

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 342 525**

21 Número de solicitud: 200801656

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **02.06.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **07.07.2010**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
07.07.2010

71 Solicitante/s: **Universidad de Vigo
Campus Universitario Lagoas Marcosende
36310 Vigo, Pontevedra, ES**

72 Inventor/es: **Sotelo Fernández, Graciela;
Morán Martínez, Paloma y
Posada González, David**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Procedimiento para la identificación genética de la centolla europea del Atlántico (*Maja brachydactyla*).**

57 Resumen:

Procedimiento para la identificación genética de la centolla europea del Atlántico (*Maja brachydactyla*).

Se ha desarrollado un protocolo para la identificación genética de la centolla europea del Atlántico (*Maja brachydactyla*) frente a las demás especies del género que se encuentran en el Mediterráneo (*M. squinado*, *M. crispata* y *M. goltziana*). Estas especies constituyen un recurso comercial de gran valor; su identificación es fundamental para posibilitar su trazabilidad y correcto etiquetado y para orientar su gestión y conservación.

El protocolo consiste en amplificar una región de 671 pb del gen 16S del ADN mitocondrial, cuya secuencia nucleotídica es característica de cada una de las 4 especies. En particular, para diferenciar *M. brachydactyla* se han diseñado cebadores específicos que permiten amplificar un fragmento interno de 223 pb.

ES 2 342 525 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la identificación genética de la centolla europea del Atlántico (*Maja brachydactyla*).

5 Sector de la técnica

La centolla es un recurso pesquero muy importante en Europa y, como tal, una exigencia básica de mercado es la autenticación de su origen y su correcto etiquetado. Además, se está explotando de forma intensiva y, de hecho, en el Mediterráneo, la especie más comercializada ya se considera amenazada. Por eso también es fundamental la
10 identificación de estas especies para desarrollar programas de recuperación y repoblación, de modo que se asegure la incorporación correcta de cada especie en su área de distribución geográfica.

Estado de la técnica

15 La centolla es uno de los crustáceos de mayor importancia económica en las costas europeas. Pertenece al género *Maja* y en esta región se han definido cuatro especies: *M. brachydactyla*, *M. squinado*, *M. crispata* y *M. goltziana* (Neumann 1998), si bien el interés comercial se centra en las dos primeras. *M. brachydactyla* se distribuye en el Atlántico (desde el sur del Mar del Norte hasta Senegal) mientras que *M. squinado* es endémica del Mediterráneo. *M. crispata* y *M. goltziana* fueron descritas inicialmente tanto en el Atlántico (desde el oeste de Portugal hasta el Golfo de Guinea) como en el Mediterráneo, aunque los registros recientes corresponden al Mediterráneo (Carmona-Suárez
20 2003, Fürböck y Patzner 2005; Soppelsa *et al.* 2005, Lelli *et al.* 2007).

La diferenciación de estas especies es muy complicada, especialmente en el caso de *M. brachydactyla* y *M. squinado*; se basa en una serie de caracteres morfológicos como la forma de los primeros gonópodos, la forma de las espinas del caparazón (y su disposición) y varias medidas morfométricas (Neumann 1998). Sin embargo, estas diferencias no son definitivas, son apreciables sólo por expertos y tienen el inconveniente añadido de que cambian a lo largo de la vida del individuo (no se observan en estado larvario y varían entre juveniles y adultos). Por este motivo, las centollas pescadas en el Atlántico (*M. brachydactyla*, según Neumann) son todavía etiquetadas en los mercados como *M. squinado*.
30

Desde el punto de vista comercial, las capturas de centolla superaron las 5000 toneladas en el año 2005 (según los últimos datos disponibles de la FAO); y, siendo un producto muy apreciado en el mercado, alcanza además precios elevados. Se pesca casi exclusivamente en el litoral Atlántico, mientras que en el Mediterráneo es cada vez más difícil de encontrar. De hecho, en algunas zonas del Mediterráneo, *M. squinado* se considera una especie amenazada.
35 Por estos motivos, se está desarrollando el cultivo en cautividad, tanto para abastecer a los mercados y paliar la sobreexplotación de las poblaciones naturales como para repoblar y recuperar las áreas más afectadas.

Para resolver los problemas de identificación, hemos llevado a cabo un estudio genético con marcadores de ADN mitocondrial: un fragmento de 710 pb del gen COI y un fragmento de 560 pb del gen 16S (Sotelo *et al.* 2008),
40 confirmando el estatus de especie de cada una de las formas propuestas.

En este estudio concluimos además que el fragmento de 16S es un marcador idóneo para la identificación de estas centollas, por ser invariable dentro de especie y variable entre especies. Conociendo la secuencia nucleotídica de estos fragmentos, es posible asignar una muestra de centolla europea de forma inequívoca a una de las cuatro especies. La
45 ventaja de la identificación genética es su validez en cualquier etapa del desarrollo del individuo, desde larva a adulto, y su aplicación sobre una pequeña cantidad de tejido del individuo analizado, por lo que no es necesario disponer del individuo completo.

Aunque la secuenciación del fragmento del 16S es un buen método de identificación, hemos diseñado un protocolo de asignación molecular más rápido y sencillo, pero igualmente eficaz. El principal objetivo es la identificación de *M. brachydactyla* frente a *M. squinado*, ya que estas dos especies de centolla son las más parecidas morfológicamente y de mayor interés comercial. Sin embargo, para evitar cualquier posible confusión con las demás especies del Mediterráneo, éstas también se han incluido a la hora de desarrollar la técnica.
50

55 Bibliografía

- Carmona-Suárez CA (2003)** Reproductive biology and relative growth in the spider crab *Maja crispata* (Crustacea: Brachyura: Majidae). *Scientia Marina* 67: 75-80
- Fürböck S, Patzner RA (2005)** Daily movement patterns of *Maja crispata* Risso 1827 (Brachyura: Majidae) *Acta Adriatica* 46: 41-45
- Lelli S, Carpentieri P, Colloca F, Ardizzone GD (2007)** The spiny spider crab *Maja goltziana* (Crustacea: Majidae) in south Lebanese waters. *JMBA2-Biodiversity Records* (Published on-line)
- Neumann V (1998)** A review of the *Maja squinado* (Crustacea: Decapoda: Brachyura) species-complex with a key to the eastern Atlantic and Mediterranean species of the genus. *Journal of Natural History* 32: 1667-1684
65

ES 2 342 525 A1

Soppelsa N, Zenetos A, Papathanassiou E (2005) *Maja goltziana* d'Oliveira, 1888 (Decapoda, Brachyura, Majidae) in the southern Tyrrhenian Sea. *Crustaceana* 78: 121-124

5 Sotelo G, Moran P, Posada D (2008) Genetic identification of the northeastern Atlantic spiny spider crab as *Maja brachydactyla* Balss, 1922. *Journal of Crustacean Biology* 28: 76-81.

Explicación de la invención

10 El objetivo de la invención es la identificación genética inequívoca de la especie europea de centolla del Atlántico frente a las del Mediterráneo. La invención se basa en la amplificación de un fragmento de 671 pb del gen 16S del ADN mitocondrial, para el que ya había cebadores disponibles con anterioridad, y en el estudio de las diferencias en la secuencia entre las 4 especies de centolla. Teniendo en cuenta estas diferencias, se han diseñado cebadores específicos para un fragmento interno de 223 pb en *M. brachydactyla*. Así, ante una muestra de centolla europea, habiendo amplificado el fragmento mayor de referencia, si amplifica también el fragmento menor, podremos identificarla como 15 *M. brachydactyla*. En caso contrario, sabremos que procede del Mediterráneo.

Descripción detallada de la invención (forma de realización)

20 El procedimiento para la identificación genética de la especie europea del género *Maja* (centollas) del Atlántico, *M. brachydactyla*, frente a las especies del mismo género del Mediterráneo, *M. squinado*, *M. crispata* y *M. goltziana*, consta de las siguientes etapas:

1. Extracción de ADN.
- 25 2. Amplificación por PCR de un fragmento de 671 pb del gen mitocondrial 16S.
3. Amplificación por PCR de un fragmento de 223 pb incluido en la región anterior.

30 1- Extracción de ADN

Para extraer ADN se parte de una muestra de tejido de 0.5 cm³, de músculo preferentemente. Se han descrito muchos protocolos de extracción, pero uno de los más sencillos y rápidos es el que utiliza la resina quelante Chelex [Estoup *et al.* (1996) *Mol Mar Biol Biotech* 5: 295-298]. Consiste en homogeneizar el tejido en 400 µL de una solución de Chelex 100 (Bio Rad) al 10%. La solución debe mantenerse caliente y en agitación antes de tratar la muestra. Para 35 potenciar la eliminación de proteínas, se añaden 30 µL de proteasa 20 mg/mL (Pronase, Roche) al homogeneizado. Éste se incuba primero a 60°C durante 1 hora (en un baño de agua, con agitación) y después a 99°C durante 15 minutos (en una estufa). Para que precipiten los restos de tejido, junto con la resina, y el ADN quede en el sobrenadante, se aplica una centrifugación final de 1 minuto.

40 Si la cantidad de muestra es limitante (si se trata de una larva, por ejemplo), el kit *NucleoSpin Tissue* (Macherey-Nagel) es más adecuado porque permite recuperar más ADN y de mejor calidad. En este caso, se siguen las instrucciones del fabricante.

45 Para comprobar la efectividad de la extracción, una alícuota de 4 µL se somete a electroforesis en un gel de agarosa (*Agarose D-1 low EEO-QDT*, Pronadisa) al 1% en tampón TBE 1x. El gel lleva incorporado bromuro de etidio, de modo que el ADN se hace visible bajo luz ultravioleta (Figura 1).

50 2.- Amplificación de un fragmento de 671 pb del gen 16S

Para amplificar por PCR este fragmento se utilizan los cebadores 16L29 y 16HLeu (SEQ ID NO 1 y 2, respectivamente), que ya habían sido descritos para otros crustáceos decápodos (en el laboratorio de Christoph Schubart). Hay que indicar que el extremo 3' del fragmento corresponde al inicio del gen tRNA^{Leu}. La reacción contiene: 1 µL de extracción (ADN), 2 µL de tampón 10x (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% Tween 20), 1 µL de MgCl₂ 50 mM, 0.5 µL de cada uno de los cebadores 20 µM, 1 µL de dNTP Mix 10 mM (Applied Biosystems), 0.2 µL de ADN polimerasa (*BIOTAQ 5 U/µL*, Bioline) y agua bidestilada estéril hasta completar un volumen de 20 µL. El programa de amplificación consiste en una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C, templado a 55°C y extensión a 72°C, cada paso durante 20 segundos, y una extensión final a 72°C durante 7 minutos. El resultado se comprueba migrando 4 µL del producto de PCR en un gel de agarosa (*Agarose D-1 low EEO-QDT*, Pronadisa) al 2%, durante 30 minutos a 100 V. En el mismo gel se co-migran también 3 µL de un marcador de peso molecular (*HyperLadder IV*, Bioline) para estimar el tamaño del fragmento amplificado. Este marcador resulta en un patrón de 10 bandas, con un rango de 100 a 1000 pb (cada banda es un múltiplo exacto de 100 pb). En toda muestra de centolla europea debe visualizarse la banda de 671 pb (Figura 2).

65

ES 2 342 525 A1

3.- Amplificación de un fragmento de 223 pb específico de *M. brachydactyla*

Teniendo en cuenta la secuencia nucleotídica del fragmento de 671 pb en cada una de las especies (SEQ ID NO 3-6) y las posiciones que varían entre ellas (Figura 3), se diseñaron dos cebadores específicos (16Lbr y 16Hbr, SEQ ID NO 7 y 8, respectivamente) para amplificar un fragmento interno de 223 pb en *M. brachydactyla* (Figura 4). La reacción de amplificación tiene la misma composición que la indicada anteriormente, y el programa consta de una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 20 segundos, templado a 45°C durante 20 segundos y extensión a 72°C durante 15 segundos, y una extensión final a 72°C durante 7 minutos. El resultado se comprueba del mismo modo que en el paso anterior. Si se observa una banda de 223 pb podemos identificar la muestra de centolla que se está analizando como *M. brachydactyla*, procedente del Atlántico (Figura 5). En caso contrario, si no se observa ninguna banda, podemos afirmar que la muestra de centolla procede del Mediterráneo, pero no podemos identificar la especie a la que pertenece (puede ser *M. squinado*, *M. crispata* o *M. goitziana*) (Figura 5).

Se trata de un método sencillo y rápido. Los equipos que se requieren son básicos en cualquier laboratorio de análisis molecular y es posible analizar simultáneamente un número elevado de muestras y obtener los resultados en horas. La gran ventaja de la identificación genética frente a la morfológica (la única disponible hasta el momento) es su aplicación a cualquier individuo independientemente de la fase vital en que se encuentre, porque no se ve afectada por cambios ontogénicos, y su aplicación a muestras pequeñas de tejido, sin necesidad de tener individuos completos e intactos.

La aportación de este procedimiento es la diferenciación de la centolla del Atlántico, *M. brachydactyla*, frente a las centollas del Mediterráneo, que se verifica amplificando el fragmento mayor de 671 pb y el fragmento menor de 223 pb. Actualmente, esta especie es la más importante para el comercio y se está evaluando su cultivo en cautividad, por lo que es fundamental asegurar su autenticidad en todo momento.

Descripción de las figuras

Figura 1. Fotografía de un gel de agarosa al 1% en el que se ha comprobado una extracción de ADN a partir de muestras de músculo de centolla. La primera calle de la izquierda corresponde al marcador de peso molecular *HyperLadder IV*, y las siguientes (de izquierda a derecha) a *Maja brachydactyla* (br), *M. squinado* (sq), *M. crispata* (cr) y *M. goitziana* (go). Se observa una banda de varios Kpb, resultado de la rotura mecánica del ADN durante el proceso de extracción, pero no se detectan fragmentos pequeños (de cientos de bases) que indicarían que el ADN estaba dañado de antemano. Además, la intensidad de la banda indica que la cantidad de ADN es suficiente para poder realizar el análisis molecular.

Figura 2. Fotografía de un gel de agarosa al 2% en el que se ha comprobado la amplificación por PCR del fragmento de 671 pb del gen 16S, a partir de muestras de centolla procedentes de la costa europea. La primera calle de la izquierda corresponde al marcador de peso molecular *HyperLadder IV*, y las siguientes (de izquierda a derecha) a *M. brachydactyla* (br), *M. squinado* (sq), *M. crispata* (cr) y *M. goitziana* (go). En las cuatro calles se observa la banda de 671 pb.

Figura 3. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del fragmento de 671 pb del gen 16S de las cuatro especies de centolla, *M. brachydactyla*, *M. squinado*, *M. crispata* y *M. goitziana* (SEQ ID NO 3-6). En el margen izquierdo se indica la especie a la que pertenece cada línea de la secuencia, que aparece separada en bloques consecutivos de 60 pb, tal como se indica en el margen derecho. Las columnas con un asterisco en la base se corresponden con las posiciones de la secuencia que no varían entre las especies; mientras que la ausencia de asterisco marca las posiciones variables. Las posiciones indicadas en minúscula, las 20 primeras y las 20 últimas, corresponden a los cebadores 16L29 y 16HLeu (SEQ ID NO 1 y 2).

Figura 4. Localización de los cebadores específicos de *M. brachydactyla*, 16Lbr y 16Hbr (SEQ ID NO 7 y 8), sobre el alineamiento del fragmento de 671 pb de las cuatro especies de centolla. Se indican en negrita y subrayados, y, como se puede observar, amplifican una región interna de 223 pb.

Figura 5. Fotografía de un gel de agarosa en el que se ha comprobado la amplificación específica por PCR del fragmento de 223 pb en *M. brachydactyla*. La primera calle de la izquierda corresponde al marcador de peso molecular *HyperLadder IV*, y las siguientes (de izquierda a derecha) a *M. brachydactyla* (br), *M. squinado* (sq), *M. crispata* (cr) y *M. goitziana* (go). Sólo se observa la banda de 223 pb en la calle que corresponde a *M. brachydactyla*.

Texto libre de la lista de secuencias

SEQ ID NO 1 corresponde al cebador directo diseñado en el laboratorio de Christoph Schubart para amplificar un fragmento del gen 16S en varios crustáceos decápodos.

SEQ ID NO 2 corresponde al cebador reverso diseñado en el laboratorio de Christoph Schubart para amplificar un fragmento del gen 16S en varios crustáceos decápodos; localizado en el extremo 5' del gen tRNA^{Leu}.

ES 2 342 525 A1

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la identificación genética de la especie de centolla europea del Atlántico, *Maja brachydactyla*, frente a las especies del Mediterráneo, *M. squinado*, *M. crispata* y *M. goltziana*, **caracterizado** por consistir en:

10 a. Obtener una muestra para evaluar.

b. Extraer el ADN de la muestra.

15 c. Amplificar por PCR un fragmento de 671 pb del ADN mitocondrial con los cebadores 16L29 y 16HLeu (SEQ ID NO 1 y 2, respectivamente) y comprobar la correcta amplificación.

d. Amplificar por PCR un fragmento de 223 pb, incluido en la región anterior, con los cebadores específicos para *M. brachydactyla* 16Lbr y 16Hbr (SEQ ID NO 7 y 8, respectivamente). Comprobar la amplificación. Si es positiva, la muestra corresponde a *M. brachydactyla*. Si es negativa, a *M. squinado*, *M. crispata* o *M. goltziana*.

20 2. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que la muestra a evaluar procede de una centolla en cualquier etapa de desarrollo capturada en las costas europeas, del Atlántico o del Mediterráneo.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

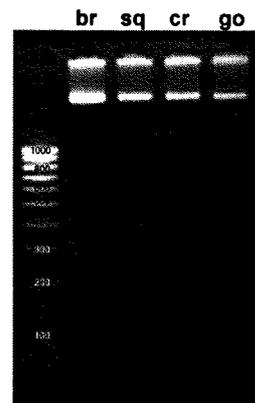


Figura 1

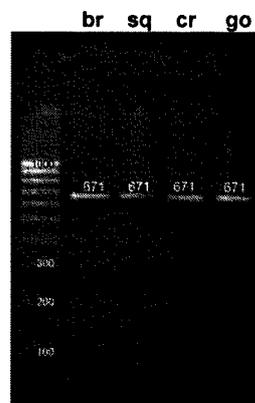


Figura 2

ES 2 342 525 A1

<i>M. brachydactyla</i>	ygctgtttatcaaaaaacatGTCTATATGAATATTTATATAGTCTAACCTGCTCATTGAC	60
<i>M. squinado</i>	ygctgtttatcaaaaaacatGTCTATATGAATATTTATATAGTCTAACCTGCTCATTGAC	
<i>M. crispata</i>	ygctgtttatcaaaaaacatGTCTATATGAATATTTATATAGTCTAACCTGCTCATTGAC	
<i>M. goltziana</i>	ygctgtttatcaaaaaacatGTCTATATGAATATTTATATAGTCTAGCCTGCTCATTGAC *****	
<i>M. brachydactyla</i>	TAAAAGTTTAAAAGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCTT	120
<i>M. squinado</i>	TAAAAGTTTAAAAGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCTT	
<i>M. crispata</i>	TAAAAGTTTAAAAGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCTT	
<i>M. goltziana</i>	TATTAAGTTTAAAAGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCTT ** *****	
<i>M. brachydactyla</i>	TAATTGAGAACTTGTATGAAAGGTTGAACAAGAGAAAGACTGTATCTATTATAAATCTTA	180
<i>M. squinado</i>	TAATTGGGAACCTGTATGAAAGGTTGAACAAGAGAAAGACTGTATCTATTATAAATCTTA	
<i>M. crispata</i>	TAATTGGGAACCTGTATGAAAGGTTGAACAAGAGAAAGACTGTATCTATTATAAATCTTA	
<i>M. goltziana</i>	TAATTGGGAACCTGTATGAAAGGTTGAACAAGAGAAAGACTGTGTCTATTATAAATCTTA *****	
<i>M. brachydactyla</i>	AATTTAACTTTTAAAGTAAAAGGCTTAAATAATTTAGAGGGACGATAAGACCTATAAAG	240
<i>M. squinado</i>	AATTTAACTTTTAAAGTAAAAGGCTTAAATAACTTAGAGGGACGATAAGACCTATAAAG	
<i>M. crispata</i>	AATTTAACTTTTAAAGTAAAAGGCTTAAATAACTTAGAGGGACGATAAGACCTATAAAG	
<i>M. goltziana</i>	AATTTAACTTTTAAAGTAAAAGGCTTAAATAATTTAGAGGGACGATAAGACCTATAAAG *****	
<i>M. brachydactyla</i>	CTTTATAAGTAAGTAGAAATTTATTGAATTAATAAATGAAAACCTATATTTCTATTGTCTT	300
<i>M. squinado</i>	CTTTATAAGTAAGTAGAAATTTATT-AATTAATAACTGAAAACCTATATTTCTATTATCTT	
<i>M. crispata</i>	CTTTATAAGTAAGTAGAAATTTATT-AATTAATAACTGAAAACCTATATTTCTATTATCTT	
<i>M. goltziana</i>	CTTTATAAGTAAGTGAAAATTTATTAATAAATAAATGAAAATTTATATTTCTATTGTCTT *****	
<i>M. brachydactyla</i>	ATTGTGTTGGGGCGACATAAATATAAATTTAACTGTTTGAGAATAAGACATAAATTT	360
<i>M. squinado</i>	ATTGTGTTGGGGCGACATAAATATAAATTTAACTGTTTGAGAATAAGACATAAATTT	
<i>M. crispata</i>	ATTGTGTTGGGGCGACATAAATATAAATTTAACTGTTTGAGAATAAGACATAAATTT	
<i>M. goltziana</i>	ATTATGTTGGGGCGACATAAATATAAATTTAACTGTTTAAAGATAAATCATGAATTT *** *****	
<i>M. brachydactyla</i>	ATGAATTAATAAATTAATTGATCCTTTTTAAAGATTTAAGTTTAAAGTTACTTTAGGGATAAC	420
<i>M. squinado</i>	ATGAATTGAAATTAATTGATCCTTTTTAAAGATTTCAAGTTTAAAGTTACTTTAGGGATAAC	
<i>M. crispata</i>	ATGAATTGAAATTAATTGATCCTTTTTAAAGATTTCAAGTTTAAAGTTACTTTAGGGATAAC	
<i>M. goltziana</i>	TTGAATTAATAAATTAATTGATCCTTTTTAAAGATTTAAGTTTAAAGTTACTTTAGGGATAAC *****	
<i>M. brachydactyla</i>	AGCGTTATTTCTTTTGAGAGTTCTTATCGAGAAAGAAGTTTGCGACCTCGATGTTGAATT	480
<i>M. squinado</i>	AGCGTTATTTCTTTTGAGAGTTCTTATCGAGAAAGAAGTTTGCGACCTCGATGTTGAATT	
<i>M. crispata</i>	AGCGTTATTTCTTTTGAGAGTTCTTATCGAGAAAGAAGTTTGCGACCTCGATGTTGAATT	
<i>M. goltziana</i>	AGCGTTATTTCTTTTGAGAGTTCTTATCGAGAAAGAAGTTTGCGACCTCGATGTTGAATT *****	
<i>M. brachydactyla</i>	AAACTATCTTGATGGTGCAGCAGCTAAGAGAGAAAGTCTGTTTCGACTTTTAAATGTTTAC	540
<i>M. squinado</i>	AAACTATCTTGATGGTGTAGCAGCTAAGAGAGAAAGTCTGTTTCGACTTTTAAATGTTTAC	
<i>M. crispata</i>	AAACTATCTTGATGGTGTAGCAGCTAAGAGAGAAAGTCTGTTTCGACTTTTAAATGTTTAC	
<i>M. goltziana</i>	AAACTATCTTGATGGTGTAGCAGCTGAGAGAGAAAGTCTGTTTCGACTTTTAAATGTTTAC *****	
<i>M. brachydactyla</i>	ATGATTTGAGTTCAGACCGCGTGAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAATATAAAAAAT	600
<i>M. squinado</i>	ATGATTTGAGTTCAGACCGCGTAAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAATATAAAAAAT	
<i>M. crispata</i>	ATGATTTGAGTTCAGACCGCGTGAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAATATAAAAAAC	
<i>M. goltziana</i>	ATGATTTGAGTTCAGACCGCGGAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAAAATTAATAAAT *****	
<i>M. brachydactyla</i>	TGCTTTAGTACGAAAGGATTGAGCAGTTAAAATATTTTGTGATTTACCAGctatthtgg	660
<i>M. squinado</i>	TGCTTTAGTACGAAAGGATTGAGTAGTTAAAATATTTTGTGATTTAC-AGctatthtgg	
<i>M. crispata</i>	TGCTTTAGTACGAAAGGATTGAGTAGTTAAAATATTTTGTGATTTAC-AGctatthtgg	
<i>M. goltziana</i>	TGCTTTAGTACGAAAGGATTAAGTAGTTAAA-TATTTTATAAATTTAC-AGctatthtgg *****	
<i>M. brachydactyla</i>	cagataaatatg	671
<i>M. squinado</i>	cagataaatatg	
<i>M. crispata</i>	cagataaatatg	
<i>M. goltziana</i>	cagataaatatg *****	

Figura 3

ES 2 342 525 A1

<i>M. brachydactyla</i>	ygccctgtttatcaaaaacatGTCTATATGAATATTTATATAGTCTAACCTGCTCATTGAC	60
<i>M. squinado</i>	ygccctgtttatcaaaaacatGTCTATATGAATATTTATATAGTCTAACCTGCTCATTGAC	
<i>M. crispata</i>	ygccctgtttatcaaaaacatGTCTATATGAATATTTATATAGTCTAACCTGCTCATTGAC	
<i>M. goltziana</i>	ygccctgtttatcaaaaacatGTCTATATGAATTTTTATATAGTCTAGCCTGCTCATTGAC *****	
<i>M. brachydactyla</i>	<u>TAAAAAGTTTAAAAGCCGCGGTATTT</u> TGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCTT	120
<i>M. squinado</i>	TAAAAAGTTTAAAAGCCGCGGTATTTCTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCTT	
<i>M. crispata</i>	TAAAAAGTTTAAAAGCCGCGGTATTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCTT	
<i>M. goltziana</i>	TATTAAGTTTAAAAGCCGCGGTATTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCTT ** *****	
<i>M. brachydactyla</i>	TAATTGAGAAGCTTGTATGAAAGGTTGAACAAGAGAAAGACTGTATCTATTATAAATCTTA	180
<i>M. squinado</i>	TAATTGGGAAGCTTGTATGAAAGGTTGAACAAGAAAAGACTGTATCTATTGTAATCTTA	
<i>M. crispata</i>	TAATTGGGAAGCTTGTATGAAAGGTTGAACAAGAGAAAGACTGTATCTATTGTAATCTTA	
<i>M. goltziana</i>	TAATTGGGAAGCTTGTATGAAAGGTTGAACAAGAGAAAGACTGTGTCTATTATAAATCTTA *****	
<i>M. brachydactyla</i>	AATTTAACTTTTAAAGTAAAAGGCTTAAATAATTTAGAGGGACGATAAGACCCCTATAAAG	240
<i>M. squinado</i>	AATTTAACTTTTAAAGTAAAAGGCTTAAATAACTTAGAGGGACGATAAGACCCCTATAAAG	
<i>M. crispata</i>	AATTTAACTTTTAAAGTAAAAGGCTTAAATAACTTAGAGGGACGATAAGACCCCTATAAAG	
<i>M. goltziana</i>	AATTTAACTTTTAAAGTAAAAGGCTTAAATAATTTAGAGGGACGATAAGACCCCTATAAAG *****	
<i>M. brachydactyla</i>	CTTTATAAGTAAGTAGAAATTTATT <u>GAATAAAAATTGAAA</u> ACTATATTTCTATTGTCTT	300
<i>M. squinado</i>	CTTTATAAGTAAGTAGAAATTTATT-AATTAATAACTGAAACCTATATTTCTATTATCTT	
<i>M. crispata</i>	CTTTATAAGTAAGTAGAAATTTATT-AATTAATAACTGAAACCTATATTTCTATTATCTT	
<i>M. goltziana</i>	CTTTATAAGTAAGTGAAATTTATTAAAAATAAAATTGAAAATTTATATTTCTATTGTCTT *****	
<i>M. brachydactyla</i>	ATTGTGTTGGGGCGACATAAATATAAATTTTAACTGTTTGAGAATAAGACATAAATTT	360
<i>M. squinado</i>	ATTGTGTTGGGGCGACATAAATATAAATTTTAACTGTTTGAGAATAAGACATAAATTT	
<i>M. crispata</i>	ATTGTGTTGGGGCGACATAAATATAAATTTTAACTGTTTGAGAATAAGACATAAATTT	
<i>M. goltziana</i>	ATTATGTTGGGGCGACATAAATATAAATTTTAACTGTTTAAAGATAAAACATGAATTT *** *****	
<i>M. brachydactyla</i>	ATGAATTAATAAATTAAATTGATCCTTTTTAAAGATTTAAGTTAAGTTACTTTAGGGATAAC	420
<i>M. squinado</i>	ATGAATTGAAATTAATTGATCCTTTTTAAAGATTTCAAGTTAAGTTACTTTAGGGATAAC	
<i>M. crispata</i>	ATGAATTGAAATTAATTGATCCTTTTTAAAGATTTCAAGTTAAGTTACTTTAGGGATAAC	
<i>M. goltziana</i>	TTGAATTAATAAATTAAATTGATCCTTTTTAAAGATTTAAGTTAAGTTACTTTAGGGATAAC *****	
<i>M. brachydactyla</i>	AGCGTTATTTCTTTTGAGAGTCTTATCGAGAAAGAAGTTGCGACCTCGATGTTGAATT	480
<i>M. squinado</i>	AGCGTTATTTCTTTTGAGAGTCTTATCGAGAAAGAAGTTGCGACCTCGATGTTGAATT	
<i>M. crispata</i>	AGCGTTATTTCTTTTGAGAGTCTTATCGAGAAAGAAGTTGCGACCTCGATGTTGAATT	
<i>M. goltziana</i>	AGCGTTATTTCTTTTGAGAGTCTTATCGAGAAAGAAGTTGCGACCTCGATGTTGAATT *****	
<i>M. brachydactyla</i>	AAACTATCTTGATGGTGCAGCAGCTAAGAGAGAAAGTCTGTTTCGACTTTTAAATGTTTAC	540
<i>M. squinado</i>	AAACTATCTTGATGGTGTAGCAGCTAAGAGAGAAAGTCTGTTTCGACTTTTAAATGTTTAC	
<i>M. crispata</i>	AAACTATCTTGATGGTGTAGCAGCTAAGAGAGAAAGTCTGTTTCGACTTTTAAATGTTTAC	
<i>M. goltziana</i>	AAACTATCTTGATGGTGTAGCAGCTGAGAGAGAAAGTCTGTTTCGACTTTTAAATGTTTAC *****	
<i>M. brachydactyla</i>	ATGATTTGAGTTCAGACCGCGTGAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAATATAAAAAAT	600
<i>M. squinado</i>	ATGATTTGAGTTCAGACCGCGTAAAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAATATAAAAAAT	
<i>M. crispata</i>	ATGATTTGAGTTCAGACCGCGTGAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAATATAAAAAAT	
<i>M. goltziana</i>	ATGATTTGAGTTCAGACCGCGTGAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAATATAAAAAAT *****	
<i>M. brachydactyla</i>	TGCTTTAGTACGAAAGGATTGAGCAGTTAAAATATTTTTGTGATTTACCAGctattttgg	660
<i>M. squinado</i>	TGCTTTAGTACGAAAGGATTGAGTAGTTAAAATATTTTTGTAAGTTAC-AGctattttgg	
<i>M. crispata</i>	TGCTTTAGTACGAAAGGATTGAGTAGTTAAAATATTTTTATGAATTAC-AGctattttgg	
<i>M. goltziana</i>	TGCTTTAGTACGAAAGGATTAAGTAGTTAAA-TATTTTTATAAATTAC-AGctattttgg *****	
<i>M. brachydactyla</i>	cagataaatatg	671
<i>M. squinado</i>	cagataaatatg	
<i>M. crispata</i>	cagataaatatg	
<i>M. goltziana</i>	cagataaatatg *****	

Figura 4

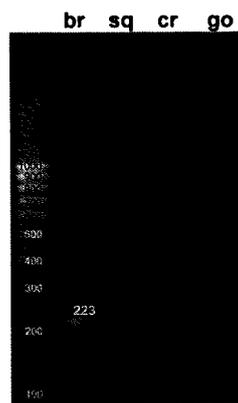


Figura 5

ES 2 342 525 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Vigo

5 <120> Identificación genética de la centolla europea del Atlántico (*Maja brachydactyla*)

<130>

10 <160> 8

<210> 1

<211> 20

15 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

20 <223> Forward primer designed at Christoph Schubart's lab to amplify a fragment of the 16S gene in several decapod crustaceans.

<400> 1

25 ygcctgttta tcaaaaacat 20

<210> 2

30 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

35 <220>

<223> Reverse primer designed at Christoph Schubart's lab to amplify a fragment of the 16S gene in several decapod crustaceans; located in the 5' extreme of the tRNA^{Leu} gene.

40 <400> 2

catattatct gccaaaatag 20

45 <210> 3

<211> 671

<212> DNA

<213> *Maja brachydactyla*

50

<400> 3

55	ygctgttta	tcaaaaacat	gtctatatga	atatttatat	agtctaacct	gctcattgac	60
	taaaaagttt	aaaagccg	gtattttgac	cgtgcaaagg	tagcataatc	attagttctt	120
	taattgagaa	cttgtatgaa	aggttgaaca	agagaaagac	tgatctatt	ataaatctta	180
	aatttaactt	ttaagtgaaa	aggcttaa	aatttagagg	gacgataaga	ccctataaag	240
	ctttataagt	aagtagaaat	ttattgaatt	aaaaattgaa	aactatattt	ctattgtctt	300
	attgtgttgg	ggcgacataa	atataaatta	ttaactgtt	tgagaataag	acataaattt	360
	atgaattaaa	attaattgat	cctttttaa	gatthaagtt	taagttactt	tagggataac	420
60	agcgttattt	cttttgagag	ttcttatcga	gaaagaagtt	tgcgacctcg	atggtgaatt	480
	aaactatctt	gatggtgcag	cagctaagag	agaaagtctg	ttcgactttt	aatggtttac	540
	atgatttgag	ttcagaccgg	cgtgagccag	gtcggtttct	atcttctaaa	tataaaaaat	600
	tgctttagta	cgaaaggatt	gagcagttaa	aatatttttg	tgatttacca	gctattttgg	660
65	cagataatat	g					671

<210> 4

<211> 671

ES 2 342 525 A1

<212> DNA

<213> *Maja squinado*

5 <400> 4

ygcctgttta	tcaaaaacat	gtctatatga	atatttatat	agtctaacct	gctcattgac	60
taaaaagttt	aaaagccgcg	gtattctgac	cgtgcaaagg	tagcataatc	attagttctt	120
taattgggaa	cttgtatgaa	aggttgaaca	agaaaaagac	tgtatctatt	gtaaactcta	180
aatttaactt	ttaagtgaaa	aggcttaaat	aacttagagg	gacgataaga	ccctataaag	240
ctttataagt	aagtagaaat	ttatt-aatt	aataactgaa	acctatattt	ctattatctt	300
attgtgttgg	ggcgacataa	atataaatta	tttaactggt	tgagaataag	acataaattt	360
atgaattgaa	attaattgat	cctttttaaa	gattcaagtt	taagttactt	tagggataac	420
agcgttattt	cttttgagag	ttcttatcga	gaaagaagtt	tgcgacctcg	atgttgaatt	480
aaactatctt	gatggtgtag	cagctaagag	agaaagtctg	ttcgactttt	aaatgtttac	540
atgatttgag	ttcagaccgg	cgtaagccag	gtcggtttct	atcttctaaa	tataaaaaat	600
tgctttagta	cgaaaggatt	gagtagttaa	aatatttttg	taagttac-a	gctatttttg	660
cagataatat	g					671

20 <210> 5

<211> 671

<212> DNA

<213> *Maja crispata*

25

<400> 5

ygcctgttta	tcaaaaacat	gtctatatga	atatttatat	agtctaacct	gctcattgac	60
taaaaagttt	aaaagccgcg	gtattttgac	cgtgcaaagg	tagcataatc	attagttctt	120
taattgggaa	cttgtatgaa	aggttgaaca	agagaaagac	tgtatctatt	gtaaactcta	180
aatttaactt	ttaagtgaaa	aggcttaaat	aacttagagg	gacgataaga	ccctataaag	240
ctttataagt	aagtagaaat	ttatt-aatt	aataactgaa	aactatattt	ctattatctt	300
attgtgttgg	ggcgacataa	atataaatta	tttaactggt	tgagaataag	acataaattt	360
atgaattgaa	attaattgat	cctttttaaa	gattcaagtt	taagttactt	tagggataac	420
agcgttattt	cttttgagag	ttcttatcga	gaaagaagtt	tgcgacctcg	atgttgaatt	480
aaactatctt	gatggtgtag	cagctaagag	agaaagtctg	ttcgactttt	aaatgtttac	540
atgatttgag	ttcagaccgg	cgtagaccag	gtcggtttct	atcttctaaa	tataaaaaac	600
tgctttagta	cgaaaggatt	gagtagttaa	aatattttta	tgaattac-a	gctatttttg	660
cagataatat	g					671

40

<210> 6

<211> 671

<212> DNA

45

<213> *Maja goltziana*

<400> 6

ygcctgttta	tcaaaaacat	gtctatatga	atatttatat	agtctagcct	gctcattgac	60
tattaagttt	aaaagccgcg	gtattttgac	cgtgcaaagg	tagcataatc	attagttctt	120
taattgggaa	cttgtatgaa	aggttgaaca	agagaaagac	tgtgtctatt	ataaatctta	180
aatttaactt	ttaagtgaaa	aggcttaaat	aatttagagg	gacgataaga	ccctataaag	240
ctttataagt	aagtggaaat	ttattaaaat	aaaaattgaa	aattatattt	ctattgtctt	300
attatggttg	ggcgacataa	atataaatta	tttaactggt	taagaataaa	acatgaattt	360
ttgaattaaa	attaattgat	cctttttaaa	gatttaagtt	taagttactt	tagggataac	420
agcgttattt	cttttgagag	ttcttatcga	gaaagaagtt	tgcgacctcg	atgttgaatt	480
aaactatctt	gatggtgtag	cagctgagag	agaaagtctg	ttcgactttt	aaatgtttac	540
atgatttgag	ttcagaccgg	cgcgagccag	gtcggtttct	atcttctaaa	aattaaaaat	600
tgctttagta	cgaaaggatt	aagtagttaa	a-tattttta	taaattac-a	gctatttttg	660
cagataatat	g					671

<210> 7

<211> 22

65

<212> DNA

<213> *Maja brachydactyla*

ES 2 342 525 A1

<400> 7

aagtttaaaa gccgcgggat tt

22

5

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

10 <213> *Maja brachydactyla*

<400> 8

15

tatagttttc aattttaat tc

22

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 342 525

② Nº de solicitud: 200801656

③ Fecha de presentación de la solicitud: **02.06.2008**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12Q 1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SOTELO, G. et al., "Genetic identification of the northeastern Atlantic spiny spider crab as <i>Maja brachydactyla</i> Balss, 1922.", JOURNAL OF CRUSTACEAN BIOLOGY, 2008 Feb, Vol. 28, No. 1, páginas 76-81, ISSN: 0278-0372, todo el documento, en particular, Materiales y Métodos: 'DNA sequencing'; Resultados: 'Genetic differentiation for 16S'.	1,2
A	SOTELO, G. et al., "Identification and characterization of microsatellite loci in the spiny spider crab <i>Maja brachydactyla</i> ", CONSERVATION GENETICS, 2007, Vol. 8, No. 1, páginas 245-247, ISSN: 1566-0621, todo el documento.	1,2
A	SCHUBART, C. D. et al., "Molecular phylogeny of the crab genus <i>Brachynotus</i> (Brachyura: Varunidae) based on 16S rRNA gene", HYDROBIOLOGIA, 2001, Vol. 449, páginas 41-46, ISSN 0018-8158, todo el documento.	1,2
A	WO 2007011367 A2 (MONTAGNIER, LUC et al.) 25.01.2007, todo el documento.	1,2

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:

<p>Fecha de realización del informe 23.06.2010</p>	<p>Examinador J.L. Vizán Arroyo</p>	<p>Página 1/5</p>
---	--	-----------------------

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.06.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1, 2	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1, 2	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Sotelo, G. et al., J. Crustac. Biol., (Feb 2008), 28(1): 76-81.	Feb 2008
D02	Sotelo, G. et al., Conserva. Geneti., (2007), 8(1): 245-24.	2007
D03	Schubart, C. D. et al., Hydrobiologia, (2001), 449: 41-46.	2001
D04	WO 2007011367 A2	25-01-2007

Observaciones sobre documentos:

En D1 se describe un procedimiento de diferenciación genética de las especies *Maja brachydactyla*, *Maja squinado* y *Maja crispata*.

En D2 se identifican y caracterizan diferentes loci microsatélites en *Maja brachydactyla*.

En D3 y D4 se describen procedimientos de identificación de microorganismos basado en una reacción PCR anidada.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes).

1.1. La presente invención satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1 y 2, es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

2.1. Reivindicación independiente 1.

2.1.1. El documento D1 constituyen el estado de la técnica más próximo. En él se describe un procedimiento para diferenciar entre sí las especies de crustáceos *Maja brachydactyla*, *Maja squinado* y *Maja crispata*, basado en el análisis del gen mitocondrial 16S de cada una de ellas mediante la técnica SSCP ('single-strand conformation polymorphism') y secuenciación de ADN. En concreto, La técnica SSCP mostró que un fragmento de 518 pb del gen 16S presenta un patrón de movilidad electroforética específico de cada especie. La comparación de las correspondientes secuencias reveló la presencia de un nucleótido Guanina (G) extra en la posición 246 en el fragmento obtenido en *M. brachydactyla* frente a los obtenidos en *M. squinado* y *M. crispata* (cf. D1: Resultados: 'Genetic Differentiation for 16S'; Discusión).

2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación independiente 1 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de un nuevo procedimiento de identificación de *Maja brachydactyla* frente a las especies *Maja squinado*, *Maja crispata* y *Maja goltziana*.

2.1.3. La solución propuesta es el procedimiento de la reivindicación 1 que comprende básicamente una reacción PCR anidada caracterizada por la amplificación de un primer fragmento 671 pb perteneciente al gen mitocondrial 16S de especie a identificar, seguida de la amplificación de un segundo fragmento de 223 pb incluido en el anterior. La identificación de *M. brachydactyla* es positiva cuando se produce la amplificación efectiva del fragmento de 223 pb. El cebador reverso 16Hbr (SEQ ID No 8), empleado en la segunda reacción de amplificación, está diseñado de manera que hibrida específicamente con la G extra y los nucleótidos adyacentes de la secuencia del gen de *M. brachydactyla* descrita en D1. Por consiguiente, el procedimiento de la invención consiste básicamente en la detección de esta peculiaridad en la secuencia del gen 16S de *M. brachydactyla*, es decir, en el uso del cebador 16Hbr (SEQ ID No 8). Por otro lado, la obtención de un cebador (o de una sonda) que hibride específicamente con una secuencia conocida supone el aplicación de técnicas ampliamente caracterizadas en el estado de la técnica (cf. D2-D4).

Hoja adicional

Por lo tanto, se considera que el procedimiento de identificación de *Maja brachydactyla* de la invención basado en una reacción PCR anidada caracterizada por el uso del cebador 16Hbr (SEQ ID No 8) sería evidente para el experto en la materia sobre la base del estado de la técnica más próximo (D1), junto con las técnicas de uso y aplicación habitual en este campo (cf. D2-D4).

Por consiguiente, el objeto de la reivindicación independiente 1 y de la dependiente 2 no es inventivo.

2.2. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-2, no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patente.