



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 353 092**

② Número de solicitud: 200901650

⑤ Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/12 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **22.07.2009**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
25.02.2011

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Cádiz
OTRI-Universidad de Cádiz
c/ Ancha, 16
11001 Cádiz, ES**

⑦ Inventor/es: **Cross Pacheco, Ismael;
Merlo Torres, Manuel Alejandro y
Rebordinos González, Laureana**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Método para la detección e identificación de especies de la familia Sparidae.**

⑤ Resumen:

Método para la detección e identificación de especies de la familia Sparidae.

La presente invención se refiere a un método para la detección e identificación de las especies *Pagrus pagrus*, *Pagrus auriga* y *Diplodus sargus*, mediante el empleo de técnicas PCR para la amplificación de la secuencia de la región ITS-1 del gen ribosómico ADNr 45S. Asimismo, se contemplan las secuencias aisladas de la región ITS-1 de dichas especies, no descritas anteriormente, así como los oligonucleótidos para la amplificación de dichas secuencias. Finalmente, la invención se refiere a un kit para la realización del método de la invención.

ES 2 353 092 A1

DESCRIPCIÓN

Método para la detección e identificación de especies de la familia Sparidae.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en sentido amplio, al análisis genético de diferentes especies de la familia Sparidae a través de cebadores específicos y en concreto a un método para la detección e identificación de las especies *Pagrus pagrus*, *Pagrus auriga* y *Diplodus sargus*, mediante el empleo de técnicas PCR para la amplificación de la secuencia de la región ITS-1 del gen ribosómico ADN_r 45S de dichas especies.

Antecedentes de la invención

La familia Sparidae comprende unas 125 especies distribuidas en 37 géneros (Accioly I. V., and Molina W. F. (2008). *Cytogenetic studies in Brazilian marine Sciaenidae and Sparidae fishes (Perciformes)*. *Genetics and Molecular Research* 7: 358-370), de ellas aproximadamente 24 especies (10 géneros) están descritas en el Atlántico noreste y el Mediterráneo (De la Herrán R., Ruiz Rejón C., Ruiz Rejón M., and Garrido-Ramos M. A. (2001). *The molecular phylogeny of the Sparidae (Pisces, Perciformes) based on two satellite DNA families*. *Hereditas* 87: 691-697).

Los miembros de esta familia están ampliamente distribuidos por aguas tropicales y templadas en los Océanos Pacífico, Índico y Atlántico; así como por los mares europeos, sobre todo el Mediterráneo (Accioly & Molina, 2008; Cataudella S., Perin Riz P., and Sola L. (1980). *A chromosome study of eight mediterranean species of Sparidae (Pisces, Perciformes)*. *Genética* 54: 155-159). En concreto, la especie *Pagrus pagrus* se distribuye a lo largo de las dos costas Atlánticas, por el oeste se encuentra desde las costas de EEUU hasta Argentina, incluyendo el Golfo de México y las aguas del Caribe. Por el Atlántico este se encuentra desde las Islas Británicas hasta las costas de Senegal, incluyendo todo el Mediterráneo, las Islas Madeira y Canarias. Mientras, *Pagrus auriga* coincide con *P. pagrus* en las costas del Atlántico este, desde Portugal hasta Angola, incluyendo también el Mediterráneo, Islas Madeira y Canarias (Bauchot M. L., and Hureau J. C. (1986). *Sparidae*. In "Fishes of the North-Eastern Atlantic and the Mediterranean" (M. L. B. P. J. P. Whitehead, J. C. Hureau, J. Nielsen, and E. Tortonese, Ed.), UNESCO, Paris). De la misma forma, *Diplodus sargus* se distribuye a lo largo de las costas del Atlántico este, desde Francia hasta Angola, incluyendo también el Mediterráneo y las Islas Madeira, Canarias y Azores. Los espáridos poseen un enorme valor comercial y económico, tanto desde el punto de vista de la pesca extractiva como desde el de la acuicultura. Tanto el pargo (*Pargus pargus*), la urta (*Pargus auriga*) y el sargo (*Diplodus sargus*) alcanzan precios muy elevados en los mercados y son especies prioritarias para la diversificación de la acuicultura.

Los problemas taxonómicos evidentes dentro de la familia Sparidae, la amplitud de sus hábitats y su elevado interés comercial, hacen necesaria la búsqueda de marcadores moleculares que permitan identificar especies o diferenciar entre poblaciones de una misma especie.

En este sentido, las familias multigénicas del ADN ribosómico han demostrado ser eficaces para este objetivo en otras especies de peces, como en el género Brycon (Wasko A. P., Martins C., Wright J. M., and Galetti Jr P. M. (2001). *Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus Brycon*. *Genome* 44: 893-902), en salmónidos (Pendás A. M., Morán P., Martínez J. L., and García-Vásquez E. (1995). *Applications of 5S rDNA in Atlantic salmon, brown trout, and in Atlantic salmon x brown trout hybrid identification*. *Molecular. Ecol.* 4: 275-276), en cíclidos (Bootton G. C., Kaufman L., Chandler M., Oguto-Ohwayo R., Duan W., and Fuerst P. A. (1999). *Evolution of the ribosomal RNA Internal Transcribed Spacer One (ITS-1) in Cichlid fishes of the Lake Victoria region*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11: 273-282), en lenguados (Manchado M., Zuasti E., Cross I., Merlo A., Infante C., and Rebordinos L. (2006a). *Molecular characterization and chromosomal mapping of the 5S rRNA gene in Solea senegalensis: a new linkage to the U1, U2, and U5 small nuclear RNA genes*. *Genome*; M. Manchado, L. Rebordinos and C. Infante (2006b). *U1 and U2 small nuclear RNA genetic linkage: a novel molecular tool for identification of six sole species (Soleidae, Pleuronectiformes)*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 3765-3767), o en escómbridos (Infante C., Blanco E., Zuasti E., Crespo A., and Manchado M. (2007). *Phylogenetic differentiation between Atlantic Scomber colias and Pacific Scomber japonicus based on nuclear DNA sequences*. *Genética* 130: 1-8; Manchado M., Infante C., and Catanese G. (2007). "Marcadores moleculares en especies marinas. Bases teóricas, tipos y aplicación al estudio de las relaciones filogenéticas, estructura poblacional y autenticación de melva (*Auxis rochei*)", *Viceconsejería. Servicio de Publicaciones y Dilvulgación, Sevilla*). Se han utilizado incluso para la identificación de especies en filetes de pescado ahumados (Carrera E. et al. "Differentiation of smoked *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* and *Brama raii* using the nuclear marker 5S rDNA" *International Journal of Food Science and Technology* (2000), 35, 401-406).

Salvo excepciones, como son algunos protozoos y hongos, los ADN ribosómicos de eucariotas se encuentran constituyendo dos familias multigénicas distintas cuyas unidades se repiten en tándem de cientos a miles de veces en el genoma nuclear: la familia representada por el ADN ribosómico 45S, que codifica para los genes ribosómicos 18S, 5.8S y 28S (26S en levaduras), y la familia representada por el gen 5S, que codifica para el ARN ribosómico 5S.

Ambas familias suelen encontrarse en cromosomas distintos. Cada uno de estos loci está constituido por repeticiones de estas unidades ribosómicas dispuestas en tándems.

ES 2 353 092 A1

La unidad 45S incluye, aparte de los mencionados genes, dos espaciadores internos que se transcriben denominados ITS (Internal Transcribed Spacers); el ITS-1, que separa los genes 18S y 5.8S, y el ITS-2, que separa los genes 5.8S y 28S.

5 Cada una de estas unidades se encuentra a su vez separada de la contigua por dos tipos de espaciadores: un espaciador externo que también se transcribe, ETS, (External Transcribed Spacer), que flanquea el gen 18S en su extremo 5' y al 28S en el 3', y otra secuencia, que en su origen se consideró como no transcrita, situada entre los 2 ETSs. Con posterioridad se ha comprobado que esta última secuencia se transcribe a niveles bajos en algunas especies y que está implicada en la regulación de la transcripción de los genes ribosómicos, por lo que se ha denominado IGS
10 (Intergenic Spacer).

Las regiones espaciadoras no codificantes del gen ribosómico 45S (ITS-1, ITS-2 o IGS) han sido utilizadas en multitud de ocasiones como marcadores para diferenciar especies o incluso para vislumbrar la estructura poblacional de una misma especie, por lo que estas regiones de ADN se sitúan como excelentes marcadores moleculares para la
15 identificación de especies.

Por otra parte, el creciente interés industrial hacia métodos rápidos ha conducido a la elaboración y aplicación de métodos basados en PCR-multiplex (PCR mediante el uso de múltiples cebadores) para la detección e identificación de especies utilizadas en elaboración de alimentos, por ejemplo identificación de materia prima a base de bonito (*Wen-Feng Lin and Deng-Fwu Hwang "A multiplex PCR assay for species identification of raw and cooked bonito" Food Control 19 (2008) 879-885*), detección de la adulteración de las especies de peces en la industria de restaurantes (*Asensio L. et al. "Application of multiplex PCR for the identification of grouper meals in the restaurant industry" Food Control 19 (2008) 1096-1099*), alimentos a base de carnes (*Ghovvati S. et al. "Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay" Food Control 20 (2009) 696-699*) y también para estudiar la seguridad alimentaria como la identificación de microbios patógenos en los alimentos (*Germini A. et al. "Simultaneous detection of Escherichia coli 0175:H7, Salmonella spp., and Listeria monocytogenes by multiplex PCR" Food Control 20 (2009) 733-738*) y cereales genéticamente modificados (*Forte V.T. et al. "A general multiplex-PCR assay for the general detection of genetically modified soya and maize" Food Control 16 (2005) 535-539*).

30 Los autores de la presente invención han secuenciado por primera vez la región ITS1 en las especies *Pagrus pagrus* (pargo), *Pagrus auriga* (urta) y *Diplodus sargus* (sargo), de la familia Sparidae, lo que les ha permitido obtener un marcador molecular para poder diferenciar estas tres especies de tan alto valor comercial.

Así, han desarrollado un nuevo método para la detección e identificación simultánea en una muestra de estas 3
35 especies mediante la amplificación por PCR multiplex de la secuencia de la región ITS-1 del gen ribosómico 45S utilizando cebadores especie-específicos diseñados para este fin y empleando una sola muestra del pez o del producto procesado. Este método permite asegurar la autenticidad de los alimentos que contengan estas especies, permitiendo iniciativas como denominaciones de origen.

40 Objeto de la invención

En primer lugar, es objeto de la invención un método para la detección e identificación simultánea en una muestra de la presencia o ausencia de al menos una de las especies de la familia Sparidae, seleccionada entre *Pagrus pagrus*, *Pagrus auriga* y *Diplodus sargus*, mediante la amplificación por PCR de la secuencia de la región espadadora ITS-1
45 del gen ribosómico 45S de al menos una de esas especies.

Son también objeto de la invención las secuencias de la región espadadora ITS-1 no codificante del ADN ribosómico 45S de cada una de estas especies, mostradas en SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3, respectivamente, empleadas como marcador genético para la detección e identificación de las especies citadas.

50 Son también objeto de la invención cada uno de los cebadores empleados en la amplificación de la región espaciadora ITS-1 no codificante del ADN ribosómico 45S de cada una de estas especies, de secuencias SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, y SEQ ID NO 7.

55 Finalmente, es objeto de la invención un kit para llevar a cabo el método descrito.

Descripción de las figuras

60 Figura 1: Productos de amplificación de la región ITS-1 en *Pagrus pagrus*, *Pagrus auriga* y *Diplodus sargus*.

Figura 2: Sitio de anclaje (sombreado) de los cebadores específicos en la región ITS-1 del gen 45S de *Pagrus pagrus*.

65 Figura 3: Sitio de anclaje (sombreado) de los cebadores específicos en la región ITS-1 del gen 45S de *Pagrus auriga*.

Figura 4: Sitio de anclaje (sombreado) de los cebadores específicos en la región ITS-1 del gen 45S de *Diplodus sargus*.

Descripción de la invención

La presente invención se enfrenta al problema de detectar e identificar simultáneamente en una muestra la presencia de hasta tres especies de la familia Sparidae (*Pagrus pagrus*, *Pagrus auriga* y *Diplodus sargus*) de forma rápida, específica y eficaz.

La solución planteada por los autores de la presente invención se basa en el empleo de la secuencia de la región ITS-1 del ADN ribosómico 45S, de aquí en adelante secuencia de la región ITS-1, como marcador genético y en el diseño de cuatro cebadores especie-específicos (tres cebadores “forward” o sentido, específicos de cada especie, y un cebador “reverse” o antisentido, común a las tres especies) que amplifican dicha secuencia, obteniéndose unas bandas de producto amplificado diferenciales en función de la/las especie/s presentes en la muestra.

El alineamiento de las secuencias completas del ADNr 45S de las tres especies estudiadas (*Pagrus pagrus*, *Pagrus auriga* y *Diplodus sargus*) revela una diferencia muy significativa en las regiones ITS-1 de dichas especies, lo que ha permitido desarrollar el método objeto de la presente invención.

Así, en una realización principal se contempla un método para la detección e identificación simultánea en una muestra de al menos una de las especies de la familia Sparidae seleccionada entre *Pagrus pagrus*, *Pagrus auriga* y *Diplodus sargus*, mediante la amplificación por PCR de la secuencia de la región ITS-1 del gen ribosómico 45S de al menos una de esas especies (de aquí en adelante, método de la invención).

La secuencia de la región ITS-1 de cada una de estas especies no había sido secuenciada anteriormente, y por tanto, no había sido descrita nunca como marcador genético para la detección y/o identificación de especies de la familia Sparidae.

Por tanto, en otro aspecto principal de la invención se contempla cada una de las secuencias aisladas correspondientes a las regiones ITS-1 del ADNr 45S de cada una de las especies citadas empleadas como marcadores genéticos en el método de la invención.

Concretamente, se contempla una molécula de ADN aislada que se corresponde con la secuencia de la región ITS-1 de la especie *Pagrus pagrus*, mostrada en SEQ ID NO 1; una molécula de ADN aislada que se corresponde con la secuencia de la región ITS-1 de la especie *Pagrus auriga*, mostrada en SEQ ID NO 2; y una molécula de ADN aislada que se corresponde con la secuencia de la región ITS-1 de la especie *Diplodus sargus*, mostrada en SEQ ID NO 3.

En la presente invención, por “muestra” se entiende tanto una muestra de un pez, fresco o congelado (en la que se detectaría una o ninguna de las especies), o como una muestra de un producto procesado (donde se podrían detectar e identificar hasta las 3 especies simultáneamente). Por “producto procesado” se entiende aquellos productos, frescos o congelados, elaborados a base del pez entero o una parte del mismo.

Ejemplos no limitantes de “productos procesados” son productos ahumados, desecados, fileteados, enlatados, etc.

En una realización preferida, la PCR empleada para llevar a cabo la amplificación del método de la invención es una PCR multiplex en un solo paso, que permite emplear simultáneamente tantos cebadores como sea necesario, en este caso cuatro cebadores, en lugar de un solo par, como en la PCR estándar, lo que permite la detección e identificación simultánea de la presencia o ausencia de las tres especies citadas en la presente invención, a partir de una sola muestra.

La extracción del ADN de la muestra se puede llevar a cabo mediante cualquier kit de extracción de ADN conocido en el estado de la técnica.

Para la realización del método se han diseñado PCRs que puedan ser realizadas en un rango amplio de condiciones. Cualquier mezcla de reacción de las habitualmente empleadas en PCR dará buenos resultados, aunque en realizaciones preferidas de la invención se emplean concentraciones finales de 10 ng de ADN genómico, 3 mM de MgCl₂, 200 μM dNTP's, 0.2 μM de cada cebador y 2U de la enzima polimerasa Taq. Por otra parte, se puede emplear cualquier termociclador normal, aunque en realizaciones particulares de la invención se emplea un termociclador Gene Amp® PCR System 2700. Los tiempos de desnaturalización, anillamiento y extensión; suelen estar entre 30 y 75 segundos en 25-40 ciclos, pero en realizaciones preferidas se emplean tiempos de 45 segundos para desnaturalización y anillamiento y 60 segundos para extensión en 35 ciclos.

Las diferencias interespecíficas de las regiones ITS-1 se pueden resolver y ser visualizadas mediante diversos tipos de electroforesis, aunque en realizaciones particulares de la invención la combinación de cebadores seleccionados para la realización del PCR multiplex genera productos de PCR diferenciales visualmente mediante electroforesis en gel de agarosa.

En una realización particular del método de la invención la amplificación de la SEQ ID NO 1 se lleva a cabo mediante el empleo del par de cebadores de secuencias SEQ ID NO 4 y 7.

De forma preferida, el empleo de la combinación de cebadores de secuencias SEQ ID NO 4 y SEQ ID NO 7, permite la amplificación de un fragmento de la región ITS-1 de 789 pb, específico de *Pagrus pagrus*.

ES 2 353 092 A1

En otra realización particular, la amplificación de la SEQ ID NO 2 se lleva a cabo mediante el empleo del par de cebadores de secuencias SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 7.

De forma preferida, el empleo de la combinación de cebadores de secuencias SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 7, permite la amplificación de un fragmento de la región ITS-1 de 644 pb, específico de *Pagrus auriga*.

En otra realización particular, la amplificación de la SEQ ID NO 3 se lleva a cabo mediante el empleo del par de cebadores de secuencias SEQ ID NO 6 y SEQ ID NO 7.

De forma preferida, el empleo de la combinación de cebadores de secuencias SEQ ID NO 6 y SEQ ID NO 7, permite la amplificación de un fragmento de la región ITS-1 de 553 pb, específico de *Diplodus sargus*.

Como se ha citado anteriormente, la secuenciación de las regiones ITS-1 de las especies estudiadas y sus posteriores alineamientos han revelado sitios polimórficos en las distintas secuencias y propios de cada especie, lo que ha permitido diseñar estos cebadores específicos de especie que permiten la identificación de cada una de estas especies y la diferenciación entre ellas de forma simultánea en un solo paso.

Así, la presente invención contempla los oligonucleótidos de secuencias mostradas en SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6 y SEQ ID NO 7 para su empleo en el método de la invención.

De forma particular, el oligonucleótido de SEQ ID NO 4 con secuencia mostrada en SEQ ID NO 4, se emplea como cebador en la identificación de la especie *Pagrus pagrus*.

El oligonucleótido, con secuencia mostrada en SEQ ID NO 5, se emplea como cebador en la identificación de la especie *Pagrus auriga*.

El oligonucleótido, con secuencia mostrada en SEQ ID NO 6, se emplea como cebador en la identificación de la especie *Diplodus sargus*.

Y el oligonucleótido, con secuencia mostrada en SEQ ID NO 7, se emplea como cebador en la identificación de cualquiera de las especies *Pagrus pagrus*, *Pagrus auriga* y *Diplodus sargus*.

El método de la presente invención es más rápido y fiable que los anteriormente descritos en el estado de la técnica. Más rápido porque el empleo de la secuencia de la región ITS-1 como marcador genético permite llevar a cabo el método en un solo paso, utilizando únicamente la técnica PCR, en vez de la técnica PCR-RFLP con enzimas de restricción, empleada en otros trabajos, y más fiable por que se emplean cebadores especie-específicos, diseñados exclusivamente para la realización de este método, que amplifican solamente en una especie concreta.

Finalmente, otro aspecto principal de la invención se refiere a un kit para llevar a cabo el método de detección e identificación de al menos una de las especies citadas, descrito en la presente invención, que comprende una solución formada por un oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO 7 y al menos un oligonucleótido seleccionado de entre SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6. En una realización preferida, la solución del kit incluye simultáneamente los cuatro oligonucleótidos (SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6 y SEQ ID NO 7).

Los ejemplos que siguen a continuación ilustran la presente invención, pero no deben ser considerados como limitaciones a los aspectos esenciales del objeto de la misma, tal como han sido expuestos en los apartados anteriores de esta descripción.

Ejemplo 1

Material y métodos

Muestras

Para llevar a cabo el análisis molecular de las familias multigénicas se tomaron muestras de tejido muscular de tres individuos distintos de *Diplodus sargus*, *Pagrus pagrus* y *Pagrus auriga*. Los peces fueron cedidos por el centro de investigación IFAPA "El Toruño" (Puerto de Santa María, Cádiz, España).

Clonación, secuenciación y análisis de las secuencias

La extracción de ADN de los tejidos musculares se realizó siguiendo el protocolo descrito en el kit FastDNA[®] (Q-Biogene). Una vez comprobada la validez de la extracción por análisis en gel de agarosa, se realizó a cada individuo una amplificación por PCR de la región completa del ITS-1, incluyendo parte de las regiones codificantes ADN_r 18S y ADN_r 5.8S. Para ello se utilizaron las parejas de cebadores descritas por Kuriwa K., Hanzawa N., Yoshino T., Kimura S., and Nishida M. (2007). *Phylogenetic relationships and natural hybridization in rabbitfishes (Teleostei: Siganidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA analyses. Molecular Phylogenetics and Evolution* **45**: 69-80. La reacción se llevó a cabo en 50 μ l totales que contenían 60-80 ng de ADN genómico, 3 mM de Cl₂Mg, 300 μ M de cada dNTP, 0.2 pmol de cada cebador y 3 U de Taq polimerasa (Euroclone). Las condiciones de amplificación

ES 2 353 092 A1

fueron las mismas descritas por Cross I., Díaz E., Sanchez I., and Rebordinos L. (2005). *Molecular and cytogenetic characterization of Crassostrea angulata chromosomes. Aquaculture* **247**: 135-144.

Los productos de PCR fueron purificados mediante el kit NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel). Estos productos de PCR purificados fueron clonados en vectores pGEM®-T Easy (Promega), una vez crecidos los clones recombinantes se extrajeron los plásmidos con el kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel). Los plásmidos se enviaron al Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba (España) y al SCAI de la Universidad de Málaga (España) para la secuenciación de los insertos clonados.

Las secuencias de los clones fueron alineadas con el programa ClustalW (Thompson J. D., Higgins D. G., and Gibson T. J. (1994). *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-7680), y las secuencias consenso fueron creadas mediante el programa BioEdit (Hall T. A. (1999). *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids Symp. Ser.* **41**: 95-98). Las secuencias consenso fueron sometidas al BLASTN (Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., and Lipman D. J. (1990). *Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol.* **215**: 403-410), tanto las regiones codificantes como las espaciadoras. Por otro lado, se procedió al diseño, dentro de los espaciadores ITS-1, de cebadores específicos de cada especie, consiguiendo diseñar 3 cebadores “forward” específicos de cada especie y uno “reverse” común a las tres especies (Tabla 1). Con estos cuatro cebadores se realizó una PCR multiplex, cuyas condiciones de PCR fueron las mismas, y para observar las bandas específicas de cada especie se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% durante 1.5 horas a 80 V.

TABLA 1

Descripción de los cebadores utilizados

Cebadores específicos	Secuencia
‘Forward’ <i>P. pagrus</i>	ITS1PpF: 5’-GCCTGCGCGGATAAAGCAC-3’ (SEQ ID NO 4)
‘Forward’ <i>P. auriga</i>	ITS1PaF: 5’-GTTGCTCGGAACGCTCTCCT-3’ (SEQ ID NO 5)
‘Forward’ <i>D. sargus</i>	ITS1DsF: 5’-CGCGACAAAAGCAACTATGT-3’ (SEQ ID NO 6)
‘Reverse’ común	ITS1INR: 5’-CACAAAGACAGAGGGTTTGAC-3’ (SEQ ID NO 7)

Resultados

De cada especie se amplificó al menos 3 individuos. Se obtuvo unas amplificaciones claras y repetitivas de la región ITS-1, dando una banda de 789 pb en los individuos de *P. pagrus*, de 644 pb en los de *P. auriga* y de 553 pb en los de *D. sargus* (Fig. 1). Con estos resultados se pudieron identificar de manera rápida y clara tres especies pertenecientes a la familia Sparidae (pargo, urta y sargo) de alto valor comercial y de enorme proyección en el campo de la acuicultura.

ES 2 353 092 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la detección e identificación simultánea en una muestra de al menos una de las especies de la familia *Sparidae* seleccionada entre *Pagrus pagrus*, *Pagrus auriga* y *Diplodus sargus*, mediante la amplificación por PCR de la secuencia de la región espadadora ITS-1 del gen ribosómico 45S de al menos una de esas especies.
- 10 2. Método, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la amplificación se lleva a cabo mediante PCR multi-plex.
- 15 3. Método, según la reivindicación 1, donde las secuencias de la región espadadora se seleccionan entre SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3.
- 20 4. Método, según la reivindicación 3, donde la amplificación de la SEQ ID NO 1 se lleva a cabo mediante el empleo del par de cebadores de secuencias SEQ ID NO 4 y 7.
- 25 5. Método según la reivindicación 4, **caracterizado** porque el empleo de la combinación de cebadores de secuencias SEQ ID NO 4 y SEQ ID NO 7, permite la amplificación de un fragmento de la región espaciadora de 789 pb, específico de *Pagrus pagrus*.
- 30 6. Método según la reivindicación 3, donde la amplificación de la SEQ ID NO 2 se lleva a cabo mediante el empleo del par de cebadores de secuencias SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 7.
- 35 7. Método según la reivindicación 6, **caracterizado** porque el empleo de la combinación de cebadores de secuencias SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 7, permite la amplificación de un fragmento de la región espaciadora de 644 pb, específico de *Pagrus auriga*.
- 40 8. Método según la reivindicación 3, donde la amplificación de la SEQ ID NO 3 se lleva a cabo mediante el empleo del par de cebadores de secuencias SEQ ID NO 6 y SEQ ID NO 7.
- 45 9. Método según la reivindicación 8, **caracterizado** porque el empleo de la combinación de cebadores de secuencias SEQ ID NO 6 y SEQ ID NO 7, permite la amplificación de un fragmento de la región espaciadora de 553 pb, específico de *Diplodus sargus*.
- 50 10. Molécula de ADN aislada que se corresponde con la secuencia de la región espaciadora ITS-1 no codificante del ADN ribosómico 45S de la especie *Pagrus pagrus*, mostrada en SEQ ID NO 1.
- 55 11. Molécula de ADN aislada que se corresponde con la secuencia de la región espaciadora ITS-1 no codificante del ADN ribosómico 45S de la especie *Pagrus auriga*, mostrada en SEQ ID NO 2.
- 60 12. Molécula de ADN aislada que se corresponde con la secuencia de la región espaciadora ITS-1 no codificante del ADN ribosómico 45S de la especie *Diplodus sargus*, mostrada en SEQ ID NO 3.
- 65 13. Oligonucleótido, con secuencia mostrada en SEQ ID NO 4, para su uso como cebador en la identificación de la especie *Pagrus pagrus*, según el método de la reivindicación 1.
14. Oligonucleótido, con secuencia mostrada en SEQ ID NO 5, para su uso como cebador en la identificación de la especie *Pagrus auriga*, según el método de la reivindicación 1.
15. Oligonucleótido, con secuencia mostrada en SEQ ID NO 6, para su uso como cebador en la identificación de la especie *Diplodus sargus*, según el método de la reivindicación 1.
16. Oligonucleótido, con secuencia mostrada en SEQ ID NO 7, para su uso como cebador en la identificación de las especies *Pagrus pagrus*, *Pagrus auriga* y *Diplodus sargus*, según el método de la reivindicación 1.
17. Kit para llevar a cabo el método de las reivindicaciones 1-9 que comprende una solución formada por el oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO 7 y al menos un oligonucleótido seleccionado de entre SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6.
18. Empleo de la región ITS-1 del gen ribosómico 45S como marcador genético para la detección e identificación de especies de la familia Sparidae.

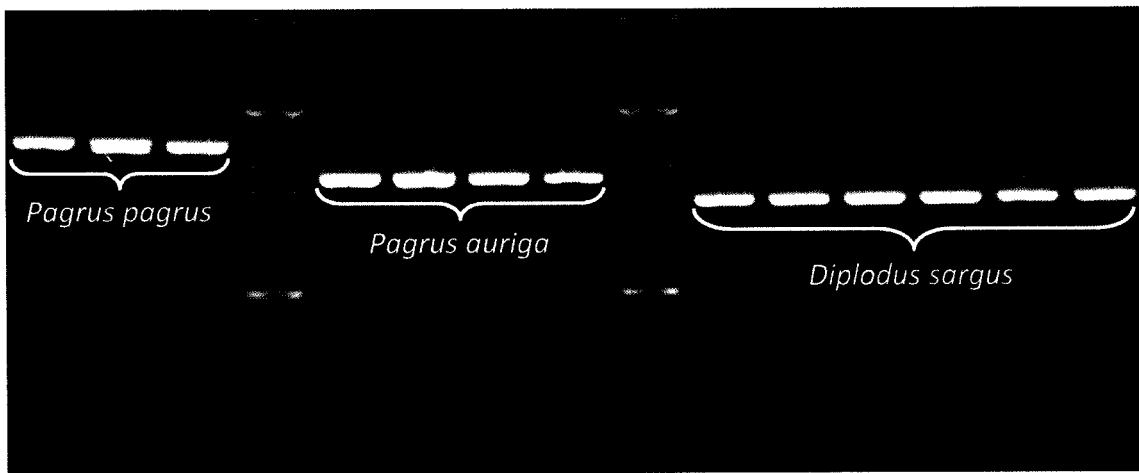


FIGURA 1

ES 2 353 092 A1

```

1      ACCGGTTGTC TGCCAGGTTT CCGGCCGAGG GGCCAGCCTG CGCGGATAAA GCACAAACTC 60
61     GAACGCCGCC GAGGGTCTCT CGTCAGGCGC GTCGACACCC CTTTCGCGGGG GGGCCGGCGT 120
121    CCGGCCGGGTC TCCCGAGGTG CGCGGCTCTC CGTGGTAGCT CGGGCCTCCT CCTCTACCCT 180
181    TGCACCTCTC TCTCGGGGGT TGTGCCTGCG GCTGGGGGTT GGTTGAACCT GCGCTGCGGT 240
241    GGGCTGCGGG AGTCGGGGGG GCAGGCGCTC TCCGTGGTAG CTCGGGCCTC TTCCTCTACC 300
301    CTTGCACCTC TCTCTCGTGG GGGGGGTGCC TCGGGCTGGG GGTGGTTGAA CCTTGCGCTG 360
361    CGGTGGGTGT TGGGCTCCTC CTCCACGCTC CCACCAACCC TGTGTGCCGG AGCCTCGAAC 420
421    CCAAACCGGG CGAACTCGCT TCGCCGCCGG CTACGCCCCC TCCACCCACG CTACGCTTCC 480
481    CGCTCGGCCT GCTCCGAGGG CACGACGGAC TTGACGTGTC GGGTTGCGCT CGCAGGAGGG 540
541    GGTACGGTGG TGTCGCCTAG TCCGGTAACA CTGGGCCCCG CCCCAAAACC CATTTCGGAAC 600
601    CTCACCCCTC CAAGCGCGGT TCGGGTTGCC TCGACCCTGG CCTCCCTCCG CGCGCCTCCG 660
661    GGTACCCAAC TCGCCTCTCC CCTCCGGGGA TTGGCGGGGG GTTCAATGAC TCCTACACCG 720
721    AACTGACCCG AGCCCCAGCG GCGGAGGCTT GTCCGTGTGG AGCGCCCGGA GGTTTTTTGGG 780
781    GGTTAACCCC CCCATTTTTT TTTTGTCAA CCCTCTGTCT TGTGAACTTG TGGCCAAGGT 840
841    GAAAATGAAC CAAAAACAA ACCTTGACAA CTCTTAGCGG TGGATCACTC 890

```

FIGURA 2

ES 2 353 092 A1

```
1   ACCGGTTTCT TTCTGGCGGG CCAGTCCCCT TGCTCGGAAC GCTCTCCTCC TCGCCGAGGG 60
61  TCTCTCGTCC GGC CGTCGC CCCTTAGCGG GGCCGGCGCC CGGCGGGTCT CCCGAGGTGT 120
121 CGCGGTTCTC CGTCGTCGCC TGGGCCTCTT CCTCTCCCCT TGCACCTCTC CCAAGGGGTG 180
181 CCTGCGGCGG GGGGTGGTTG AACTTGCCTT GCGGTGGGCC GCGGGTGGGG TCAAACCCTG 240
241 CCAACAAACC ACCTGTAGTC TGGAGCCTCG AACCCAACCG GCGGACCTCG CTTGCCACC 300
301 GGTTACGCCC CCTCCACCC ACGCTACGCT CCCGCTCGGC CTGTTCCGAG GGCTGGACGG 360
361 ACTCGACCTG TCGGGTGC GC TCGCGGGAGG GGTACGGTG GTGTGCCTAG TCCGGTAACG 420
421 CTGGGCCCGG CCCAAAACA TTCGGAACCT CACCTCCCAA GCGCGGTTGC GGTCGCCCCG 480
481 CCCTGGCCTC CCTCCGCGCG CCTCCGGGTA CCCAACTCTC CTCTCCCCTC CGGGGAGAGG 540
541 CGGGGGGTTT AATGACTCCT ACACCGCCCT GTCCACCCTG CCCAGCGGC AGGTGGCTTG 600
601 TCCGTGTGGA GCGCCCGGAG GTTGGGGTTA ACCCCCATT TTTTTTGTGT GTGTCAAACC 660
661 CTCTGTCTTG TGAACTTTGG CCAAGGAAAA CAAAACAAAA AAACCTTGAC AACTCTTAGC 720
721 GGTGGATCAC TC 732
```

FIGURA 3

ES 2 353 092 A1

```
1   ACCGGTTGGC TTTGCGTCGC GGGGCGGCC C GCGACAAAAG CAACTATGTC CCCCACCACC 60
61  ACGCCGAGGG TCTCCCCTTG GTGCGGCGGG CTCTCCGTCG TCGCCTGGGC CTCTTCCCCT 120
121 TGCACCTCGG TGCCTGCGGG GGTTGCCCTT GCGCTGCGGT GGGTCTGCCT CGTAGTCTGG 180
181 AGCCTCGACC CCAAGCCGGG CTTCGCCGCC GGACACTGCC CCCTCCGCCA CACGCTACGC 240
241 TCCCGCACGG CCTGCTCCGA GGGCCGACGG ACTTGACGTG ACGGGCTGCG CTCGCAAGGA 300
301 GGGGTACGG TGGCGTGCTA CGTCCGGTGA CCCACGGTCC TGGCCCCGAA ACTCGGAACC 360
361 TCACCTCCCC AGCGCGGTTG CGGTTGCCTC GCCCTGGCCT CCCTCCGTGC GCCTCCGGGT 420
421 ACCCAACTCT CCTCTCCCCT GCGGGGAAGG AGGGGGTTC AATGACTCCG ACTCGTACCT 480
481 GTCCCCCTCG CCCCCGCGC GGGGGAGCTT GGCCGGGTGG AGCGCCCGGA GGTTGTTAGG 540
541 GGGTAACCC CCCTTTTTTT TTGTCAAACC CTCTGTCTTG TGAAC TTGGC CGAACCAAAC 600
601 CAAACAAAAA CCTCTACAAC TCTTAGCGGT GGATCACTC 639
```

FIGURA 4

ES 2 353 092 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD DE CÁDIZ

5 <120> MÉTODO PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE LA FAMILIA SPARIDAE

<130> 180/09

10 <160> 7

<170> PatentIn version 3.3

15 <210> 1

<211> 890

<212> DNA

20 <213> *Pagrus pagrus*

<220>

<223> Región ITS-1

25 <400> 1

accggttgtc	tgccaggttt	ccggccgagg	ggccagcctg	cgcgataaa	gcacaaactc	60
30 gaacgccgcc	gagggctctt	cgtcaggcgc	gtcgcacacc	cttcgcgggg	gggcccggcgt	120
ccggcggggtc	tcccagggtg	cgcggtcttc	cgtggtagct	cgggcctcct	cctctaccct	180
tgcacctctc	tctcgggggt	tgtgcctgcg	gctggggggt	ggttgaactt	gcgctgcggt	240
35 gggctgcggg	agtcgggggg	gcaggcgctc	tccgtggtag	ctcgggcctc	ttcctctacc	300
cttgcacctc	tctctcgtgg	gggggggtgcc	tgcggctggg	ggtggttgaa	ccttgcgctg	360
40 cggtgggtgt	tgggctcctc	ctccacgctc	ccaccaacc	tgttgtccgg	agcctcgaac	420
ccaaaccggg	cgaactcgct	tcgccgccgg	ctacgcccc	tccaccacg	ctacgcttcc	480
cgctcggcct	gctccgaggg	cacgacggac	ttgacgtgtc	gggttgcgct	cgcaggaggg	540
45 ggtacggtgg	tgctgcctag	tccggtaaca	ctgggcccgc	ccccaaaacc	cattcggaac	600
ctcacctcc	caagcgcggt	tgcggttgcc	tcgaccctgg	cctccctccg	cgcgcctccg	660
50 ggtaccaaac	tcgcctctcc	cctccgggga	ttggcggggg	gttcaatgac	tcctacaccg	720
acctgaccgg	agccccagcg	gcggaggcct	gtccgtgtgg	agcggccgga	ggtttttggg	780
ggttaacccc	cccatttttt	ttttgtcaaa	ccctctgtct	tgtgaacttg	tggccaaggt	840
55 gaaaatgaac	caaaaaacaa	accttgacaa	ctcttagcgg	tggatcactc		890

<210> 2

60 <211> 732

<212> DNA

<213> *Pagrus auriga*

65 <220>

<223> Región ITS-1

ES 2 353 092 A1

<400> 2

	accggtttct ttctggcggg ccagtcccgt tgctcggaac gctctcctcc tcgccgaggg	60
5	tctctcgtcc ggcgcgtcgc cccttagcgg ggccggcgcc cggcgggtct cccgaggtgt	120
	cgcggttctc cgtcgtcgcc tgggcctctt cctctcccct tgcacctctc ccaaggggtg	180
10	cctgcggcgg ggggtggttg aacttgcgct gcggtgggcc gcgggtgggg tcaaaccctg	240
	ccaacaaacc acctgtagtc tggagcctcg aaccaaccg ggcgacctcg ctctgccacc	300
	ggttacgccc cctccacccc acgctacgct cccgctcggc ctgttccgag ggctggacgg	360
15	actcgacctg tcgggtgcgc tcgcgggagg gggtagcgtg gtgtgcctag tccggtaacg	420
	ctgggccccg ccccaaaaaca ttcggaacct cacctcccaa gcgcggttgc ggtcgccccg	480
20	ccctggcctc cctccgcgcg cctccgggta cccaactctc ctctcccctc cggggagagg	540
	cgggggggttc aatgactcct acaccgccct gtccaccctg cccagcggc aggtggcttg	600
	tccgtgtgga gcgcccggag gttggggtta accccccatt ttttttgtgt gtgtcaaacc	660
25	ctctgtcttg tgaactttgg ccaaggaaaa caaaacaaaa aaaccttgac aactcttagc	720
	ggtggatcac tc	732

30 <210> 3

<211> 639

<212> DNA

35 <213> *Diplodus sargus*

<220>

<223> Región ITS-1

40 <400> 3

	accggttggc tttgcgtcgc ggggcggccc gcgacaaaag caactatgtc ccccaccacc	60
45	acgccgaggg tctccccctg gtgcggcggg ctctccgctg tcgcctgggc ctcttcccct	120
	tgcacctcgg tgcctgcggg ggttgccctt gcgctgcggt gggctctgcct cgtagtctgg	180
50	agcctcgacc ccaagccggg ctctgccgcc ggacctgcc cctccgcca cacgctacgc	240
	tcccgcacgg cctgctccga gggccgacgg acttgacgtg acgggctgcg ctcgcaagga	300
	gggggtacgg tggcgtgcta cgtccggtga cccacggctc tggccccgaa actcggaaacc	360
55	tcacctccc agcgcggttg cggttgcctc gccctggcct cctccgtgc gcctccgggt	420
	acccaactct cctctcccct gcggggaagg aggggggttc aatgactccg actcgtacct	480
60	gtccccctcg cccccgcggc gggggagctt ggccgggttg agcgcgccga ggttgtagg	540
	gggtaacccc ccctttttt ttgtcaaacc ctctgtcttg tgaacttggc cgaaccaaac	600
	caaacaaaaa cctctacaac tcttagcggg ggatcactc	639

65 <210> 4

ES 2 353 092 A1

	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
5	<220>		
	<223> Cebador específico <i>P. pagrus</i> (ITS1PpF)		
10	<400> 4		
	gcctgcgcg ataaagcaca		20
15	<210> 5		
	<211> 20		
	<212> DNA		
20	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador específico <i>P. auriga</i> (ITS1PaF)		
25	<400> 5		
	gttgctcgga acgctctcct		20
30	<210> 6		
	<211> 20		
	<212> DNA		
35	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador específico <i>D. sargus</i> (ITS1DsF)		
40	<400> 6		
	cgcgacaaaa gcaactatgt		20
45	<210> 7		
	<211> 20		
50	<212> DNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
55	<223> Cebador "reverse" (ITS1INR) común a las tres especies (<i>P. pagrus</i> , <i>P. auriga</i> y <i>D. sargus</i>)		
	<400> 7		
60	cacaagacag agggtttgac		20
65			



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N.º solicitud: 200901650

② Fecha de presentación de la solicitud: **22.07.2009**

③ Fecha de prioridad: **00-00-0000**
00-00-0000
00-00-0000

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: **C12Q 1/68** (2006.01)
G01N 33/12 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	VANDERSEA, M.W., et al. Identification of larval sea basses (<i>Centropristis</i> spp.) using ribosomal DNA-specific molecular assays. <i>Fishery Bulletin</i> (Seattle) Abril-2008. Vol. 106, nº 2, páginas 183-193. ISSN 0090-0656. Ver todo el documento.	1-18
A	KACI-CHAOUCH, T., et al. Host specificity is linked to intraspecific variability in the genus <i>Lamellodiscus</i> (Monogenea). <i>Parasitology</i> . Abril-2008. Vol. 135, nº 5, páginas 607-616. ISSN 1469-8161 (Electrónico). Ver todo el documento, especialmente resumen, página 609 y tabla 1.	
A	DESDEVISES, Y., et al. Coevolution between <i>Lamellodiscus</i> (Monogenea: Diplectanidae) and Sparidae (Teleostei): the study of a complex host-parasite system. <i>Evolution; international journal of organic evolution</i> . Dic-2002. Vol. 56, nº 12, páginas 2459-2471. ISSN 0014-3820 (Print). Ver todo el documento, especialmente resumen, tabla 1 y página 2463 (1ª columna).	
A	SAITOH, K., et al. Genetic identification of fish eggs collected in Sendai Bay and off Johban, Japan. <i>Ichthyological Research</i> . Abril-2009. Vol. 56, nº 2, páginas 200-203. ISSN 1341-8998. Ver todo el documento, especialmente resumen y materiales y métodos.	

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
31.05.2010

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/4

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

C12Q, G01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, EBI (EMBL AII, EMBL Vert, naGeneSeq), REGISTRY.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.05.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-18	SÍ NO
	Reivindicaciones _____	
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones _____	SÍ NO
	Reivindicaciones 1-18	

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	VANDERSEA, M.W., et al.	Abril-2008
D02	KACI-CHAOUCH, T., et al.	Abril-2008
D03	DESDEVISES, Y., et al.	Dic-2002
D04	SAITOH, K., et al.	Abril-2009

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

La presente solicitud de patente describe y reivindica un método para detectar e identificar, mediante PCR múltiple, especies de la familia Sparidae, concretamente las especies *Pagrus pagrus*, *Pagrus auriga* y *Diplodus sargus*. El método emplea las secuencias de la región espaciadora ITS-1 del gen ribosómico 45S. La solicitud reivindica también estas secuencias específicas en las tres especies mencionadas, y los oligonucleótidos empleados en el método, así como el uso de las regiones ITS-1 como marcadores genéticos para la detección e identificación de especies de la familia Sparidae.

No se ha encontrado ningún documento del estado de la técnica que divulgue la utilización de este método para identificar especies de la familia Sparidae, ni se han encontrado las secuencias reivindicadas, por lo que la solicitud es nueva, según el artículo 6 de la Ley de Patentes.

El documento D01 se considera el más cercano del estado de la técnica. En este artículo se emplea el método de la solicitud para identificar larvas de tres especies de Centropristis. Este género pertenece a la familia Serranidae, del mismo orden y suborden que la familia Sparidae (Perciformes).

Igual que en la solicitud, en D01 se amplifican mediante PCR las regiones ITS-1 de los organismos estudiados, empleando oligonucleótidos universales. Posteriormente se secuencian y alinean las regiones amplificadas, para diseñar oligonucleótidos específicos de cada una de las especies estudiadas, de modo que éstas se pueden identificar mediante amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos así diseñados. En este método se utiliza, entre otros controles, ADN de una especie de la familia Sparidae (*Diplodus holbrookii*), cuya región ITS-1 es también amplificada y secuenciada con este fin. Esto demuestra que el método descrito en D01 es aplicable a especies de la familia Sparidae, por lo se considera evidente para el experto en la materia aplicarlo para identificar otras especies de esta familia. Por otro lado, una vez conocido el método divulgado en D01, lo único que tendría que hacer el experto en la materia sería amplificar y alinear las secuencias de las especies que quisiera estudiar, para obtener oligonucleótidos específicos de cada especie que sirvieran para identificar cada una de ellas. Estas técnicas están ampliamente extendidas, y se dispone de numerosas herramientas en el estado de la técnica para el diseño de oligonucleótidos.

Por tanto, resultaría obvio para el experto en la materia obtener las secuencias de las regiones ITS-1 de las especies de la familia Sparidae, y aplicar el método descrito en el documento D01 para detectar e identificar distintas especies de esta familia, por lo que las reivindicaciones 1, 3, 10, 11, 12 y 18 de la presente solicitud no cumplen el requisito de actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes. Y, puesto que la técnica de PCR múltiple es ampliamente conocida, no se considera que su empleo en el método de la solicitud suponga un esfuerzo inventivo, por lo que tampoco la reivindicación 2 cumpliría este requisito de patentabilidad.

Como se ha mencionado anteriormente, el diseño de oligonucleótidos específicos a partir de una secuencia de ADN está muy extendido, y su conocimiento y uso supone una técnica rutinaria en el estado de la técnica, por lo que las secuencias reivindicadas SEQ ID NO 4 a 7 no confieren actividad inventiva a las reivindicaciones 4 a 9 y 13 a 17 de la presente solicitud.

Por otro lado, los documentos D02 y D03 son estudios de la especificidad de huésped y la coevolución entre peces de la familia Sparidae y parásitos de los mismos. En ambos artículos se emplean secuencias ITS-1 para identificar las especies de los parásitos, pero el estudio filogenético de la familia Sparidae se realiza mediante estudios morfológicos en D02 y mediante el análisis de secuencias del ADN mitocondrial 16S y de citocromo b en D03. Puesto que en ninguno de estos dos documentos se emplean las secuencias ITS-1 para discriminar especies de la familia Sparidae, D02 y D03 no afectan la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud.

Igualmente, el documento D03 se considera un mero documento general del estado de la técnica, que no afecta los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud. Este documento divulga un método de identificación genética de peces de distintas especies (incluyendo peces de la familia Sparidae) mediante técnicas de PCR. A diferencia de la solicitud, los oligonucleótidos empleados amplifican la región del ADN mitocondrial 16S, y no se menciona el uso de las regiones ITS en el método empleado en D03.