



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑯ Número de publicación: **2 237 271**

⑯ Número de solicitud: 200300651

⑯ Int. Cl.

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/12** (2006.01)

**C07H 21/00** (2006.01)

⑯

PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN PREVIO

B2

⑯ Fecha de presentación: **20.03.2003**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2005**

Fecha de la concesión: **02.03.2006**

⑯ Fecha de anuncio de la concesión: **01.04.2006**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**01.04.2006**

⑯ Titular/es: **Universidade de Vigo  
Oporto, nº 1  
36201 Vigo, Pontevedra, ES**

⑯ Inventor/es: **Pérez Rodríguez, Montserrat;  
Vieites Baptista de Sousa, Juan Manuel y  
Presa Martínez, Pablo**

⑯ Agente: **No consta**

⑯ Título: **Procedimiento para la identificación genética de todas las especies mundiales de merluza, *Merluccius spp.*, en productos comerciales.**

⑯ Resumen:

Procedimiento para la identificación genética de todas las especies mundiales de merluza, *Merluccius spp.*, en productos comerciales.

El objeto de la invención es la identificación genética de merluzas, *Merluccius spp.*: *M. merluccius*, *M. senegalensis*, *M. polli*, *M. capensis*, *M. paradoxus*, *M. productus*, *M. gayi*, *M. australis*, *M. hubbsi*, *M. albidus*, *M. angustimanus* y *M. bilinearis*, en productos comerciales.

El procedimiento se caracteriza por 1) amplificar un fragmento de 122 pb del gen citocromo *b* del ADN mitocondrial, para determinar la presencia de merluza en una muestra, 2) por amplificar un fragmento de 464-465 pb del mismo gen y digerirlo con endonucleasas de restricción, y 3) por el análisis de patrones combinados de los fragmentos obtenidos, para diferenciar inequívocamente las 12 especies de merluza y el bacalao, en todo tipo de productos y subproductos frescos, congelados y precocinados. De aplicación en los sectores: alimentario, sanitario, importador, y forense pesquero.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la identificación genética de todas las especies mundiales de merluza, *Merluccius spp.*, en productos comerciales.

5

### Sector de la técnica

La invención tiene aplicación en el control de calidad y origen de materia prima, control de fraude al consumidor, control de fraude en importaciones, etiquetado de productos y subproductos, genética forense de pesquerías, conflictos pesqueros en aguas internacionales, gestión de pesquerías (zonas limítrofes entre especies) y en investigación científica (evolución e hibridación).

### Estado de la técnica

15 La merluza es la especie estrella en los mercados europeos. La elevada demanda de este pescado y la diversificación de sus productos comerciales, ha provocado el declive de sus pesquerías en Europa. La sobreexplotación de los caladeros europeos ha llevado a las empresas transformadoras a importar y comercializar otras especies del mismo género (*Merluccius spp.*) para cubrir las necesidades de mercado. La avalancha de nuevas especies en los mercados europeos ha puesto de manifiesto la necesidad de control, por parte de las administraciones y las asociaciones de consumidores, sobre el etiquetado de los productos. El control de origen y autenticidad de especies es tanto más urgente 1) cuanto mayor es la diversidad de especies susceptibles de ser comercializadas bajo el mismo nombre, por ejemplo la denominación comercial "merluza" que comprende 12 especies distintas, y 2) cuanto más se manipule y transforme el pescado previamente a la venta, mediante procesos como fileteado, eviscerado y descabezado, que dificultan o hacen imposible la identificación de los especímenes. Existe una preocupación creciente por parte de la administración y de los consumidores por estar informados de la composición de los alimentos, bien por cuestiones de salud pública, bien por diferencias en calidad o en precio. Esta preocupación ha favorecido el aumento de la reglamentación, tanto a escala estatal como europea, en materia de etiquetado y control de autenticidad de origen de especies.

30 En la legislación española vigente (BOE nº 3, pág. 183, 3/1/03) según el Real Decreto 1380/2002, de 20 de diciembre, de identificación de los productos de la pesca, de la acuicultura y del marisqueo, congelados y ultracongelados, se recoge "La creciente variedad de la oferta en productos pesqueros congelados hace necesario que el consumidor tenga una información precisa de la especie y de su origen...". Este Real Decreto tiene en cuenta el Título III de la Ley 3/2001 de 26 de marzo de Pesca Marítima del Estado sobre comercialización de productos pesqueros, el reglamento (CE) número 104/2000 del Consejo, de 17 de diciembre de 1999 por el que se establece la Organización Común de Mercados (OCM), el Real Decreto 1334/1999 (31 julio) por el que se aprueba la Norma general de etiquetado y el Real Decreto 1109/1991 (12 julio) por el que se aprueba la Norma general relativa a los alimentos ultracongelados destinados a la alimentación humana. De tal modo que en los mercados españoles se admiten las siguientes denominaciones comerciales (Tabla 1).

40

TABLA 1

*Especies comerciales de merluza y sus denominaciones admitidas en el mercado español (BOE 250, pág 366,*

*Resolución de 25 de septiembre de 2002, de la Secretaría de Pesca Marítima, por la que se establece y se da publicidad al Listado de denominaciones comerciales de especies pesqueras y de acuicultura admitidas en España)*

45

	Nombre científico	Nombre comercial
	<i>Merluccius australis</i>	Merluza austral o merluza de Chile o M. sureña
	<i>Merluccius bilinearis</i>	Merluza americana o plateada
50	<i>Merluccius capensis</i>	Merluza del Cabo
	<i>Merluccius gayi</i>	Merluza del Perú o gayi
	<i>Merluccius hubbsi</i>	Merluza argentina o sudamericana
	<i>Merluccius merluccius</i>	Merluza o merluza europea
55	<i>Merluccius paradoxus</i>	Merluza del cabo o M. de altura
	<i>Merluccius polli</i>	Merluza negra
	<i>Merluccius productus</i>	Merluza del Pacífico
	<i>Merluccius senegalensis</i>	Merluza negra
60	<i>Merluccius spp.</i>	Merluzas o pescadillas

La substitución de unas especies por otras de menor valor comercial, como por ejemplo *Merluccius bilinearis* por pescadilla del Caladero Nacional, o el etiquetado erróneo de productos precocinados, suponen prácticas de indudable beneficio económico. Las características organolépticas diferenciales de las especies influyen tanto en la aceptación de un determinado producto por parte de los consumidores, como en el precio que aquellos alcanzan el mercado. Para favorecer la aceptación por parte del comprador de las distintas especies en todos sus formatos comerciales, es

necesaria una herramienta que permita identificar sin ambigüedad la especie concreta que se encuentra en el interior de los envases y comprobar el correcto etiquetado de los subproductos.

Cuando el pescado está intacto, ya sea fresco o congelado, es en teoría posible reconocer la especie por caracteres morfológicos (Inada 1981), aunque sólo los expertos lo consiguen en la práctica. Una vez transformado (pelado, fileteado, troceado, etc...), la identificación por caracteres morfológicos es prácticamente imposible, ya que la mayoría de dichos caracteres han desaparecido o sufrido modificaciones irreversibles. La primera alternativa a la identificación morfológica en el género *Merluccius*, fue la utilización de proteínas (Mackie IM and Jones BW, 1978; Piñeiro *et al.*, 2001), con la importante limitación de la alteración proteica en productos sometidos a procesamientos térmicos como los precocinados (normalmente rebozados), la difícil reproducibilidad de los patrones electroforéticos o la imposibilidad de diferenciar especies muy próximas, como ocurre en el género *Thunnus* (Mackie *et al.*, 1992).

Dado que el deterioro que sufren los ácidos nucleicos tras los tratamientos térmicos es menor que las proteínas, el análisis del ADN (ácido desoxirribonucleico) ha permitido identificar especies en productos así tratados. Para la identificación de especies se puede utilizar tanto el ADN mitocondrial (ADNmt) como el ADN nuclear. Se utiliza preferentemente el ADNmt ya que está en mayor número de copias que el nuclear, no presenta secuencias no codificantes (intrones) y es de menor tamaño que el ADN nuclear. Aunque potencialmente existen distintos métodos de identificación de especies con ADN, se han utilizado fundamentalmente dos metodologías: las basadas en la amplificación por PCR de un fragmento de ADN específico de especie (por ejemplo, en dípteros, Rutledge *et al.*, 1999), y las que utilizan la técnica de PCR-RFLPs, es decir, la digestión de un fragmento de ADN amplificado por PCR, con una batería de enzimas de restricción (por ejemplo en peces planos, Céspedes *et al.*, 1998).

Quinteiro *et al.* (2001) identifican 11 de las 12 especies del género *Merluccius* spp., empleando la técnica de PCR-RFLPs. Amplifican por PCR la región control del ADN mitocondrial y la digieren con 4 enzimas de restricción. La comparación de los patrones de bandas obtenidos les permite diferenciar 11 especies. Sin embargo, este procedimiento carece de una primera fase de diagnóstico de presencia-ausencia de merluza en una muestra, que permita ahorrar el esfuerzo posterior de identificación negativa de la especie, y tampoco consigue identificar todas las especies mundiales de merluza. Por todo lo antedicho, es imprescindible disponer de un procedimiento para la identificación y diferenciación genética de todas las especies de merluza *Merluccius* spp.: *M. merluccius*, *M. senegalensis*, *M. poll*, *M. capensis*, *M. paradoxus*, *M. productus*, *M. gayi*, *M. australis*, *M. hubbsi*, *M. albidus*, *M. angustimanus* y *M. bilinearis* en productos comerciales, que supere todos o parte de los inconvenientes previamente mencionados.

## Bibliografía

- 35 **Burgener, M.** 1997. Molecular species differentiation of fish and mammals. Thesis, University of Bern, Switzerland.
- 40 **Céspedes A., García T., Carrera E., González I., Sanz B., Hernández P.E. and Martín R.** 1998. Identification of flatfish species using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction analysis of the cytochrome *b* gene. *Journal of Food Science* Vol 63(2): 206-209.
- 45 **Inada** 1981. Studies on Merlucüd fish. *Bulletin Far Seas Fisheries Research Laboratory*, Shimizu, Japan 18: 1-172.
- 50 **Mackie I.M. and Jones B.W.** 1978. The use of electrophoresis of the water-soluble(sarcoplasmic) proteins of fish muscle to differentiate the closely related species of hake (*Merluccius* spp.). *Comparative Biochemistry and Physiology* Vol. 59B: 95-98.
- 55 **Mackie I. M., Chalmers M., Reece P., Scobbie A. E. and Ritchie A.H.** 1992. The application of electrophoretic techniques to the identification of canned tuna and bonito. En: *Pelagic fish, the resource and its exploitation*. Editores: Burt J.R., Hardy R., Whittle K.J. Fishing News Books, Oxford.
- 60 **Piñeiro C., Vázquez J., Marina A. I., Barros-Velázquez J., and Gallardo J. M.** 2001. Characterization and partial sequencing of species-specific polypeptides from comercial hake species by mass spectrometry following two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 22: 1545-1552.
- 65 **Quinteiro J., Vidal R., Izquierdo M., Sotelo C.G., Chapela M.j., Pérez-Martín R. I., Rehbein H., Hold G.L., Russel V.J., Pryde S.E., Rosa C., Santos A.T. and Rey-Méndez M.** 2001. Identificaton of hake speceis (*Merluccius* genus) using sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA control region sequences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5108-5114.
- 70 **Rutledge C.R., Wesson D.M. and Meek C.L.** 1999. Polymerase chain reaction assay to identify all immature stages of two species of the *Anopheles quadrimaculatus* sibling species complex (Diptera: Culicidae). *Journal of the American Mosquito Control Association* 15(4): 573-575.
- 75 **Explicación de la invención**
- 80 El objetivo de esta invención es la detección de merluza en una muestra y en caso positivo, la posterior identificación genética inequívoca de la o las especies de merluza *Merluccius merluccius*, *Merluccius senegalensis*, *Merluccius*

polli, *Merluccius capensis*, *Merluccius paradoxus*, *Merluccius productus*, *Merluccius gayi*, *Merluccius australis*, *Merluccius hubbsi*, *Merluccius albidus*, *Merluccius angustimanus* y *Merluccius bilinearis*, presentes en dicha muestra, ya sean alimentos o productos frescos, fileteados, refrigerados, congelados y precocinados, o en sus diversos formatos comerciales. La invención se basa en la amplificación de un fragmento de 122 pb. del gen del citocromo *b* mitocondrial

5 para comprobar la presencia de merluza o bacalao en la muestra y, en caso positivo, la amplificación de un fragmento de 464-465 pb del mismo gen, y el estudio de las diferencias de su secuencia nucleotídica entre las 12 especies de merluza. Basándose en estas diferencias interespecíficas, se aplica una batería de 3 endonucleasas de restricción que generan patrones de bandas característicos de cada una de las especies comercializadas bajo la denominación merluza.

10 La novedad de la técnica que se presenta radica en que se proporciona al usuario la secuencia de 2 cebadores de ADN que permiten determinar la presencia o ausencia en la muestra de alguna de las doce especies de merluza o bacalao. Los cebadores seleccionados fueron probados en especies de géneros cercanos como *Gadus morhua* (Bacalao), *Macruronus novaezelandiae* y *Macruronus magellanicus* (Merluzas de cola), y géneros lejanos como *Salmo salar* y *Salmo trutta* (salmónidos), y *Scophthalmus maximus*, *Scophthalmus rhombus*, y *Platichthys flesus* (peces planos),

15 amplificando únicamente en *Gadus morhua*. En consecuencia, en caso de que el primer test de amplificación de 122 pb sea positivo, y por tanto haya merluza o bacalao en la muestra, se amplifica un fragmento de mayor tamaño (464 165 pb) sobre el que se han seleccionado un conjunto de dianas de corte de endonucleasas específicas que permiten, tras el estudio del patrón de bandas de los fragmentos que generan, diferenciar inequívocamente todas las especies de merluza y el bacalao.

20 La técnica presentada tiene bajo coste, es sencilla y requiere poco tiempo de ejecución. Presenta evidentes ventajas frente a técnicas de análisis de proteínas que son alteradas en los procesos a los que se someten los productos. Con respecto a la técnica propuesta por Quenteiro *et al.* (2001) el presente procedimiento presenta varias ventajas, a saber: a) el uso de cebadores específicos para merluza que permite un primer diagnóstico de presencia-ausencia de merluza

25 en los productos, sin necesidad de recurrir a la amplificación del ADN, la digestión con enzimas y la interpretación de patrones de corte, b) la identificación de la especie de merluza es posible, a menor coste, con tres enzimas de restricción, en lugar de 4, c) para identificar la especie de merluza, no es siempre necesario digerir el ADN con las 3 enzimas de restricción, pues con una sola enzima ya se distinguen 3 especies, con dos enzimas se distinguen 9 especies y con las 3 enzimas se distinguen las 12 especies, lo que supone menor coste y mayor rapidez que el método

30 de Quenteiro *et al.* (2001) que utiliza 4 enzimas, d) con el presente procedimiento es posible diferenciar todas las especies mundiales del género *Merluccius* (12 especies) descritas hasta la fecha, e) los cebadores utilizados se han confeccionado de modo que solamente funcionan sobre ADN de merluza y bacalao, pero en ningún otro grupo de peces ensayado, por lo que son altamente específicos e informativos, y f) el fragmento amplificado en la primera parte del procedimiento para detectar presencia-ausencia de merluza es 65 pb más corto (122 pb) que el de Quenteiro *et al.* (187 pb), lo cual resulta en un aumento de la potencia del test en un 35%, en situaciones de ADN muy degradado, por ejemplo el de productos precocinados.

### Descripción detallada de la invención

40 Se trata de un procedimiento para la detección de presencia-ausencia de merluza o bacalao en una muestra, y en caso positivo para la identificación de la o las especies que contiene (*Merluccius merluccius*, *Merluccius senegalensis*, *Merluccius polli*, *Merluccius capensis*, *Merluccius paradoxus*, *Merluccius productus*, *Merluccius gayi*, *Merluccius australis*, *Merluccius hubbsi*, *Merluccius albidus*, *Merluccius angustimanus*, *Merluccius bilinearis*, y *Gadus morhua*), ya sean productos frescos, congelados, ultracongelados y/o procesados.

45 El procedimiento se caracteriza por la amplificación de un fragmento de 122 pb del gen del citocromo *b* mitocondrial para comprobar la presencia de merluza o bacalao en la muestra y, en caso positivo, la amplificación posterior de un fragmento de 464-465 pb del mismo gen, por la aplicación secuencial de una batería de endonucleasas de restricción sobre el fragmento amplificado de 464 165 pb, y por el análisis de los fragmentos obtenidos característicos de

50 cada especie y que permiten diferenciar las especies de merluza entre sí y el bacalao. La metodología se describe en la Figura 1 y sigue los pasos que se detallan a continuación:

### Metodología

- 55 1.- Extracción y purificación del ADN.
- 2.- Comprobación de la cantidad y calidad del ADN.
- 3.- Determinación de la presencia de ADN de merluza o bacalao en la muestra mediante amplificación de un fragmento de 122 pb del gen del citocromo *b* del ADN mitocondrial.
- 60 4.- Comprobación de la correcta amplificación de dicho fragmento.
- 5.- Amplificación de un fragmento de 464 165 pb del citocromo *b* del ADN mitocondrial
- 65 6.- Comprobación de la correcta amplificación de dicho fragmento.

7.- Digestión de alícuotas del fragmento amplificado con endonucleasas de restricción que reconocen y cortan específicamente las secuencias C!TAG/GAT!C, CCTC(N)<sub>7</sub>!/GGAG(N)6! y GT!AC/CA!TG.

5 8.- Estudio de los fragmentos de ADN obtenidos tras la digestión y determinación de la especie de merluza o del bacalao por comparación con los patrones característicos de cada especie.

A continuación se describe detalladamente cada una de las etapas mencionadas:

10 1.- *Extracción y purificación del ADN*

Al objeto de evitar contaminaciones con ADN no procedente de la muestra, es necesario esterilizar los reactivos y materiales que se vayan a utilizar en la extracción y amplificación del ADN. En la bibliografía se pueden encontrar distintos métodos para extraer ADN (Sambrook *et al.*, 1989). La mayoría de ellos requieren fenolización de la muestra, aunque los hay menos contaminantes como los que utilizan agentes quelantes como la resina Chelex (Estoup *et al.*, 1996). En productos precocinados y/o rebozados es necesaria una etapa previa de desengrasado.

15 2.- *Comprobación de la cantidad y calidad del ADN*

El ADN extraído debe estar en cantidad y calidad suficientes para los análisis. El principal problema para conseguirlo es la degradación que ha sufrido el ADN de los productos durante su elaboración. No obstante el ADN extraído de esos productos suele alcanzar una longitud suficiente para amplificar el fragmento de 464-465 pb del citocromo *b* que servirá para la diagnosis de especie.

20 3.- *Determinación de la presencia de ADN de merluza o bacalao en la muestra mediante amplificación de un fragmento de 122 pb del gen del citocromo b del ADN mitocondrial*

30 A partir del ADN extraído y purificado, se ensaya la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de un fragmento de 122 pb, localizado en el gen del citocromo *b* del ADN mitocondrial. Para ello se utilizan dos cebadores, denominados respectivamente MP1 y MP2, que amplifican solamente en todas las especies de merluza y en el bacalao, y que corresponden a las siguientes secuencias de nucleótidos (véase apartado denominado Lista de Secuencias: MP1: SEC ID NO 1 (17 nucleótidos) y MP2: SEC ID NO 2 (23 nucleótidos)).

35 El diseño de los cebadores se realizó alineando las secuencias del gen citocromo *b* obtenidas para cada una de las especies de merluza y seleccionándolos en las regiones nucleotídicas conservadas entre especies. Los cebadores sintéticos pueden obtenerse mediante síntesis realizada por casas comerciales, por ejemplo Sigma-Aldrich. La reacción de amplificación por PCR se realiza en un termociclador, programado con ciclos de temperatura como el que sigue:

40 Un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, 30 ciclos de: 95°C durante 1 minuto, 59°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto, y un ciclo final de elongación a 72°C durante 10 minutos.

45 4.- *Comprobación de la correcta amplificación del fragmento de 122 pb del citocromo b*

Es necesario comprobar visualmente la amplificación del fragmento de 122 pb del citocromo *b*. El método más sencillo es mediante electroforesis en geles de agarosa (Figura 2). La tinción se realiza con Bromuro de Etilio y los fragmentos amplificados se visualizan en un transiluminador ultravioleta. Es indispensable comigrar la muestra con un marcador de pesos moleculares de fragmentos comprendidos entre 100 y 1000 pb, para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados y comprobar que la amplificación es correcta. Si se ha producido la amplificación del fragmento de 122 bp entonces podemos asegurar que hay ADN mitocondrial de merluza o bacalao en la muestra.

50 5.- *Amplificación de un fragmento de 464-465 pb del citocromo b del ADN mitocondrial*

La amplificación del fragmento de 464-465 pb del citocromo *b* se realiza con los cebadores descritos por Burgener en 1997 y denominados H15149AD y L14735. El programa de amplificación en el termociclador es el siguiente: un ciclo inicial de desnaturalización a 96°C durante 3 minutos, 40 ciclos de: 96°C durante 30 segundos, 63°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto, y un ciclo final de elongación a 72°C durante 10 minutos.

55 6.- *Comprobación de la correcta amplificación del fragmento de 464-465 pb del citocromo b*

60 Es necesario comprobar visualmente la amplificación del fragmento de 464-465 pb del citocromo *b*. El método más sencillo es mediante electroforesis en geles de agarosa (Figura 2). La tinción se realiza con Bromuro de Etilio y los fragmentos amplificados se visualizan en un transiluminador ultravioleta. Es indispensable comigrar la muestra con un marcador de pesos moleculares de fragmentos comprendidos entre 100 y 1000 pb para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados y comprobar que la amplificación es correcta (Figura 3).

65 7.- *Digestión de alícuotas del fragmento amplificado con endonucleasas de restricción que reconocen y cortan específicamente las secuencias C!TAG/GAT!C, CCTC(N)<sub>7</sub>!/GGAG(N)6! y GT!AC/CA!TG*

El fragmento de 464-465 pb del citocromo *b* mitocondrial de las 12 especies de merluza presenta una serie de

nucleótidos característicos de cada especie (Figuras 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 14, 15, y 16). Estas diferencias nucleotídicas permiten seleccionar una batería compuesta por tres endonucleasas de restricción, que, aplicadas de modo secuencial, permiten identificar a todas las especies de merluza.

5 Los patrones de fragmentos generados tras la digestión con la enzima *Bfa I* distinguen las especies *Merluccius capensis*, *Merluccius albidus* y *Merluccius bilinearis* de las demás (Figura 17). Esta enzima reconoce la secuencia C!TAG/GAT!C, que está presente en todas las especies menos en *Merluccius capensis*, de modo que esta especie se distingue del resto por ausencia de digestión del fragmento. La enzima *Bfa I* en *Merluccius albidus* produce 3 cortes en las posiciones 145, 157 y 400 generando 4 fragmentos respectivamente de 243, 145, 64 y 12 pb. En *Merluccius bilinearis* produce 2 cortes en las posiciones 157 y 400 respectivamente, generando 3 fragmentos de 243, 157 y 67 pb. En las especies *Merluccius merluccius* y *Merluccius senegalensis* produce dos cortes en las posiciones 146 y 188, generando tres fragmentos respectivamente de 277, 146 y 42 pb. En las especies *Merluccius polli* y *Merluccius paradoxus*, *Bfa I* corta en la posición 401 generando dos fragmentos de 401 y 64 pb. En *Merluccius productus* y *Merluccius hubbsi* corta en tres posiciones 145, 157 y 187 generando 4 fragmentos de 277, 145, 30 y 12 pb. En 10 *Merluccius angustimanus*, *Merluccius gayi* y *Merluccius australis* produce 4 cortes en las posiciones 145, 157, 187 y 400, generando 5 fragmentos de 213, 145, 64, 30 y 12 pb.

20 Una vez diferenciadas estas 3 especies, la enzima *Mnl I* distinguirá *Merluccius merluccius* de *Merluccius senegalensis*, *Merluccius productus* de *Merluccius hubbsi* y *Merluccius polli* de *Merluccius paradoxus* (Figura 18). Esta enzima reconoce la secuencia

25 CCTC(N<sub>7</sub>)!/GGAG(N)6!, que está presente en distintas posiciones de la secuencia de las especie. En *Merluccius merluccius* corta en 9 posiciones 56, 118, 125, 161, 326, 329, 434, 443 y 452, generando 10 fragmentos de 165, 105, 62, 56, 36, 13, 9, 9, 7 y 3 pb y en *Merluccius senegalensis* corta en 8 posiciones 56, 118, 161, 326, 329, 434, 443 y 452, generando 9 fragmentos de 165, 105, 62, 56, 43, 13, 9, 9 y 3 pb. En *Merluccius hubbsi* corta en 10 posiciones 55, 106, 160, 237, 306, 325, 328, 406, 433 y 451, generando 11 fragmentos de 78, 77, 69, 55, 54, 51, 27, 19, 18, 13 y 3 pb y en *Merluccius productus* corta en 11 posiciones 55, 73, 106, 117, 160, 306, 325, 328, 406, 433 y 451, generando 12 fragmentos de 146, 78, 55, 43, 53, 33, 27, 19, 18, 18, 13, 11 y 3 pb. En *Merluccius polli* corta en 10 posiciones 56, 72, 118, 161, 329, 350, 407, 434, 443 y 452, generando 11 fragmentos de 168, 57, 56, 46, 43, 27, 21, 16, 13, 9 y 9 pb y en 30 *Merluccius paradoxus* corta en 9 posiciones 56, 118, 161, 326, 329, 406, 434, 444 y 452, generando 10 fragmentos de 165, 78, 62, 56, 43, 27, 13, 9, 9 y 3 pb.

35 La enzima *Afa I* distingue las especies *Merluccius angustimanus*, *Merluccius gayi* y *Merluccius australis* (Figura 19). Esta enzima reconoce la secuencia GT!AC/CA!TG. En *Merluccius angustimanus* corta en tres posiciones 236, 343 y 389, generando 4 fragmentos de 236, 107, 75 y 46 pb, en *Merluccius gayi* corta en 2 posiciones 236 y 389, generando 3 fragmentos de 236, 153 y 75 pb y en *Merluccius australis* corta en 2 posiciones 343 y 389, generando 3 fragmentos de 343, 75 y 46 pb.

40 La digestión del fragmento de 464-465 pb del citocromo *b* mitocondrial se realiza a 37°C, con las enzimas *Bfa I*, *Mnl I* y *Afa I*, en 3 viales independientes y utilizando el tampón adecuado para cada una de ellas. La incubación se realiza durante 5 horas, si bien cuanto más tiempo se digiera más claros serán los patrones de bandas.

45 En bacalao, *Gadus morhua*, la enzima de restricción *Bfa I* corta en 2 posiciones, 145 y 187, generando 3 fragmentos de 277, 145 y 42 pb. La enzima *Mnl I* corta en 5 posiciones 110, 206, 299, 416 y 435, generando 6 fragmentos de 117, 110, 96, 93, 29 y 19 pb. La enzima *Afa I* no tiene dianas en la secuencia de esta especie, de modo que se observa el fragmento de 464 pb intacto (Figura 20).

#### 8.- Estudio de los fragmentos de ADN obtenidos tras la digestión y determinación de la especie de merluza por comparación con los patrones característicos de cada especie

50 Para obtener los patrones característicos de cada especie debe visualizarse el resultado de la digestión. Las muestras se identificarán basándose en la restricción con *Bfa I* de modo que *Merluccius capensis* se distingue del resto por ausencia de digestión, *Merluccius albidus* presentará 4 fragmentos de 243, 145, 64 y 12 pb respectivamente y *Merluccius bilinearis* presentará 3 fragmentos de 243, 157 y 67 pb. El resto de especies forman cuatro grupos en función del 55 patrón generado con esta enzima, a saber, *Merluccius merluccius* y *Merluccius senegalensis* presentarán tres fragmentos de 277, 146 y 42 pb respectivamente, *Merluccius polli* y *Merluccius paradoxus* presentarán dos fragmentos de 401 y 64 pb, *Merluccius productus* y *Merluccius hubbsi* presentarán 4 fragmentos de 277, 145, 30 y 12 pb y *Merluccius angustimanus*, *Merluccius gayi* y *Merluccius australis* presentarán 5 fragmentos de 213, 145, 64, 30 y 12pb.

60 Posteriormente con la enzima *Mnl I* se distinguirán *Merluccius merluccius*, con 10 fragmentos de 165, 105, 62, 56, 36, 13, 9, 9, 7 y 3 pb, de *Merluccius senegalensis*, con 9 fragmentos de 165, 105, 62, 56, 43, 13, 9, 9 y 3 pb; *Merluccius hubbsi* con 11 fragmentos de 78, 77, 69, 55, 54, 51, 27, 19, 18, 13 y 3 pb, de *Merluccius productus* con 12 fragmentos de 146, 78, 55, 43, 33, 27, 19, 18, 18, 13, 11 y 3 pb; y *Merluccius polli*, con 11 fragmentos de 168, 57, 56, 46, 43, 27, 21, 16, 13, 9 y 9 pb, de *Merluccius paradoxus*, con 10 fragmentos de 165, 78, 62, 56, 43, 27, 13, 9, 9 y 3pb.

65 Tras la digestión con la enzima *Afa I* se distinguirán *Merluccius angustimanus*, *Merluccius gayi* y *Merluccius australis*. La enzima *Afa I* genera 4 fragmentos de 236, 107, 75 y 46 pb en *Merluccius angustimanus*, lo que permite

distinguirla de *Merluccius gayi*, con 3 fragmentos de 236, 153 y 75 pb y de *Merluccius australis* con 3 fragmentos de 343, 75 y 46 pb.

En resumen, la invención proporciona un procedimiento para la identificación genética y diferenciación de las especies *Merluccius merluccius*, *Merluccius senegalensis*, *Merluccius polli*, *Merluccius capensis*, *Merluccius paradoxus*, *Merluccius productus*, *Merluccius gayi*, *Merluccius australis*, *Merluccius hubbsi*, *Merluccius albidus*, *Merluccius angustimanus*, *Merluccius bilinearis* y *Gadus Morhua*, en una muestra problema a ensayar, que comprende las etapas de:

- a) Obtención de una muestra a ensayar.
- 10 b) Extracción y purificación del ADN de la muestra.
- c) Amplificación por PCR de una secuencia de 122 pb del citocromo *b* con los cebadores MP1 y MP2, que corresponden respectivamente a las secuencias SEC ID NO 1 y SEC ID NO 2.
- 15 d) Comprobación de la amplificación para saber si hay merluza y/o bacalao en la muestra.
- e) Si ha habido amplificación, se amplifica por PCR un fragmento de 464-465 pb del citocromo *b* con los cebadores de Burgener (1997) denominados H15149AD y L14735, y se comprueba la correcta amplificación del fragmento.
- 20 f) Digestión de los amplicones con enzimas de restricción que reconozcan las dianas C!TAG/GAT!C, CCTC (N)<sub>7</sub>!/GGAG(N)6! y GT!AC/CA!TG.
- g) Análisis de los productos de digestión obtenidos frente a los patrones de restricción característicos de las especies a identificar de modo que:
  - con la enzima de restricción que reconoce la secuencia C!TAG/GAT!C, la visualización del fragmento de 465 pb sin digerir es indicativo de la presencia de *Merluccius capensis*. Cuatro fragmentos de 243, 145, 64 y 12 pb, son indicativos de la presencia de *Merluccius albidus* y 3 fragmentos de 243, 157 y 67 pb indican la presencia de *Merluccius bilinearis*. Tres fragmentos de 277, 146 y 42 pb indican la presencia de *Merluccius merluccius* y/o *Merluccius senegalensis*, y dos fragmentos de 401 y 64 pb indican la presencia de *Merluccius polli* y/o *Merluccius paradoxus*. Cuatro fragmentos de 277, 145, 30 y 12 pb son indicativos de la presencia de *Merluccius productus* y/o *Merluccius hubbsi* y cinco fragmentos de 213, 145, 64, 30 y 12 pb indican la presencia de *Merluccius angustimanus*, *Merluccius gayi* y/o *Merluccius australis*,
  - con la enzima de restricción que reconoce la secuencia CCTC(N)<sub>7</sub>!/GGAG(N)6!, la aparición de 10 fragmentos de 165, 105, 62, 56, 36, 13, 9, 9, 7 y 3 pb es indicativa de la presencia de *Merluccius merluccius*; 9 fragmentos de 165, 105, 62, 56, 43, 13, 9, 9 y 3 pb son característicos de *Merluccius senegalensis*; 11 fragmentos de 78, 77, 69, 55, 54, 51, 27, y 3 pb indican la presencia de *Merluccius hubbsi*, y 12 fragmentos de 146, 78, 55, 43, 33, 27, 19, 18, 18, 13, 11 y 3 pb son indicativos de *Merluccius productus*. Si está presente *Merluccius polli* se observan 11 fragmentos de 168, 57, 56, 46, 43, 27, 21, 16, 13, 9 y 9 pb y se distingue de *Merluccius paradoxus* que presenta 10 fragmentos de 165, 78, 62, 56, 43, 27, 13, 9, 9 y 3 pb.
  - con la enzima de restricción que reconoce la secuencia GT!AC/CA!TG, la aparición de 4 fragmentos de 236, 107, 75 y 46 pb indica la presencia de *Merluccius angustimanus*; 3 fragmentos de 236, 153 y 75 pb son indicativos de *Merluccius gayi*; 3 fragmentos de 343, 75 y 46 pb son indicativos de *Merluccius australis*.

El procedimiento proporcionado por esta invención puede aplicarse a cualquier tipo de producto fresco, congelado, refrigerado, precocinado, etc.

## 55 Modos de realización de la invención y aplicaciones industriales

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

### 60 Ejemplo 1

#### *Control de fraude en importaciones de merluza*

Se plantea el problema de identificar el origen geográfico y la especie de merluza de una partida de medallones de pescado importados de otro país para consumo humano. La información previa sobre la muestra es que se trata de una partida de medallones de merluza importada de Argentina y exportada como *Merluccius australis*. Se trata de determinar inequívocamente la especie ya que en estas aguas se puede encontrar tanto *Merluccius australis* como *Merluccius hubbsi*, la primera de mayor valor comercial.

1.- *Extracción de ADN*

La extracción de ADN se realizó con resina Chelex 100 Resin (Bio-Rad, referencia del catálogo 143-2832). Previamente a la extracción se preparó disolución de Chelex al 10% en agua pura y se calentó a 55°C.

5 Se cortó con un bisturí un trozo de tejido de 4 medallones de la muestra. Los trozos de tejido se introdujeron independientemente en tubos de ensayo de 1,5 mL y se añadieron 300  $\mu$ L de la disolución de Chelex al 10% (caliente y en agitación) y 5  $\mu$ L de proteinasa-K (10 mg/mL). Se agitó la mezcla fuertemente y se incubó a 55°C durante 1 hora y después a 100°C durante 15 minutos. Tras la incubación se centrifugó a 12.000 g durante 3 minutos, de modo que los restos de tejido precipitaron unidos a la resina y el ADN permaneció en el sobrenadante.

10 Para comprobar la cantidad y la calidad del ADN extraído se tomó una alícuota del ADN así extraído y se hizo migrar por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%.

15 2.- *Reacción de amplificación (PCR) de un fragmento de 122 pb del gen del citocromo b del ADN mitocondrial*

Para su amplificación se utilizaron disoluciones (10  $\mu$ M) de los dos cebadores, denominados MP1 y MP2 (SEC ID NO 1 y SEC ID NO 2, respectivamente).

20 La reacción se llevó a cabo con el kit “puRe Taq Ready-to-go PCR Beads” (Amersham Biosciences, referencia del catálogo 27-9557-01), en tubos de 0,2 mL. En la reacción se mezclaron: 5  $\mu$ L de ADN extraído con Chelex, 20 pmol de cada cebador, 1,25  $\mu$ L de Cl<sub>2</sub>Mg a 10 mM (para una concentración final de 2 mM de Cl<sub>2</sub>Mg) y 15,75  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O para ajustar el volumen final de la reacción a 25  $\mu$ L. La reacción de amplificación por PCR se desarrolló en un termociclador con el programa siguiente: 95°C x 5 minutos, 30 ciclos de: 95°C x 1 minuto, 59°C x 1 minuto y 72°C x 1 minuto, y finalmente un ciclo de 72°C x 10 minutos.

25 3.- *Comprobación de la correcta amplificación*

30 Se empleó la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TBE 1X (Para 1 L de TBE 10X: 108 g Tris, 55 g Acido Bórico, 40 mL EDTA 0,5 M pH = 8.0) con 1,3  $\mu$ L de Bromuro de Etidio (10 mg/ mL). Tras la migración de 15  $\mu$ L del producto de la amplificación a 70 voltios durante 30 minutos, el ADN se visualizó mediante iluminación del gel sobre una lámpara UV. Para estimar el peso molecular de los fragmentos amplificado, se empleó un patrón de pesos moleculares de fragmentos de ADN comprendidos entre 100 y 1000 pb.

35 La visualización del fragmento de 122 pb fue indicativa de la presencia de ADN de merluza o bacalao en la muestra (Figura 21A).

40 4.- *Amplificación del fragmento de 464-465 pb del citocromo b mitochondrial*

Para amplificar este fragmento se utilizaron disoluciones (10  $\mu$ M) de los dos cebadores descritos por Burgener en 1997, denominados H15149AD y L14735.

45 La reacción se llevó a cabo con el kit “puRe Taq Ready-to-go PCR Beads” (Amersham Biosciences, referencia de catálogo 27-9557-01), en tubos de 0,2 mL. La reacción consistió en: 5  $\mu$ L de ADN extraído con Chelex, 20 pmol de cada cebador, 1,25  $\mu$ L de Cl<sub>2</sub>Mg a 10 mM (para una concentración final de 2 mM de Cl<sub>2</sub>Mg) y 15,75  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O para ajustar el volumen final de la reacción a 25  $\mu$ L. La reacción de amplificación por PCR se desarrolló en un termociclador con el programa siguiente: 96°C x 3 minutos, 40 ciclos de 96°C x 30 segundos, 63°C x 1 minuto y 72°C x 1 minuto, seguidos de un ciclo final de 72°C x 10 minutos.

50 5.- *Comprobación de la correcta amplificación*

Se empleó la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón 1X con 1,3  $\mu$ L de Bromuro de Etidio (10 mg/mL). Tras la migración de 5  $\mu$ L del producto de la amplificación a 70 voltios durante 30 minutos, el ADN se visualizó mediante iluminación del gel sobre una lámpara UV. Para estimar el peso molecular de los fragmentos amplificados., se empleó un patrón de pesos moleculares de fragmentos de ADN comprendidos entre 100 y 1000 pb.

En todos los casos se obtuvo un fragmento de 464-465 pb correspondiente al citocromo b (Figura 21B).

60 6.- *Purificación del fragmento amplificado de 464-465 pb*

Con el fin de evitar artefactos que dificulten la interpretación de los patrones tras la digestión, el producto de la PCR se purificó con el kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (Amersham Biosciences, referencia de catálogo 27-9602-01).

65 7.- *Digestión con la enzima de restricción Bfa I*

Se digirió una alícuota del producto de PCR purificado, con la enzima de restricción Bfa I. La digestión se realizó en tubos de ensayo de 1,5 mL, se añadieron de 5  $\mu$ L del fragmento de PCR purificado, 2  $\mu$ L del tampón adecuado

para la enzima, 5 U de enzima y se completó el volumen hasta 20  $\mu$ L con agua pura. Las reacciones de digestión se incubaron durante toda la noche a 37°C al baño María.

7.- *Visualización del patrón de restricción*

5

La visualización del patrón de restricción se realizó en un gel de agarosa al 3%, compuesto por una mezcla de agarosas (2 x NuSieve: 1 x Seakem LE) y 1,3  $\mu$ L de Bromuro de Etidio (10 mg/mL) añadidos al gel.

En cada pocillo se cargó toda la reacción de restricción mezclada con 3  $\mu$ L de tampón de carga (Tampón de carga: 10 16 mL Sacarosa 40%, 4 mL EDTA 0,5 M pH = 8,0 y 0,025% de Azul de Bromofenol). En la primera calle se migró un marcador de pesos moleculares denominado pGEM (Promega, referencia de catálogo G1741). La migración se realizó a 70 V durante una hora y tras ella se visualizaron los fragmentos obtenidos a la luz ultravioleta (Figura 22). Por comparación de las bandas obtenidas con los patrones esperados para las dos especies (si se trata de *Merluccius hubbsi* esperamos 4 fragmentos de 277, 145, 30 y 12 pb y si es *Merluccius australis* esperamos 5 fragmentos de 213, 15 145, 64, 30 y 12 pb) pudimos identificar inequívocamente la especie, que en este caso era *Merluccius australis*.

Los organismos oficiales de control de importaciones habrían verificado fehacientemente que no ha habido fraude en esta partida importada, y que el precio pagado por ella corresponde al valor de mercado acordado para la partida importada.

20

Ejemplo 2

*Control de fraude al consumidor*

25 Se plantea el problema de saber si hay merluza en un plato precocinado como el pisto marinero, y en caso positivo si responde a la especie reflejada en la etiqueta como *Merluccius merluccius*.

1.- *Extracción de ADN*

30 Al tratarse de un producto precocinado se procedió a desengrasar la muestra previamente a la extracción. Para ello se introdujeron 4 porciones de pescado (aproximadamente 0,5 g) extraídos de la muestra, en 4 tubos de ensayo de 15 mL. Las porciones de tejido se trocearon con unas tijeras y se añadió una mezcla de cloroformo: etanol: agua (1:2:0,8). Se mantuvieron a temperatura ambiente durante dos horas y transcurrido este tiempo, el contenido del tubo de 15 mL 35 se filtró con papel de filtro. La extracción de ADN se realizó con resina Chelex, previamente diluida al 10% en agua pura y calentada a 55°C.

40 Un trozo de tejido de aproximadamente 50 mg, fue introducido independientemente en tubos de ensayo de 1,5 mL y se añadieron 300  $\mu$ L de la disolución de Chelex al 10% (caliente y en agitación) y 5  $\mu$ L de proteinasa-K. Se agitó la mezcla fuertemente en vortex y se incubó a 55°C durante 1 hora y después a 100°C durante 15 minutos. Tras la incubación se centrifugó a 12.000 g durante 3 minutos, de modo que los restos de tejido precipitaron unidos a la resina y el ADN permaneció en el sobrenadante.

45 Para comprobar la cantidad y la calidad del ADN extraído se tomó una alícuota del ADN y se hizo migrar por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%.

2.- *Reacción de amplificación (PCR) de un fragmento de 122 pb del gen del citocromo b del ADN mitocondrial*

50 Para amplificar dicho fragmento se utilizaron disoluciones (10  $\mu$ M) de los dos cebadores, denominados MP1 y MP2 (SEC ID NO 1 y SEC ID NO 2, respectivamente). La reacción se llevó a cabo con el kit “puRe Taq Ready-to-go PCR Beads” (Amersham Biosciences, referencia de catálogo 27-9557-01), en tubos de ensayo de 0,2 mL. Se mezclaron: 5  $\mu$ L de ADN extraído con Chelex, 20 pmol de cada cebador, 1,25  $\mu$ L de Cl<sub>2</sub>Mg a 10 mM (para una concentración final de 2 mM de Cl<sub>2</sub>Mg) y 15,75  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O para ajustar el volumen final de la reacción a 25 1L. La reacción de amplificación por PCR se desarrolló en un termociclador y fue la siguiente: 95°C x 5 minutos, 30 ciclos de: 95°C x 1 minuto, 59°C x 1 minuto y 72°C x 1 minuto, y finalmente un ciclo de 72°C x 10 minutos.

55

3.- *Comprobación de la correcta amplificación*

60 Se empleó la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TBE 1X con 1,3  $\mu$ L de Bromuro de Etidio a 10 mg/mL. Se visualizaron 15  $\mu$ L, del producto de la amplificación mediante iluminación con una lámpara UV. Para estimar el peso molecular de los fragmentos amplificados se empleó un patrón de pesos moleculares de fragmentos de ADN comprendidos entre 100 y 1000 pb.

65 No se obtuvo amplificación de modo que se concluyó que las porciones de tejido presentes en la muestra no eran ni merluza ni bacalao.

65

Los inspectores alimentarios encargados de controlar el fraude al consumidor podrían disponer de una prueba pericial de alto valor diagnóstico para fiscalizar el fraude al consumidor en la información de la etiqueta y en el precio final del producto.

## Ejemplo 3

*Trazabilidad de un producto en la cadena alimentaria*

5 Se trata de comprobar que un producto ultracongelado etiquetado como lomos de merluza, es efectivamente merluza. La información que se tiene de la muestra procede de la etiqueta en la que se indica que se trata de Merluza del Cabo (*Merluccius capensis* y/o *Merluccius paradoxus*). Además se indica que ha habido varias denuncias de consumidores por problemas gastrointestinales supuestamente ocasionados por su consumo y se desea identificar y retirar todos los subproductos comerciales procedentes de esa partida.

10 1.- *Extracción de ADN*

La extracción de ADN se realizó con resina Chelex. Previamente a la extracción se preparó disolución de Chelex al 10% en agua pura y se calentó a 55°C.

15 Tres trozos de tejido, de aproximadamente 50 mg, extraídos de tres lomos fueron introducidos independientemente en tubos de ensayo de 1,5 mL y se les añadió 300  $\mu$ L de la disolución de Chelex al 10% (caliente y en agitación) y 5  $\mu$ L de proteinasa-K. Se agitó la mezcla fuertemente en vortex y se incubó a 55°C durante 1 hora y después a 100°C durante 15 minutos. Tras la incubación se centrifugó a 12.000 g durante 3 minutos, de modo que los restos de tejido 20 precipitaron unidos a la resina y el ADN permaneció en el sobrenadante.

Para comprobar la cantidad y la calidad del ADN extraído se tomó una alícuota del ADN así extraído y se migró por electroforesis a 70 voltios durante 30 minutos en un gel de agarosa al 0,8%.

25 2.- *Reacción de amplificación (PCR) de un fragmento de 122 pb del gen del citocromo b del ADN mitocondrial*

Para amplificar el fragmento se utilizaron disoluciones (10  $\mu$ M) de los dos cebadores, denominados MP1 y MP2 (SEC ID N° 1 y SEC ID NO 2, respectivamente). La reacción se llevó a cabo con el kit “puRe Taq Ready-to-go PCR Beads” (Amersham Biosciences, referencia de catálogo 27-9557-01), en tubos de 0,2 mL. Se mezclaron: 5  $\mu$ L de ADN extraído con Chelex, 20 pmol de cada cebador, 1,25  $\mu$ L de Cl<sub>2</sub>Mg a 10mM (para una concentración final de 2 mM de Cl<sub>2</sub>Mg) y 15,75  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O para ajustar el volumen final de la reacción a 25  $\mu$ L. La reacción de amplificación por PCR se desarrolló en un termociclador y fue la siguiente: 95°C x 5 minutos, 30 ciclos de: 95°C x 1 minuto, 59°C x 1 minuto y 72°C x 1 minuto, y finalmente un ciclo de 72°C x 10 minutos.

35 3.- *Comprobación de la correcta amplificación*

Se empleó la técnica de electroforesis en un gel de agarosa al 2% en tampón TBE 1X con 1,3  $\mu$ L de Bromuro de Etidio (10 mg/mL). Se visualizaron 15  $\mu$ L del producto de la amplificación mediante iluminación con una lámpara UV. Para estimar el peso molecular de los fragmentos amplificados se empleó un patrón de pesos moleculares de 40 fragmentos de ADN comprendidos entre 100 y 1000 pb.

La obtención del fragmento de 122 pb fue indicativa de la presencia de ADN de merluza o bacalao en la muestra.

45 4.- *Amplificación del fragmento de 464-465 pb del citocromo b mitochondrial*

Para amplificar dicho fragmento se utilizaron disoluciones (10  $\mu$ M) de los dos cebadores descritos por Burgener en 1997 y denominados H15149AD y L14735.

50 La reacción se llevó a cabo con el kit “puRe Taq Ready-to-go PCR Beads” (Amersham Biosciences, referencia de catálogo 27-9557-01), en tubos de 0,2 mL. Se mezclaron: 5  $\mu$ L de ADN extraído con Chelex, 20 pmol de cada cebador, 1,25  $\mu$ L de Cl<sub>2</sub>Mg a 10 mM (para una concentración final de 2 mM de Cl<sub>2</sub>Mg) y 15,75  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O para ajustar el volumen final de la reacción a 25  $\mu$ L. La reacción de amplificación por PCR se desarrolló en un termociclador y fue la siguiente: 96°C x 3 minutos, 40 ciclos de: 96°C x 30 segundos, 63°C x 1 minuto y 72°C x 1 minuto, y finalmente un ciclo de 72°C x 10 minutos.

55 5.- *Comprobación de la correcta amplificación*

Se empleó la técnica de electroforesis en un gel de agarosa al 2% en tampón TBE 1X con 1,3  $\mu$ L de Bromuro de Etidio a 10 mg/mL. Se visualizaron 5  $\mu$ L del producto de la amplificación mediante iluminación con una lámpara UV. Para estimar el peso molecular de los fragmentos amplificados, se empleó un patrón de pesos moleculares de fragmentos de ADN comprendidos entre 100 y 1000 pb.

En todos los casos se obtuvo un fragmento de 464-465 pb del citocromo b.

6.- *Purificación del fragmento amplificado*

Con el fin de evitar artefactos que dificulten la interpretación de los patrones de digestión el producto de la PCR se purificó con el kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (Amersham Biosciences, referencia de catálogo 5 27-9602-01).

7.- *Digestión con las enzimas de restricción *Bfa I*, *Mnl I* y *Afa I**

Se digirió una alícuota del fragmento purificado con cada una de las enzimas de restricción por separado, *Bfa I*, 10 *Mnl I* y *Afa I*. La digestión se realizó en tubos de ensayo de 1,5 mL. Se mezclaron 5  $\mu$ L del fragmento purificado, 2  $\mu$ L del tampón adecuado para cada enzima, 5 U de enzima y se completó el volumen hasta 20  $\mu$ L con agua pura. Las reacciones de digestión se incubaron durante toda la noche a 37°C al baño María.

15 8.- *Visualización del patrón de corte*

La visualización del patrón de corte o restricción se realizó en un gel de agarosa al 3%, compuesto por una mezcla de agarosas (2: 1, NuSieve: Seakem LE) y 1,3  $\mu$ L de Bromuro de Etilio (10 mg/mL).

En cada pocillo se cargó toda la reacción de restricción mezclada con 3  $\mu$ L de tampón de carga y en la primera 20 calle se migró un marcador de pesos moleculares denominado pGEM (Promega, referencia de catálogo G1741). La migración se realizó a 70 V durante una hora y tras ella se visualizaron los fragmentos obtenidos en una lámpara ultravioleta (Figura 23). Todos los individuos se identificaron como *Merluccius capensis* puesto que el fragmento amplificado no fue digerido con *Bfa I* (calles 1, 4 y 7), los patrones obtenidos con las otras dos enzimas (*Mnl I*, calles 2, 5 y 8; *Afa I*, calles 3, 6 y 9) confirmaron el diagnóstico.

25 Las autoridades alimentarias podrían comprobar que este producto corresponde efectivamente a determinada partida importada de *M. capensis*, de acuerdo con lo que se indica en la etiqueta, y adoptar las medidas necesarias para su retirada de la cadena alimentaria.

30 **Descripción de las figuras**

La figura 1 muestra el esquema general del protocolo a seguir para determinar la presencia o ausencia de merluza en una muestra y en caso positivo identificar la especie concreta.

35 La figura 2 muestra un gel de agarosa 2% para comprobar la eficiencia de amplificación del fragmento de 122 bp en todas las especies de merluza (*Merluccius spp*) y bacalao (*Gadus morhua*) con los cebadores MP1 y MP2. La primera calle de la izquierda son los fragmentos del marcador de peso molecular p-GEM (Promega, referencia de catálogo G1741) y las siguientes calles son (de izquierda a derecha) el fragmento de 122 pb amplificado en el DNA de: ME = 40 *M. merluccius*, SE = *M. senegalensis*, PO = *M. polli*, CA = *M. capensis*, PA = *M. paradoxus*, PR = *M. productus*, GA = *M. gayi*, AU = *M. australis*, HU = *M. hubbsi*, AL = *M. albidus*, AN = *M. angustimanus*, BI = *M. bilinearis* y GM = *Gadus morhua*.

45 La figura 3 muestra un gel de agarosa 2%, en el que se pone de manifiesto la eficiencia de amplificación del fragmento de 464-465 pb del citocromo *b* en todas las especies de merluza y en el bacalao. La primera calle es el marcador de peso molecular (p-GEM, Promega, referencia de catálogo G1741) y las siguientes calles (de izquierda a derecha) contienen el fragmento de 464-465 pb amplificado sobre DNA de: ME = *M. merluccius*, SE = *M. senegalensis*, PO = *M. polli*, CA = *M. capensis*, PA = *M. paradoxus*, PR = *M. productus*, GA = *M. gayi*, AU = *M. australis*, HU = *M. hubbsi*, AL = *M. albidus*, AN = *M. angustimanus*, BI = *M. bilinearis* y GM = *Gadus morhua* (bacalao).

50 La figura 4 muestra la secuencia del fragmento de 465 pb amplificado en DNA de la especie *Merluccius merluccius*. Se indican las dianas de reconocimiento de las enzimas de restricción: *Bfa I* (C!TAG/GAT!C), *Mnl I* (CCTC(N)<sub>7</sub>!GGAG(N)6!) y *Afa I* (GT!AC/CA!TG). La secuencia de dicho fragmento se muestra en la SEC ID NO 3 (Lista de Secuencias). Las secuencias subrayadas corresponden a los cebadores utilizados para amplificar por PCR el fragmento de 465 pb. Las secuencias dentro de un recuadro indican los cebadores específicos que amplifican el fragmento de 122 pb en merluzas y en bacalao.

55 La figura 5 muestra la secuencia del fragmento de 465 pb amplificado en la especie *Merluccius senegalensis*. Se indican las dianas de reconocimiento de las enzimas de restricción: *Bfa I* (C!TAG/GAT!C), *Mnl I* (CCTC(N)<sub>7</sub>!GGAG(N)6!) y *Afa I* (GT!AC/CA!TG). La secuencia de dicho fragmento se muestra en la SEC ID NO 4 (Lista de Secuencias). Las secuencias subrayadas corresponden a los cebadores utilizados para amplificar por PCR el fragmento de 465 pb. Las secuencias dentro de un recuadro indican los cebadores específicos que amplifican el fragmento de 122 pb en merluzas y en bacalao.

60 La figura 6 muestra la secuencia del fragmento de 465 pb amplificado en la especie *Merluccius polli*. Se indican las dianas de reconocimiento de las enzimas de restricción: *Bfa I* (C!TAG/GAT!C), *Mnl I* (CCTC(N)7!/GGAG(N)6!) y *Afa I* (GT!AC/CA!TG). La secuencia de dicho fragmento se muestra en la SEC ID NO 5 (Lista de Secuencias). Las secuencias subrayadas corresponden a los cebadores utilizados para amplificar por PCR el fragmento de 465 pb. Las

secuencias dentro de un recuadro indican los cebadores específicos que amplifican el fragmento de 122 pb en merluzas y en bacalao.

La figura 7 muestra la secuencia del fragmento de 465 pb amplificado en la especie *Merluccius capensis*. Se indican 5 las dianas de reconocimiento de las enzimas de restricción: *Bfa* I (C!TAG/GAT!C), *Mnl* I (CCTC(N)<sub>7</sub>!/GGAG(N)6!) y *Afa* I (GT!AC/CA!TG). La secuencia de dicho fragmento se muestra en la SEC ID NO 6 (Lista de Secuencias). Las secuencias subrayadas corresponden a los cebadores utilizados para amplificar por PCR el fragmento de 465 pb. Las secuencias dentro de un recuadro indican los cebadores específicos que amplifican el fragmento de 122 pb en merluzas y en bacalao.

10 La figura 8 muestra la secuencia del fragmento de 465 pb amplificado en la especie *Merluccius paradoxus*. Se indican las dianas de reconocimiento de las enzimas de restricción: *Bfa* I (C!TAG/GAT!C), *Mnl* I (CCTC(N)<sub>7</sub>!/GGAG (N)6!) y *Afa* I (GT!AC/CA!TG). La secuencia de dicho fragmento se muestra en la SEC ID NO 7 (Lista de Secuencias). Las secuencias subrayadas corresponden a los cebadores utilizados para amplificar por PCR el fragmento de 465 15 pb. Las secuencias dentro de un recuadro indican los cebadores específicos que amplifican el fragmento de 122 pb en merluzas y en bacalao.

20 La figura 9 muestra la secuencia del fragmento de 464 pb amplificado en la especie *Merluccius productus*. Se indican las dianas de reconocimiento de las enzimas de restricción: *Bfa* I (C!TAG/GAT!C), *Mnl* I (CCTC(N)<sub>7</sub>!/GGAG(N) 6!) y *Afa* I. (GT!AC/CA!TG). La secuencia de dicho fragmento se muestra en la SEC ID NO 8 (Lista de Secuencias). Las secuencias subrayadas corresponden a los cebadores utilizados para amplificar por PCR el fragmento de 464 pb. Las secuencias dentro de un recuadro indican los cebadores específicos que amplifican el fragmento de 122 pb en 25 merluzas y en bacalao.

25 La figura 10 muestra la secuencia del fragmento de 464 pb amplificado en la especie *Merluccius gayi*. Se indican las dianas de reconocimiento de las enzimas de restricción: *Bfa* I (C!TAG/GAT!C), *Mnl* I (CCTC(N)<sub>7</sub>!/GGAG(N)6!) y *Afa* I (GT!AC/CA!TG). La secuencia de dicho fragmento se muestra en la SEC ID NO 9 (Lista de Secuencias). Las secuencias subrayadas corresponden a los cebadores utilizados para amplificar por PCR el fragmento de 464 pb. Las secuencias dentro de un recuadro indican los cebadores específicos que amplifican el fragmento de 122 pb en 30 merluzas y en bacalao.

35 La figura 11 muestra la secuencia del fragmento de 464 pb amplificado en la especie *Merluccius australis*. Se indican las dianas de reconocimiento de las enzimas de restricción: *Bfa* I (C!TAG/GAT!C), *Mnl* I (CCTC(N)<sub>7</sub>!/GGAG(N) 6!) y *Afa* I (GT!AC/CA!TG). La secuencia de dicho fragmento se muestra en la SEC ID NO 10 (Lista de Secuencias). Las secuencias subrayadas corresponden a los cebadores utilizados para amplificar por PCR el fragmento de 464 pb. Las secuencias dentro de un recuadro indican los cebadores específicos que amplifican el fragmento de 122 pb en 40 merluzas y en bacalao.

45 La figura 12 muestra la secuencia del fragmento de 464 pb amplificado en la especie *Merluccius hubbsi*. Se indican las dianas de reconocimiento de las enzimas de restricción: *Bfa* I (C!TAG/GAT!C), *Mnl* I (CCTC(N)<sub>7</sub>!/GGAG(N)6!) y *Afa* I (GT!AC/CA!TG). La secuencia de dicho fragmento se muestra en la SEC ID NO 11 (Lista de Secuencias). Las secuencias subrayadas corresponden a los cebadores utilizados para amplificar por PCR el fragmento de 464 pb. Las secuencias dentro de un recuadro indican los cebadores específicos que amplifican el fragmento de 122 pb en merluzas y en bacalao.

50 La figura 13 muestra la secuencia del fragmento de 464 pb amplificado en la especie *Merluccius albidus*. Se indican las dianas de reconocimiento de las enzimas de restricción: *Bfa* I (C!TAG/GAT!C), *Mnl* I (CCTC(N)<sub>7</sub>!/GGAG(N)6!) y *Afa* I (GT!AC/CA!TG). La secuencia de dicho fragmento se muestra en la SEC ID NO 12 (Lista de Secuencias). Las secuencias subrayadas corresponden a los cebadores utilizados para amplificar por PCR el fragmento de 464 pb. Las secuencias dentro de un recuadro indican los cebadores específicos que amplifican el fragmento de 122 pb en merluzas y en bacalao.

55 La figura 14 muestra la secuencia del fragmento de 464 pb amplificado en la especie *Merluccius angustimanus*. Se indican las dianas de reconocimiento de las enzimas de restricción: *Bfa* I (C!TAG/GAT!C), *Mnl* I (CCTC(N)<sub>7</sub>!/GGAG(N)6!) y *Afa* I (GT!AC/CA!TG). La secuencia de dicho fragmento se muestra en la SEC ID NO 13 (Lista de Secuencias). Las secuencias subrayadas corresponden a los cebadores utilizados para amplificar por PCR el fragmento de 464 pb. Las secuencias dentro de un recuadro indican los cebadores específicos que amplifican el fragmento de 122 pb en merluzas y en bacalao.

60 La figura 15 muestra la secuencia del fragmento de 464 pb amplificado en la especie *Merluccius bilinearis*. Se indican las dianas de reconocimiento de las enzimas de restricción: *Bfa* I (C!TAG/GAT!C), *Mnl* I (CCTC(N)<sub>7</sub>!/GGAG (N)6!) y *Afa* I (GT!AC/CA!TG). La secuencia de dicho fragmento se muestra en la SEC ID NO 14 (Lista de Secuencias). Las secuencias subrayadas corresponden a los cebadores utilizados para amplificar por PCR el fragmento de 464 pb. Las secuencias dentro de un recuadro indican los cebadores específicos que amplifican el fragmento de 122 pb en merluzas y en bacalao.

65 La figura 16 muestra la secuencia del fragmento de 464 pb amplificado en el bacalao *Gadus morhua*. Se indican las dianas de reconocimiento de las enzimas de restricción: *Bfa* I (C!TAG/GAT!C), *Mnl* I (CCTC(N)<sub>7</sub>!/GGAG(N)6!) y

*Afa* I (GT!AC/CA!TG). La secuencia de dicho fragmento se muestra en la SEC ID NO 15 (Lista de Secuencias). Las secuencias subrayadas corresponden a los cebadores utilizados para amplificar por PCR el fragmento de 464 pb. Las secuencias dentro de un recuadro indican los cebadores específicos que amplifican el fragmento de 122 pb en merluzas y en bacalao.

5 La figura 17 muestra una foto de un gel de agarosa 3% con los patrones de fragmentos obtenidos tras la digestión del fragmento de 464-465 pb del citocromo *b* con *Bfa* I, para cada una de las especies de merluza. La primera calle es el marcador de peso molecular (p-GEM, Promega, referencia de catálogo G1741) y las siguientes calles son (de izquierda a derecha): ME = *M. merluccius*, SE = *M. senegalensis*, PO = *M. polli*, CA = *M. capensis*, PA = *M. paradoxus*, PR = 10 PR = *M. productus*, GA = *M. gayi*, AU = *M. australis*, HU = *M. hubbsi*, AL = *M. albidus*, AN = *M. angustimanus*, BI = *M. bilinearis* y GM = *Gadus morhua* (bacalao). Los tamaños de los fragmentos se indican en pares de bases.

15 La figura 18 muestra una foto de un gel de agarosa 3% con los patrones de fragmentos obtenidos tras la digestión con *Mnl* I del fragmento de 464 165 pb del citocromo *b* para cada una de las especies de merluza. La primera calle es el marcador de peso molecular (p-GEM, Promega, referencia de catálogo G1741) y las siguientes calles son (de izquierda a derecha): ME = *M. merluccius*, SE = *M. senegalensis*, PO = *M. polli*, CA = *M. capensis*, PA = *M. paradoxus*, PR = 20 PR = *M. productus*, GA = *M. gayi*, AU = *M. australis*, HU = *M. hubbsi*, AL = *M. albidus*, AN = *M. angustimanus*, BI = *M. bilinearis* y GM = *Gadus morhua* (bacalao). Los tamaños de los fragmentos se indican en pares de bases.

25 La figura 19 muestra una foto de un gel de agarosa 3% con los patrones de fragmentos obtenidos tras la digestión con *Afa* I del fragmento de 464-465 pb del citocromo *b*, para cada una de las especies de merluza. La primera calle es el marcador de peso molecular (p-GEM, Promega, referencia de catálogo G1741) y las siguientes calles son (de izquierda a derecha): ME = *M. merluccius*, SE = *M. senegalensis*, PO = *M. polli*, CA = *M. capensis*, PA = *M. paradoxus*, PR = 30 PR = *M. productus*, GA = *M. gayi*, AU = *M. australis*, HU = *M. hubbsi*, AL = *M. albidus*, AN = *M. angustimanus*, BI = *M. bilinearis* y GM = *Gadus morhua* (bacalao). Los tamaños de los fragmentos se indican en pares de bases.

35 La figura 20 muestra una foto de un gel de agarosa 3% con los fragmentos obtenidos tras la digestión con *Bfa* I, *Mnl* I y *Afa* I del fragmento de 464 pb del citocromo *b* del bacalao. La primera calle de la izquierda es el marcador de peso molecular p-GEM (Promega, referencia de catálogo G1741). Los tamaños de los fragmentos se indican en pares de bases.

40 La figura 21 muestra una foto de un gel de agarosa 2% en el que se observa la amplificación de A) el fragmento de 122 pb del citocromo *b* que indica la presencia de merluza o bacalao en 4 muestras problema, con los cebadores MP1 y MP2 (peine superior) y B) del fragmento de 464 165 pb del citocromo *b* con los cebadores H15149AD y L14735 (Burgener, 1997) en las mismas muestras que A (peine inferior). Los números corresponden a los 4 muestras etiquetadas como medallones de merluza. La primera calle de la izquierda es el marcador de peso molecular (p-GEM, Promega, referencia de catálogo G1741). Los tamaños de los fragmentos se indican en pares de bases.

45 La figura 22 muestra una foto de un gel de agarosa 3% en el que se observan los patrones de bandas obtenidos tras la digestión del fragmento de 464-465 pb del citocromo *b* con *Bfa* I en las muestras problema del Ejemplo 1. Los números corresponden a 4 muestras etiquetadas como medallones de merluza. La primera calle de la izquierda es el marcador de peso molecular (p-GEM, Promega, referencia de catálogo G1741). Los tamaños de los fragmentos se indican en pares de bases.

50 La figura 23 muestra una foto de un gel de agarosa 3% en el que se observan los patrones de bandas obtenidos tras la digestión con *Bfa* I (calles 1, 4 y 7), *Mnl* I (calles 2, 5 y 8) y *Afa* I (calles 3, 6 y 9) del fragmento de 464 165 pb del citocromo *b* de las muestras problema del Ejemplo 2. La primera calle de la izquierda es el marcador de peso molecular (p-GEM, Promega, referencia de catálogo G1741). Los tamaños de los fragmentos se indican en pares de bases.

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la identificación genética de todas las especies mundiales de merluza, *Merluccius spp.*, en 5 productos comerciales, que comprende las etapas siguientes:

- a) Obtención de una muestra a ensayar.
- b) Extracción y purificación del ADN de la muestra.
- 10 c) Amplificación por PCR de una secuencia de 122 pb del citocromo *b* con los cebadores MP1 y MP2, que corresponden respectivamente a las SEC ID NO 1 y SEC ID NO 2.
- 15 d) Comprobación de la amplificación del fragmento de 122 pb mediante electroforesis.
- 20 e) En caso de amplificación positiva, se amplifica por PCR un fragmento de 464-465 pb del citocromo *b* con los cebadores de Burgener (1997) denominados H15149AD y L14735 y se comprueba la correcta amplificación del fragmento por electroforesis.
- 25 f) Digestión de los amplicones de PCR con enzimas de restricción que reconozcan las dianas C!TAG/GAT!C, CCTC(N)<sub>7</sub>!/GGAG(N)6! y GT!AC/CA!TG,
- 30 g) Análisis electroforético de los productos de digestión obtenidos y comparación frente a los patrones de restricción característicos de las especies a identificar de modo que:
  - con la enzima de restricción que reconoce la secuencia C!TAG/GAT!C, la aparición del fragmento de 465 pb sin digerir es indicativo de la presencia de *Merluccius capensis*; 4 fragmentos de 243, 145, 64 y 12 pb son indicativos de la presencia de *Merluccius albidus* y 3 fragmentos de 243, 157 y 67 pb indican la presencia de *Merluccius bilinearis*; 3 fragmentos de 277, 146 y 42 pb indican la presencia de *Merluccius merluccius* y/o *Merluccius senegalensis* y 2 fragmentos de 401 y 64 pb de *Merluccius polli* y/o *Merluccius paradoxus*; 4 fragmentos de 277, 145, 30 y 12 pb son indicativos de la presencia de *Merluccius productus* y/o *Merluccius hubbsi* y 5 fragmentos de 213, 145, 64, 30 y 12 pb indican la presencia de *Merluccius angustimanus*, *Merluccius gayi* y/o *Merluccius australis*;
  - con la enzima de restricción que reconoce la secuencia CCTC(N)7!/GGAG(N)6!, la visualización de 10 fragmentos de 165, 105, 62, 56, 36, 13, 9, 9, 7 y 3 pb es indicativa de la presencia de *Merluccius merluccius*; 9 fragmentos de 165, 105, 62, 56, 43, 13, 9, 9 y 3 pb son característicos de *Merluccius senegalensis*; 11 fragmentos de 78, 77, 69, 55, 54, 51, 27, 19, 18, 13 y 3 pb indican la presencia de *Merluccius hubbsi* y 12 fragmentos de 146, 78, 55, 43, 33, 27, 19, 18, 18, 13, 11 y 3 pb identifican a *Merluccius productus*,
  - con la enzima de restricción que reconoce la secuencia GT!AC/CA!TG, 4 fragmentos de 236, 107, 75 y 46 pb indican la presencia de *Merluccius angustimanus*; 3 fragmentos de 236, 153 y 75 pb son indicativos de *Merluccius gayi*; 3 fragmentos de 343, 75 y 46 pb identifican a *Merluccius australis*; 4 fragmentos de 237, 83, 75 y 70 pb identifican a *Merluccius polli*, y 3 fragmentos de 237, 153 y 75 pb son diagnóstico de *Merluccius paradoxus*.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la muestra a ensayar procede de un producto fresco, congelado o procesado, etiquetado como Merluza, pescadilla, merluza austral o merluza de Chile o *M. sureña*, merluza americana o plateada, merluza del Cabo, merluza del Perú o *gayi*, merluza argentina o sudamericana, merluza europea, merluza del cabo o *M. de altura*, merluza negra o merluza del Pacífico.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que la molécula que reconoce y corta en la diana de restricción C!TAG/GAT!C es la enzima *Bfa* I; la molécula que reconoce y corta en la diana de restricción CCTC(N)<sub>7</sub>!/GGAG (N)6! es la enzima *Mnl* I, y la molécula que reconoce y corta en la diana de restricción GT!AC/CA!TG es la enzima *Afa* I.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el análisis de los productos de la digestión enzimática se lleva a cabo mediante separación electroforética de los fragmentos y la visualización de los mismos por tinción del gel de agarosa 3% (2:1, NuSieve: Seakem LE) con Bromuro de Etidio.

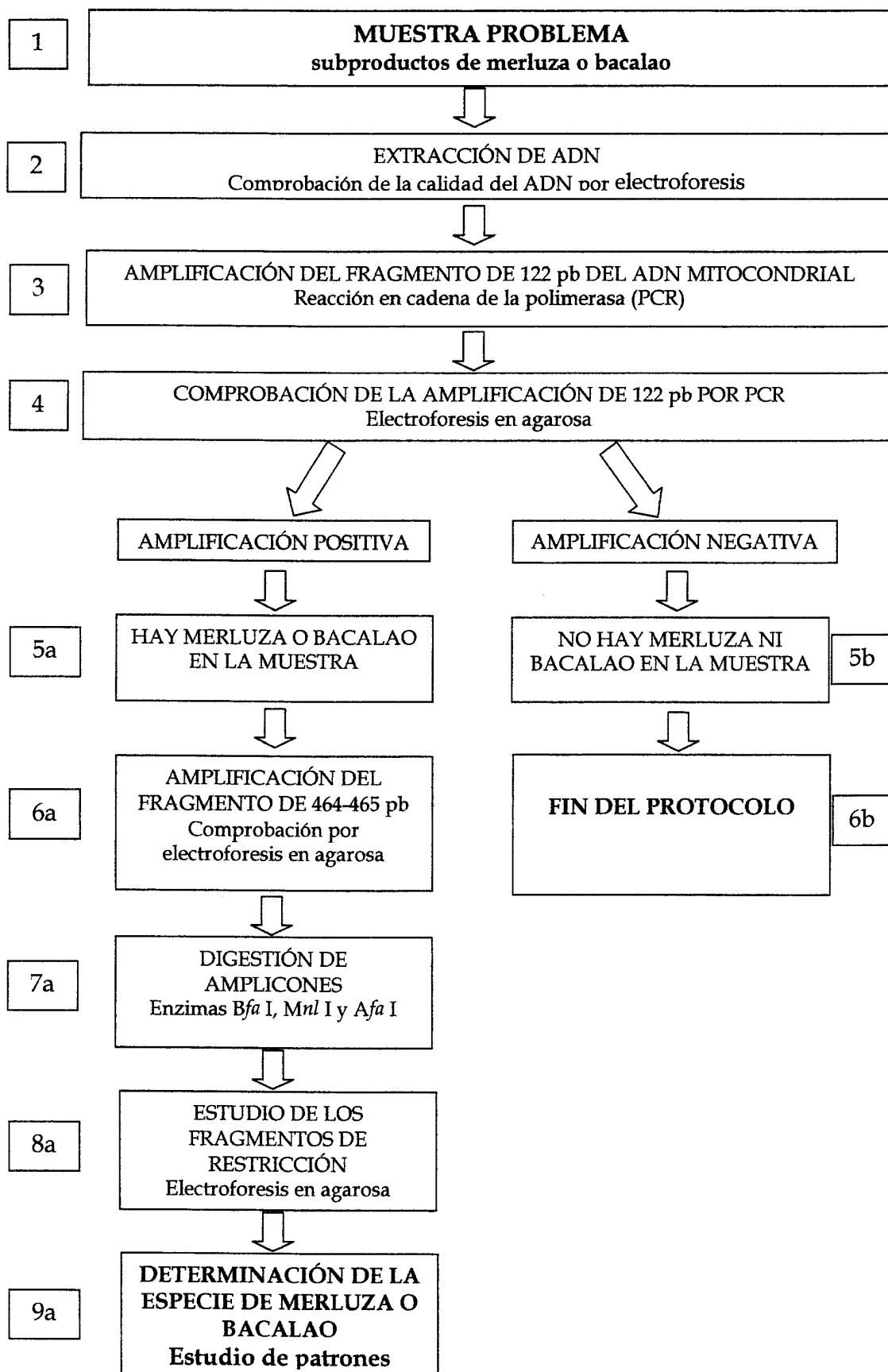


Figura 1

ES 2 237 271 B2

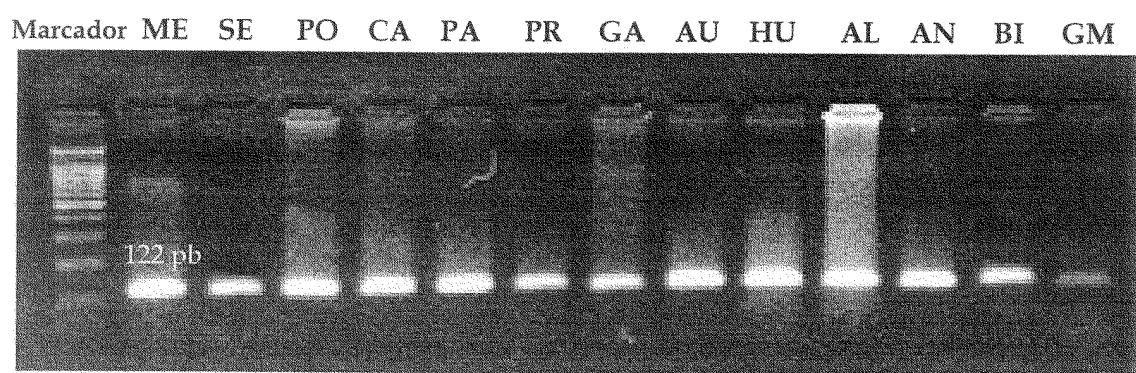


Figura 2

ES 2 237 271 B2

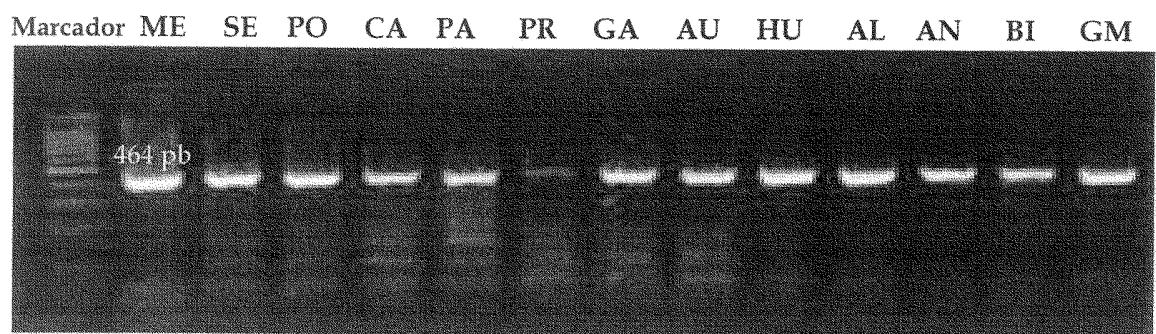


Figura 3

5'

AAAAACCACC GTTGTATTC AACTACAAGA ACCCTTAATG GCCAGCCTCC *Mnl I*  
 GAAAAAACTCA TCCCCTTCTA AAGATTGCTA ATGATGCATT AGTAGACCTT  
 CCTGCCCCCT *Mnl I* *Mnl I* CTAACCTCTC AACATTATGA AACTTCGGGT CTCTCCTAGG *Bfa I*  
 CCTCTGCTTA GCCGCCAAA TCTTAACAGG GCTATTTCTA GCGATACATT *Bfa I*  
 ATACCGCAAA CGTCGAGATA GCTTTCTCAT CCGTCGTACA CATCTGCCGC *Afa I*  
 GACGTAAATT ACGGATGACT AATCCGCAAC ATACACGCCA ACGGCGCTTC  
 TTTCTTCTTC ATCTGCCTCT ACCTACACAT TGCACGAGGC CTATATTACG *Mnl I* *Mnl I*  
 GCTCCTACTT ATTCATAGAG ACCTGAAACA TTGGAGTTGT ACTATTCCTT *Afa I*  
 TTAGTAATAA TGACCGCCTT CGTAGGCTAC GTCCTCCCTT *Mnl I* *Mnl I* GAGGACAAAT  
Mnl I  
ATCATTCTGA GGCGC 3'

Figura 4

5'

AAAAACCACC GTTGTATTC AACTACAAGA ACCCTTAATG GCCAGCCTCC *Mnl I*  
 GAAAAAACTCA TCCCCTTCTA AAGATTGCTA ATGATGCATT AGTAGACCTT  
 CCTGCCCCCT *Mnl I* CTAACATCTC AACATTATGA AACTTCGGGT CTCTCCTAGG *Bfa I*  
 CCTCTGCTTA GCCGCCAAA TCTTAACAGG GCTGTTTCTA GCAATACATT *Bfa I*  
 ATACCGCAAA CGTCGAAATA GCTTTCTCAT CCGTCGTACA CATCTGCCGC *Afa I*  
 GACGTAAATT ACGGATGACT AATCCGCAAC ATACACGCCA ACGGCGCTTC  
 TTTCTTCTTC ATCTGCCTCT ACCTACACAT TGCACGAGGC CTATATTACG *Mnl I* *Mnl I*  
 GCTCCTACTT ATTCATAGAG ACCTGAAACA TTGGAGTTGT ACTATTCCTT *Afa I*  
 TTAGTAATAA TGACCGCCTT CGTAGGCTAC GTCCTCCCTT *Mnl I* *Mnl I* GAGGACAAAT  
Mnl I  
ATCATTCTGA GGCGC 3'

Figura 5

5'

AAAAACCACC GTTGTATTCA AACTACAAGA ACCCTTAATG GCCAGCCTCC  
GAAAAACTCA CCCTCTTCTA AAGATTGCTA ATGATGCATT AGTAGACCTT  
Mnl I  
CCTGCC CCTA CCAACATCTC AACATGATGA AACTTGGGT CTCTTTAGG  
Mnl I  
CCTCTGCTTA GCCGCCAAA TCTAACAGG ACTATTTTA GCAATACACT  
Afa I  
ATACCGCAAA CGTCGAAATA GCCTTCTCAT CCGTCGTACA CATCTGCCGC  
GACGTAAATT ACGGATGACT AATTCGCAAC ATGCACGCCA ACGGTGCTTC  
Afa I  
TTTCTTCTTC ATCTGCCTGT ACCTACACAT TGCACGAGGC CTCTACTACG  
Afa I  
GCTCTTACTT ATTTATAGAG ACCTGAAACA TCGGCGTTGT ACTATTCCCTC  
Bfa I  
CTAGTAATAA TAACCGCTTT CGTAGGCTAT GTCCTCCCGAGGACAAAT  
Mnl I  
ATCATTCTGA GGC 3'

Figura 6

5'

AAAAACCACC GTTGTATTCA AACTACAAGA ACCCTTAATG GCCAGCCTCC  
GAAAAACTCA TCCCCTCCTA AAGATTGCTA ATGATGCATT AGTAGACCTT  
Mnl I  
CCTGCC CCTA CCAACATCTC AACATGATGA AACTTGGGT CTCTCTTAGG  
Mnl I  
CCTCTGCTTA GCCGCCAAA TCTAACAGG CTTATTTCTG GCGATACACT  
Afa I  
ACACCGCAAA CGTCGAAATA GCTTCTCAT CCGTCGTACA CATCTGCCGC  
GACGTAAATT ACGGATGACT AATCCGCAAC ATACACGCCA ACGGCGCTTC  
Mnl I  
TTTCTTCTTC ATCTGCCTCT ACCTGCACAT TGCACGAGGC CTATATTACG  
Afa I  
GCTCTTACTT ATTTATAGAG ACCTGAAACA TCGGGGTTGT ACTGTTCTT  
Mnl I  
TTAGTAATAA TGACCGCCTT CGTAGGTTAC GTCCTCCCGAGGACAAAT  
Mnl I  
GTCATTCTGA GGC 3'

Figura 7

5'

AAAAACCACC GTTGTATTC AACTACAAGA ACCCTTAATG GCCAGCCTCC *Mnl* I  
GAAAAACTCA TCCCCTTCTA AAGATTGCTA ATGATGCATT AGTAGACCTT  
Mnl I CCTGCCCTCT CCAACATCTC AACATTATGA AACTTTGGGT CTCTCTTAGG  
Mnl I CCTCTGCTTA GCCGCCAAA TCTAACAGG ACTATTTCTA GCAATACACT  
Afa I ACACCGCAAA CGTCGAGATA GCTTCATCCGTCGTACA CATCTGCCGC  
GACGTGAATT ACGGATGACT AATCCGCAAC ATACACGCCA ACGGCGCTTC  
Mnl I Mnl I TTTCTTCTTC ATCTGCCTCT ACCTACACAT TGCACGAGGC CTATACTACG  
Afa I Mnl I GCTCTTACTT ATTCATAGAG ACCTGAAACA TTGGAGTTGT ACTATTCCCTC  
Bfa I Mnl I Mnl I CTAGTAATAA TGACCGCCTT CGTAGGCTAC GTCCTCCCTT GAGGACAAAT  
Mnl I ATCATTCTGA GGCGC 3'

Figura 8

5'

AAAAACCACC GTTGTATTC AACTACAAGA ACCCTAATGG CCAGCCTCCG *Mnl* I  
AAAAACCCAC CCCCTCCTAA AGATCGCTAA TGATGCATTA GTAGACCTCC *Mnl* I  
Mnl I CTGCCCTCTC CAACATCTCC ACATGATGAA ACTTTGGGTC TCTCCTAGGC *Bfa* I  
Mnl I Bfa I Bfa I CTCTGTCTAG CCGCCAAAT CTTAACAGGA CTATTTCTAG CAATACACTA  
Afa I CACCGCAAA GTCGAAATAG CCTTCTCATC AGTTGTACAC ATCTGCCGTG  
ACGTAAATT CGGGTGACTA ATTCAGAATA TACACGCCA CGGGCGCTCC  
Mnl I Mnl I Afa I TTCTTCTTA TCTGCCTCTA CCTACACATC GCACGAGGTC TGTACTACGG  
Afa I Mnl I CTCCTACCTG TTTATGGAAA CCTGAAACAT CGGAGTCGTA CTCTTCCCTCC  
Mnl I TGGTAATAAT AACCGCCTTC GTAGGTTACG TTCTACCCTG AGGACAAATG  
Mnl I TCATTCTGAG GCGC 3'

Figura 9

ES 2 237 271 B2

5'

AAAAACCACC GTTGTATTC AACTACAAGA ACCCTAATGG CCAGCCTCCG *Mnl I*  
AAAAACCCAC CCCCTCCTAA AGATCGCTAA TGATGCATTA GTAGACCTCC *Mnl I*  
CTGCCCCCTC CAACATCTCC ACATGATGAA ACTTTGGGTC TCTCCTAGGC *Bfa I*  
*Mnl I* *Bfa I* *Bfa I* CTCTGTCTAG CCGCCCAAAT CTTAACAGGA CTATTCTAG CAATACACTA  
CACCGCAAAC GTCGAAATAG CCTTCTCATC AGTTGTACAC ATCTGCCGTG  
ACGTAAATTA CGGATGGCTA ATTGCAATA TACACGCCAA CGGCGCCTCC *Mnl I*  
TTCTTCTTTA TCTGCCTCTA CCTACACATC GCACGAGGTC TATACTACGG *Mnl I*  
CTCCTACCTG TTTATGGAAA CCTGAAACAT CGGAGTTGTA CTCTTCCTCC *Afa I* *Mnl I*  
*Bfa I* TAGTAATAAT AACCGCCTTC GTAGGTTACG TCCTACCCTG *AGGACAAATG* *Mnl I*  
TCATTCTGAG GCGC 3'

Figura 10

5'

AAAAACCACC GTTGTATTC AACTACAAGA ACCCTAATGG CCAGCCTCCG *Mnl I*  
AAAAACCCAC CCCCTCCTGA AGATCGCTAA TGATGCATTA GTAGACCTCC *Mnl I*  
CTGCCCCCTC CAACATCTCA GCATGATGAA ACTTTGGGTC TCTCCTAGGC *Bfa I*  
*Mnl I* *Bfa I* *Bfa I* CTCTGTCTAG CCGCCCAAAT CTTAACAGGA CTATTCTAG CAATACACTA  
CACCGCAAAC GTCGAAATAG CCTTCTCATC CGTTGTTACAC ATCTGCCGCG  
ACGTAAATTA TGGGTGACTA ATTGCAATA TACACGCCAA CGGCGCCTCC *Mnl I*  
TTCTTCTTTA TCTGCCTCTA CCTACACATC GCACGAGGCC TGTACTACGG *Mnl I* *Afa I*  
CTCCTACCTC TTTATGGAAA CCTGAAACAT CGGAGTTGTA CTTTTCTCC *Afa I* *Mnl I*  
*Bfa I* TAGTAATAAT AACCGCCTTC GTAGGTTACG TTCTCCCCTG *AGGACAAATA* *Mnl I*  
TCATTCTGAG GCGC 3'

Figura 11

5'

AAAAACCACC GTTGTATTCC AACTACAAGA ACCCTAATGG CCAGCCTCCG *MnI*  
AAAAACCCAC CCCCTTCTAA AGATCGCTAA TGATGCGGTA GTAGACCTCC *MnI*  
CTGCCCCTTC CAACATCTCG ACATGATGAA ACTTTGGGTC TCTCCTAGGC *BfaI*  
*MnI* *BfaI* *BfaI* CTCTGTCTAG CCGCCCAAAT CTTAACAGGA CTATTTCTAG CAATACACTA  
CACCGCAAAC GTCGAAATAG CTTCTCCTC CGTTGTACAC ATCTGCCGCG *MnI* *AfaI*  
ACGTAAATT CGGATGACTA ATTGCAACA TACACGCCAA CGGCGCCTCC *MnI*  
TTCTTCTTTA TCTGCCTCTA CCTACACATC GCACGAGGCC TGTACTACGG *MnI* *AfaI*  
CTCCTACCTG TTTATGGAGA CCTGAAATAT CGGAGTCGTA CTTTCCTCC *MnI*  
TGGTAATAGT CACCGCCTTC GTAGGCTACG TTCTCCCTG AGGACAAATA *MnI*  
TCATTCTGAG GCGC 3'

Figura 12

5'

AAAAACCACC GTTGTATTCC AACTACAAGA ACCCTAATGG CCAGCCTCCG *MnI*  
AAAAACCCAC CCCCTCCTAA AGATCGCTAA TGACGCATTA GTAGACCTCC *MnI*  
CTGCCCCCTC CAACATCTCG ACATGATGAA ACTTTGGGTC TCTCCTAGGC *BfaI*  
*BfaI* CTTGTCTAG CCGCCCAAAT CTTAACAGGA CTATTTTAG CAATACACTA  
CACCGCAAAC GTCGAAATAG CTTCTCATC CGTCGTACAC ATCTGCCGCG *AfaI*  
ACGTAAATT TGGATGACTA ATTGCAACA TACACGCCAA CGGCGCCTCC *MnI*  
TTCTTCTTTA TCTGCCTCTA CATACACATC GCACGAGGCC TGTACTACGG *MnI* *MnI* *AfaI* *MnI*  
CTCCTACCTA TTTATGGAGA CCTGAAACAT CGGAGTCGTA CTTTCCTCC *BfaI* TAGTTATAAT GACCGCCTTC GTAGGCTACG TTCTCCCTG AGGACAAATG *MnI*  
TCATTCTGAG GCGC 3'

Figura 13

ES 2 237 271 B2

5'

AAAAACCACC GTTGTATTC AACTACAAGA ACCCTAATGG CCAGCCTCCG *Mnl I*  
AAAAACCCAC CCCCTCCTAA AGATCGCTAA TGATGCATTA GTAGACCTCC *Mnl I*  
CTGCC CCCCTC CAACATCTCC ACATGATGAA ACTTTGGATC TCTCCTAGGC *Mnl I*  
CTCTGTCTAG CCGCCCAAAT CTTAACAGGA CTATTCTAG CAATACACTA *Bfa I*  
ACCGCAAAC GTCGAAATAG CCTTCTCATC AGTTGTACAC ATCTGCCGTG *Afa I*  
ACGTAAATTA CGGATGACTA ATTGCAATA TACACGCCAA CGGCGCCTCC *Mnl I*  
TTCTTCTTTA TCTGCCTCTA CCTACACATC GCACGAGGTC TGTACTACGG *Mnl I*  
CTCCTACCTG TTTATGGAAA CCTGAAACAT CGGAGTCGTA CTCTCCCTCC *Mnl I*  
TAGTAATAAT AACCGCCTTC GTAGGTTACG TTCTACCCAGGACAAATG *Mnl I*  
TCATTCTGAG GCGC 3'

Figura 14

5'

AAAAACCACC GTTGTATTC AACTACAAGA ACCCTAATGG CCAGCCTCCG *Mnl I*  
AAAAACCCAC CCCCTCCTAA AGATCGCTAA TGACGCATTA GTAGACCTGC *Mnl I*  
CTGCC CCCCTC CAACATCTCG ACATGATGAA ACTTTGGTC TCTTTAGGC *Mnl I*  
CTCTGTCTAG CCGCCCAAAT CCTAACAGGA CTATTTTAG CAATACACTA *Bfa I*  
ACCGCAAAC GTCGAAATAG CCTTCTCATC CGTCGTACAC ATCTGCCGCG *Afa I*  
ACGTAAATTA TGGATGACTA ATTGCAACA TACACGCCAA CGGCGCCTCC *Mnl I*  
TTCTTCTTTA TCTGCCTCTA CATACACATC GCACGAGGCC TATACTACGG *Mnl I*  
CTCCTACCTA TTTATGGAAA CCTGAAACAT TGGGGTCGTA CTCTTCTCC *Afa I*  
TAGTTATAAT AACCGCCTTC GTAGGCTACG TCCTCCCAGGACAAATG *Mnl I* *Mnl I*  
TCATTCTGAG GCGC 3'

Figura 15

5'

AAAAACCACC GTTGTATTACACTACAAGA ACCTTAATGG CCAGCCTTCG  
 GAAAACCCAT CCAATCCTAA AAATTGCTAA TAGCGCATTA GTTGATCTCC  
*Mnl* I CCGCCCCCTC CAATATCTCA GTATGATGAA ATTTGGGCTC TCTTCTAGGC  
*Bfa* I CTTTGCTTAA TTACTCAACT TCTAACAGGA CTATTTCTAG CCATACACTA  
*Mnl* I TACCTCAGAC ATCGAGACAG CCTTCTCATC CGTAGTCCAC ATCTGTCGTG  
*Mnl* I ATGTAAACTA CGGCTGACTA ATTGGAAATA TACATGCTAA TGTTGCCTCT  
*Mnl* I TTCTTTTCA TTTGTCTTTA TATGCACATT GCCCGAGGTC TCTATTATGG  
 TTCCTATCTT TTTGTAGAGA CATGAAACAT CGGGGTTGTC CTTTCCCTT  
*Mnl* I *Mnl* I *Mnl* I TAGTAATAAT AACCTCTTTC GTAGGTTATG TCCTCCCTG AGGACAAATA  
Mnl I TCATTCTGAG GAGC 3'

Figura 16

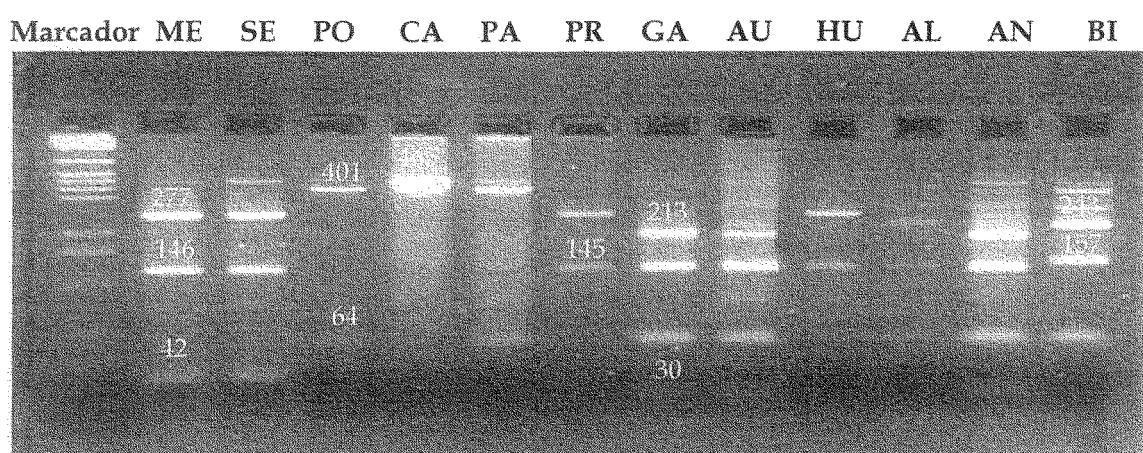


Figura 17

ES 2 237 271 B2

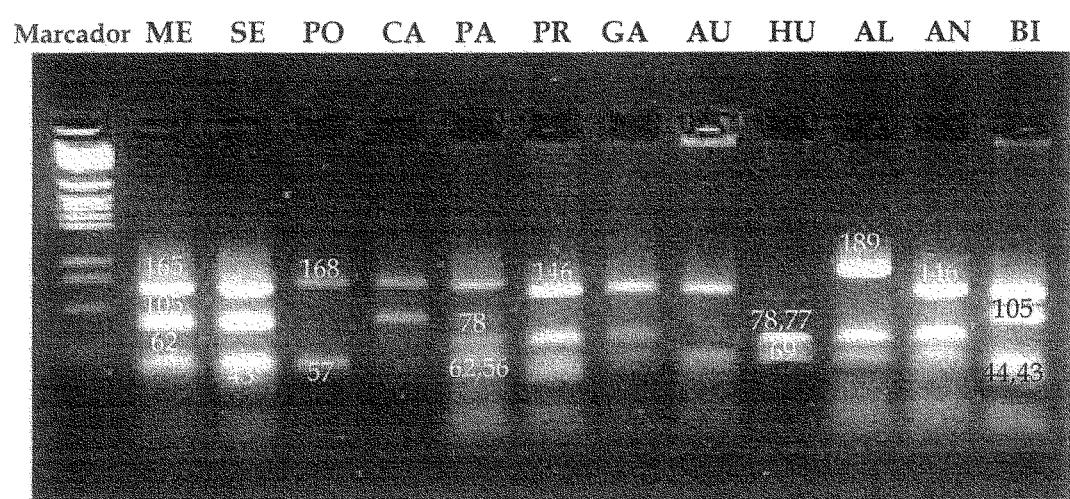


Figura 18

ES 2 237 271 B2

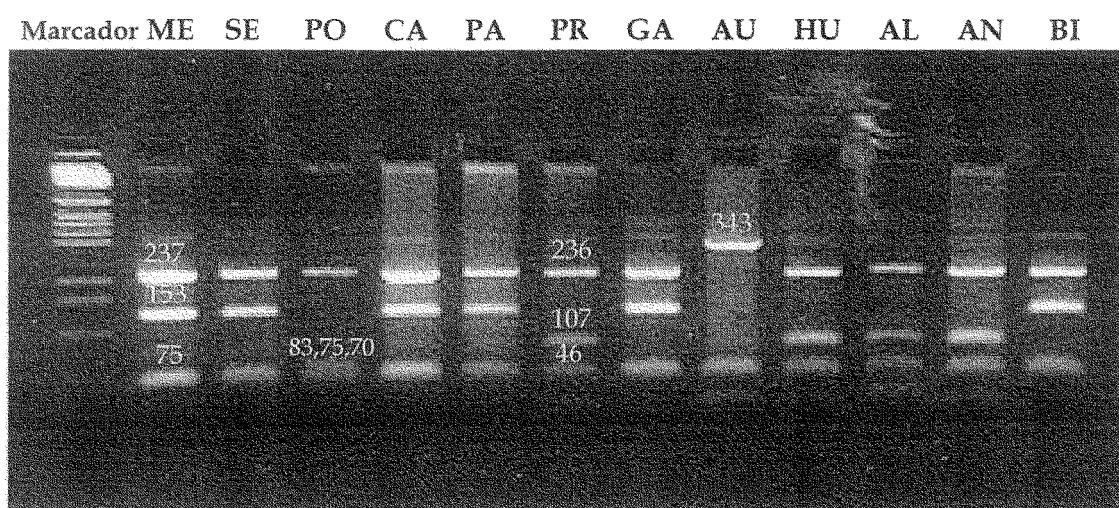


Figura 19

## ES 2 237 271 B2

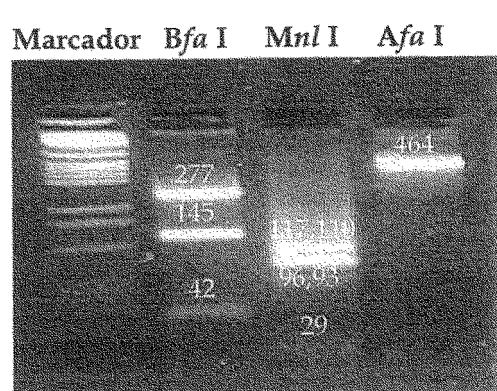


Figura 20

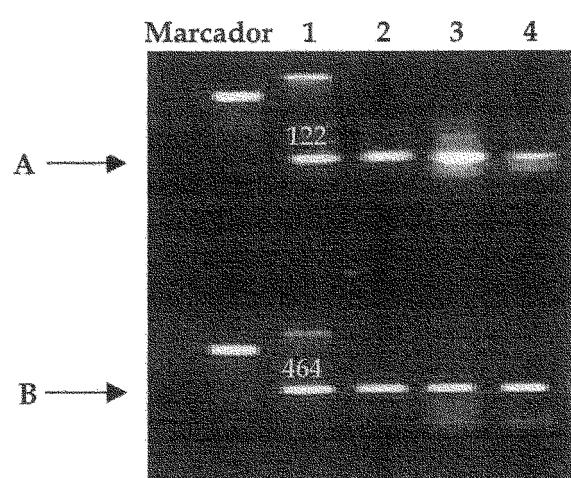


Figura 21

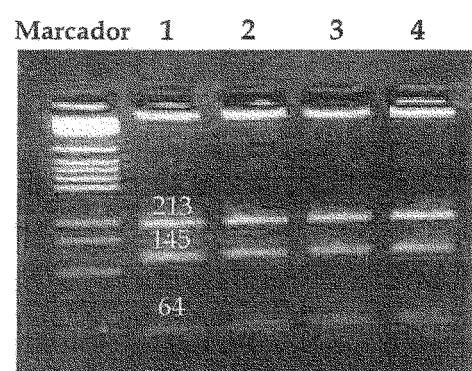


Figura 22

ES 2 237 271 B2

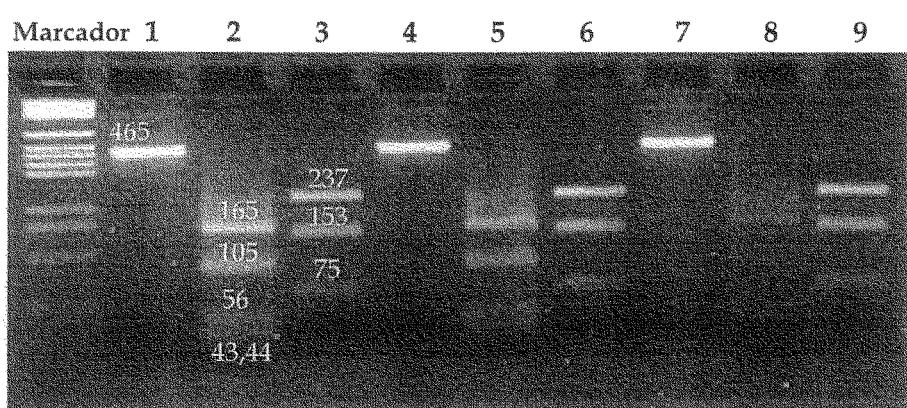


Figura 23

# ES 2 237 271 B2

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Vigo

5 <120> Procedimiento para la identificación genética de todas las especies mundiales de merluza, *Merluccius spp.*, en  
productos comerciales.

10 <130> mpmercyyt.doc

15 <160> 15

<170> PatentIn version 3.1

20 <210> 1  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> *Merluccius spp*

25 <400> 1

25 accgcaaacg tcgaaat 17

30 <210> 2  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> *Merluccius spp*

35 <400> 2

35 aggttagaggc agataaagaa gaa 23

40 <210> 3  
<211> 465  
<212> DNA  
<213> *Merluccius merluccius*

45 <220>  
<221> gene  
<222> (1)..(37)

50 <223> Extremo 3' parcial del gen mitocondrial tRNA-Glu

55 <220>  
<221> gene  
<222> (38)..(465)

55 <223> Extremo 5' parcial del gen mitocondrial del citocromo *b*

60

65

## ES 2 237 271 B2

<400> 3

aaaaaccacc gttgttattc aactacaaga acccttaatg gccagcctcc gaaaaactca 60  
5 tccccttcta aagattgcta atgatgcatt agtagacctt cctgccccct ctaacctctc 120  
aacattatga aacttcgggt ctctcctagg cctctgctta gccgccccaaa tcttaacagg 180  
10 gctatttcta gcgatacatt ataccgcaaa cgctcgagata gctttctcat ccgtcgtaca 240  
catctgcccgc gacgtaaatt acggatgact aatccgcaac atacacgcca acggcgcttc 300  
15 tttcttcttc atctgcctct acctacacat tgcacgaggc ctatattacg gtcctactt 360  
attcatagag acctgaaaca ttggagttgt actattcctt ttagtaataa tgaccgcctt 420  
20 cgtaggctac gtcctccctt gaggacaaat atcattctga ggcgc 465

<210> 4

<211> 465

<212> DNA

25 <213> *Merluccius senegalensis*

<220>

30 <221> gene

<222> (1)..(37)

<223> Extremo 3' parcial del gen mitocondrial tRNA-Glu

35 <220>

<221> gene

<222> (38)..(465)

<223> Extremo 5' parcial del gen mitocondrial del citocromo *b*

40 <400> 4

45 aaaaaccacc gttgttattc aactacaaga acccttaatg gccagcctcc gaaaaactca 60  
tccccttcta aagattgcta atgatgcatt agtagacctt cctgccccct ctaacatctc 120  
aacattatga aacttcgggt ctctcctagg cctctgctta gccgccccaaa tcttaacagg 180  
50 gctgtttcta gcaatacatt ataccgcaaa cgctcgaaata gctttctcat ccgtcgtaca 240  
catctgcccgc gacgtaaatt acggatgact aatccgcaac atacacgcca acggcgcttc 300  
55 tttcttcttc atctgcctct acctacacat tgcacgaggc ctatattacg gtcctactt 360  
attcatagag acctgaaaca ttggagttgt actattcctt ttagtaataa tgaccgcctt 420  
60 cgtaggctac gtcctccctt gaggacaaat atcattctga ggcgc 465

<210> 5

<211> 465

65 <212> DNA

<213> *Merluccius polli*

## ES 2 237 271 B2

<220>  
<221> gene  
<222> (1)..(37)  
5 <223> Extremo 3' parcial del gen mitocondrial tRNA-Glu

<220>  
<221> gene  
10 <222> (38)..(465)  
<223> Extremo 5' parcial del gen mitocondrial del citocromo *b*

15 <400> 5

	aaaaaccacc gttgttattc aactacaaga acccttaatg gccagcctcc gaaaaactca	60
20	tcccccctcta aagattgcta atgatgcatt agtagacctt cctgccccct ctaacatctc	120
	aacattatga aacttcgggt ctctcctagg cctctgctta gccgccccaaa tcttaacagg	180
25	gctgtttctta gcaatacatt ataccgcaaa cgtcgaaata gctttctcat ccgtcgtaca	240
	catctgccgc gacgtaaatt acggatgact aatccgcaac atacacgcca acggcgcttc	300
	tttcttcttc atctgcctct acctacacat tgcacgaggc ctatattacg gtcctacttt	360
30	attcatagag acctgaaaca ttggagttgt actattcctt ttagtaataa tgaccgcctt	420
	cgtaggctac gtcctccctt gaggacaaat atcattctga ggcgc	465

35 <210> 6  
<211> 465  
<212> DNA  
40 <213> *Merluccius capensis*

<220>  
<221> gene  
45 <222> (1)..(37)  
<223> Extremo 3' parcial del gen mitocondrial tRNA-Glu

<220>  
50 <221> gene  
<222> (38)..(465)  
<223> Extremo 5' parcial del gen mitocondrial del citocromo *b*

55

60

65

## ES 2 237 271 B2

<400> 6

5       aaaaaccacc gttgttattc aactacaaga acccttaatg gccagcctcc gaaaaactca       60  
      tcccctccta aagattgcta atgatgcatt agtagacctt cctgccccct ccaacatctc       120  
      aacatgatga aactttgggt ctctcttagg cctctgctta gccgccccaa tcttaacagg       180  
10      cttatttctg gcgatacact acaccgcaaa cgtcgaaata gcttctcat ccgtcgtaca       240  
      catctgccgc gacgtaaatt acggatgact aatccgcaac atacacgcca acggcgcttc       300  
15      tttcttcttc atctgcctct acctgcacat tgcacgaggc ctatattacg gctcttactt       360  
      atttatagag acctgaaaca tcggggttgt actgttcctt ttagtaataa tgaccgcctt       420  
20      cgtaggttac gtcctccctt gaggacaaat gtcattctga ggcgc       465

<210> 7

<211> 465

25 <212> DNA

<213> *Merluccius paradoxus*

<220>

30 <221> gene

<222> (1)..(37)

<223> Extremo 3' parcial del gen mitocondrial tRNA-Glu

35 <220>

<221> gene

<222> (38)..(465)

40 <223> Extremo 5' parcial del gen mitocondrial del citocromo *b*

<400> 7

45       aaaaaccacc gttgttattc aactacaaga acccttaatg gccagcctcc gaaaaactca       60  
      tcccctccta aagattgcta atgatgcatt agtagacctt cctgccccct ccaacatctc       120  
      aacatgatga aactttgggt ctctcttagg cctctgctta gccgccccaa tcttaacagg       180  
50      cttatttctg gcgatacact acaccgcaaa cgtcgaaata gcttctcat ccgtcgtaca       240  
      catctgccgc gacgtaaatt acggatgact aatccgcaac atacacgcca acggcgcttc       300  
55      tttcttcttc atctgcctct acctgcacat tgcacgaggc ctatattacg gctcttactt       360  
      atttatagag acctgaaaca tcggggttgt actgttcctt ttagtaataa tgaccgcctt       420  
60      cgtaggttac gtcctccctt gaggacaaat gtcattctga ggcgc       465

<210> 8

<211> 464

65 <212> DNA

<213> *Merluccius productus*

## ES 2 237 271 B2

<220>  
<221> gene  
<222> (1)..(36)

5 <223> Extremo 3' parcial del gen mitocondrial tRNA-Glu

<220>  
<221> gene  
10 <222> (37)..(464)

<223> Extremo 5' parcial del gen mitocondrial del citocromo *b*

15 <400> 8

	aaaaaccacc	gttgttattc	aactacaaga	accctaattgg	ccagcctccg	aaaaaccac	60
20	ccctcctaa	agatcgctaa	tgtatgcatta	gttagacctcc	ctgccccctc	caacatctcc	120
	acatgatgaa	actttgggtc	tctccttaggc	ctctgtctag	ccgccccaaat	cttaacagga	180
25	ctatttctag	caatacacta	caccgcaaaac	gtcgaaatag	ccttctcatc	agttgtacac	240
	atctgccgtg	acgtaaattt	cgggtgacta	attcgcaata	tacacgccaa	cggcgctcc	300
30	ttcttcttta	tctgcctcta	cctacacatc	gcacgaggc	tgtactacgg	ctcctacctg	360
	tttatggaaa	cctgaaacat	cggagtcgta	ctcttcctcc	tggtaataat	aaccgccttc	420
	gttaggttacg	ttctaccctg	aggacaaatg	tcattctgag	gcgc		464

35 <210> 9  
<211> 464  
<212> DNA

40 <213> *Merluccius gayi*

<220>  
<221> gene  
45 <222> (1)..(36)

<223> Extremo 3' parcial del gen mitocondrial tRNA-Glu

<220>  
50 <221> gene  
<222> (37)..(464)

<223> Extremo 5' parcial del gen mitocondrial del citocromo *b*

55

60

65

# ES 2 237 271 B2

<400> 9

5	aaaaaccacc gttgttattc aactacaaga accctaattgg ccagcctccg aaaaaccac	60
	ccccctctaa agatcgctaa ttagatgcatta gtagacctcc ctgccccctc caacatctcc	120
	acatgtatgaa actttgggtc ttccttaggc ctctgtctag ccggccaaat cttaacagga	180
10	ctatttctag caatacacta caccgcaaac gtcgaaatag ctttctcatc agttgtacac	240
	atctgcccgtg acgttaaattta cggatggcta attcgcaata tacacgccaa cggcgccctcc	300
15	ttcttcctta tctgcctcta cctacacatc gcacgaggc tatactacgg ctcctacctg	360
	tttatggaaa cctgaaacat cggagttgtta ctttcctcc tagtaataat aaccgccttc	420
20	gtaggttacg tcctaccctg aggacaaatg tcattctgag gcgc	464

<210> 10

<211> 464

25 <212> DNA

<213> *Merluccius australis*

<220>

30 <221> gene

<222> (1)..(36)

<223> Extremo 3' parcial del gen mitocondrial tRNA-Glu

35 <220>

<221> gene

<222> (37)..(464)

40 <223> Extremo 5' parcial del gen mitocondrial del citocromo *b*

<400> 10

45	aaaaaccacc gttgttattc aactacaaga accctaattgg ccagcctccg aaaaaccac	60
	ccccctctga agatcgctaa ttagatgcatta gtagacctcc ctgccccctc caacatctca	120
	gcacatgtatgaa actttgggtc ttccttaggc ctctgtctag ccggccaaat cttaacagga	180
50	ctatttctag caatacacta caccgcaaac gtcgaaatag ctttctcatc cggtgttcac	240
	atctgcccgtg acgttaaattta tgggtgacta attcgcaata tacacgccaa cggcgccctcc	300
55	ttcttcctta tctgcctcta cctacacatc gcacgaggc tatactacgg ctcctacctg	360
	tttatggaaa cctgaaacat cggagttgtta ctttcctcc tagtaataat aaccgccttc	420
60	gtaggttacg ttctccctg aggacaaata tcattctgag gcgc	464

<210> 11

<211> 464

65 <212> DNA

<213> *Merluccius hubbsi*

## ES 2 237 271 B2

<220>  
<221> gene  
<222> (1)..(36)

5 <223> Extremo 3' parcial del gen mitocondrial tRNA-Glu

<220>  
<221> gene  
10 <222> (37)..(464)

<223> Extremo 5' parcial del gen mitocondrial del citocromo *b*

15 <400> 11

	aaaaaccacc gttgttattc aactacaaga accctaattgg ccagcctccg aaaaacccac	60
20	cccttctaa agatcgctaa tggatgcggta gtagacctcc ctgccccttc caacatctcg	120
	acatgatgaa actttgggtc tctccttaggc ctctgtctag ccggccaaat ctttaacagga	180
25	ctatttctag caatacacta caccgcaaac gtcgaaatag ctttctcctc cggtgtacac	240
	atctggcgcg acgtaaatata cggtatgacta attcgcaaca tacacgcca cggcgccctcc	300
	ttcttcttta tctgcctcta cctacacatc gcacgaggcc tggactacgg ctccctacctg	360
30	tttatggaga cctgaaatata cgagtcgta ctttcctcc tggtaatagt caccgccttc	420
	gtaggctacg ttctccctg aggacaaata tcattctgag gcgc	464

35 <210> 12  
<211> 464  
<212> DNA  
<213> *Merluccius albidus*

40

<220>  
<221> gene  
<222> (1)..(36)

45 <223> Extremo 3' parcial del gen mitocondrial tRNA-Glu

<220>  
50 <221> gene  
<222> (37)..(464)

<223> Extremo 5' parcial del gen mitocondrial del citocromo *b*

55

60

65

## ES 2 237 271 B2

<400> 12

5       aaaaaccacc gttgttattc aactacaaga accctaattgg ccagcctccg aaaaaccac       60  
      cccctcctaa agatcgctaa tgacgcatta gtagacctcc ctgccccctc caacatctcg       120  
      acatgatgaa actttgggtc tcttcttaggc ctttgtctag cggcccaaatt cctaacagga       180  
10      ctatTTTtag caatacacta caccgcaaacc gtcgaaatag ctttctcatc cgtcgtacac       240  
      atctgcccgcg acgtaaatTTA tggatgacta attcgcaaca tacacgccaa cggcgccctcc       300  
15      ttcttcttta tctgcctcta catacacatc gcacgaggcc tgtactacgg ctcctaccta       360  
      tttatggaga cctgaaacat cggagtcgta ctcttcctcc tagttataat gaccgccttc       420  
20      gtaggctacg ttctccctg aggacaaatg tcattctgag gcgc       464

<210> 13

<211> 464

25 <212> DNA

<213> *Merluccius angustimanus*

<220>

30 <221> gene

<222> (1)..(36)

<223> Extremo 3' parcial del gen mitocondrial tRNA-Glu

35 <220>

<221> gene

<222> (37)..(464)

40 <223> Extremo 5' parcial del gen mitocondrial del citocromo *b*

<400> 13

45       aaaaaccacc gttgttattc aactacaaga accctaattgg ccagcctccg aaaaaccac       60  
      cccctcctaa agatcgctaa tgatgcatta gtagacctcc ctgccccctc caacatctcc       120  
      acatgatgaa actttggata tctccttaggc ctctgtctag cggcccaaatt ctttaacagga       180  
50      ctatTTTctag caatacacta caccgcaaacc gtcgaaatag ctttctcatc agttgtacac       240  
      atctgcccgtg acgtaaatTTA cggatgacta attcgcaata tacacgccaa cggcgccctcc       300  
      ttcttcttta tctgcctcta cttacacatc gcacgaggcc tgtactacgg ctcctacctg       360  
      tttatggaaa cctgaaacat cggagtcgta ctcttcctcc tagtaataat aaccgccttc       420  
60      gtaggttacg ttctaccctg aggacaaatg tcattctgag gcgc       464

<210> 14

65 <211> 464

<212> DNA

<213> *Merluccius bilinearis*

## ES 2 237 271 B2

<220>  
<221> gene  
<222> (1)\_(36)

5 <223> Extremo 3' parcial del gen mitocondrial tRNA-Glu

<220>  
<221> gene  
10 <222> (37)..(464)

<223> Extremo 5' parcial del gen mitocondrial del citocromo *b*

15 <400> 14

	aaaaaccacc gttgttattc aactacaaga accctaattgg ccagcctccg aaaaacccac	60
20	ccccctctaa agatcgctaa tgacgcatta gtagacctgc ctgccccctc caacatctcg	120
	acatgatgaa actttgggtc tcttttaggc ctctgtctag cggcccaaatt cctaacagga	180
25	ctatTTTtag caatacacta caccgcaaac gtcgaaatag ctttctcatc cgtcgtacac	240
	atctgcccg acgtaaatata tggatgacta attcgcaaca tacacgcca cggcgccctcc	300
	ttcttcttta tctgcctcta catacacatc gcacgaggcc tatactacgg ctccctaccta	360
30	tttatggaaa cctgaaacat tgggtcgta ctcttctcc tagttataat gaccgccttc	420
	gtaggctacg tcctccctg aggacaaatg tcattctgag gcgc	464

35 <210> 15  
<211> 464  
<212> DNA  
40 <213> *Gadus morhua*

<220>  
<221> gene  
45 <222> (1)\_(36)

<223> Extremo 3' parcial del gen mitocondrial tRNA-Glu

<220>  
50 <221> gene  
<222> (37)..(464)

<223> Extremo 5' parcial del gen mitocondrial del citocromo *b*

55

60

65

## ES 2 237 271 B2

<400> 15

5	aaaaaccacc gttgttattc aactacaaga accttaatgg ccagccttcg gaaaaccat	60
	ccaatcctaa aaattgctaa tagcgcatta gttgatctcc ccgccccctc caatatctca	120
	gtatgatgaa attttggctc tcttcttaggc ctttgcttaa ttactcaact tctaacagga	180
10	ctatttctag ccatacacta tacctcagac atcgagacag ccttctcatc cgtagtccac	240
	atctgtcgtg atgtaaacta cggtctgacta attcggaaata tacatgctaa tggtgccctct	300
15	ttcttttca tttgtcttta tatgcacatt gcccgaggc tctattatgg ttcctatctt	360
	tttgttagaga catgaaacat cgggggtgtc ctttccttt tagtaataat aacctcttc	420
20	gtaggtttag tcctcccctg aggacaaata tcattctgag gagc	464

25

30

35

40

45

50

55

60

65



## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.7:** C12Q 1/68, G01N 33/12, C07H 21/00

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	QUINTEIRO J. et al. "Identification of Hake species ( <i>Merluccius</i> Genus) using sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA control region sequences". <i>J. Agric. Food Chem.</i> , 2001 Nov., 49 (11):5108-14. Citado en la solicitud.	1-4
A	WOLF C. et al. "PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification". <i>J. Agric. Food Chem.</i> , 1999 Abr., 47 (4):1350-5.	1-4
A	MEYER R. et al. "Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food". <i>J. AOAC Int.</i> , 1995 Nov.-Dic., 78 (6):1542-51.	1.4
A	WO 02101091 A2 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 19.02.2002	1-4

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 31.05.2005	Examinador M. Hernández Cuéllar	Página 1/1
--	------------------------------------	---------------