

TIBURÓN ARCOÍRIS TRANSGÉNICO

REFERENCIA CRUZADA A APLICACIONES RELACIONADAS

5 Esta solicitud se presenta el 10 de enero de 2019, como una solicitud de patente internacional PCT, y reivindica prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No. 62/615.625, presentada el 10 de enero de 2018 y titulada Tiburón Arcoíris Transgénico Naranja, y la solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No. 62/615.628, presentada el 10 de enero de 2018 y titulada Tiburón Arcoíris Transgénico Morado, y la solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No. 62/615.634, presentada el 10 de enero de 2018 y titulada Tiburón Arcoíris Transgénico Azul, y la solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No. 62/615.638, presentada el 10 de enero de 2018 y Titulada Tiburón Arcoíris Transgénico Verde. Cada una de las referencias citadas se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

15

CAMPO DE LA INVENCION

 Esta invención se refiere a peces transgénicos. Específicamente, la invención se refiere a tiburones arcoíris transgénicos naranjas. Específicamente, la invención se refiere a tiburones arcoíris transgénicos morados. Específicamente, la invención se refiere a tiburones arcoíris transgénicos azules. Específicamente, la invención se refiere a tiburones arcoíris transgénicos verdes. Específicamente, la invención se refiere a tiburones arcoíris transgénicos verdes.

25

INTRODUCCIÓN

 La tecnología transgénica implica la transferencia de un gen extraño a un organismo huésped que le permite al huésped adquirir un rasgo nuevo y heredable. La tecnología transgénica tiene muchas aplicaciones potenciales. Por ejemplo, se puede usar para introducir un transgén en un pez para crear nuevas variedades de peces. Hay muchas formas de introducir un gen extraño en los peces, que incluyen: micro inyección

(por ejemplo, Zhu et al., 1985; Du et al., 1992), electroporación (Powers et al., 1992), transferencia génica mediada por espermatozoides (Khoo et al., 1992; Sin et al., 1993), bombardeo de genes o pistola de genes (Zelenin et al., 1991), transferencia de genes mediada por liposomas (Szelei et al., 1994) y la inyección directa de ADN en el

5 músculo tejido (Xu et al., 1999). El primer informe de peces transgénicos fue publicado por Zhu et al. (1985) utilizando una construcción de genes quiméricos que consiste en un promotor del gen de metalotioneína de ratón y un gen de la hormona del crecimiento humano. La mayoría de los primeros estudios de peces transgénicos se han concentrado en la transferencia de genes de la hormona del crecimiento con el objetivo de generar

10 peces de rápido crecimiento. Si bien la mayoría de los primeros intentos utilizaron genes y promotores heterólogos de la hormona del crecimiento y no lograron producir estos peces (por ejemplo, Chourrout et al., 1986; Penman et al., 1990; Brem et al., 1988; Gross et al., 1992), una mejora en el crecimiento de peces transgénicos en varias especies de peces ha sido demostrado, incluido el salmón del Atlántico, varias especies

15 de salmones del Pacífico y los lochas (por ejemplo, Du et al., 1992; Delvin et al., 1994, 1995; Tsai et al., 1995).

El tiburón arcoíris (*Epalzeorhynchus frenatum*) es un ciprínido de agua dulce que proviene de Tailandia. Mientras que las aletas poseen una coloración de rojo a

20 naranja-rojo, el cuerpo varía de negro o gris oscuro a un color más claro, casi plateado. La forma albina carece de estas manchas más oscuras, y el color del cuerpo tiene un aspecto de mantequilla o perla. Sin embargo, para la industria de peces ornamentales, el cuerpo gris o perlado no ayuda en la visualización eficiente de los diferentes colores. La disponibilidad de tales tiburones arcoíris que tienen pigmentación modificada para la

25 transgénesis con proteínas fluorescentes daría como resultado mejores productos para la industria de peces ornamentales debido a una mejor visualización de los diversos colores.

Muchas proteínas fluorescentes son conocidas en la técnica y se han utilizado

30 para investigar diversos procesos celulares, incluidas las proteínas fluorescentes que exhiben varios colores verde, amarillo, naranja, azul o morado. Aunque los

experimentos transgénicos que involucran proteínas fluorescentes han proporcionado nuevos marcadores y reporteros para la transgénesis, el progreso en el campo del desarrollo y la producción de tiburones arcoíris que expresan tales proteínas ha sido limitado.

5

TIBURÓN ARCOÍRIS TRANSGÉNICO

En ciertas realizaciones, la presente divulgación se refiere a la producción de peces fluorescentes transgénicos y proporcionar tales peces a la industria de peces ornamentales.

10

En algunas realizaciones, se proporcionan peces transgénicos o métodos para producir peces transgénicos. En ciertos aspectos, los peces transgénicos son peces fértiles, transgénicos, fluorescentes. En una realización particular, el pez para emplear con las construcciones y métodos descritos es el tiburón arcoíris. El color de la piel del tiburón arcoíris está determinado por las células de pigmento en la piel, que contienen gránulos de pigmento llamados melanosomas (color negro o marrón), xanthosomas (color amarillo), eritrosomas (color naranja o rojo) o iridosomas (colores iridiscentes, incluido el color blanco). El número, el tamaño y la densidad de los gránulos de pigmento por célula de pigmento influyen en el color de la piel del pez.

15
20

En al menos un ejemplo de realización, se proporcionan tiburones arcoíris transgénicos o una progenie de los mismos que comprenden eventos de integración transgénicos específicos, denominados en el presente documento eventos de transformación. Estos peces son de particular interés porque, por ejemplo, incorporan un color naranja estéticamente agradable. Los peces transgénicos que comprenden estos eventos transgénicos específicos pueden ser homocigóticos o heterocigotos (incluyendo, por ejemplo, hemicigotos) para el evento de transformación. Los peces homocigotos criados con peces que carecen de un evento de transformación producirán en casi todos los casos una descendencia 100% heterocigótica. Los huevos, el esperma y los

25
30

embriones que comprenden estos eventos transgénicos específicos también se incluyen como parte de la invención.

En una de tales realizaciones con respecto a un evento de integración transgénica específico, se proporciona un tiburón arcoíris transgénico naranja o una progenie del mismo que comprende transgenes integrados cromosómicamente, en donde el tiburón arcoíris comprende el “evento de transformación del tiburón naranja 1”, el espermatozoides que comprende el evento de transformación del tiburón arcoíris naranja 1 ha sido depositado en el ECACC (Número de Acceso 19010802). Los transgenes integrados cromosómicamente pueden estar presentes en un casete de expresión integrado o en dos o más casetes de expresión integrados. En ciertos aspectos, este tiburón arcoíris transgénico es un tiburón arcoíris transgénico fértil. Tal tiburón arcoíris transgénico puede ser homocigoto o heterocigoto (incluyendo, por ejemplo, hemicigoto) para los transgenes o casete(s) de expresión integrados.

También se describen métodos para proporcionar un tiburón arcoíris transgénico que comprende el evento de transformación del tiburón arcoíris naranja 1 en el mercado de peces ornamentales. En algunas realizaciones, el método comprende obtener un tiburón arcoíris transgénico o una progenie del mismo que comprende transgenes cromosómicamente integrados, en el que el tiburón arcoíris comprende el “evento de transformación del tiburón arcoíris naranja 1”, el espermatozoides que comprende el evento de transformación tiburón arcoíris naranja 1 ha sido depositado en el ECACC (Número de Acceso 19010802), y la distribución de los peces al mercado de peces ornamentales. Tal pez puede ser distribuido por un productor a un distribuidor comercial, o dicho pez puede ser distribuido por un productor o un distribuidor comercial a un minorista como, por ejemplo, un minorista multi-producto que tenga un departamento de peces ornamentales.

En algunos aspectos, se proporcionan métodos para producir un tiburón arcoíris transgénico que comprende: (a) obtener un tiburón arcoíris que exhibe fluorescencia y comprende uno o más transgenes o casetes de expresión cromosómicamente integrados,

en donde el tiburón arcoíris comprende el “evento de transformación del tiburón arcoíris naranja 1”, el esperma que comprende el evento de transformación del tiburón arcoíris naranja 1 ha sido depositado en el ECACC (Número de Acceso 19010802); y (b) criar el tiburón arcoíris obtenido con un segundo tiburón arcoíris para proporcionar un

5 tiburón arcoíris transgénico que comprenda el evento de transformación del tiburón arcoíris naranja 1. El segundo tiburón arcoíris puede ser un tiburón arcoíris transgénico o no transgénico.

En realizaciones adicionales, también se proporcionan métodos para producir un

10 organismo transgénico, el método comprende el empleo de esperma que comprende la transformación tiburón arcoíris naranja 1, tal esperma ha sido depositado en el ECACC (Número de Acceso 19010802), para producir descendencia transgénica. Tal descendencia puede ser, por ejemplo, un tiburón arcoíris, una especie de la familia *Cypriniformes*, una especie del género *Epalzeorhynchos*, una especie o género de peces

15 relacionados con el tiburón arcoíris, u otra especie o género de peces. En algunos aspectos, el pez puede producirse empleando técnicas de fertilización *in vitro* conocidas en la técnica o descritas en el presente documento.

En al menos un ejemplo de realización, se proporcionan tiburones arcoíris

20 transgénicos o una progenie de los mismos que comprenden eventos de integración transgénicos específicos, denominados en el presente documento eventos de transformación. Estos peces son de particular interés porque, por ejemplo, incorporan un color morado estéticamente agradable. Los peces transgénicos que comprenden estos eventos transgénicos específicos pueden ser homocigóticos o heterocigotos (incluyendo,

25 por ejemplo, hemicigotos) para el evento de transformación. Los peces homocigotos criados con peces que carecen de un evento de transformación producirán en casi todos los casos una descendencia 100% heterocigótica. Los huevos, el esperma y los embriones que comprenden estos eventos transgénicos específicos también se incluyen como parte de la invención.

30

En una de tales realizaciones con respecto a un evento de integración transgénica específica, se proporciona un tiburón arcoíris transgénico morado o una progenie del mismo que comprende transgenes cromosómicamente integrados, en donde el tiburón arcoíris comprende el “evento de transformación del tiburón arcoíris morado 1”, el
5 esperma que comprende el evento de transformación del tiburón arcoíris morado 1 ha sido depositado en la ECACC (Número de Acceso 19010801). Los transgenes integrados cromosómicamente pueden estar presentes en un casete de expresión integrado o en dos o más casetes de expresión integrados. En ciertos aspectos, este tiburón arcoíris transgénico es un tiburón arcoíris transgénico fértil. Tal tiburón arcoíris
10 transgénico puede ser homocigoto o heterocigoto (incluyendo, por ejemplo, hemicigoto) para los transgenes o casete(s) de expresión integrados.

También se describen métodos para proporcionar un tiburón arcoíris transgénico que comprende el evento de transformación del tiburón arcoíris morado 1 al mercado de
15 peces ornamentales. En algunas realizaciones, el método comprende obtener un tiburón arcoíris transgénico o una progenie del mismo que comprende transgenes cromosómicamente integrados, en el que el tiburón arco iris comprende el “evento de transformación del tiburón arcoíris morado 1”, el esperma que comprende el evento de transformación del tiburón arcoíris morado 1 ha sido depositado en el ECACC (Número
20 de Acceso 19010801), y la distribución de los peces al mercado de peces ornamentales. Tal pez puede ser distribuido por un productor a un distribuidor comercial, o dicho pez puede ser distribuido por un productor o un distribuidor comercial a un minorista como, por ejemplo, un minorista multi-producto que tenga un departamento de peces ornamentales.

25

En algunos aspectos, se proporcionan métodos para producir un tiburón arcoíris transgénico que comprende: (a) obtener un tiburón arcoíris que exhibe fluorescencia y comprende uno o más transgenes o casetes de expresión cromosómicamente integrados, en donde el tiburón arcoíris comprende el “evento de transformación del tiburón arcoíris morado 1”, el esperma que comprende el evento de transformación del tiburón arcoíris morado 1 ha sido depositado en el ECACC (Número de Acceso 19010801); y (b) criar
30

el tiburón arcoíris obtenido con un segundo tiburón arcoíris para proporcionar un tiburón arcoíris transgénico que comprende el evento de transformación del tiburón arcoíris morado 1. El segundo tiburón arcoíris puede ser un tiburón arcoíris transgénico o no transgénico.

5

En realizaciones adicionales, también se proporcionan métodos para producir un organismo transgénico, el método comprende el empleo de esperma que comprende la transformación del tiburón arcoíris morado 1, tal esperma ha sido depositado en el ECACC (Número de Acceso 19010801), para producir descendencia transgénica. Tal descendencia puede ser, por ejemplo, un tiburón arcoíris, una especie de la familia *Cypriniformes*, una especie del género *Epalzeorhynchos*, una especie o género de peces relacionados con el tiburón arcoíris, u otra especie o género de peces. En algunos aspectos, el pez puede producirse empleado técnicas de fertilización *in vitro* conocidas en la técnica o descritas en el presente documento.

15

En al menos un ejemplo de realización, se proporcionan tiburones arcoíris transgénicos o una progenie de los mismos que comprenden eventos de integración transgénicos específicos, denominados en el presente documento eventos de transformación. Estos peces son de particular interés porque, por ejemplo, incorporan un color azul estéticamente agradable. Los peces transgénicos que comprenden estos eventos transgénicos específicos pueden ser homocigóticos o heterocigotos (incluyendo, por ejemplo, hemicigotos) para el evento de transformación. Los peces homocigotos criados con peces que carecen de un evento de transformación producirán en casi todos los casos una descendencia 100% heterocigótica. Los huevos, el esperma y los embriones que comprenden estos eventos transgénicos específicos también se incluyen como parte de la invención.

25

En una de tales realizaciones con respecto a un evento de integración transgénica específica, se proporciona un tiburón arcoíris transgénico azul o una progenie del mismo que comprende transgenes cromosómicamente integrados, en donde el tiburón arcoíris comprende el “evento de transformación del tiburón arcoíris azul 1”, el esperma

30

que comprende el evento de transformación del tiburón arcoíris azul 1 ha sido depositado en la ECACC (Número de Acceso 19010803). Los transgenes integrados cromosómicamente pueden estar presentes en un casete de expresión integrado o en dos o más casetes de expresión integrados. En ciertos aspectos, este tiburón arcoíris

5 transgénico es un tiburón arcoíris transgénico fértil. Tal tiburón arcoíris transgénico puede ser homocigoto o heterocigoto (incluyendo, por ejemplo, hemicigoto) para los transgenes o casete(s) de expresión integrados.

También se describen métodos para proporcionar un tiburón arcoíris transgénico

10 que comprende el evento de transformación del tiburón arcoíris azul 1 al mercado de peces ornamentales. En algunas realizaciones, el método comprende obtener un tiburón arcoíris transgénico o una progenie del mismo que comprende transgenes cromosómicamente integrados, en el que el tiburón arcoíris comprende el “evento de transformación del tiburón arcoíris azul 1”, el esperma que comprende el evento de

15 transformación del tiburón arcoíris azul 1 ha sido depositado en el ECACC (Número de Acceso 19010803), y la distribución de los peces al mercado de peces ornamentales. Tal pez puede ser distribuido por un productor a un distribuidor comercial, o dicho pez puede ser distribuido por un productor o un distribuidor comercial a un minorista como, por ejemplo, un minorista multi-producto que tenga un departamento de peces

20 ornamentales.

En algunos aspectos, se proporcionan métodos para producir un tiburón arcoíris transgénico que comprende: (a) obtener un tiburón arcoíris que exhibe fluorescencia y comprende uno o más transgenes o casetes de expresión cromosómicamente integrados,

25 en donde el tiburón arcoíris comprende el “evento de transformación del tiburón arcoíris azul 1”, el esperma que comprende el evento de transformación del tiburón arcoíris azul 1 ha sido depositado en el ECACC (Número de Acceso 19010803); y (b) criar el tiburón arcoíris obtenido con un segundo tiburón arcoíris para proporcionar un tiburón arcoíris transgénico que comprende el evento de transformación del tiburón arcoíris azul

30 1. El segundo tiburón arcoíris puede ser un tiburón arcoíris transgénico o no transgénico.

En realizaciones adicionales, también se proporcionan métodos para producir un organismo transgénico, comprendiendo el método el empleo de esperma que comprende la transformación del tiburón arcoíris azul 1, tal esperma ha sido depositado en el ECACC (Número de Acceso 19010803), para producir descendencia transgénica. Tal descendencia puede ser, por ejemplo, un tiburón arcoíris, una especie de la familia *Cypriniformes*, una especie del género *Epalzeorhynchus*, una especie o género de peces relacionados con el tiburón arcoíris, u otra especie o género de peces. En algunos aspectos, el pez puede producirse usando técnicas de fertilización *in vitro* conocidas en la técnica o descritas en el presente documento.

En al menos un ejemplo de realización, se proporcionan tiburones arcoíris transgénicos o una progenie de los mismos que comprenden eventos de integración transgénicos específicos, denominados en el presente documento eventos de transformación. Estos peces son de particular interés porque, por ejemplo, incorporan un color verde estéticamente agradable. Los peces transgénicos que comprenden estos eventos transgénicos específicos pueden ser homocigóticos o heterocigotos (incluyendo, por ejemplo, hemicigotos) para el evento de transformación. Los peces homocigotos criados con peces que carecen de un evento de transformación producirán en casi todos los casos una descendencia 100% heterocigótica. Los huevos, el esperma y los embriones que comprenden estos eventos transgénicos específicos también se incluyen como parte de la invención.

En una de tales realizaciones con respecto a un evento de integración transgénica específico, se proporciona un tiburón arcoíris transgénico verde o una progenie del mismo que comprende transgenes integrados cromosómicamente, en donde el tiburón arcoíris comprende el “evento de transformación del tiburón verde arcoíris 1”, el esperma que comprende el evento de transformación del tiburón verde arcoíris 1 ha sido depositado en la ECACC (Número de Acceso 19010803). Los transgenes cromosómicamente integrados pueden estar presentes en un casete de expresión integrado o en dos o más casetes de expresión integrados. En ciertos aspectos, este

tiburón arcoíris transgénico es un tiburón arcoíris transgénico fértil. Tal tiburón arcoíris transgénico puede ser homocigoto o heterocigoto (incluyendo, por ejemplo, hemicigoto) para los transgenes o casete(s) de expresión integrados.

- 5 También se describen métodos para proporcionar un tiburón arcoíris transgénico que comprende el evento de transformación del tiburón verde arcoíris 1 al mercado de peces ornamentales. En algunas realizaciones, el método comprende obtener un tiburón arcoíris transgénico o una progenie del mismo que comprende transgenes cromosómicamente integrados, en el que el tiburón arcoíris comprende el “evento de transformación del tiburón verde 1 del arco iris”, el esperma que comprende el evento de transformación del tiburón arco iris verde 1 ha sido depositado en el ECACC (Número de Acceso 19010804), y la distribución de los peces al mercado de peces ornamentales. Tal pez puede ser distribuido por un productor a un distribuidor comercial, o dicho pez puede ser distribuido por un productor o un distribuidor comercial a un minorista como, por ejemplo, un minorista multi-producto que tenga un departamento de peces ornamentales.
- 10
- 15

- En algunos aspectos, se proporcionan métodos para producir un tiburón arcoíris transgénico que comprende: (a) obtener un tiburón arcoíris que exhibe fluorescencia y comprende uno o más transgenes o casetes de expresión cromosómicamente integrados, en donde el tiburón arcoíris comprende el “evento de transformación del tiburón verde arcoíris 1”, el esperma que comprende el evento de transformación del tiburón verde arcoíris 1 ha sido depositado en el ECACC (Número de Acceso 19010804); y (b) criar el tiburón arcoíris obtenido con un segundo tiburón arcoíris para proporcionar un tiburón arcoíris transgénico que comprende el evento de transformación 1 del tiburón arcoíris verde. El segundo tiburón arcoíris puede ser un tiburón arcoíris transgénico o no transgénico.
- 20
- 25

- En realizaciones adicionales, también se proporcionan métodos para producir un organismo transgénico, comprendiendo el método el empleo de esperma que comprende la transformación del tiburón verde arcoíris 1, tal esperma ha sido depositado en el
- 30

ECACC (Número de Acceso 19010804), para producir descendencia transgénica. Tal descendencia puede ser, por ejemplo, un tiburón arcoíris, una especie de la familia *Cypriniformes*, una especie del género *Epalzeorhynchos*, una especie o género de peces relacionados con el tiburón arcoíris, u otra especie o género de peces. En algunos

5 aspectos, el pez puede producirse empleando técnicas de fertilización *in vitro* conocidas en la técnica o descritas en el presente documento.

Como se usa en esta especificación, “un” o “uno” pueden significar uno o más. Como se usa aquí en la (s) reivindicación (es), cuando se usa junto con la palabra “que

10 comprende”, las palabras “un” o “una” pueden significar uno o más de uno.

El uso del término “o” en las reivindicaciones se usa para significar “y/o” a menos que se indique explícitamente que se refieren solo a alternativas o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalda una definición

15 que se refiere solo a alternativas y “y/o”. Como se usa en el presente documento, “otro” puede significar al menos un segundo o más.

A lo largo de esta aplicación, el término “aproximadamente” se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el método

20 empleado para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos del estudio. Cualquier realización de cualquiera de los presentes métodos, kits y composiciones pueden consistir o consistir esencialmente en, en lugar de comprender/incluir/contener/tener, las características y/o pasos descritos.

Por lo tanto, en cualquiera de las reivindicaciones, el término “consiste en” o “consiste esencialmente en” puede ser sustituido por cualquiera de los verbos de enlace abiertos mencionados anteriormente, con el fin de cambiar el alcance de una afirmación

25 dada de lo que de otro modo sería estar utilizando el verbo de vinculación abierto. Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción

30 detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la

invención, se dan solo a modo de ilustración, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia a partir de esta descripción detallada.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Peces transgénicos

En algunos aspectos, la presente descripción se refiere a peces transgénicos. Los métodos para hacer peces transgénicos se describen, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Nos. 7.135.613; 7.700.825; 7.834.239, cada uno de los cuales se incorpora por referencia en su totalidad. Por ejemplo, se puede generar un tiburón arcoíris transgénico naranja empleando un casete de expresión que codifica la proteína fluorescente amarilla (YFP), tal como TurboYFP una variante mejorada de la proteína fluorescente amarilla PhiYFP de la medusa *Phialidium sp.* (Shagin et al., 2004). En otros ejemplos, se puede generar un tiburón arcoíris transgénico morado empleando un casete de expresión que codifica la proteína fluorescente púrpura (PFP). En otros ejemplos, se puede generar un tiburón arcoíris transgénico azul empleando un casete de expresión que codifica la proteína fluorescente azul (BFP), tal como TagBFP o TagBFP en combinación con cromoproteína azul no fluorescente. En otros ejemplos, se puede generar un tiburón arcoíris transgénico verde empleando un casete de expresión que codifica la proteína fluorescente verde (GFP), tal como ZsGreen1.

Se prefiere emplear peces pertenecientes a especies y variedades de peces de valor comercial, particularmente de valor comercial dentro de la industria de peces ornamentales. Dichos peces incluyen, entre otros, bagre, pez cebra y otros danios, medaka, carpa, tilapia, pez dorado, tetras, púas, tiburones (ciprínidos de la familia, como el tiburón arcoíris), pez ángel, lochas, koi, peces de vidrio, disco, anguila, gobio, gourami, guppy, *Xiphophorus*, pez hacha, pez Molly o pangasius. Un pez particular para emplear en el contexto de la presente descripción es el tiburón arcoíris, *Epalzeorhynchus frenatum*. Los tiburones arcoíris son animales ornamentales cada vez más populares y tendrían un valor comercial agregado en varios colores. Los embriones

de tiburón arcoíris son fácilmente accesibles y casi transparentes. El color de la piel del tiburón arcoíris está determinado por las células de pigmento en la piel, que contienen gránulos de pigmento llamados melanosomas. El número, el tamaño y la densidad de los melanosomas por célula pigmentaria influyen en el color de la piel del pez.

5

Fertilización *in vitro*

En la acuicultura comercial, los tiburones arcoíris, incluidos los tiburones arcoíris naranjas, morados, azules y verdes, no se reproducen de forma natural, sino que se reproducen *in vitro* empleando el mismo proceso estándar de la industria que se ha utilizado para la reproducción de sus homólogos no fluorescentes en las últimas décadas. Al mismo tiempo, los tiburones arcoíris son un candidato ideal para la inducción hormonal, ya que son lo suficientemente grandes como para ser fácilmente manipulados y fecundos, y las hembras producen una cantidad sustancial de huevos por desove. En términos generales, los tiburones arcoíris son reproductores estacionales y pueden engendrarse más fácilmente aproximadamente desde mayo hasta octubre. Los tiburones arcoíris tardan aproximadamente un año en alcanzar la madurez sexual. Las hembras de un año pueden liberar hasta mil huevos por desove, mientras que las hembras mayores pueden liberar hasta 10,000 huevos por desove si están bien acondicionadas para la reproducción. Las hembras pueden desovar una o dos veces por temporada. Los machos pueden desovar tan frecuentemente como dos o tres veces al mes. La hormona más comúnmente utilizada para la inducción de la ovulación, que ha sido aprobada para su empleo con peces ornamentales por la FDA, se llama Ovaprim. Contiene un análogo de la hormona liberadora de gonadotropina salmónida y un antagonista de la dopamina. Ovaprim produce resultados consistentes, es fácil de dosificar y está ampliamente disponible comercialmente. La información de reproducción estándar de la industria para esta especie (tanto para el fenotipo fluorescente como para el no fluorescente) sigue a continuación, sin embargo, los detalles exactos pueden variar ligeramente de un productor a otro.

30 El suministro de crías de tiburones se puede mantener en tanques interiores, preferiblemente con un volumen de al menos 300 galones (1136 litros), pero

generalmente se acondicionan al aire libre en estanques de tierra. Una vez acondicionados para la cría, los tiburones arcoíris son trasladados desde el exterior, de los estanques de tierra a grandes cubas de retención interiores. Para la cría, las crías acondicionadas se retiran del tanque de retención y se colocan en agua que contiene un
5 sedante, como Tricaine, que está aprobado por la FDA para este tipo de aplicación. Los peces se consideran adecuadamente sedados cuando se dan vuelta. En este momento, el pescado en cuestión se retira del agua que contiene el sedante, se pesa y se inyecta con Ovaprim. Los machos también pueden recibir una inyección de Ovaprim para inducir la espermiación. Las hembras generalmente comenzarán la ovulación aproximadamente
10 siete horas después de la inyección; una vez que comienza la ovulación, los huevos fluirán libremente cuando los peces se aprietan suavemente. Para prepararse para la fertilización *in vitro*, los huevos se deben despojar en un recipiente seco. Algunas gotas de semen de tiburones arcoíris machos se deben despojar de manera similar en el mismo recipiente. Agitar los huevos y el esperma junto con 0,5 ml (aproximadamente 10 gotas)
15 de agua para comenzar el proceso de fertilización. Después de 20 segundos, se deben agregar otros 2 ml de agua. Este proceso hará que los óvulos sean fertilizados en aproximadamente 30 segundos. Una vez fertilizados, los huevos se pueden colocar en frascos para incubar de tipo McDonald. Los huevos se hincharán y flotarán durante los primeros 30 minutos, por lo que el flujo en los frascos de incubación debe ajustarse al
20 nivel más bajo posible inicialmente para evitar la pérdida de los huevos. El flujo debe verificarse con frecuencia y ajustarse según sea necesario. Los alevines deben ser alimentados con nauplios de *Artemia* recién nacidos el día dos después de la eclosión, y deben continuar siendo alimentados con *Artemia* durante una semana. A partir de ese momento, pueden comenzar la transición a una dieta preparada, superponiéndose con la
25 alimentación en vivo durante 5 días. Dos semanas después de la eclosión, los alevines pueden trasladarse a tanques y/o estanques para un crecimiento continuo hasta la madurez.

Fertilización de esperma congelado

30 Los métodos de congelación de esperma de pescado son bien conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Walker y Streisinger (1983) y Draper y Moens (2007), los

cuales se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Para obtener los peces transgénicos descritos aquí, se puede emplear espermatozoos de tiburón arcoíris congelado para fertilizar los huevos.

- 5 En al menos un método, las hembras acondicionadas se retiran del tanque de retención y se colocan en agua que contiene un sedante, como Tricaine, que está aprobado por la FDA para este tipo de aplicación. Los peces se consideran adecuadamente sedados cuando se da vuelta. Una vez sedado, el pez sujeto se retira del agua que contiene el sedante, se pesa y se inyecta con Ovaprim. Las hembras inyectadas
- 10 generalmente comenzarán la ovulación aproximadamente siete horas después de la inyección; una vez que comienza la ovulación, los huevos fluirán libremente cuando los peces se aprietan suavemente. Para prepararse para la fertilización *in vitro*, los huevos se deben despojar en un recipiente seco. Los huevos de varias hembras pueden agruparse; los huevos pueden mantenerse sin fertilizar durante varios minutos. El
- 15 espermatozoos congelado se descongela a 33°C en un baño de agua durante 18-20 segundos. Una vez que el espermatozoos se descongela, se añaden 70 µl de solución Hanks a temperatura ambiente al vial y se mezclan. El espermatozoos se agrega inmediatamente a los huevos y se mezcla suavemente. Agitar los huevos y el espermatozoos junto con 0,5 ml (aproximadamente 10 gotas) de agua para comenzar el proceso de fertilización. Después de 20 segundos, se
- 20 deben agregar otros 2 ml de agua. Este proceso hará que los óvulos sean fertilizados en aproximadamente 30 segundos. Una vez fertilizados, los huevos se pueden colocar en frascos para incubar de tipo McDonald. Los huevos se hincharán y flotarán durante los primeros 30 minutos, por lo que el flujo en los frascos de incubación debe ajustarse al nivel más bajo posible inicialmente para evitar la pérdida de los huevos. El flujo debe
- 25 verificarse con frecuencia y ajustarse según sea necesario. Los alevines deben ser alimentados con nauplios de *Artemia* recién nacidos el día dos después de la eclosión, y deben continuar siendo alimentados con *Artemia* durante una semana. Después de la primera semana después de la eclosión, los alevines pueden comenzar la transición a una dieta preparada, superponiéndose con la alimentación en vivo durante 5 días. Dos
- 30 semanas después de la eclosión, los alevines pueden trasladarse a tanques y/o estanques para un crecimiento continuo hasta la madurez. Parichy y Johnson, 2001, que se

incorpora por referencia en su totalidad, proporciona ejemplos adicionales con respecto a la fertilización *in vitro*.

La presente divulgación abarca además la progenie de un pez transgénico que
5 contiene el evento de transformación del tiburón arcoíris naranja 1, así como dicho pez transgénico derivado de un huevo de pescado transgénico, el esperma, el embrión u otra célula que contiene una construcción transgénica genómicamente integrada. “Progenie”, como se emplea el término en el presente documento, puede resultar de criar dos peces transgénicos de la invención, o de criar un primer pez transgénico de la invención a un
10 segundo pez que no es un pez transgénico de la invención. En el último caso, el segundo pez puede ser, por ejemplo, un pez de tipo salvaje, una cepa especializada de peces, un pez mutante u otro pez transgénico. El segundo pez puede ser de la misma especie, o puede ser de una especie o género diferente. La progenie híbrida de estos emparejamientos tiene los beneficios del transgén para fluorescencia combinada con los
15 beneficios derivados de estos otros linajes.

La forma más sencilla de identificar los peces que contienen el evento de transformación del tiburón arcoíris naranja 1 es mediante inspección visual, ya que el pez en cuestión sería de color naranja e inmediatamente distinguible de los peces no
20 transgénicos.

La presente descripción abarca además la progenie de un pez transgénico que contiene el evento de transformación del tiburón arcoíris morado 1, así como dicho pez transgénico derivado de un huevo de pez transgénico, el esperma, el embrión u otra
25 célula que contiene una construcción transgénica genómicamente integrada. “Progenie”, como se emplea el término en el presente documento, puede resultar de criar dos peces transgénicos de la invención, o de criar un primer pez transgénico de la invención a un segundo pez que no es un pez transgénico de la invención. En el último caso, el segundo pez puede ser, por ejemplo, un pez de tipo salvaje, una cepa especializada de peces, un
30 pez mutante u otro pez transgénico. El segundo pez puede ser de la misma especie, o puede ser de una especie o género diferente. La progenie híbrida de estos

emparejamientos tiene los beneficios del transgén para fluorescencia combinada con los beneficios derivados de estos otros linajes.

La forma más sencilla de identificar los peces que contienen el evento de transformación del tiburón arcoíris morado 1 es mediante inspección visual, ya que el pez en cuestión sería de color morado e inmediatamente distinguible de los peces no transgénicos.

La presente divulgación abarca además la progenie de un pez transgénico que contiene el evento de transformación del tiburón arcoíris azul 1, así como dicho pez transgénico derivado de un huevo de pez transgénico, el esperma, el embrión u otra célula que contiene una construcción transgénica genómicamente integrada. “Progenie”, como se emplea el término en el presente documento, puede resultar de criar dos peces transgénicos de la invención, o de criar un primer pez transgénico de la invención a un segundo pez que no es un pez transgénico de la invención. En el último caso, el segundo pez puede ser, por ejemplo, un pez de tipo salvaje, una cepa especializada de peces, un pez mutante u otro pez transgénico. El segundo pez puede ser de la misma especie, o puede ser de una especie o género diferente. La progenie híbrida de estos emparejamientos tiene los beneficios del transgén para fluorescencia combinada con los beneficios derivados de estos otros linajes.

La forma más sencilla de identificar los peces que contienen el evento de transformación del tiburón arcoíris azul 1 es mediante inspección visual, ya que los peces en cuestión serían de color azul e inmediatamente distinguibles de los peces no transgénicos.

La presente descripción abarca además la progenie de un pez transgénico que contiene el evento de transformación del tiburón arcoíris verde 1, así como dicho pez transgénico derivado de un huevo de pez transgénico, el esperma, el embrión u otra célula que contiene una construcción transgénica genómicamente integrada. “Progenie”, como se emplea el término en el presente documento, puede resultar de criar dos peces

transgénicos de la invención, o de criar un primer pez transgénico de la invención a un segundo pez que no es un pez transgénico de la invención. En el último caso, el segundo pez puede ser, por ejemplo, un pez de tipo salvaje, una cepa especializada de peces, un pez mutante u otro pez transgénico. El segundo pez puede ser de la misma especie, o
5 puede ser de una especie o género diferente. La progenie híbrida de estos emparejamientos tiene los beneficios del transgén para fluorescencia combinada con los beneficios derivados de estos otros linajes.

La forma más sencilla de identificar los peces que contienen el evento de transformación del tiburón arcoíris verde 1 es mediante inspección visual, ya que los
10 peces en cuestión serían de color verde e inmediatamente distinguibles de los peces no transgénicos.

EJEMPLOS

15 Ciertas realizaciones de la invención se describen adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos pretenden ser meramente ilustrativos de la invención y no pretenden limitar o restringir el alcance de la presente invención de ninguna manera y no deben interpretarse como condiciones, parámetros, reactivos o
20 materiales de partida que deben utilizarse exclusivamente en para practicar el arte de la presente invención.

Ejemplo 1 - Tiburón arcoíris transgénico naranja

25 Se proporcionan peces transgénicos que exhiben un color naranja. Los eventos transgénicos específicos incorporados en estos peces se designan como el “evento de transformación del tiburón arcoíris naranja 1”. El esperma de estos peces se puede emplear para fertilizar los huevos de tiburón arcoíris y, por lo tanto, criar tiburones arcoíris transgénicos que comprenden estos eventos específicos de integración
30 transgénica. El esperma de esta línea se depositó en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC (Número de Acceso 19010802)), Public Health England,

CRYOSTORES, Bld. 17, Porton Down, Salisbury, SP4 OJG, Reino Unido, en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest como “Orange rainbow shark 1” (Tiburón arcoíris naranja 1).

5 Ejemplo 2 - Tiburón arcoíris transgénico morado

Se proporcionan peces transgénicos que exhiben un color morado. Los eventos transgénicos específicos encarnados en estos peces se denominan “evento de transformación del tiburón arcoíris morado 1”. El esperma de estos peces se puede
10 emplear para fertilizar los huevos de tiburón arcoíris y, por lo tanto, criar tiburones arcoíris transgénicos que comprenden estos eventos específicos de integración transgénica. El esperma de esta línea se depositó en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC (Número de Acceso 19010801)), Public Health England, CRYOSTORES, Bld. 17, Porton Down, Salisbury, SP4 OJG, Reino Unido, de
15 conformidad con las disposiciones del Tratado de Budapest como “Purple rainbow shark 1” (Tiburón arcoíris morado 1).

Ejemplo 3 - Tiburón arcoíris transgénico azul

20 Se proporcionan peces transgénicos que exhiben un color azul. Los eventos transgénicos específicos encarnados en estos peces se denominan “evento de transformación del tiburón azul arcoíris 1”. El esperma de estos peces se puede emplear para fertilizar los huevos de tiburón arcoíris y, por lo tanto, criar tiburones arcoíris transgénicos que comprenden estos eventos específicos de integración transgénica. El
25 esperma de esta línea se depositó en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC (Número de Acceso 19010803)), Public Health England, CRYOSTORES, Bld. 17, Porton Down, Salisbury, SP4 OJG, Reino Unido, en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest como “Blue rainbow shark 1” ((Tiburón arcoíris azul 1).

30 Ejemplo 4 - Tiburón arcoíris transgénico verde

Se proporcionan peces transgénicos que exhiben un color verde. Los eventos transgénicos específicos encarnados en estos peces se denominan “evento de transformación del tiburón verde arcoíris 1”. El espermatozoides de estos peces se puede emplear para fertilizar los huevos de tiburón arcoíris y, por lo tanto, criar tiburones arcoíris transgénicos que comprenden estos eventos específicos de integración transgénica. El espermatozoides de esta línea se depositó en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC (Número de Acceso 19010804)), Public Health England, CRYOSTORES, Bld. 17, Porton Down, Salisbury, SP4 OJG, Reino Unido, en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest como “Green rainbow shark 1”.

10

Los peces transgénicos fluorescentes tienen uso como peces ornamentales en el mercado. Las líneas transgénicas de expresión estable pueden desarrollarse criando un individuo transgénico con un pez de tipo salvaje, pez mutante u otro pez transgénico. El pez transgénico deseado se puede distinguir del pez no transgénico al observar el pez con luz blanca, luz solar, luz ultravioleta, luz azul o cualquier otra condición de iluminación útil que permita la visualización del color naranja, morado, verde o azul del transgénico. pez.

15

Los peces transgénicos fluorescentes también deberían ser valiosos en el mercado de herramientas de investigación científica porque pueden usarse para estudios embrionarios como el rastreo del linaje celular y la migración celular. Además, estos peces se pueden usar para marcar células en experimentos de mosaico genético y en modelos de cáncer de pescado.

20

Todas las composiciones y/o métodos descritos y reivindicados en el presente documento pueden hacerse y ejecutarse sin experimentación excesiva a la luz de la presente descripción. Si bien las composiciones y métodos de esta invención se han descrito en términos de realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la materia que se pueden aplicar variaciones a las composiciones y/o métodos y en los pasos o en la secuencia de pasos de los métodos descritos aquí sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la invención. Más específicamente, será evidente que

25

30

- ciertos agentes que están relacionados química y fisiológicamente pueden ser sustituidos por los agentes descritos en este documento, mientras que se obtendrían los mismos resultados o resultados similares. Se considera que todos los sustitutos y modificaciones similares aparentes para los expertos en la materia están dentro del espíritu, alcance y
- 5 concepto de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.