



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 237 271**

⑫ Número de solicitud: 200300651

⑬ Int. Cl.

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/12** (2006.01)

**C07H 21/00** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

② Fecha de presentación: **20.03.2003**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2005**

Fecha de la concesión: **02.03.2006**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.04.2006**

⑥ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**01.04.2006**

⑦ Titular/es: **Univesidade de Vigo**  
**Oporto, nº 1**  
**36201 Vigo, Pontevedra, ES**

⑧ Inventor/es: **Pérez Rodríguez, Montserrat;**  
**Vieites Baptista de Sousa, Juan Manuel y**  
**Presa Martínez, Pablo**

⑨ Agente: **No consta**

⑩ Título: **Procedimiento para la identificación genética de todas las especies mundiales de merluza, *Merluccius spp.*, en productos comerciales.**

⑪ 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.

ES 2 237 271 B2

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.

## 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

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.

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).

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)*

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
<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
<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
<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 procesos 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. polli*, *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

**Burgener, M. 1997.** Molecular species differentiation of fish and mammals. Thesis, University of Bern, Switzerland.

**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.

**Inada 1981.** Studies on Merlucüd fish. Bulletin Far Seas Fisheries Research Laboratory, Shimizu, Japan 18: 1-172.

**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.

**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.

**Piñeiro C., Vázquez J., Marina A. I., Barros-Velázquez J., and Gallardo J. M. 2001.** Characterization and partial sequencing of species-specific polypeptides from commercial hake species by mass spectrometry following two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 22: 1545-1552.

**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.

**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.

## Explicación de la invención

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 australes*, *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 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.

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), 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.

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 Quinteiro *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 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 de Quinteiro *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 Quinteiro *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

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 australes*, *Merluccius hubbsi*, *Merluccius albidus*, *Merluccius angustimanus*, *Merluccius bilinearis*, y *Gadus morhua*), ya sean productos frescos, congelados, ultracongelados y/ o procesados.

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

### Metodología

- 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.
- 4.- Comprobación de la correcta amplificación de dicho fragmento.
- 5.- Amplificación de un fragmento de 464 165 pb del citocromo *b* del ADN mitocondrial
- 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)<sub>6</sub>! y GT!AC/CA!TG.

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:

#### 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.

#### 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.

#### 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

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)).

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:

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.

#### 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 Etidio 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 pb entonces podemos asegurar que hay ADN mitocondrial de merluza o bacalao en la muestra.

#### 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.

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

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 Etidio 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).

#### 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)<sub>6</sub>! 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

## ES 2 237 271 B2

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 15 *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.

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 20 enzima reconoce la secuencia

CCTC(N<sub>7</sub>)/GGAG(N)<sub>6</sub>!, 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, 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.

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. 35

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. 40

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). 45

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 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. 55

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. 60 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

## ES 2 237 271 B2

distinguir la 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.
- 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.
- 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.
- f) Digestión de los amplicones con enzimas de restricción que reconozcan las dianas C!TAG/GAT!C, CCTC(N)<sub>7</sub>!/GGAG(N)<sub>6</sub>! 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)<sub>6</sub>!, 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.

### 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.

#### 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.

## ES 2 237 271 B2

### 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.

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.

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%.

### 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).

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  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  a 10 mM (para una concentración final de 2 mM de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ ) y 15,75  $\mu$ L de  $\text{H}_2\text{O}$  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.

### 3.- Comprobación de la correcta amplificación

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.

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

### 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.

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  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  a 10 mM (para una concentración final de 2 mM de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ ) y 15,75  $\mu$ L, de  $\text{H}_2\text{O}$  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.

### 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).

### 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).

### 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

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: 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, 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.

#### Ejemplo 2

##### Control de fraude al consumidor

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

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 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.

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.

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

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  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  a 10 mM (para una concentración final de 2 mM de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ ) y 15,75  $\mu$ L de  $\text{H}_2\text{O}$  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.

#### 3.- Comprobación de la correcta amplificación

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.

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

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*

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.

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.

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 µL de la disolución de Chelex al 10% (caliente y en agitación) y 5 µL 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.

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%.

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 µM) 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 0,2 mL. Se mezclaron: 5 µL de ADN extraído con Chelex, 20 pmol de cada cebador, 1,25 µL de Cl<sub>2</sub>Mg a 10mM (para una concentración final de 2 mM de Cl<sub>2</sub>Mg) y 15,75 µL de H<sub>2</sub>O para ajustar el volumen final de la reacción a 25 µL. 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.

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 µL de Bromuro de Etidio (10 mg/mL). Se visualizaron 15 µL 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.

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

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

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

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 µL de ADN extraído con Chelex, 20 pmol de cada cebador, 1,25 µL 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 µL de H<sub>2</sub>O para ajustar el volumen final de la reacción a 25 µL. 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.

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 µL de Bromuro de Etidio a 10 mg/mL. Se visualizaron 5 µL 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 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, *Mnl* I y *Afa* I. La digestión se realizó en tubos de ensayo de 1,5 mL. Se mezclaron 5 µL, del fragmento purificado, 2 µL del tampón adecuado para cada enzima, 5 U de enzima y se completó el volumen hasta 20 µL. con agua pura. Las reacciones de digestión se incubaron durante toda la noche a 37°C al baño María.

## 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 µL de Bromuro de Etidio (10 mg/mL).

En cada pocillo se cargó toda la reacción de restricción mezclado con 3 µL de tampón de carga y 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 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.

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.

## 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.

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 = *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*.

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).

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)<sub>6</sub>!) 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.

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)<sub>6</sub>!) 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.

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)<sub>7</sub>!/GGAG(N)<sub>6</sub>!) 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

## ES 2 237 271 B2

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 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.

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 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 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 merluzas y en bacalao.

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 merluzas y en bacalao.

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 merluzas y en bacalao.

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.

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.

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.

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.

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 = *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.

10

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 = *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 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 = *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.

20

25

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.

30

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.

35

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.

40

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.

45

50

55

60

65

# REIVINDICACIONES

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

- a) Obtención de una muestra a ensayar.
- 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 SEC ID NO 1 y SEC ID NO 2.
- d) Comprobación de la amplificación del fragmento de 122 pb mediante electroforesis.
- 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.
- 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)<sub>6</sub>! y GT!AC/CA!TG,
- 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* productos 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)<sub>7</sub>!/GGAG(N)<sub>6</sub>!, 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)<sub>6</sub>! 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.

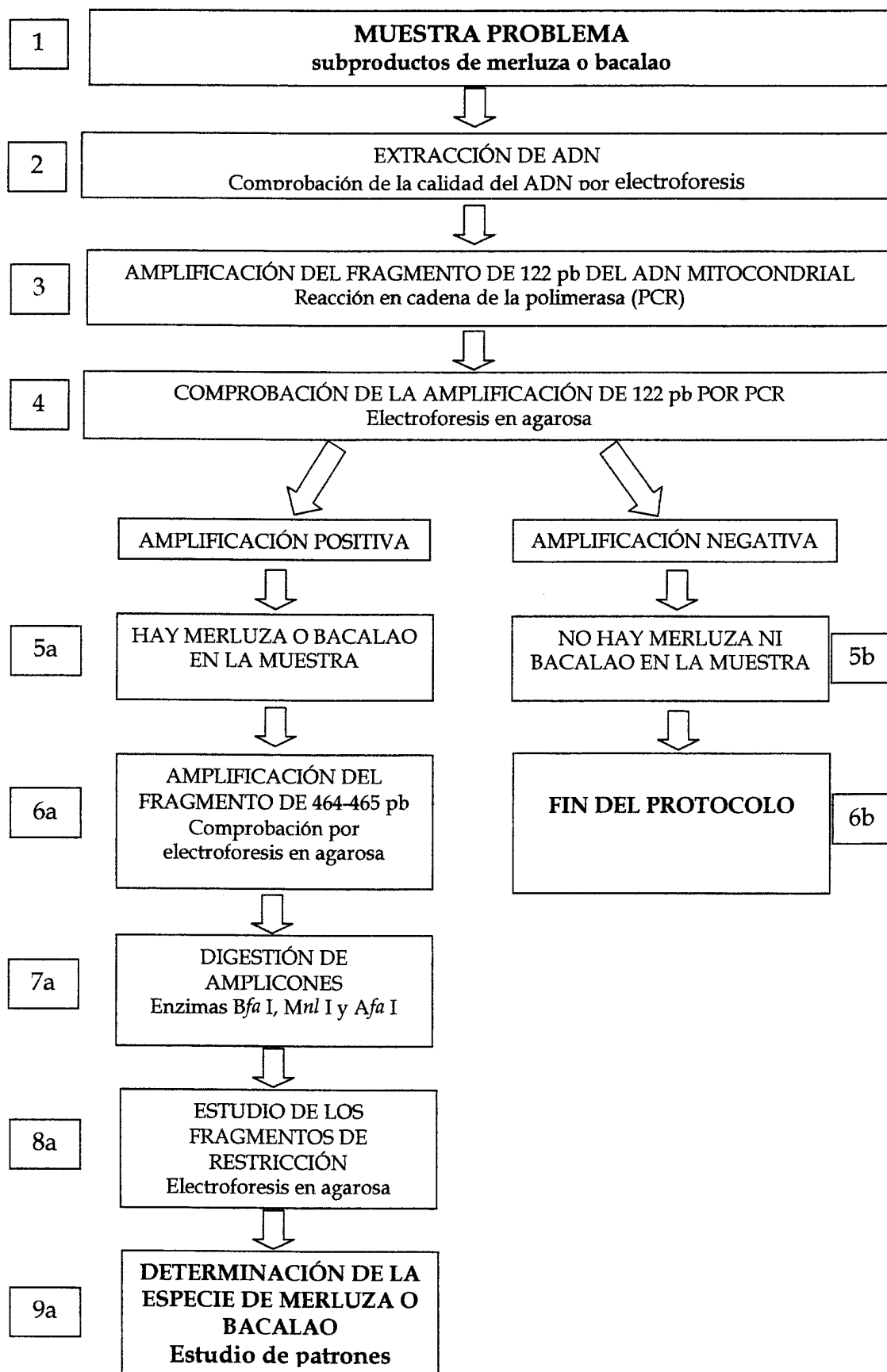


Figura 1

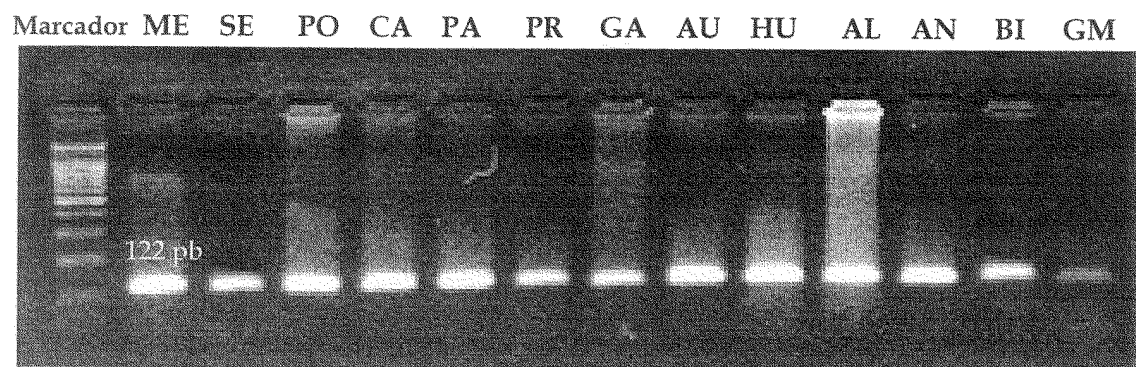


Figura 2



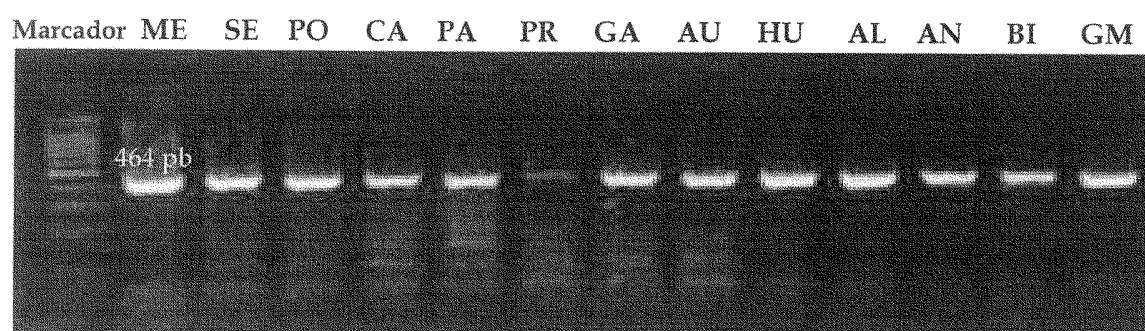


Figura 3

# ES 2 237 271 B2

5'

AAAAACCACC GTTGTTATTC AACTACAAGA ACCCTTAATG <sup>Mnl</sup>I GCCAGCCTCC  
 GAAAAACTCA TCCCCTTCTA AAGATTGCTA ATGATGCATT AGTAGACCTT  
 CCTGCCCCCT <sup>Mnl</sup>I CTAACCTCTC <sup>Mnl</sup>I AACATTATGA AACTTCGGGT <sup>Bfa</sup>I CTCTCCTAGG  
 CCTCTGCTTA <sup>Mnl</sup>I GCCGCCCAA TCTTAACAGG <sup>Bfa</sup>I GCTATTCTA GCGATACATT  
 ATACCGCAAA CGTCGAGATA <sup>Afa</sup>I GCTTTCTCAT CCGTCGTACA CATCTGCCGC  
 GACGTAAATT ACGGATGACT AATCCGCAAC ATACACGCCA ACGGCGCTTC  
 TTTCTTCTTC <sup>Mnl</sup>I ATCTGCCTCT ACCTACACAT <sup>Mnl</sup>I TGCACGAGGC CTATATTACG  
 GCTCCTACTT ATTCATAGAG ACCTGAAACA TTGGAGTTGT <sup>Afa</sup>I ACTATTCCTT  
 TTAGTAATAA TGACCGCCTT CGTAGGCTAC <sup>Mnl</sup>I GTCCTCCCTT <sup>Mnl</sup>I GAGGACAAAT  
 ATCATTCTGA <sup>Mnl</sup>I GCGC 3'

Figura 4

5'

AAAAACCACC GTTGTTATTC AACTACAAGA ACCCTTAATG <sup>Mnl</sup>I GCCAGCCTCC  
 GAAAAACTCA TCCCCTTCTA AAGATTGCTA ATGATGCATT AGTAGACCTT  
 CCTGCCCCCT <sup>Mnl</sup>I CTAACATCTC <sup>Bfa</sup>I AACATTATGA AACTTCGGGT CTCTCCTAGG  
 CCTCTGCTTA <sup>Mnl</sup>I GCCGCCCAA TCTTAACAGG <sup>Bfa</sup>I GCTGTTTCTA GCAATACATT  
 ATACCGCAAA CGTCGAAATA <sup>Afa</sup>I GCTTTCTCAT CCGTCGTACA CATCTGCCGC  
 GACGTAAATT ACGGATGACT AATCCGCAAC ATACACGCCA ACGGCGCTTC  
 TTTCTTCTTC <sup>Mnl</sup>I ATCTGCCTCT ACCTACACAT <sup>Mnl</sup>I TGCACGAGGC CTATATTACG  
 GCTCCTACTT ATTCATAGAG ACCTGAAACA TTGGAGTTGT <sup>Afa</sup>I ACTATTCCTT  
 TTAGTAATAA TGACCGCCTT CGTAGGCTAC <sup>Mnl</sup>I GTCCTCCCTT <sup>Mnl</sup>I GAGGACAAAT  
 ATCATTCTGA <sup>Mnl</sup>I GCGC 3'

Figura 5

5'

AAAAACCACC GTTGTTATTC AACTACAAGA ACCCTTAATG GCCAGCCTCC <sup>Mnl</sup>I

GAAAAACTCA <sup>Mnl</sup>I CCTCTTCTA AAGATTGCTA ATGATGCATT AGTAGACCTT

<sup>Mnl</sup>I CCTGCCCCCT CCAACATCTC AACATGATGA AACTTTGGGT CTCTTTTAGG

<sup>Mnl</sup>I CCTCTGCTTA GCCGCCCAA TCTTAACAGG ACTATTTTGA GCAATACACT

AT ACCGCAAA CGTCGAAATA <sup>Afa</sup>I GCCTTCTCAT CCGTCGTACA CATCTGCCGC

GACGTAAATT ACGGATGACT AATTCGCAAC ATGCACGCCA ACGGTGCTTC

<sup>Afa</sup>I TTTCTTCTTC ATCTGCCTGT ACCTACACAT <sup>Mnl</sup>I <sup>kn</sup>I TGCACGAGGC CTCTACTACG

GCTCTTACTT ATTTATAGAG ACCTGAAACA TCGGCGTTGT <sup>Afa</sup>I <sup>Mnl</sup>I ACTATTCCTC

<sup>Bfa</sup>I CTAGTAATAA TAACCGCTTT CGTAGGCTAT <sup>Mnl</sup>I <sup>kn</sup>I GTCCTCCCCT GAGGACAAAT

<sup>Mnl</sup>I ATCATTCTGA GGCGC 3'

Figura 6

5'

AAAAACCACC GTTGTTATTC AACTACAAGA ACCCTTAATG GCCAGCCTCC <sup>Mnl</sup>I

GAAAAACTCA <sup>Mnl</sup>I TCCCCTCCTA AAGATTGCTA ATGATGCATT AGTAGACCTT

<sup>Mnl</sup>I CCTGCCCCCT CCAACATCTC AACATGATGA AACTTTGGGT CTCTCTTAGG

<sup>Mnl</sup>I CCTCTGCTTA GCCGCCCAA TCTTAACAGG CTTATTTCTG GCGATACACT

AC ACCGCAAA CGTCGAAATA <sup>Afa</sup>I GCTTTCTCAT CCGTCGTACA CATCTGCCGC

GACGTAAATT ACGGATGACT AATCCGCAAC ATACACGCCA ACGGCGCTTC

<sup>Mnl</sup>I TTTCTTCTTC ATCTGCCTCT ACCTGCACAT <sup>Mnl</sup>I TGCACGAGGC CTATATTACG

GCTCTTACTT ATTTATAGAG ACCTGAAACA TCGGGGTTGT <sup>Afa</sup>I ACTGTTCCCT

TTAGTAATAA TGACCGCCTT CGTAGGTTAC <sup>Mnl</sup>I <sup>Mnl</sup>I GTCCTCCCCT GAGGACAAAT

<sup>Mnl</sup>I GTCATTCTGA GGCGC 3'

Figura 7

# ES 2 237 271 B2

5'

AAAAACCACC GTTGTTATTC AACTACAAGA ACCCTTAATG MnlI GCCAGCCTCC  
 GAAAAACTCA TCCCCTTCTA AAGATTGCTA ATGATGCATT AGTAGACCTT  
 CCTGCCCCCT MnlI CCAACATCTC AACATTATGA AACTTTGGGT CTCTCTTAGG  
 CCTCTGCTTA MnlI GCCGCCCAA TCTTAACAGG ACTATTTCTA GCAATACACT  
 ACACCGCAAA CGTCGAGATA AfaI GCTTTCTCAT CCGTCGTACA CATCTGCCGC  
 GACGTGAATT ACGGATGACT AATCCGCAAC ATACACGCCA ACGGCGCTTC  
 TTTCTTCTTC MnlI ATCTGCCTCT ACCTACACAT MnlI TGCACGAGGC CTATACTACG  
 GCTCTTACTT ATTCATAGAG ACCTGAAACA TTGGAGTTGT AfaI MnlI ACTATTCCTC  
 BfaI CTAGTAATAA TGACCGCCTT CGTAGGCTAC MnlI MnlI GAGGACAAAT  
ATCATTCTGA MnlI GGCGC 3'

Figura 8

5'

AAAAACCACC GTTGTTATTC AACTACAAGA ACCCTAATGG MnlI CCAGCCTCCG  
 AAAAACCAC MnlI CCCCTCCTAA AGATCGCTAA TGATGCATTA MnlI GTAGACCTCC  
 CTGCCCCCTC MnlI CAACATCTCC ACATGATGAA ACTTTGGGTC BfaI TCTCCTAGGC  
MnlI BfaI CTCTGTCTAG CCGCCCAAAT CTTAACAGGA CTATTTCTAG BfaI CAATACACTA  
 CACCGCAAAC GTCGAAATAG AfaI CCTTCTCATC AGTTGTACAC ATCTGCCGTG  
 ACGTAAATTA CGGGTGACTA ATTCGCAATA TACACGCCAA CGGCGCCTCC  
 TTCTTCTTTA MnlI TCTGCCTCTA CCTACACATC MnlI AfaI GCACGAGGTC TGTACTACGG  
 CTCCTACCTG TTTATGGAAA CCTGAAACAT CGGAGTCGTA AfaI MnlI CTCTTCCTCC  
 TGGTAATAAT AACCGCCTTC GTAGGTTACG MnlI AGGACAAATG  
TCATTCTGAG MnlI GCGC 3'

Figura 9

# ES 2 237 271 B2

5'

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

Figura 10

5'

AAAAACCACC GTTGTTATTC AACTACAAGA ACCCTAATGG CCAGCCTCCG *Mnl*I  
 AAAAACCAC *Mnl*I CCCCTCCTGA AGATCGCTAA TGATGCATTA GTAGACCTCC *Mnl*I  
 CTGCCCCCTC *Mnl*I CAACATCTCA GCATGATGAA ACTTTGGGTC *Bfa*I TCTCCTAGGC  
*Mnl*I *Bfa*I CTCTGTCTAG CCGCCCAAAT CTTAACAGGA CTATTTCTAG CAATACACTA  
 CACCGCAAAC GTCGAAATAG CCTTCTCATC CGTTGTTTAC ATCTGCCGCG  
 ACGTAAATTA TGGGTGACTA ATTCGCAATA TACACGCCAA CGGCGCCTCC *Mnl*I  
 TTCTTCTTTA *Mnl*I TCTGCCTCTA *Mnl*I CCTACACATC GCACGAGGCC *Afa*I TGTACTACGG  
 CTCCTACCTC *Mnl*I TTTATGGAAA CCTGAAACAT CGGAGTTGTA *Afa*I *Mnl*I CTTTTCCTCC  
*Bfa*I TAGTAATAAT CACCGCCTTC GTAGGTTACG TTCTCCCCTG *Mnl*I AGGACAAATA  
 TCATTCTGAG *Mnl*I GCGC 3'

Figura 11

# ES 2 237 271 B2

5'

AAAAACCACC GTTGTATTTC AACTACAAGA ACCCTAATGG CCAGCCTCCG *Mnl*I

AAAAACCCAC CCCCTTCTAA AGATCGCTAA TGATGCGGTA GTAGACCTCC *Mnl*I

CTGCCCCCTTC CAACATCTCG ACATGATGAA ACTTTGGGTC TCTCCTAGGC *Bfa*I

*Mnl*I *Bfa*I CCGCCCAAAT CTTAACAGGA CTATTTCTAG CAATACACTA *Bfa*I

CACCGCAAAC GTCGAAATAG CTTTCTCCTC CGTTGTACAC ATCTGCCGCG *Mnl*I *Afa*I

ACGTAAATTA CGGATGACTA ATTCGCAACA TACACGCCAA CGGCGCCTCC *Mnl*I

TTCTTCTTTA TCTGCCTCTA CCTACACATC GCACGAGGCC TGTACTACGG *Mnl*I *Afa*I

CTCCTACCTG TTTATGGAGA CCTGAAATAT CGGAGTCGTA CTTTTCCTCC *Mnl*I

TGGTAATAGT CACCGCCTTC GTAGGCTACG TTCTCCCCTG AGGACAAATA *Mnl*I

TCATTCTGAG GCGC 3' *Mnl*I

Figura 12

5'

AAAAACCACC GTTGTATTTC AACTACAAGA ACCCTAATGG CCAGCCTCCG *Mnl*I

AAAAACCCAC CCCCTCCTAA AGATCGCTAA TGACGCATTA GTAGACCTCC *Mnl*I

CTGCCCCCTTC CAACATCTCG ACATGATGAA ACTTTGGGTC TCTTCTAGGC *Mnl*I *Bfa*I

CTTTGTCTAG CGGCCCAAAT CCTAACAGGA CTATTTTTAG CAATACACTA *Bfa*I

CACCGCAAAC GTCGAAATAG CTTTCTCATC CGTCGTACAC ATCTGCCGCG *Afa*I

ACGTAAATTA TGGATGACTA ATTCGCAACA TACACGCCAA CGGCGCCTCC *Mnl*I

TTCTTCTTTA TCTGCCTCTA CATACACATC GCACGAGGCC TGTACTACGG *Mnl*I

CTCCTACCTA TTTATGGAGA CCTGAAACAT CGGAGTCGTA CTCTTCCTCC *Afa*I *Mnl*I

*Bfa*I TAGTTATAAT GACCGCCTTC GTAGGCTACG TTCTCCCCTG AGGACAAATG *Mnl*I

TCATTCTGAG GCGC 3' *Mnl*I

Figura 13

# ES 2 237 271 B2

5'

AAAAACCACC GTTGTTATTC AACTACAAGA ACCCTAATGG CCAGCCTCCG *Mnl*I

AAAAACCCAC *Mnl*I CCCCTCCTAA AGATCGCTAA TGATGCATTA GTAGACCTCC *Mnl*I

*Mnl*I CTGCCCCCTC CAACATCTCC ACATGATGAA ACTTTGGATC *Bfa*I TCTCCTAGGC

*Mnl*I *Bfa*I CTCTGTCTAG CCGCCCAAAT CTTAACAGGA CTATTTCTAG CAATACACTA *Bfa*I

CACCGCAAAC GTCGAAATAG CTTTCTCATC AGTTGTACAC ATCTGCCGTG *Afa*I

ACGTAAATTA CGGATGACTA ATTGCAATA TACACGCCAA CGGCGCCTCC *Mnl*I

*Mnl*I TTCTTCTTTA TCTGCCTCTA CCTACACATC *Mnl*I GCACGAGGTC TGTACTACGG

CTCCTACCTG TTTATGGAAA CCTGAAACAT CGGAGTCGTA CTCTTCCTCC *Mnl*I

TAGTAATAAT AACCGCCTTC GTAGGTTACG TTCTACCCTG *Mnl*I AGGACAAATG

*Mnl*I TCATTCTGAG GCGC 3'

Figura 14

5'

AAAAACCACC GTTGTTATTC AACTACAAGA ACCCTAATGG CCAGCCTCCG *Mnl*I

AAAAACCCAC *Mnl*I CCCCTCCTAA AGATCGCTAA TGACGCATTA GTAGACCTGC

*Mnl*I CTGCCCCCTC CAACATCTCG ACATGATGAA ACTTTGGGTC TCTTTTAGGC

*Mnl*I *Bfa*I CTCTGTCTAG CCGCCCAAAT CTTAACAGGA CTATTTTTAG CAATACACTA

CACCGCAAAC GTCGAAATAG CTTTCTCATC CGTCGTACAC ATCTGCCGCG *Afa*I

ACGTAAATTA TGGATGACTA ATTGCAACA TACACGCCAA CGGCGCCTCC *Mnl*I

*Mnl*I TTCTTCTTTA TCTGCCTCTA CATACACATC *Mnl*I GCACGAGGCC TATACTACGG

CTCCTACCTA TTTATGGAAA CCTGAAACAT TGGGGTCGTA CTCTTTCTCC *Afa*I

*Bfa*I TAGTTATAAT GACCGCCTTC GTAGGCTACG *Mnl*I *Mnl*I TCCTCCCCTG AGGACAAATG

*Mnl*I TCATTCTGAG GCGC 3'

Figura 15

## ES 2 237 271 B2

5'

<u>AAAAACCACC</u>	<u>GTTGTTATTC</u>	<u>AACTACAAGA</u>	ACCTTAATGG	CCAGCCTTCG
GAAAACCCAT	CCAATCCTAA	AAATTGCTAA	TAGCGCATT	GTTGATCTCC
<i>Mn</i> /I				<i>Bfa</i> I
CCGCCCCCTC	CAATATCTCA	GTATGATGAA	ATTTTGGCTC	TCTTCTAGGC
			<i>Bfa</i> I	
CTTTGCTTAA	TTACTCAACT	TCTAACAGGA	CTATTTCTAG	CCATACACTA
<i>Mn</i> /I				
TACCTCAGAC	ATCGAGACAG	CCTTCTCATC	CGTAGTCCAC	ATCTGTCGTG
				<i>Mn</i> /I
ATGTAAACTA	CGGCTGACTA	ATTCGGAATA	TACATGCTAA	TGGTGCCTCT
			<i>Mn</i> /I	
TTCTTTTTCA	TTTGTCTTTA	TATGCACATT	GCCCGAGGTC	TCTATTATGG
TTCCTATCTT	TTTGTAGAGA	CATGAAACAT	CGGGGTTGTC	CTTTTCCTTT
	<i>Mn</i> /I		<i>Mn</i> /I	<i>Mn</i> /I
TAGTAATAAT	AACCTCTTTC	GTAGGTTATG	TCCTCCCCTG	<u>AGGACAAATA</u>
	<i>Mn</i> /I			
TCATTCTGAG	GAGC	3'		

Figura 16



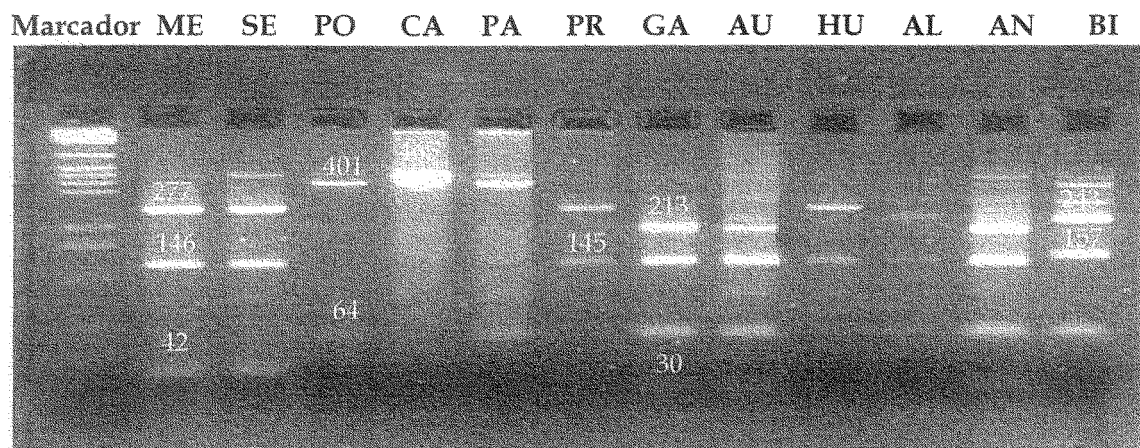


Figura 17

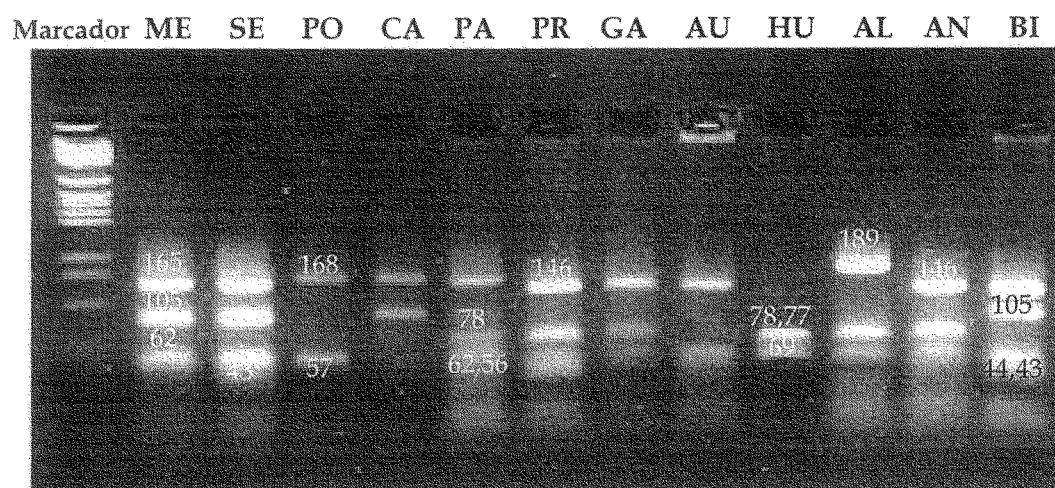


Figura 18

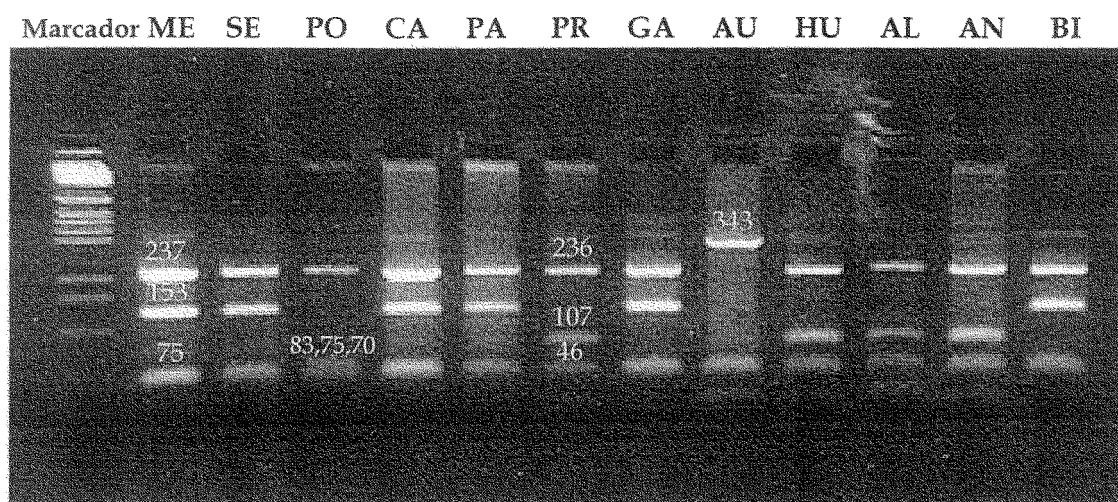


Figura 19

ES 2 237 271 B2

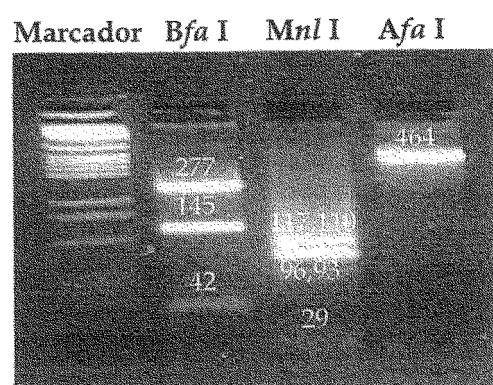


Figura 20

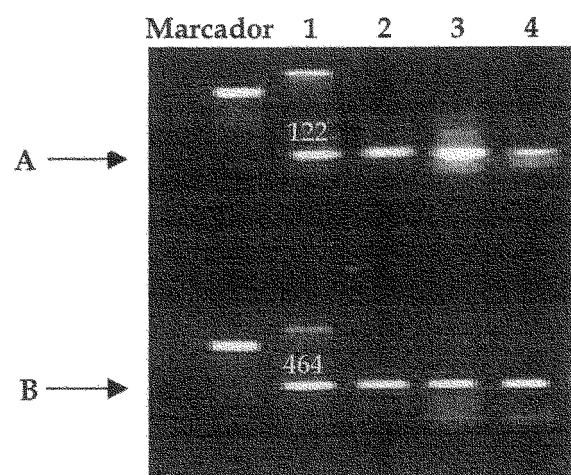


Figura 21

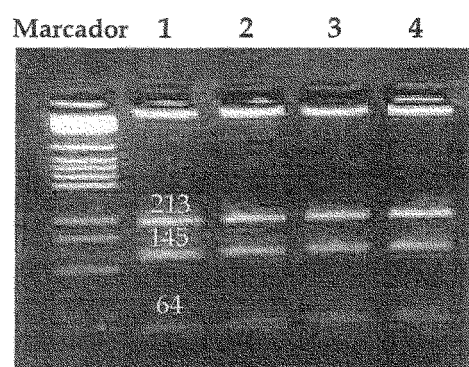


Figura 22

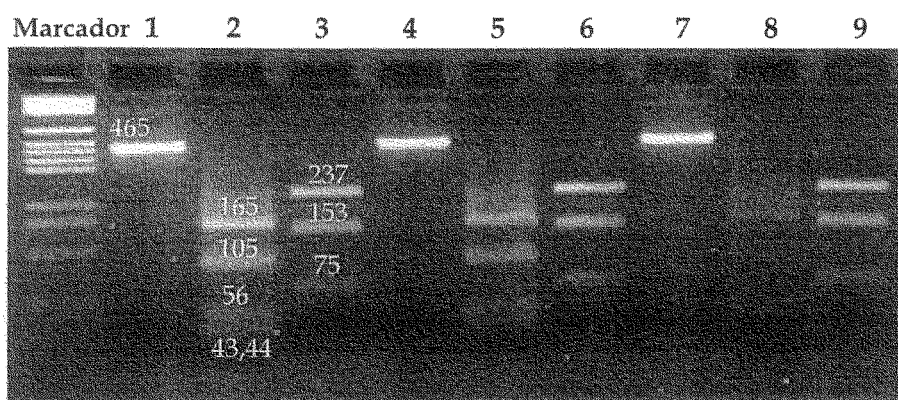


Figura 23

# 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, <i>Merluccius spp.</i> , en productos comerciales.	
	<130> mpmercytb.doc	
10	<160> 15	
	<170> PatentIn version 3.1	
15	<210> 1	
	<211> 17	
	<212> DNA	
20	<213> <i>Merluccius spp</i>	
	<400> 1	
25	accgcaaacg tcgaaat	17
	<210> 2	
	<211> 23	
30	<212> DNA	
	<213> <i>Merluccius spp</i>	
	<400> 2	
35	aggtagaggc agataaagaa gaa	23
	<210> 3	
40	<211> 465	
	<212> DNA	
	<213> <i>Merluccius merluccius</i>	
45	<220>	
	<221> gene	
	<222> (1)..(37)	
50	<223> Extremo 3' parcial del gen mitocondrial tRNA-Glu	
	<220>	
	<221> gene	
55	<222> (38)..(465)	
	<223> Extremo 5' parcial del gen mitocondrial del citocromo <i>b</i>	
60		
65		



## ES 2 237 271 B2

<400> 3

```

5      aaaaaccacc gttgttattc aactacaaga acccttaatg gccagcctcc gaaaaactca      60
      tcccccttcta aagattgcta atgatgcatt agtagacctt cctgccccct ctaacctctc      120
      aacattatga aacttcgggt ctctcctagg cctctgctta gccgccc aaa tcttaacagg      180
10     gctatttcta gcgatacatt ataccgcaa cgtcgagata gctttctcat ccgtcgtaca      240
      catctgccgc 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
      tcccccttcta aagattgcta atgatgcatt agtagacctt cctgccccct ctaacatctc      120
      aacattatga aacttcgggt ctctcctagg cctctgctta gccgccc aaa tcttaacagg      180
50     gctgtttcta gcaatacatt ataccgcaa cgtcgaaata gctttctcat ccgtcgtaca      240
      catctgccgc 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*  
  
 <400> 5  
 15  
 aaaaaccacc gttgttattc aactacaaga acccttaatg gccagcctcc gaaaaactca 60  
 tcccccttcta aagattgcta atgatgcatt agtagacott cctgccccct ctaacatctc 120  
 20 aacattatga aacttcgggt ctctcctagg cctctgctta gccgccc aaa tcttaacagg 180  
 gctgttttcta gcaatacatt ataccgcaa cgtcgaaata gctttctcat ccgtcgtaca 240  
 25 catctgccgc gacgtaaatt acggatgact aatccgcaac atacacgcca acggcgcttc 300  
 tttcttcttc atctgcctct acctacacat tgcacgaggc ctatattacg gctcctactt 360  
 30 attcatagag acctgaaaca ttggagttgt actattcctt ttagtaataa tgaccgcott 420  
 cgtaggctac gtctccctt gaggacaaat atcattctga ggccgc 465  
  
 35 <210> 6  
 <211> 465  
 <212> DNA  
 <213> *Merluccius capensis*  
 40  
 <220>  
 <221> gene  
 <222> (1)..(37)  
 45 <223> Extremo 3' parcial del gen mitocondrial tRNA-Glu  
  
 <220>  
 <221> gene  
 50 <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 gccgcccaaa tcttaacagg      180
10     cttattttctg gcgatacact acaccgcaaa cgtcgaaata gctttctcat ccgtcgtaca      240
      catctgccgc gacgtaaatt acggatgact aatccgcaac atacacgcca acggcgcttc      300
15     tttcttcttc atctgcctct acctgcacat tgcacgaggc ctatattacg gctcttactt      360
      atttatagag acctgaaaca tcgggggttgt actgttcctt ttagtaataa tgaccgcctt      420
20     cgtaggttac gtcctcccct 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 gccgcccaaa tcttaacagg      180
50     cttattttctg gcgatacact acaccgcaaa cgtcgaaata gctttctcat ccgtcgtaca      240
      catctgccgc gacgtaaatt acggatgact aatccgcaac atacacgcca acggcgcttc      300
55     tttcttcttc atctgcctct acctgcacat tgcacgaggc ctatattacg gctcttactt      360
      atttatagag acctgaaaca tcgggggttgt actgttcctt ttagtaataa tgaccgcctt      420
60     cgtaggttac gtcctcccct 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*  
  
 <400> 8  
 15  
 aaaaaccacc gttgttattc aactacaaga accctaattg ccagcctccg aaaaaccac 60  
 20 cccctcctaa agatcgctaa tgatgcatta gtagacctcc ctgccccctc caacatctcc 120  
 acatgatgaa actttgggtc tctcctaggc ctctgtctag ccgccc aaat cttaacagga 180  
 ctattttctag caatacacta caccgcaaac gtcgaaatag ccttctcatc agttgtacac 240  
 25 atctgccgtg acgtaaatta cgggtgacta attcgcaata tacacgcaa cgggcgctcc 300  
 ttctttcttta tctgcctcta cctacacatc gcacgaggtc tgtactacgg ctctacctg 360  
 30 tttatggaaa cctgaaacat cggagtcgta ctcttcctcc tggtataat aaccgccttc 420  
 gtaggttacg 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 accctaattg ccagcctccg aaaaaccac      60
      cccctcctaa agatcgctaa tgatgcatta gtagacctcc ctgccccctc caacatctcc      120
      acatgatgaa actttgggtc tctcctaggc ctctgtctag ccgccccaaat cttaacagga      180
10     ctatttctag caatacacta caccgcaaac gtcgaaatag ccttctcatc agttgtacac      240
      atctgccgtg acgtaaatta cggatggcta attcgcaata tacacgcaa cggcgcctcc      300
15     ttcttcttta tctgcctcta cctacacatc gcacgaggtc tatactacgg ctctacctg      360
      tttatggaaa cctgaaacat cggagttgta ctcttccctc 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 accctaattg ccagcctccg aaaaaccac      60
      cccctcctga agatcgctaa tgatgcatta gtagacctcc ctgccccctc caacatctca      120
      gcatgatgaa actttgggtc tctcctaggc ctctgtctag ccgccccaaat cttaacagga      180
50     ctatttctag caatacacta caccgcaaac gtcgaaatag ccttctcatc cgttgttcac      240
      atctgccgcg acgtaaatta tgggtgacta attcgcaata tacacgcaa cggcgcctcc      300
55     ttcttcttta tctgcctcta cctacacatc gcacgaggcc tgtactacgg ctctacctc      360
      tttatggaaa cctgaaacat cggagttgta ctttccctcc tagtaataat caccgccttc      420
60     gtaggttacg ttctcccctg 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*  
  
 <400> 11  
 15  
 aaaaaccacc gttgttattc aactacaaga accctaattg ccagcctccg aaaaaccac 60  
 ccccttctaa agatcgctaa tgatgcggtg gtagacctcc ctgccccttc caacatctcg 120  
 20 acatgatgaa actttgggtc tctcctaggc ctctgtctag ccgccc aaat cttaacagga 180  
 ctattctctag caatacacta caccgcaaac gtcgaaatag ctttctcttc cgttgtacac 240  
 25 atctgccgcg acgtaaatta cggatgacta attcgcaaca tacacgcaa cggcgcctcc 300  
 ttcttcttta tctgcctcta cctacacatc gcacgaggcc tgtactacgg ctctacctg 360  
 30 tttatggaga cctgaaatat cggagtcgta ctttctctcc tggtaatagt caccgccttc 420  
 gtaggctacg ttctcccctg 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>  
 <221> gene  
 50 <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 accctaattg ccagcctccg aaaaaccac      60
      cccctcctaa agatcgctaa tgacgcatta gtagacctcc ctgccccctc caacatctcg      120
      acatgatgaa actttgggtc tcttctaggc ctttgtctag cggcccaaat cctaacagga      180
10     ctatTTTTtag caatacacta caccgcaaac gtcgaaatag ctttctcatc cgtcgtacac      240
      atctgccgcg acgtaaatta tggatgacta attcgcaaca tacacgcaa cggcgcctcc      300
15     ttcttcttta tctgcctcta catacacatc gcacgaggcc tgtactacgg ctctaccta      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 accctaattg ccagcctccg aaaaaccac      60
      cccctcctaa agatcgctaa tgatgcatta gtagacctcc ctgccccctc caacatctcc      120
50     acatgatgaa actttggatc tctcctaggc ctctgtctag cggcccaaat cttaacagga      180
      ctatttctag caatacacta caccgcaaac gtcgaaatag ctttctcatc agttgtacac      240
      atctgccgtg acgtaaatta cggatgacta attcgcaata tacacgcaa cggcgcctcc      300
55     ttcttcttta tctgcctcta cctacacatc gcacgaggtc tgtactacgg ctctacctg      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*  
  
 <400> 14  
 15  
  
 aaaaaccacc gttgttattc aactacaaga accctaattg ccagcctccg aaaaaccac 60  
 20 cccctcctaa agatcgctaa tgacgcatta gtagacctgc ctgccccctc caacatctcg 120  
 acatgatgaa actttgggtc tcttttaggc ctctgtctag cggcccaaat cctaacagga 180  
 ctattttttag caatacacta caccgcaaac gtcgaaatag ccttctcatc cgtcgtacac 240  
 25 atctgccgcg acgtaaatta tggatgacta attcgcaaca tacacgcaa cggcgccctcc 300  
 ttcttcttta tctgcctcta catacacatc gcacgaggcc tatactacgg ctccctaccta 360  
 30 tttatggaaa cctgaaacat tggggtcgta ctctttctcc tagttataat gaccgccttc 420  
 gtaggctacg tcctcccctg 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

	aaaaaccacc gttgttatto aactacaaga acctaatgg ccagccttcg gaaaacccat	60
5	ccaatcctaa aaattgctaa tagcgcatta gttgatctcc ccgccccctc caatatctca	120
	gtatgatgaa attttggtc tcttctaggg ctttgcttaa ttactcaact tctaacagga	180
10	ctatttctag ccatacacta tacctcagac atcgagacag ccttctcatc cgtagtccac	240
	atctgtcgtg atgtaaacta cggctgacta attcgggaata tacatgctaa tgggtgcctct	300
15	ttctttttca ttgtcttta tatgcacatt gcccgaggtc tctattatgg ttctatctt	360
	tttgtagaga catgaaacat cgggggtgtc cttttccttt tagtaataat aacctctttc	420
20	gtaggttatg tctccccctg aggacaaata tcattctgag gagg	464

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 237 271

⑫ Nº de solicitud: 200300651

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 20.03.2003

⑭ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ 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 (Merluccius Genus) using sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA control region sequences". J. Agric. Food Chem., 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". J. Agric. Food Chem., 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". J. AOAC Int., 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