

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 376 683**

(21) Número de solicitud: 200901649

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

(12)

SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación: **22.07.2009**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2012**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.03.2012

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

(72) Inventor/es: **Rebordinos González, Laureana y**
Chairi, Hicham

(74) Agente/Representante:
No consta

(54) Título: **Método para la detección e identificación de especies de la familia *Engraulidae*.**

(57) Resumen:

Método para la detección e identificación de especies de la familia *Engraulidae*.

La presente invención se refiere a un método para la detección e identificación simultánea en una muestra de al menos una de las especies de la familia *Engraulidae* seleccionada entre *Engraulis encrasicolus*, *Engraulis mordax* y *Engraulis ringens*, mediante amplificación por PCR multiplex de al menos una de la secuencias, seleccionada de entre SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3, correspondiente con el espaciador no transcrito (NTS) del ADN ribosómico 5S de al menos una de las 3 especies, utilizando al menos uno de los pares de cebadores de secuencia seleccionados entre: SEQ ID NO 4 y SEQ ID NO 5; SEQ ID NO 6 y SEQ ID NO 7; y SEQ ID NO 8 y SEQ ID NO 9.

DESCRIPCIÓN

Método para la detección e identificación de especies de la familia *Engraulidae*.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en sentido amplio, al análisis genético de diferentes especies de la familia *Engraulidae* a través de cebadores específicos y en concreto a un método para la detección e identificación simultánea de las especies *Engraulis encrasicolus*, *Engraulis mordax* y *Engraulis ringens* mediante el empleo de técnicas PCR para la amplificación de la secuencia del espacio no transcrito del ADNr 5S.

Antecedentes de la invención

La anchoa o boquerón, *Engraulis encrasicolus*, es una especie distribuida en el Mediterráneo y en las costas Atlánticas orientales, desde Noruega hasta Angola. Es una especie objetivo de las pesquerías comerciales en España y por ello se ha sometido a sobrepesca, lo que plantea la necesidad de establecer un programa de gestión y conservación de este recurso. Uno de estos programas es la seguridad alimentaria y la trazabilidad de esta especie para evitar cualquier confusión o fraude, sabiendo que se está produciendo un aumento importante de las importaciones de otras especies de boquerón, entre ellas las que proceden del continente americano, para paliar este problema. Estos productos importados pueden ser frescos, congelados o procesados, lo que supone una dificultad añadida para su identificación morfológica.

El creciente interés industrial hacia métodos rápidos ha conducido a la elaboración y aplicación de métodos basados en PCR-multiplex 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 (Ghowati 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).

En relación con el boquerón, hasta el momento han sido descritos dos estudios; el primero (Santaclara et al. "Development of a method for genetic identification of four species of anchovies: *E. encrasicolus*, *E. anchoita*, *E. ringens* and *E. japonicus*". *Eur Food Res Technol* (2006) 223: 609-614) describe un método para identificar genéticamente 4 especies de la familia *Engraulidae*: *E. encrasicolus*, *E. anchoita*, *E. ringens* y *E. japonicus* mediante la técnica PCR-RFLP para la amplificación del Citocromo b del ADN mitocondrial.

El segundo estudio (Rea S. et al. "Species identification in anchovy pastes from the market by PCR-RFLP technique" *Food Control* 20 (2009), 515-520) trata de identificar las especies utilizadas en alimentos a base de pasta de boquerón mediante PCR-RFLP del Citocromo b del ADN mitocondrial. Las especies estudiadas fueron: *E. encrasicolus* (boquerón), *Sardina pilchardus* (sardina), *Sprattus sprattus* (espadín), *Alosa fallax* (sábalo), *Sardinella aurita* (alacha), *Trachurus trachurus* (jurel Atlántico) y *Trachurus mediterraneus* (jurel Mediterráneo).

Sin embargo, como es bien conocido en el estado de la técnica, el ADN mitocondrial acumula mutaciones, y en caso de que no se estudien todas las secuencias posibles, basta con una mutación puntual en la diana de restricción para que el método no resulte válido. Tal y como se cita en Santaclara et al. "es importante detectar toda la variabilidad intraespecífica de la especie para diseñar un buen método que utilice un gran número de muestras que deben incluir todas las zonas de distribución".

En base a estas limitaciones, los autores de la presente invención, tras una importante labor de investigación, han desarrollado un método que permite detectar e identificar simultáneamente 3 especies de boquerón, una europea (*Engraulis encrasicolus*) y dos americanas (*Engraulis mordax* y *Engraulis ringens*) con una simple técnica, como la PCR multiplex, en un solo paso, que amplifica la secuencia del espaciador no transcrito del ADNr 5S, 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 a base de boquerón (*E. encrasicolus*) frente a aquellos a base de otras especies americanas, permitiendo iniciativas como denominaciones de origen.

El nuevo marcador en el que se basa el método desarrollado, el espaciador no transcrito (NTS) de la secuencia del ADNr 5S, no había sido secuenciado hasta el momento para estas especies.

El ADN ribosómico (ADNr) es una secuencia de ADN contenida en los cromosomas del nucléolo que codifica ARN ribosómico. Estas secuencias regulan la transcripción e iniciación de la amplificación. Está formado por numerosas unidades de repetición separadas unas de otras por un espaciador intergénico.

La unidad de repetición del ADNr 5S se compone de una región codificante de 120 pb muy conservada y un espacio no transcrito (NTS) que presenta una gran variabilidad en tamaño y secuencia, lo que hace de éste una herramienta muy útil para comparar especies estrechamente relacionadas.

- 5 El empleo del espaciador no transcrito de la secuencia de ADNr 5s como marcador genético para la detección e identificación de estas especies, permite desarrollar un método más rápido y fiable que los anteriormente realizados.

10 Teniendo en cuenta que el boquerón europeo, *E. encrasicolus*, pasa por una fase de sobrepesca, las características del método de la invención permiten llevar a cabo la trazabilidad de estas especies de una forma rápida y eficaz, resolviendo así los problemas de errores de etiquetado de productos procesados (fileteado, envasado, etc), así como la venta fraudulenta de las mismas.

Objeto de la invención

15 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 *Engraulidae*, seleccionada entre *Engraulis encrasicolus*, *Engraulis mordax* y *Engraulis ringens*, mediante amplificación por PCR de al menos una de la secuencias correspondiente con el espaciador no transcrito (NTS) del ADN ribosómico 5S de estas tres especies.

20 Son también objeto de la invención las secuencias del espaciador no transcrito (NTS) del ADN ribosómico 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.

25 Son también objeto de la invención cada uno de los cebadores empleados en la amplificación del espaciador no transcrito del ADN ribosómico 5S de cada una de las especies citadas, de secuencias SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8 y SEQ ID NO 9.

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

30 Descripción de las figuras

Figura 1: Esquema resumen del proceso de identificación entre las 3 especies de boquerón mediante PCR Múltiplex con cebadores específicos.

35 Figura 2: Localización de los cebadores específicos (SEQ ID NO 4 y SEQ ID NO 5) en la secuencia del NTS del ADNr 5S de *E. encrasicolus*.

Figura 3: Localización de los cebadores específicos (SEQ ID NO 6 y SEQ ID NO 7) en la secuencia del NTS del ADNr 5S de *E. mordax*.

40 Figura 4: Localización de los cebadores específicos (SEQ ID NO 8 y SEQ ID NO 9) en la secuencia del NTS del ADNr 5S de *E. ringens*.

Descripción de la invención

45 La presente invención se enfrenta al problema de detectar e identificar simultáneamente en una muestra la presencia de hasta tres especies de la familia *Engraulidae* (*E. encrasicolus*, *E. mordax* y *E. ringens*) de forma rápida, específica y eficaz.

50 La solución planteada por los autores de la presente invención se basa en el empleo de la secuencia correspondiente al espaciador no transcrito (NTS) del ADN ribosómico 5S como marcador genético de estas especies y en el diseño de tres pares de cebadores especie-específicos que amplifican dicha secuencia en cada especie, obteniéndose unas bandas de producto amplificado diferenciales en función de la/las especie/s presentes en la muestra.

55 Como se ha mencionado anteriormente, la unidad de repetición del gen ribosómico 5S está formada por una región codificante de 120 pb y un espaciador no transcrito (NTS) de longitud y secuencia variable.

60 El alineamiento de las secuencias completas del ADNr 5S de las tres especies estudiadas (*E. encrasicolus*, *E. mordax* y *E. ringens*) (mostradas en SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11 y SEQ ID NO 12, respectivamente) revela una diferencia muy significativa en los NTS de dichas especies, lo que ha permitido desarrollar el método objeto de la presente invención.

65 Así, un aspecto principal de la invención se refiere al método para la detección e identificación simultánea en una muestra de al menos una de las especies de la familia *Engraulidae* seleccionada de entre *Engraulis encrasicolus*, *Engraulis mordax* y *Engraulis ringens*, mediante amplificación por PCR de al menos una de las secuencias, seleccionada de entre SEQ ID NO 1, 2 y 3, correspondientes, respectivamente, con el espaciador no transcrito (NTS) del ADN ribosómico 5S de las especies citadas (de aquí en adelante, método de la invención).

ES 2 376 683 A1

La secuencia NTS 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 Engraulidae.

5 Por tanto, en otro aspecto principal de la invención se contempla cada una de las secuencias aisladas correspondientes a los NTS del ADNr 5S de cada una de las especies citadas empleadas como marcadores genéticos en el método de la invención.

10 Concretamente, se contempla una molécula de ADN aislada que se corresponde con la secuencia del espaciador no transcrito del ADN ribosómico 5S de la especie *Engraulis encrasicolus*, mostrada en SEQ ID NO 1; una molécula de ADN aislada que se corresponde con la secuencia del espaciador no transcrito del ADN ribosómico 5S de la especie *Engraulis mordax*, mostrada en SEQ ID NO 2; y una molécula de ADN aislada que se corresponde con la secuencia del espaciador no transcrito del ADN ribosómico 5S de la especie *Engraulis ringens*, mostrada en SEQ ID NO 3.

15 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) 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 de boquerón. Ejemplos no limitantes de “productos procesados” son filetes de conservas, alimentos rellenos con pasta de boquerón, paté de anchoas, etc.

20 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 los tres pares de cebadores, en lugar de uno solo 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.

25 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.

30 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 y tiempos (desnaturalización, anillamiento y extensión) entre 30 y 75 segundos y 25 y 40 ciclos, 35 y en realizaciones preferidas se emplean tiempos de 45 segundos para desnaturalización y anillamiento, 60 segundos para extensión, y 35 ciclos.

40 Las diferencias alélicas entre los NTSs se pueden resolver y ser visualizados 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 diferenciables visualmente mediante electroforesis en gel de agarosa.

45 En una realización particular del método de la presente invención se contempla el empleo de la combinación de cebadores de secuencias SEQ ID NO 4 y SEQ ID NO 5, para la amplificación de un fragmento de 599 pb, específico de *Engraulis encrasicolus*.

50 Otra realización particular del método de la presente invención se refiere al empleo de la combinación de cebadores de secuencias SEQ ID NO 6 y SEQ ID NO 7, para la amplificación de un fragmento de 382 pb, específico de *Engraulis mordax*.

Otra realización particular del método de la presente invención se refiere al empleo de la combinación de cebadores de secuencias SEQ ID NO 8 y SEQ ID NO 9, para la amplificación de un fragmento de 250 pb, específico de *Engraulis ringens*.

55 Como se ha citado anteriormente, la secuenciación de los NTS 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.

60 Así, en otro aspecto de la invención se contempla un oligonucleótido, con secuencia mostrada en SEQ ID NO 4, para su uso como cebador en la detección e identificación de la especie *Engraulis encrasicolus*.

En otro aspecto de la invención, se contempla un oligonucleótido, con secuencia mostrada en SEQ ID NO 5, para su uso como cebador en la detección e identificación de la especie *Engraulis encrasicolus*.

65 En otro aspecto de la invención se contempla un oligonucleótido, con secuencia mostrada en SEQ ID NO 6, para su uso como cebador en la detección e identificación de la especie *Engraulis mordax*.

En otro aspecto de la invención, se contempla un oligonucleótido, con secuencia mostrada en SEQ ID NO 7, para su uso como cebador en la detección e identificación de la especie *Engraulis mordax*.

En otro aspecto de la invención se contempla un oligonucleótido, con secuencia mostrada en SEQ ID NO 8, para su uso como cebador en la detección e identificación de la especie *Engraulis ringens*.

En otro aspecto de la invención se contempla un oligonucleótido, con secuencia mostrada en SEQ ID NO 9, para su uso como cebador en la detección e identificación de la especie *Engraulis ringens*.

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 NTS 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. Así por ejemplo, estos cebadores fueron probados en sardina y dieron resultado negativo.

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 al menos uno de los pares de cebadores seleccionados entre SEQ ID NO 4 y SEQ ID NO 5; SEQ ID NO 6 y SEQ ID NO 7; y SEQ ID NO 8 y SEQ ID NO 9.

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

Obtención de las muestras

El análisis de la secuencia del gen ADNr 5S se ha realizado en las especies *Engraulis encrasicolus* del golfo de Cádiz, *Engraulis mordax* de baja California en México y *Engraulis ringens* de Valparaíso en Chile.

Amplificación del gen ADNr 5S

Después de extraer el ADN genómico de las 3 especies mediante el FastDNA® Kit, se amplificó el gen ADNr 5S con los cebadores universales 5S1F (5'-TACGCCCCGATCTCGTCCGATC-3') (SEQ ID NO 13) y 5S2R (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3') (SEQ ID NO 14) descritos por Cespedes *et al.*, (1999) diseñados para unirse con orientación opuesta a una región de la zona codificante del 5S.

La PCR se realizó en un volumen final de 50 µl, conteniendo 4 µl de ADN genómico, 3 mM de MgCl₂, 200 µM dNTP's, 0.2 µM de cada cebador, 2U de la enzima polimerasa Taq (Euro-Clone, Italy) y el tampón apropiado para la enzima. La reacción se llevó a cabo mediante un ciclo inicial de 5 min a 94°C y 35 ciclos de 45 seg a 94°C, 45 seg a 59°C y 1 min a 72°C, y una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) tras una electroforesis de 1,5 h a 80 V. Las bandas de ADN se observaron en los geles mediante luz ultravioleta y el tamaño de las bandas se determinó por el marcador de peso molecular.

Clonación y secuenciación del ADNr 5S

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados mediante el Nucleospin kit (Macherey-Nagel) y clonados usando el kit de clonación pGEM®-T Easy Vector Systems (promega).

A partir de estos productos se realizó una ligación al vector de clonación p-GEM®-T Easy Vector (Promega), la reacción de ligación que contiene producto de PCR, ligasa de ADN T4, tampón de la ligasa y agua se llevó a cabo durante una noche a 4°C.

La transformación de bacterias competentes de alta eficiencia JM109 se realizó mediante un choque térmico de 42°C durante 45 seg. Una vez sembradas en placas con medio LB/ampicilina/YPTG/X-Gal, se seleccionaron las colonias blancas, las cuales contienen el producto de PCR clonado. Finalmente, a partir de las colonias seleccionadas se extrajeron y purificaron plásmidos mediante el NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kit (Macherey-Nagel) y se secuenciaron usando los promotores T7 y SP6 de la ARN polimerasa.

Las secuenciaciones se llevaron a cabo mediante un kit de secuenciación (BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems) en un secuenciador automático en la Unidad de Genómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba. Las secuencias correspondientes al ADNr 5S de cada una de las especies (*E. encrasicolus*, *E. mordax* y *E. ringens*) se muestran en las SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11 y SEQ ID NO 12. Los picos de secuenciación se analizaron con el programa Chromas 2.0 y las secuencias obtenidas se alinearon usando el programa ClustalW. Se analizaron un total de 37 clones entre las 3 especies.

ES 2 376 683 A1

Diseño de cebadores especies-específicos

El alineamiento de las secuencias del ADNr 5S de las 3 especies estudiadas reveló una diferencia muy significativa en los NTS de *E. encrasicolus*, *E. mordax* y *E. ringens*.

Para poder diferenciar entre estas especies, se diseñaron cebadores especies específicos localizados en el espaciador mediante el programa Primer3. Las secuencias de estos cebadores fueron, para *E. encrasicolus*: E.E1F (CCCAAAAAGGTAAGGAGAAAG) (cebador forward (sentido)) (SEQ ID NO 4) y E.E2R (TGCAACATTGCAACAAACTT) (cebador reverse (antisentido)) (SEQ ID NO 5); para *E. mordax*: E.M1F (TGAAAAGACATTCTCACGTTGTG) (forward) (SEQ ID NO 6) y E.M2R (ACGGTCCTCCTCTCACAGTC) (reverse) (SEQ ID NO 7); y para *E. ringens*: E.R1F (TGAAAAGGGAATGGGGTTT) (forward) (SEQ ID NO 8) y E.R2R (CGGTCCTTTTAGGGTTAGGG) (reverse) (SEQ ID NO 9).

Las figuras 2, 3 y 4 muestran la localización de estos cebadores.

La realización de las PCR múltiplex para la identificación simultánea de las diferentes especies de la familia Engraulidae, se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l, conteniendo 2 μ l del ADN, 0.2 μ M de cada cebador (E.E1F (SEQ ID NO 4), E.E2R (SEQ ID NO 5), E.M1F (SEQ ID NO 6), E.M2R (SEQ ID NO 7), E.R1F (SEQ ID NO 8) y E.R2R (SEQ ID NO 9), 3 mM de MgCl₂, 200 μ M dNTP's, 2U de la enzima polimerasa Taq y el tampón apropiado para la enzima. La reacción se llevó a cabo mediante un ciclo inicial de 5 min a 94°C y 35 ciclos de 45 seg a 94°C, 45 seg a 59°C y 1 min a 72°C, y una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml) tras una electroforesis de 1 h a 80 V. Las bandas de ADN se observan en los geles mediante luz ultravioleta y el tamaño de las bandas se determina por el marcador de peso molecular.

Los productos de PCR fueron purificados con el kit descrito anteriormente y directamente secuenciados en el SCAI de la Universidad de Córdoba usando los mismos cebadores para comprobar que los productos amplificados eran los mismos que los diseñados previamente.

Estos cebadores no solamente indicaron la presencia o ausencia de amplificación, si no que además permitieron diferenciar el tamaño de los productos, lo que facilitó una vez más la lectura de los resultados. El esquema de la figura 1 resume todo el proceso y el resultado final.

REIVINDICACIONES

1. Método para la detección e identificación simultánea en una muestra de al menos una de las especies de la familia *Engraulidae* seleccionada entre *Engraulis encrasicolus*, *Engraulis mordax* y *Engraulis ringens*, mediante amplificación por PCR de al menos una de la secuencias, seleccionada de entre SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3, correspondiente con el espaciador no transcrito (NTS) del ADN ribosómico 5S.

2. Método, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la amplificación se lleva a cabo mediante PCR multiplex.

3. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el empleo de la combinación de cebadores de secuencias SEQ ID NO 4 y SEQ ID NO 5, permite la amplificación de un fragmento 599 pb, específico de *Engraulis encrasicolus*.

4. Método según la reivindicación 1, **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 382 pb, específico de *Engraulis mordax*.

5. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el empleo de la combinación de cebadores de secuencias SEQ ID NO 8 y SEQ ID NO 9, permite la amplificación de un fragmento de 250 pb, específico de *Engraulis ringens*.

6. Oligonucleótido, con secuencia mostrada en SEQ ID NO 4, para su uso como cebador en la detección e identificación de la especie *Engraulis encrasicolus*, según el método de la reivindicación 1.

7. Oligonucleótido, con secuencia mostrada en SEQ ID NO 5, para su uso como cebador en la detección e identificación de la especie *Engraulis encrasicolus*, según el método de la reivindicación 1.

8. Oligonucleótido, con secuencia mostrada en SEQ ID NO 6, para su uso como cebador en la detección e identificación de la especie *Engraulis mordax*, según el método de la reivindicación 1.

9. Oligonucleótido, con secuencia mostrada en SEQ ID NO 7, para su uso como cebador en la detección e identificación de la especie *Engraulis mordax*, según el método de la reivindicación 1.

10. Oligonucleótido, con secuencia mostrada en SEQ ID NO 8, para su uso como cebador en la detección e identificación de la especie *Engraulis ringens*, según el método de la reivindicación 1.

11. Oligonucleótido, con secuencia mostrada en SEQ ID NO 9, para su uso como cebador en la detección e identificación de la especie *Engraulis ringens*, según el método de la reivindicación 1.

12. Molécula de ADN aislada que se corresponde con la secuencia del espaciador no transcrito del ADN ribosómico 5S de la especie *Engraulis encrasicolus* mostrada en SEQ ID NO 1.

13. Molécula de ADN aislada que se corresponde con la secuencia del espaciador no transcrito del ADN ribosómico 5S de la especie *Engraulis mordax* mostrada en SEQ ID NO 2.

14. Molécula de ADN aislada que se corresponde con la secuencia del espaciador no transcrito del ADN ribosómico 5S de la especie *Engraulis ringens* mostrada en SEQ ID NO 3.

15. Kit para llevar a cabo el método de las reivindicaciones 1-5 que comprende una solución formada por al menos uno de los pares de cebadores seleccionados entre SEQ ID NO 4 y SEQ ID NO 5; SEQ ID NO 6 y SEQ ID NO 7; y SEQ ID NO 8 y SEQ ID NO 9.

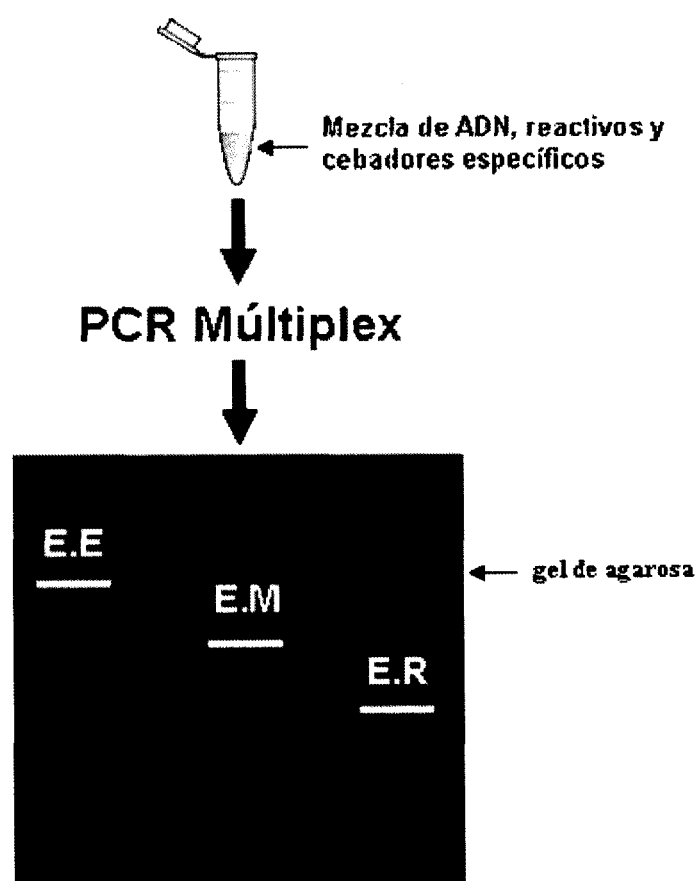


FIGURA 1

Cebadores específicos en el NTS de *E. encrasicolus*

```

TTCATTTTCTTGCTGT CACACATTATTTACACTTAGGAACTTTTATGCGGGACGGAAA
GGCAAAAAGATGCTTTTTTGGACCTTTTTTGCCCCCCCCCCCCCAGGAAAAAAAAAAAAACC
CTAAAGACATGTTGATTTGTCTTTCTAGAGGCAGTCAGTGGATTTGGTACTTGTGGCATG
ATGTTGAAAGGAAGTTTTGTTGCAATGTTGCAATGTTGCAACAAAAAAAAACAACAAAAAA
          ← E.E.2R
AGAAGTTTTTGGGCCTTTTTTGCCCCCCCACCCCAAAAAGGTAAAGGAGAAAGTATTTTG
          E.E.1F →
GGCCTTTTTTGGCCCCCTCCCCGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCTGAGGAGATGTAGAGT
TGTCTTTCTAGAGGCAGTCAGTGGATTTGGTACTTCTGACATGCTGTAGAAAGGAAGTTT
TAAATGCAATGAGAGAAAAAGGTCAAAAAGACGTTTTTTCGGTCCCTATTTTTTGGCACCTTG
TATTTGACATGTGGGCAAAAAGACTGTGCTATAAAAGAATCTGCTCTGGCCTCAGCCTTT

```

FIGURA 2

Cebadores específicos en el NTS de *E. mordax*

TTCCTTTTGTCTTCACACATTATTTACAATTAGAAAAGAACTTTTATGCAGTGAAAA
 AAAAGTACAAAAGACACTTTTGTAGGCTTTTTTTTCCGGCTCCCTGGACATCGACTGTG
AGAGGAGGACCGTACTTTAAAATGACCGTTTTTCGGCCTCAGCCCCGGCACACAGAGGCCA
 E.M.2R
 AAAATGCTGTTTATCGACAGATTTAATTTGGGAACACCGGGGTTGAAAAGACATTCTC
 E.M.1F
ACGTTGTGAAAAAGAGCTAGAAAAAGGGTTTTCTTAGGCCTTTCTTGGCTCCACATGTGT
 GAAATGTGGGACAAGGACCGTACTATAAAAGGACCGTTTTTCAGCCTCAGCCTTT

FIGURA 3

Cebadores específicos en el NTS de *E. ringens*

```

TTCATTTCCTAACAAGTAGGAGGTGCTACCGGGCAGAAACCACCATTGCAACTATTTAT
TGCCTTCATGCACCCTGTTTGTGTCAAGGAAAAATAATGGGCCTCATATAATACAAAAAT
AGACATTAATTGACATCAGATTACTATTGGAAATGCCAGGTGCTTGCTGTAAGATTTTC
CTTTTTCTGTCAAGATGCGTTATTTCCCGGTAGAAAATCACTTTTTATCCACTGAAAAA
ATGACAGACACCATTTTGTTTTGTAGCTTTTTTGCTGTTTAGAATGTGAAAAGGGGAATG
                                     E.R.1F
GGGTTTAAAAGGACCTTGTTCAACCTCAGGTCTCGCTTACGGCCATACCTGGATGAACCT
→
GTTATCTACTGAAAAAAGACAAAAACACTTTTTTTTTTGGCTTTTCTGCTATTAAGAATG
TGAAAGAGGGAACAAGGTTCTAAAGGACCTTTTTTCAGCTTCAGCTCTCGCTTACGGCCAT
ACCACGCTGAGCACGCCCGATCTCGTCCGGCCGTAACCTAACCTAAAAGGACCGTTTT
                                     ← E.R.2R
CAGCTTTAGCTCTC

```

FIGURA 4

ES 2 376 683 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD DE CÁDIZ

5 <120> DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE LA FAMILIA ENGRAULIDAE

<130> 179/09

10 <160> 14

<170> PatentIn version 3.3

15 <210> 1

<211> 539

<212> DNA

20 <213> *Engraulis encrasicolus*

<220>

<223> NTS

25 <400> 1

```
ttcatttttc ttgctgtcac acattattta cacttaggaa ctttttatgc gggacggaaa      60
30 ggcaaaaaga tgcttttttg accttttttg cccccccccc ccaggaaaaa aaaaaaaacc      120
ctaaagacat gttgatttgt ctttctagag gcagtcagtg gatttggtac ttgtggcatg      180
atgttgaaaag gaagttttgt tgcaatgttg caatgttgca acaaaaaaaaa caacaaaaaa      240
35 agaagttttt tgggcctttt ttgccccccc accccaaaaa ggtaaggaga aagtattttg      300
ggcctttttt tgccccctc cccgggaaaa aaaaaaaaaa aagctgagga gatgtagagt      360
40 tgtctttcta gaggcagtca gtggatttgg tacttctgac atgctgtaga aaggaagttt      420
taatgcaatg agagaaaaag gtcaaaaaga cgtttttctgg tccctatttt tggcaccttg      480
tatttgacat gtgggcaaaa gactgtgcta taaaagaatc tgctctggcc tcagccttt      539
```

<210> 2

<211> 353

50 <212> DNA

<213> *Engraulis mordax*

<220>

55 <223> NTS

60

65

ES 2 376 683 A1

<400> 2

	ttcctttttg tcttcacaca ttatttacia ttagaaaaga actttttatg cagtgaaaaa	60
5	aaagtacaaa aagacacttt ttgaggcttt tttttccggc tccctggaca tcgactgtga	120
	gaggaggacc gtactttaaa atgaccgttt tcggcctcag ccccggcaca cagaggccaa	180
10	aaatgctgtt tatcgacaga ttttaattttg ggaacaccgg gggttgaaaa gacatttctca	240
	cgttgtgaaa aagagctaga aaaaggggtt tcttaggcct ttcttggctc cacatgtgtg	300
	aaatgtggga caaggaccgt actataaaag gaccgttttc agcctcagcc ttt	353

15

<210> 3

<211> 334

<212> DNA

20

<213> *Engraulis ringens*

<220>

25

<223> NTS

<400> 3

30	ttcattttcc taaccagtag gaggtgctac cgggcagaaa ccaccattgc aactatttat	60
	tgccttcatg caccctgttt gtgtcaagga aaaataatgg gcctcatata atacaaaaat	120
	agacattaat tgacatcaga ttactatttg gaaatgccag gtgcttgctg taagattttc	180
35	ctttttcttg tcaagatgcg ttatttcccg gtagaaaatc actttttatc cactgaaaaa	240
	atgacagaca ccattttgtt ttttagcttt ttgtctgttt agaatgtgaa aaaggggaatg	300
40	gggttttaaaa ggaccttggt cagcctcagg tctc	334

<210> 4

<211> 21

45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

50

<223> Cebador forward de *E. encrasicolus*

<400> 4

55

cccaaaaagg taaggagaaa g

21

<210> 5

60

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

65

<220>

<223> Cebador Revers de *E. encrasicolus*

ES 2 376 683 A1

	<400> 5	
	tgcaacattg caacaaaact t	21
5		
	<210> 6	
	<211> 23	
10	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> cebador forward de <i>E. mordax</i>	
	<400> 6	
20	tgaaaagaca ttctcacggtt gtg	23
	<210> 7	
	<211> 20	
25	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> cebador reverse de <i>E. mordax</i>	
	<400> 7	
35	acggtcctcc tctcacagtc	20
	<210> 8	
40	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> cebador forward de <i>E. ringens</i>	
50	<400> 8	
	tgaaaaaggg aatgggggttt	20
55	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> DNA	
60	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador revers de <i>E. ringens</i>	
65		

ES 2 376 683 A1

<400> 9

cggtcctttt agggttaggg

20

5

<210> 10

<211> 659

<212> DNA

10

<213> *Engraulis encrasicolus*

<220>

15

<223> ADNr 5S

<400> 10

20	gcttacggcc ataccagcct gagtacgccc gatctcgtcc gatctcggaa gctaagcagc	60
	gtcgggcctg gttagtactt ggatgggaga cgcctggga ataccaggtg ctgtaagcctt	120
	ttcatttttc ttgctgtcac acattattta cacttaggaa ctttttatgc gggacggaaa	180
25	ggcaaaaaga tgcttttttg accttttttg ccccccccc ccaggaaaaa aaaaaaaacc	240
	ctaaagacat gttgatttgt ctttctagag gcagtcagtg gatttggtag ttgtggcatg	300
	atgttgaaag gaagttttgt tgcaatgttg caatgttgca acaaaaaaaaa caacaaaaaa	360
30	agaagttttt tgggcctttt ttgccccccc accccaaaaa ggtaaggaga aagtattttg	420
	ggcctttttt tgccccctc cccgggaaaa aaaaaaaaaa aagctgagga gatgtagagt	480
35	tgtctttcta gaggcagtca gtggatttgg tacttctgac atgctgtaga aaggaagttt	540
	taatgcaatg agagaaaaag gtcaaaaaga cgtttttcgg tccctatttt tggcaccttg	600
40	tatttgacat gtgggcaaaa gactgtgcta taaaagaatc tgctctggcc tcagccttt	659

<210> 11

<211> 474

45

<212> DNA

<213> *Engraulis mordax*

<220>

50

<223> ADNr 5S

<400> 11

55	gcttacggcc ataccagcct gagtacgccc gatctcgtcc gatctcggaa gctaagcagc	60
	gtcgggcctg gttagtactt ggatgggaga cgcctggga ataccaggtg ctgtaagcat	120
60	tttccttttt gtcttcacac attatttaca attagaaaag aactttttat gcagtgaaaa	180
	aaaagtacaa aaagacactt tttgaggctt ttttttccgg ctccctggac atcgactgtg	240

65

ES 2 376 683 A1

	agaggaggac cgtactttaa aatgaccgtt ttcggcctca gccccggcac acagaggcca	300
	aaaatgctgt ttatcgacag atttaatttt gggaacaccg ggggttgaaa agacattctc	360
5	acgtttgtgaa aaagagctag aaaaaggggtt ttcttaggcc tttcttggct ccacatgtgt	420
	gaaatgtggg acaaggaccg tactataaaa ggaccgtttt cagcctcagc cttt	474
10	<210> 12	
	<211> 674	
	<212> DNA	
	<213> <i>Engraulis ringens</i>	
15	<220>	
	<223> ADNr 5S	
20	<400> 12	
	gcttacggcc ataccagcct gagtacgccc gatctcgtcc gatctcggaa gctaagcagc	60
25	gtcgggcctg gttagtactt ggatgggaga ccgcctggga ataccagggtg ctgtaagctt	120
	ttcattttcc taacaagtag gaggtgctac cgggcagaaa ccaccattgc aactatttat	180
	tgccttcatg caccctgttt gtgtcaagga aaaataatgg gcctcatata atacaaaaat	240
30	agacattaat tgacatcaga ttactattg gaaatgccag gtgcttgctg taagattttc	300
	ctttttcttg tcaagatgcg ttattttccg gtagaaaatc actttttatc cactgaaaaa	360
35	atgacagaca ccattttggt tttgagcttt tttgctgttt agaatgtgaa aaaggggaatg	420
	gggttttaaaa ggaccttggt cagcctcagg tctcgcttac ggccatacct ggatgaactt	480
	gttatctact gaaaaaagac aaaaacactt ttttttttgg cttttctgct attaagaatg	540
40	tgaaagaggg aacaaggttc taaaggacct ttttcagctt cagctctcgc ttacggccat	600
	accacgctga gcacgcccga tctcgtccgg ccgtaaccct aaccctaaaa ggaccgtttt	660
45	cagcttttagc tctc	674
	<210> 13	
	<211> 21	
	<212> DNA	
50	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> Cebador universal 5s1F	
	<400> 13	
60	tacgcccgat ctcgtccgat c	21
	<210> 14	
	<211> 21	
65	<212> DNA	
	<213> Artificial	

ES 2 376 683 A1

<220>

<223> cebador universal 5S2R

5 <400> 14

caggctggta tggccgtaag c

21

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200901649

②② Fecha de presentación de la solicitud: 22.07.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)
C12N15/11 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HICHAM, C., CROSS, I., REBORDINOS, L. Análisis molecular de familias multigénicas ribosomales y de snRNAs y su uso como herramientas para diferenciar entre especies de la familia de <i>Engraulidae</i> . XVII Seminario de Genética de Poblaciones y Evolución. Ribadesella. Noviembre 2008, página 30 [en línea] [recuperado el 24.11.2010] Recuperado de internet: <URL:http://www.segenetica.es/secciones/resumenes/XVII_SGPE_Ribadesella_2008.pdf>	1-15
X	MARTINS, C., WASKO, A. P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. En: Focus on Genome Research. 2004. Nova Science Publishers, Inc., ISBN 1-59033-960-6(H), páginas 335-363.	1-15
X	RASMUSSEN, R. S., MORRISSEY, M. T. DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Junio 2008, Vol. 7, Nº 3, páginas 280-295.	1-15
X	RASMUSSEN, R. S., MORRISSEY, M. T. Application of DNA-based methods to identify fish and seafood substitution on the commercial market. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Abril 2009, Vol. 8, Nº 2, páginas 118-154.	1-15
X	PINHAL, D., GADIG, O. B. F., WASKO, A. P. et al. Discrimination of shark species by simple PCR of 5S rDNA repeats. Genetics and Molecular Biology. Abril 2008, Vol. 31, Nº 1, Supl. S, páginas 361-365. ISSN 1415-4757.	1-15
X	WASKO, A. P., MARTINS, C., WRIGHT, J. M., GALETTI, P. M. Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus <i>Brycon</i> . Genome. Octubre 2001, Vol. 44, Nº 5, páginas 893-902. ISSN 0831-2796.	1-15
A	ASENSIO, L. Application of multiplex PCR for the identification of grouper meals in the restaurant industry. Food Control. Noviembre 2008, Vol. 19, Nº 11, páginas 1096-1999. ISSN 0956-7135 <DOI:10.1016/j.foodcont.2007.11.002>	1-15

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
29.02.2012

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
1/5

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

C12Q, C12N

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, MEDILINE, BIOSIS, EMBASE, NPL, COMPENDX, INSPEC, XPESP, XPOAC, EMBL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.02.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-15	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 se publica.

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	HICHAM, C. et al. XVII Seminario de Genética de Poblaciones y Evolución. Ribadesella. Noviembre 2008, página 30.	11-2008
D02	MARTINS, C. et al. En: Focus on Genome Research. 2004. Nova Science Publishers, Inc., páginas 335-363.	2004
D03	RASMUSSEN, R. S. et al. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Junio 2008, Vol. 7, Nº 3, páginas 280-295.	06-2008
D04	RASMUSSEN, R. S., et al. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Abril 2009, Vol. 8, Nº 2, páginas 118-154.	04-2009
D05	PINHAL, D., et al. Genetics and Molecular Biology. Abril 2008, Vol. 1, Nº 1, Supl. S, páginas 361-365.	04-2008
D06	WASKO, A. P., et al. Genome. Octubre 2001, Vol. 44, Nº 5, páginas 893-902.	10-2001
D07	ASENSIO, L. Food Control. Noviembre 2008, Vol. 19, Nº 11, páginas 1096-1999.	11-2008

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

El objeto de la presente solicitud, es un método de detección e identificación de las especies *Engraulis encrasicolus*, *Engraulis mordax* y *Engraulis ringens*, mediante la amplificación por PCR múltiplex de los espaciadores no transcritos (NTS) del ADN ribosómico 5S, de secuencias SEQ. ID. NO. 1 (*E. encrasicolus*), SEQ. ID. NO. 2 (*E. mordax*) y SEQ. ID. NO. 3 (*E. ringens*) (reivindicaciones 1 y 2). Los cebadores de secuencias SEQ. ID. NO. 4 y 5, permiten la amplificación del NTS de *E. encrasicolus*, los de SEQ. ID. NO. 6 y 7 el de *E. mordax*, y los de SEQ. ID. NO. 8 y 9 el de *E. ringens* (reivindicaciones de la 3 a la 5). Así mismo, son objeto de la presente solicitud, los cebadores de secuencias de SEQ. ID. NO. 4 a 9 (reivindicaciones de la 6 a la 11), las secuencias NTS de SEQ. ID. NO. 1 a 3 (reivindicaciones de la 12 a la 14), así como el kit que comprenda alguno de los pares de cebadores arriba indicados (reivindicación 15).

En D01 se anticipa un procedimiento de diferenciación de *Engraulis encrasicolus*, *Engraulis mordax* y *Engraulis ringens*, mediante una PCR múltiplex de los NTS del ADN ribosómico 5S.

D02 muestra una revisión sobre la estructura y la organización del ADN ribosómico 5S en peces. Además, destaca sus ventajas como marcador para la diferenciación de especies, híbridos o subespecies.

En D03 se divulga una revisión de los métodos de identificación de especies acuáticas, entre ellos el análisis del ADN ribosómico 5S.

D04 presenta una revisión sobre los distintos métodos de diferenciación de especies comerciales acuáticas, como el estudio del ADN ribosómico 5S.

En D05 se desarrolla un método de diferenciación de especies de tiburón mediante una PCR de la región del ADN ribosómico 5S.

D06 investiga la organización del ADN ribosómico 5S en siete especies de peces neotropicales del género *Brycon*. Los datos obtenidos indican que el ADN ribosómico 5S puede servir de marcador para la identificación de especies cercanas de este género.

En D07 se describe un método para la diferenciación del mero (*Epinephelus marginatus*) de otras especies (*Lates niloticus* y *Polyprion americanus*) en productos cocinados, mediante la amplificación del ADN ribosómico 5S por PCR múltiplex.

1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986).

Las reivindicaciones de la 1 a la 15 son nuevas (Art. 6.1 LP 11/1986).

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986).

El objeto de la presente solicitud, según las reivindicaciones de la 1 a la 5, es un método de detección e identificación de las especies *E. encrasicolus*, *E. ringens* y *E. mordax*, mediante la amplificación de los espaciadores no transcritos (NTS) del ADN ribosómico 5S, cuyas secuencias son SEQ. ID. NO. 1, 2 y 3 respectivamente, con los cebadores de secuencias SEQ. ID. NO. 4 y 5 para *E. encrasicolus*, SEQ. ID. NO. 6 y 7 para *E. mordax* y SEQ. ID. NO. 8 y 9 para *E. ringens*.

En D01 se anticipa un procedimiento de diferenciación de *E. encrasicolus*, *E. mordax* y *E. ringens*, mediante una PCR múltiplex de los NTS del ADN ribosómico 5S de dichas especies. La diferencia entre D01 y la presente solicitud, es que en este documento no se especifican las secuencias de los NTS ni las de los cebadores.

Sin embargo, dado que para la obtención de las secuencias NTS se han utilizado unos cebadores universales (ver página 10, líneas 1 a 7 de la descripción), no se cree que haya habido una dificultad técnica especial a la hora de poder conseguir dichas secuencias. Además, el diseño de cebadores específicos para cada especie a partir del estudio de las secuencias obtenidas, se considera una actividad rutinaria para el experto en la materia.

Por otro lado, D02 presenta una revisión sobre la estructura y la organización del ADN ribosómico 5S en peces. Mientras que el ADN ribosómico 5S está conservado entre taxones no relacionados, los NTS muestran una gran variabilidad en cuanto a su longitud. De hecho, se pueden detectar diferencias significativas en los NTS incluso entre especies cercanas. Debido a estas características, los patrones de repetición del ADN ribosómico 5S han sido útiles como marcadores para la identificación de especies, híbridos o subespecies de peces. Además, el ADN 5S es un candidato útil para los estudios mediante PCR por los siguientes motivos: i) tiene una organización multigénica cabeza-cola; ii) los NTS están flanqueados por los 5S, por lo que se puede usar la PCR para aislar los NTS; iii) el gen del ADN ribosómico 5S está muy conservado entre especies no relacionadas, por lo que se pueden diseñar PCR para aislar NTS basándose en secuencias disponibles de especies no relacionadas; iv) las unidades de repetición del ADNr 5S no exceden el rango de amplificación de la PCR; v) se pueden obtener las unidades de repetición del ADNr 5S a partir de ADN de poca calidad, debido a sus repeticiones y pequeño tamaño. De este modo, se ha utilizado para la diferenciación de especies del género *Salmo*, o del género *Brycon*, o la identificación de especies de productos ahumados. En D03 se divulga una revisión de los métodos de identificación de especies de peces. Uno de ellos, es el análisis del ADN ribosómico 5S, que ha servido para identificar especies de salmónidos y tiburones, entre otros. Por último, en D04 se presenta una revisión sobre los distintos métodos de diferenciación de especies comerciales de peces. Así, el estudio del ADN ribosómico 5S se ha utilizado en la diferenciación de especies de las familias *Merlucciidae*, *Salmonidae*, *Scombridae*, *Sparidae* o del superorden *Selachimorpha*.

En D05 se desarrolla un método de diferenciación de especies de tiburón (*Sphyrna lewini*, *Isurus oxyrinchus*, *Carcharhinus limbatus*, *Carcharhinus achronotus*, *Galeocerdo cuvier*, *Alopias superciliosus*, *Carcharhinus leucas*, *Carcharhinus obscurus*). Salvo *Carcharhinus leucas* y *Carcharhinus obscurus*, todas las especies se pueden distinguir mediante una PCR de la región del ADN ribosómico 5S. En este documento se describen las ventajas por las que el ADN ribosómico 5S es un buen candidato a marcador molecular en la diferenciación de distintas especies, y se citan ejemplos de estudios de esta índole realizados en otras especies acuáticas.

D06 investiga la organización del ADN ribosómico 5S en siete especies de peces neotropicales del género *Brycon* (*B. lundii*, *B. orbignyanus*, *B. microlepis*, *B. cephalus*, *B. brevicauda*, *B. insignis*). Las secuencias de las regiones NTS son muy diferentes entre sí. Por lo tanto, estos datos indican que el ADN ribosómico 5S puede servir de marcador para la identificación de especies cercanas del género *Brycon*. Además, se afirma que esta región ya se ha utilizado con el mismo fin en estudios de otras especies acuáticas.

En vista de los documentos D02 a D06, en los que se destaca el uso de esta región en la diferenciación de especies en grupos taxonómicos muy distintos, un experto en la materia intentaría el análisis de los NTS del ADN ribosómico 5S, para la diferenciación y detección de las especies *E. encrasicolus*, *E. ringens* y *E. mordax*, con una expectativa razonable de éxito. Además, se considera que para un experto en la materia, el aislamiento y el análisis de los NTS del ADN ribosómico 5S de estas especies, así como el diseño de los cebadores específicos para las mismas, no entraña especial dificultad.

En consecuencia, las reivindicaciones de la 1 a la 5 no presentan actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

Por estos mismos motivos, los cebadores de secuencias SEQ. ID. NO. 4, 5, 6, 7, 8 y 9 (reivindicaciones de la 6 a la 11), las secuencias NTS de SEQ. ID. NO. 1, 2 y 3 (reivindicaciones de la 12 a la 14) y el kit que comprende al menos uno de los pares de cebadores de secuencias SEQ. ID. NO. 4 y 5, SEQ. ID. NO. 6 y 7, o SEQ. ID. NO. 8 y 9 (reivindicación 15), tampoco cumplen el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).