



Valerat de estradiol

estra-1,3,5(10)-trien-3,17-diol(17P)-,17-pentanoat



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 303/2012