(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 390 019**

(21) Número de solicitud: 201031241

(51) Int. CI.:

C12Q 1/68 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN PREVIO B2

(22) Fecha de presentación:

10.08.2010

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

06.11.2012

Fecha de la concesión:

03.05.2013

(45) Fecha de publicación de la concesión:

16.05.2013

(73) Titular/es:

UNIVERSIDADE DA CORUÑA
A MAESTRANZA, S/N
15071 A CORUÑA (A Coruña) ES

(72) Inventor/es:

FREIRE ÁLVAREZ, María Ruth;
GARCÍA GIL, José Baldomero;
FERNÁNDEZ TAJES, Juan y
MÉNDEZ FELPETO, Josefina

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

(54) Título: **MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE ADN RIBOSOMICO 5S DE ESPECIES DE ALMEJA.**

(57) Resumen:

La presente invención es un método para la identificación de las especies de almejas Ruditapes decussatus (almeja fina), Ruditapes phillipinarum (almeja japonesa), Venerupis pullastra (almeja babosa), Venerupis rhomboides (almeja rubia) y Venerupis aurea (almeja dorada), que comprende aislar el ADN presente en una muestra de almeja, amplificar secuencias nucleotídicas de ADN ribosómico 5S mediante la reacción en cadena de la polimerasa y detectar las secuencias nucleotídicas amplificadas.

ES 2 390 019 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE ADN RIBOSÓMICO 5S DE ESPECIES DE ALMEJA

SECTOR DE LA TÉCNICA

El método de la invención se encuadra dentro del sector de la identificación de especies comerciales de almejas a partir de técnicas moleculares. El método tiene aplicación en el sector alimentario, concretamente en el sector pesquero y conservero, para evitar el fraude comercial por sustitución de una especie determinada de almeja por otra más barata.

ANTECEDENTES

La producción media de almejas en toda Europa es de 60.000 toneladas anuales, siendo España el segundo país productor de almeja en Europa, y Galicia produce más de la mitad de las almejas que se comercializan en España, excluyendo las procedentes de importación. En Europa, la almeja japonesa *Ruditapes philippinarum* es la que presenta una mayor producción, seguida muy de lejos por la almeja fina *Ruditapes decussatus* y por la almeja babosa *Venerupis pullastra*. En España también se comercializan otras dos especies de almeja, la almeja rubia *Venerupis rhomboides* y la almeja dorada *Venerupis aurea*. Existe una diferencia en precio entre las distintas especies de almeja: el precio medio alcanzado por la almeja fina en España en el año 2009 fue de 19,24 €/kg, el de la almeja babosa 12,39 €/kg, y el de la japonesa 6,90 €/kg. La almeja rubia y la almeja dorada son las almejas que tienen un precio más bajo.

La identificación de las especies de almeja se puede realizar mediante métodos morfológicos, pero estos métodos no se pueden aplicar a muestras procesadas, donde la mayoría de los caracteres morfológicos necesarios para la identificación de la especie han sido eliminados.

En la identificación de especies de moluscos se han empleado diversas metodologías como el análisis de las secuencias nucleotídicas, RAPD (amplificación al azar de ADN polimórfico), PCR-RFLPs (polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción y PCR-SSCP (polimorfismo conformacional de cadena sencilla).

Los métodos moleculares de análisis de proteínas y ADN del estado de la técnica se han utilizado para la identificación de especies de almejas comercializadas, pero ninguno de ellos incluye la identificación de la especie *Venerupis aurea* (almeja dorada), pese a presentar esta especie una gran similitud con las almejas fina y babosa, ambas de mayor calidad comercial.

El documento más cercano del estado de la técnica es la patente ES2303460, en dicho documento se describe un método para identificación de especies de navajas comerciales mediante PCR y análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción de secuencias de ADN ribosómico 5S. El método de detección descrito en dicho documento incluye una digestión enzimática mediante enzimas de restricción y es, por tanto, distinto al método de la presente invención.

El problema que plantea la técnica es encontrar un método viable técnica y económicamente de diferenciar entre ellas las especies de almejas prevalentes en el mercado presentes en una única muestra alimentaria, incluyendo en el método a *Venerupis aurea* (almeja dorada), especie que no ha sido incluida en ninguno de los métodos del estado de la técnica. Las otras cuatro especies que se detectan son *Ruditapes decussatus* (almeja fina), *Ruditapes phillipinarum* (almeja japonesa), *Venerupis pullastra* (almeja babosa) y *Venerupis rhomboides* (almeja rubia). La solución que propone la presente invención es un experimento de amplificación por polimerasa de dicha única muestra alimentaria en presencia de un cocktail de cebadores sobre el ADN 5S ribosomal, de gran especificidad.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención es un método para la detección de ADN ribosómico 5S de especies de almeja que comprende aislar el ADN presente en una muestra de almeja, amplificar secuencias nucleotídicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa sobre el ADN extraído empleando una mezcla de cebadores que comprende los cebadores identificados por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 o una variante funcional o su secuencia complementaria, y detectar las secuencias nucleotídicas amplificadas como resultado de la citada reacción en cadena de la polimerasa.

El método consiste en la extracción del ADN de ejemplares vivos, conservados en etanol, congelados o envasados en conserva de distintas especies. De forma que una realización de la invención es que la muestra de almeja esté seleccionada entre el grupo compuesto por almejas frescas, conservadas en etanol, congeladas y en conserva.

El método de la invención detecta secuencias de ADN ribosómico 5S para la identificación de las distintas especies. De forma que una realización más es el método de la invención para identificar las especies seleccionadas de entre el grupo compuesto por *Ruditapes decussatus* (almeja fina), *Ruditapes phillipinarum* (almeja japonesa), *Venerupis pullastra* (almeja babosa), *Venerupis rhomboides* (almeja rubia) y *Venerupis aurea* (almeja dorada).

Tras la extracción del ADN, se amplifican distintas secuencias mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*). La PCR permite obtener un gran número de copias de una secuencia de ADN particular presente en un número limitado de copias. En este método, se utiliza PCR multiplex, una PCR en la cual se amplifica más de una secuencia en una misma reacción. La amplificación por PCR multiplex en este método se lleva a cabo con un cebador común y cinco cebadores específicos desarrollados a partir de la secuencia del ADN ribosómico 5S de cada una de las cinco especies de almeja, generando fragmentos característicos para cada especie: la almeja fina amplifica un fragmento con un tamaño de 480 pb, la almeja japonesa un fragmento de entre 430-450 pb, la almeja babosa amplifica dos fragmentos de 300 y 360 pb, la almeja rubia un fragmento de 225 pb y la almeja dorada dos fragmentos de 500 y 550 pb. Pese a presentar en algunos casos más de una banda de amplificación, y en otros variaciones de tamaño en los productos amplificados, todo ello debido a las características de esta región genómica en almejas, los patrones observados y las diferencias en longitud de los fragmentos amplificados permiten diferenciar claramente entre las especies. Estos tamaños han sido amplificados de manera satisfactoria en ejemplares vivos, conservados en etanol, congelados o envasados en conserva.

Una de las ventajas de este método es que aunque el ADN esté degradado en las muestras (especialmente en productos envasados en conserva), es posible amplificar el ADN de estas muestras mediante el método de la invención. El método de la invención permite garantizar el cumplimiento de las normativas de comercialización

vigentes y evitar fraudes al consumidor, principalmente teniendo en cuenta la elevada similitud que existe entre las cinco especies comercializadas, la gran diferencia económica que existe entre ellas y la imposibilidad de usar los caracteres morfológicos para distinguirlas en muestras procesadas.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Patrón de amplificación de las especies analizadas empleando PCR multiplex. Se presentan los resultados de amplificación sobre ADN extraído de ejemplares de almeja dorada recogidos en la costa gallega (pocillos 2-4), de almeja japonesa recogida en la costa gallega (pocillos 5 y 6) y en la costa mediterránea (pocillos 7 y 8), de almeja fina procedente de la costa gallega (pocillos 9 y 10) y de la costa mediterránea (pocillos 11 y 12), de almeja babosa de la costa gallega (pocillos 13-15) y de almeja rubia de la costa gallega (pocillos 16-19). Los pocillos 1 y 20 corresponden a marcadores de peso molecular.

Figura 2. Patrón de amplificación de muestra de identidad desconocida y comparación con muestras de identidad conocida. Se presentan los resultados de amplificación sobre ADN extraído de almejas enlatadas identificadas solamente como "almejas de las rías gallegas" (pocillos 1 al 6) junto con ejemplares de almeja japonesa (pocillos 8 y 9), almeja rubia (pocillo 10), almeja dorada (pocillo 11), almeja fina (pocillo 12) y almeja babosa (pocillo 13). El pocillo 7 corresponde al marcador de peso molecular y el pocillo 14 al control negativo.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Extracción de ADN a partir de muestras de almejas

En primer lugar, se tomaron muestras de 30 individuos de almeja fina procedentes de diferentes poblaciones gallegas y de Delta del Ebro, de 30 individuos de almeja babosa de diferentes localidades gallegas, de 30 individuos de almeja japonesa de diferentes poblaciones gallegas y del mediterráneo, de 30 individuos de almeja rubia procedentes de Cangas (Pontevedra) y de 15 individuos de almeja dorada procedentes de Vilanova de Arousa (Pontevedra). Parte de estas muestras se conservaron en etanol 96%.

También se tomaron muestras de almejas en conserva procedentes de los supermercados locales, con la única denominación de "almejas de las rías gallegas". El ADN se extrajo a partir de muestras frescas o en etanol 96% de almejas naturales y de muestras de almejas en conserva, siguiendo el método descrito en Fernández-Tajes et al. (Fernández-Tajes, J. et al. 2007. Identification of the razor clam species *Ensis arcuatus*, *E. siliqua*, *E. directus*, *E. macha*, and *Solen marginatus* using PCR-RFLP analysis of the 5S rDNA region. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(18), 7278-7282).

En todos los casos, se pesaron 30 mg de muestra a partir de un único individuo en un tubo eppendorf estéril de 1,5 ml y se añadieron 400 µl de tampón de lisis (1M Tris, 0.2M EDTA, 2.5% N-Lauryl-sarcosine) y 6 µl de Proteinasa K (1 mg/ml). Esta mezcla se incubó a 60° durante toda una noche, se añadieron 4 µl de RNAsa (2mg/ml) y se incubó esta mezcla durante 1 hora a 37° C. Posteriormente, se añadió un volumen de 150 µl del tampón de precipitación (acetato amónico 3M pH 6.0), se agitó con vortex y se incubó en hielo 10 minutos. Esta mezcla se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a otro tubo estéril. Se añadieron 400 µl de isopropanol frío a este sobrenadante y se dejó precipitar durante 2 minutos. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 6 minutos, se eliminó el isopropanol, se añadió 1 ml de etanol 70% frío y se lavó durante una hora en noria. Esta mezcla se centrifugó a 12000 rpm durante 6 minutos, se eliminó el sobrenadante, se secó el ADN y se resuspendió en 100 µl de tampón TRIS-EDTA.

Ejemplo 2. Amplificación mediante PCR de secuencias específicas de ADN

La amplificación por PCR del ADN extraído obtenido en el ejemplo 1 se realizó en un volumen final de 25 µL, conteniendo 10 ng de ADN, 2,5 µL de tampón Tris-HCl 100 mM y KCl 500 mM, pH 8,3, $MgCl_2$ 2 mM, dNTPs 200 µM cada uno, 0,6 µM de cada cebador (un cebador común a todas las especies que marca el inicio de la secuencia de amplificación (SEQ ID NO: 1) y un cebador específico para cada una de las especies: *Ruditapes decussatus* (SEQ ID NO: 2), *R. phillipinarum* (SEQ ID NO: 3), *Venerupis pullastra* (SEQ ID NO: 4), *V. rhomboides* (SEQ ID NO: 5) y *V. aurea* (SEQ ID NO: 6)) y 0,6 U de la enzima *Taq* polimerasa.

Se empleó un programa de amplificación con una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94ºC, seguida de 35 ciclos de 94ºC durante 30 segundos, 55ºC durante 30 segundos y 72ºC durante 30 segundos, y de un paso final de elongación de 72ºC durante 7 minutos.

Ejemplo 3. Detección de las secuencias amplificadas mediante electroforesis en gel de agarosa

El análisis electroforético de las muestras de ADN amplificadas obtenidas en el ejemplo 2 se realizó en geles de agarosa al 2%, se aplicó un voltaje de aproximadamente 90 V durante 2 horas. Los fragmentos amplificados se visualizaron tras tinción con Bromuro de etidio (0,5 µg/ml) bajo iluminación con luz ultravioleta.

Ejemplo 4. Identificación de muestras de origen e identidad desconocida

Se emplearon las muestras procedentes de las latas de conserva etiquetadas como “almejas de las rías gallegas”. La extracción de ADN, amplificación y análisis electroforético se realizaron de igual manera a la indicada en los ejemplos 1, 2 y 3. Además de las muestras de origen desconocido, se analizaron muestras de almejas ya identificadas para emplearlas como control. En la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos, comprobándose que las almejas enlatadas corresponden a almeja japonesa.

REIVINDICACIONES

1. Método para la detección de ADN ribosómico 5S de especies de almeja que comprende:

a) aislar el ADN presente en una muestra de almeja,

b) amplificar secuencias nucleotídicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa sobre el ADN extraído en a) empleando una mezcla de cebadores que comprende los cebadores identificados por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 o su secuencia complementaria,

c) detectar las secuencias nucleotídicas amplificadas como resultado de la citada reacción en cadena de la polimerasa.

2. Método según reivindicación 1, caracterizado por que la muestra de almeja se selecciona de entre el grupo compuesto por almejas frescas, conservadas en etanol, congeladas y en conserva.
3. Método según las reivindicaciones 1 ó 2, para la identificación de las especies seleccionadas de entre el grupo compuesto por *Ruditapes decussatus, Ruditapes phillipinarum, Venerupis pullastra, Venerupis rhomboides* y *Venerupis aurea*.

FIGURA 1

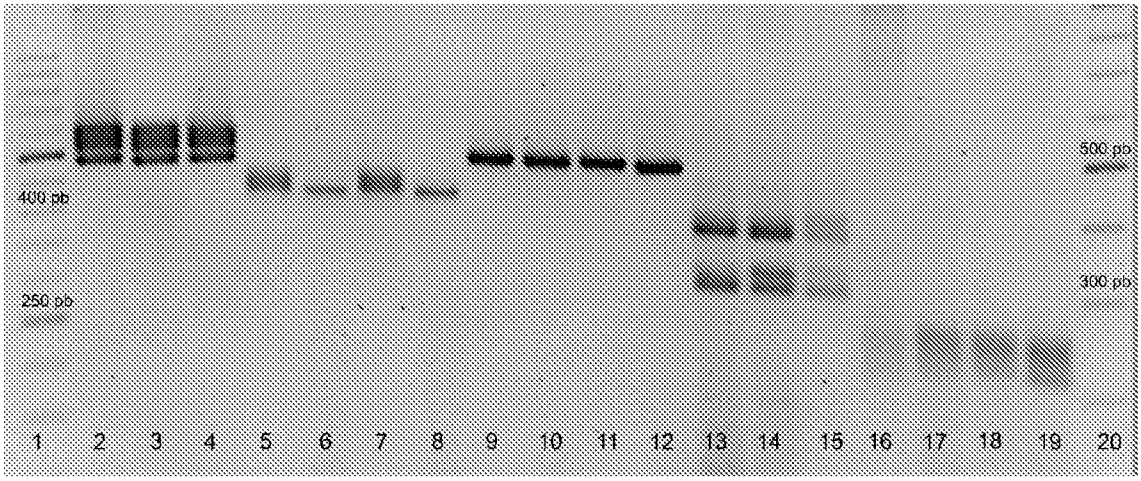
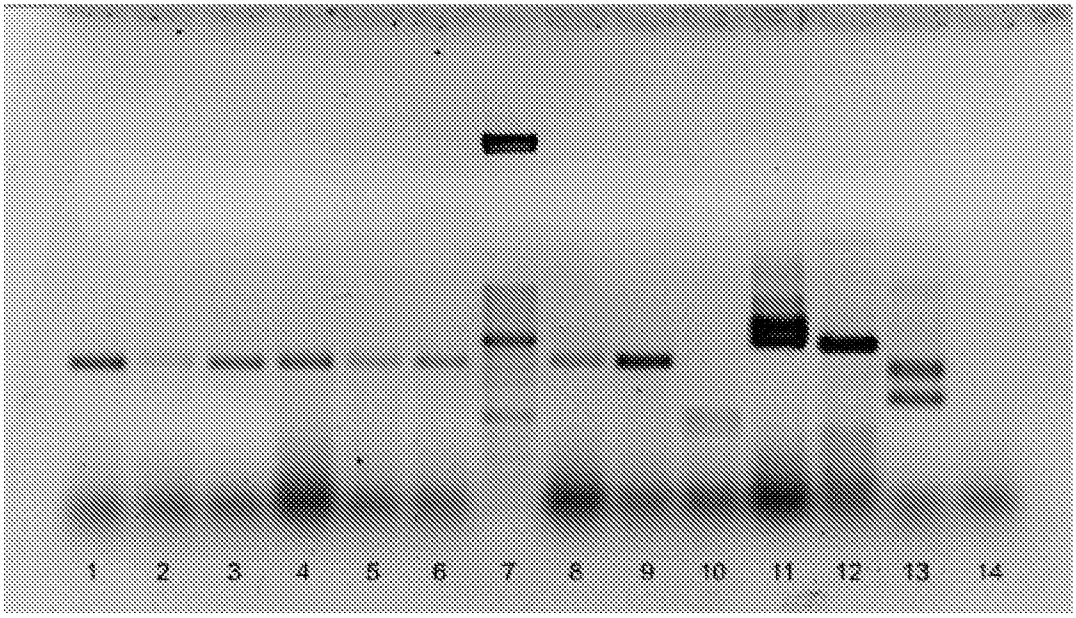

500 pb
400 pb
300 pb
250 pb
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

FIGURA 2



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidade da Coruña

<120> MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE ADN RIBOSÓMICO 5S DE ESPECIES DE ALMEJA

<130> P699/2010

<160> 6

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 1
cgtccgatca ccgaagttaa 20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador Ruditapes decussatus

<400> 2
ctttggcggc aaaataaaac
20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador Ruditapes phillipinarum

<400> 3
tactggcgta cgtgcatacc
20

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador Venerupis pullastra

<400> 4
tttaggaagc ctacagtgcg ta
22

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador Venerupis rhomboides

<400> 5
ttcgctttag gatgtggtca
20

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador Venerupis aurea

<400> 6
acaggctact gaaccttaaa acgt
24

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201031241

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 10.08.2010

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

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

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	FERNÁDEZ-TAJES J. et al. "Identification of the razor clam species *Ensis arcuatus*, *E. siliqua*, *E. directus*, *E. macha*, and *Solen marginatus* using PCR-RFLP analysis of the 5S rDNA region" Journal of Agricultural and Food Chemistry (08 noviembre 2007) Vol. 55, N°. 18, páginas 7278-7282; DOI 10.1021/jf0709855; todo el documento.	1-3
A	FERNÁNDEZ A. et al. "Identification of the clam species *Ruditapes decussatus* (Grooved Carpet Shell), *Venerupis pullastra* (Pullet Carpet Shell), and *Ruditapes philippinarum* (Japanese Carpet Shell) by PCR-RFLP" Journal of Agricultural and Food Chemistry (Julio 2000) Vol. 48, N°. 8, páginas 3338-3341; DOI 10.1021/jf0002185; todo el documento.	1-3
A	FERNÁNDEZ A. et al. "PCR-RFLP analysis of the internal trancribed spacer (ITS) region for identification of 3 clam species" Food Chemistry and Toxicology (junio 2001) Vol. 66, N°. 5, páginas 657-661; DOI 10.1111/j.1365-2621.2001.tb04617.x; todo el documento.	1-3
A	FERNÁNDEZ A. et al. "Genetic differentiation between the clam species *Ruditapes decussatus* (grooved carpet shell) and *Venerupis pullastra* (pullet carpet shell) by PCR-SSCP analysis" Journal of the Sciences of Food and Agriculture (junio 2002) Vol. 82, N°. 8, páginas 881-885; DOI 10.1002/jsfa.1117; todo el documento.	1-3
A	RASMUSSEN R.S. et al. "Application of DNA based methods to identify fish and seafood substitution on the commercial market" Comprehensive Reviewa in Food Science and Food Safety (2009) Vol. 8, páginas 118-154; todo el documento.	1-3

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	Examinador	Página
19.10.2012	M. Á. García Coca	1/5

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, WPI, EMBL-EBI, STN data bases, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, XPSEP/ELSEVIER

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 19.10.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-3	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-3	**SI**
	Reivindicaciones		**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	FERNÁDEZ-TAJES J. et al. "Identification of the razor clam species *Ensis arcuatus*, *E. siliqua*, *E. directus*, *E. macha*, and *Solen marginatus* using PCR-RFLP analysis of the 5S rDNA region" Journal of Agricultural and Food Chemistry (08 noviembre 2007) Vol. 55, N°. 18, páginas 7278-7282; DOI 10.1021/jf0709855.	08.11.2007
D02	FERNÁNDEZ A. et al. "Identification of the clam species *Ruditapes decussatus* (Grooved Carpet Shell), *Venerupis pullastra* (Pullet Carpet Shell), and *Ruditapes philippinarum* (Japanese Carpet Shell) by PCR-RFLP" Journal of Agricultural and Food Chemistry (Julio 2000) Vol. 48, N°. 8, páginas 3338-3341; DOI 10.1021/jf0002185.	Julio 2000
D03	FERNÁNDEZ A. et al. "PCR-RFLP analysis of the internal trancribed spacer (ITS) region for identification of 3 clam species" Food Chemistry and Toxicology (junio 2001) Vol. 66, N°. 5, páginas 657-661; DOI 10.1111/j.1365-2621.2001.tb04617.x.	Junio 2001
D04	FERNÁNDEZ A. et al. "Genetic differentiation between the clam species *Ruditapes decussatus* (grooved carpet shell) and *Venerupis pullastra* (pullet carpet shell) by PCR-SSCP analysis" Journal of the Sciences of Food and Agriculture (junio 2002) Vol. 82, N°. 8, páginas 881-885; DOI 10.1002/jsfa.1117.	Junio 2002
D05	RASMUSSEN R.S. et al. "Application of DNA based methods to identify fish and seafood substitution on the commercial market" Comprehensive Reviewa in Food Science and Food Safety (2009) Vol. 8, páginas 118-154.	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

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-3, es un método para la detección de ADN ribosómico 5S de especies de almeja en una muestra, mediante PCR utilizando una mezcla de cebadores (SEQ ID NO:1-6). Las especies identificadas mediante este método son *Ruditapes decussatus*, *R. phillipinarum*, *Venerupis pullastra*, *V. romboides* y *V. aurea*.

Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D01 divulga análisis de PCR y RFLP de una región del ADN ribosómico 5S para el establecimiento de marcadores moleculares basados en el ADN, para la identificación de distintas especies de navajas frescas y en conserva. En este documento se divulga la utilización de una pareja de primes universales para el análisis mediante PCR, siendo, uno de ellos el identificado en la solicitud de patente como SEQ ID NO 1.

El documento D02 divulga análisis de PCR-RFLP para la identificación de almejas de las especies *Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra* y *Ruditapes philippinarum* utilizando un set de primers para la PCR diseñados a partir de secuencias nucleotídicas de ADN de la α-actina nuclear de humanos y de varios animales.

El documento D03 divulga análisis de PCR-RFLP para la identificación de almejas de las especies *Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra* y *Ruditapes philippinarum* utilizando un set de primers para la PCR diseñados a partir de secuencias nucleotídicas de DNA ribosomal de las regiones ITS de *Mylitus*.

El documento D04 divulga análisis de PCR-SSCP para establecer la diferencia genética entre las especies *Ruditapes decussatus* y *Venerupis pullastra*, utilizando un set de primers diseñados para la amplificación de una pequeño fragmento del gen de la α-actina.

El documento D05 divulga métodos basados en el DNA para la identificación de especies de peces y mariscos en productos comerciales. En este documento se divulgan tanto los métodos utilizados como los marcadores que se utilizan en cada uno de ellos. Sin embargo, en este documento se indica que cada técnica y cada marcador son específicos para determinadas especies, por ejemplo, el análisis de PCR-RFLP de la α-actina nuclear y de la región ITS-1 e ITS-2, se usa para la identificación de almejas de las especies *Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra* y *Ruditapes philippinarum*; y el análisis de PCR-RFLP de 16S rRNA mitocondrial para la identificación de las especies *Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra*, *Vererupis romboides* y *Ruditapes philippinarum* (tabla 14).

Aunque en los documentos citados se divulgan distintos cebadores y primers para la identificación de almejas, e incluso, en el documento D01 se divulga la SEQ ID NO 1 de la solicitud, en ellos no se divulga la mezcla de cebadores de la invención. Además, con los cebadores divulgados en estos documentos tampoco es posible la identificación de todas las especies de almejas que se reivindican en la solicitud.

Por lo tanto, ninguno de los documentos citados del estado de la técnica anterior a la solicitud, tomados solos o en combinación, revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-3. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-3. Así, la invención contenida en las reivindicaciones 1-14 es con referencia a los documentos D01-D05 nueva y se considera que implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).