

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 293**

21 Número de solicitud: 201130837

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**23.05.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**07.12.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:

**07.12.2012**

71 Solicitantes:

**FUNDACION AZTI/AZTI FUNDAZIOA (50.0%)**

**Isla de Txatxarramendi, s/n**

**48395 SUKARRIETA, Bizkaia, ES y**

**UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO - EUSKAL**

**HERRIKO UNIBERTSITATEA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PARDO GONZÁLEZ, Miguel Angel;**

**ARRIZABALAGA DE MINGO, Haritz Joseba;**

**JIMÉNEZ URIBE, Elisa;**

**ESCUREDO GARCÍA DE GALDEANO, Pedro Ramón;**

**ESTONBA REKALDE, Andone;**

**VELADO FERNÁNDEZ, Igor;**

**IRIONDO ORENSANZ, Mikel y**

**ZARRAONAINDIA MARTINEZ, Iratxe**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

54 Título: **MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DEL ATÚN BLANCO (Thunnus alalunga) Y DE SU ORIGEN GEOGRÁFICO O POBLACIÓN BLANCO**

57 Resumen:

Método de identificación genética del atún blanco (Thunnus alalunga) y de su origen geográfico o población. La invención pertenece al campo de la identificación genética del atún blanco (Thunnus alalunga). Más concretamente, la invención consiste en una serie de marcadores moleculares del tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) y un método genético que utiliza dicho panel de marcadores SNP para identificar el origen geográfico o poblaciones de la especie atún blanco (Thunnus alalunga) en productos derivados de la pesca. Asimismo, consiste en un kit con los cebadores y/o sondas adecuados para llevar a cabo el método de la invención.

ES 2 392 293 A1

## DESCRIPCIÓN

Método de identificación genética del atún blanco (*Thunnus alalunga*) y de su origen geográfico o población.

### CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La invención pertenece al campo de la identificación genética del atún blanco (*Thunnus alalunga*). Más concretamente, la invención consiste en una serie de marcadores moleculares del tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) y un método genético que utiliza dicho panel de marcadores SNP para identificar el origen geográfico o poblaciones de la especie atún blanco (*Thunnus alalunga*) en productos derivados de la pesca. Asimismo, consiste en un kit con los cebadores y/o sondas adecuados para llevar a cabo el método de la invención.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 El atún blanco (*Thunnus alalunga*) se comercializa bajo las denominaciones comerciales de ATÚN BLANCO, BONITO DEL NORTE o ALBACORA.

Las características sensoriales de firmeza y sabor del atún blanco procedente del Atlántico Norte hacen que éste sea muy valorado culinariamente en comparación con el atún blanco procedente de otros orígenes. Esto hace que su valor en el mercado resulte muy alto y sea muy apreciado por los consumidores.

- 15 La denominación comercial “Bonito del Norte” ha sido utilizada en España para la especie *Thunnus alalunga* capturada por la flota del Cantábrico con artes de pesca sostenibles. De hecho, las comunidades pesqueras españolas de la Región Cantábrica y Región Noroeste tienen una tradición marítima y una cultura pesquera comunes que se remontan a los siglos XI y XII, cuyo principal exponente es la utilización de artes de pesca, tradicionales y selectivas. La utilización de este tipo de artes permite capturar un pescado con menor grado de fatiga y por tanto de calidad superior al capturado con redes de arrastre. En definitiva, las características reconocidas para el “Bonito del Norte” son el resultado de las artes de pesca utilizadas, la zona de captura y el tratamiento del pescado a bordo, que le confieren unas especificaciones de calidad diferenciales del resto muy valoradas por el consumidor final.

- 25 Atendiendo al Real Decreto 1193/2000, de 23 de Junio (anexo IV del Real Decreto 1521/1984, de 1 de Agosto por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria de los establecimientos y productos de la pesca y la acuicultura con destino al consumo humano) para el caso del *T. alalunga*, las denominaciones comerciales admitidas son tres: “Atún Blanco”, “Bonito del Norte” y “Albacora” (última actualización realizada el 27 de Febrero de 2007 por la Secretaría General de Pesca Marítima). El Reglamento europeo (CE) 2065/2001, de 22 de Octubre de 2001, establece las disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) 104/2000 del Consejo en lo relativo a la información del consumidor en el sector de los productos de la pesca y de la acuicultura. Dicho reglamento incluye la obligatoriedad de informar en la etiqueta sobre el nombre científico, el método de producción (acuicultura o pesca extractiva) y la zona de captura del producto de origen. Esta ley tiene como objetivo la correcta comercialización de los productos derivados de la pesca, evitando fraudes en el etiquetado de las muestras, y ofrece medidas de protección de denominaciones de origen de productos de alta calidad que no suelen estar asociados únicamente con el empleo de una especie concreta, sino que abarcan áreas o regiones geográficas específicas.

De hecho, en los últimos años, el incremento de las importaciones de *T. alalunga* de otras áreas geográficas y capturados con otras artes, y por lo general, sometidos a congelación, ha generado distorsiones en el mercado y ha inducido a error al consumidor al haber utilizado la denominación comercial de “Bonito del Norte” también para el pescado importado.

- 40 El atún blanco es una especie pelágica y migratoria que se encuentra en todos los océanos y en el Mar Mediterráneo. Su longitud no suele exceder los 140 cm y su peso es inferior a 60 kg. La longevidad del atún blanco se estima en unos 10 años y se considera que alcanza la madurez sexual a partir de los 5 años.

- 45 Según la ICCAT (*International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas*), IOTC (*Indian Ocean Tuna Commission*), IATTC (*Inter-American Tropical Tuna Commission*) y WCPFC (*Western and Central Pacific Fisheries Commission*), a nivel mundial se considera la existencia de seis grandes stocks de *Thunnus alalunga* que corresponden a: Atlántico Norte, Atlántico Sur, Mediterráneo, Índico, Pacífico Norte y Pacífico Sur. Muchos autores defienden que la definición más útil de *stock* es aquella que tiene una base genética, definiéndose un *stock* como un grupo intraespecífico de individuos con apareamiento aleatorio e integridad de espacio temporal.

- 50 En cuanto a los **datos biológicos de migraciones**, tanto los atunes blancos juveniles como los adultos del Atlántico Norte pasan la época invernal en la zona central del Atlántico. En primavera, con el calentamiento de las aguas, los individuos jóvenes comienzan una migración trófica hacia aguas más productivas del Atlántico Nordeste (Figura 1). Durante uno o dos meses se localizan al Suroeste de Irlanda y Golfo de Vizcaya, permaneciendo en estas regiones hasta principios de otoño. Después, según van enfriándose las aguas en el Golfo de Vizcaya, el regreso al Atlántico central lo realizan por las rutas del Sur de Portugal, Islas Canarias e Islas Azores. Por otro lado, los atunes blancos

adultos, al llegar los meses estivales, realizan la migración con fines reproductivos a las zonas de reproducción situadas en la parte oeste del Atlántico frente a Venezuela y Mar de los Sargazos (Figura 1).

Arrizabalaga *et al.* (2004 y 2007), tras utilizar técnicas de marcado recaptura, grupos sanguíneos y análisis de datos pesqueros en varias poblaciones a nivel mundial concluyen que hay una marcada estructuración poblacional, aunque en algunos casos puede haber cruce de unos pocos individuos entre algunas áreas. Los datos analizados indican que el nivel de aislamiento del *stock* del Atlántico Norte es considerable, no observándose mezcla y pareciendo existir una cierta diferenciación genética entre los ejemplares del *stock* del Atlántico Norte y del Atlántico Sur. Asimismo, existe muy poca mezcla entre los ejemplares del Atlántico Norte y Mediterráneo, manteniéndose las diferencias genéticas en consecuencia.

En cuanto a los **datos genéticos**, la información es muy escasa y distintos trabajos han proporcionado resultados contradictorios sobre la estructura genética de la especie. Los estudios se han basado básicamente en el análisis de genes mitocondriales mediante análisis de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) y alozimas.

- Mediante el análisis de RFLP del gen ATPasa mitocondrial, Chow y Ushima (1995) confirmaron que el Atlántico y el Pacífico eran poblaciones diferenciadas, concluyendo que cada océano albergaba una única población y no una por cada hemisferio.
- Otros autores, empleando marcadores microsatélites, concluyeron que los *stocks* del Atlántico Norte, Atlántico Sur, Pacífico Norte y Pacífico Sur son poblaciones genéticamente distintas (Takagi *et al.*, 2001).
- En los *stocks* del Atlántico Norte y del Mediterráneo no se observaron diferencias significativas al analizar la región hipervariable *D-loop* del genoma mitocondrial (Viñas *et al.*, 1999). Otros autores también han llegado a esta misma conclusión mediante el uso de métodos bioquímicos (Pujolar *et al.*, 2003). Sin embargo, Arrizabalaga *et al.* (2004), mediante el estudio de grupos sanguíneos, y Viñas *et al.* (2004) analizando el ADN mitocondrial, observaron que Atlántico Norte y Mediterráneo pueden considerarse como dos poblaciones independientes.

De cualquier modo, los alozimas y RFLPs tienden a tener un poder limitado para detectar diferenciación poblacional en especies como la que nos ocupa, altamente móvil con tamaños de censo amplios, siendo necesaria la utilización de múltiples *loci* independientes con frecuencias alélicas altamente diferenciables entre las subpoblaciones.

Los polimorfismos de único nucleótido (SNP, *Single Nucleotide Polymorphisms*) representan la clase más abundante de polimorfismos en cualquier organismo, y por ello se han convertido en los marcadores genéticos de mayor utilidad. En comparación con los microsatélites, la tasa de mutación de los SNP es significativamente menor (Landegren *et al.* 1998, Nielsen 2000). Esta estabilidad es ventajosa en estudios evolutivos, estudios de genética de poblaciones, así como en estudios de pedigrís y asignación individual (Rengmark *et al.*, 2006).

La aplicación de marcadores de ADN microsatélite indica que podrían ser informativos, pero se trata de marcadores extremadamente dependientes de la integridad del ADN, con lo que su empleo estaría limitado en el caso de conservas de atún. Es importante destacar que la utilización de SNP permite la identificación de muestras incluso en casos de material de partida altamente degradado, tal y como es el caso de las conservas y semiconservas.

En lo que respecta a especies de túnidos en general, existen numerosos métodos genéticos basados en PCR que permiten dicha identificación. Entre los métodos más utilizados se encuentran los ya mencionados RFLPs, la Secuenciación Directa o FINS (*Forensically Informative Nucleotide Sequencing*) (Ram *et al.*, 1996; Rehbein *et al.*, 1999; Lockley *et al.*, 2000; Terol *et al.*, 2002; Pardo *et al.*, 2004) y la PCR en Tiempo Real (López y Pardo, 2005).

Sin embargo, hasta la fecha, no tenemos constancia de ningún método genético que utilice un panel de SNP específico para la identificación del origen geográfico o poblaciones de atún blanco (*Thunnus alalunga*) en individuos capturados o productos derivados de la pesca, ya sea fresco, congelado o procesado. Por lo tanto, la invención aquí presentada es novedosa y original.

#### **OBJETO DE LA INVENCION**

La invención consiste en un panel de 18 marcadores de tipo SNP (SNP1 a SNP18), comprendidos en 17 secuencias de ADN (SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 17), que permiten, en primer lugar, la identificación del atún blanco (*Thunnus alalunga*) frente al resto de especies de atún pertenecientes al género *Thunnus*, y en segundo lugar, la identificación del origen geográfico o poblaciones del atún blanco, en particular la población del Atlántico frente a otras áreas de pesca, como el Mediterráneo, Índico y Pacífico. Asimismo, la invención consiste en los oligonucleótidos y sondas necesarios para la amplificación y genotipado de dichos SNP, el método para llevar a cabo la identificación del atún blanco y el kit que comprende los cebadores y/o sondas necesarios para la realización del método de la invención.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Figura 1.- Esquema de migración del atún blanco del Atlántico Norte (según Bard, 1981). Los atunes blancos juveniles y los adultos pasan la época invernal en la zona central de Atlántico. En primavera, los individuos jóvenes migran hacia aguas más productivas del Atlántico Nordeste. Durante uno o dos meses se localizan al Suroeste de Irlanda y Golfo de Vizcaya, permaneciendo en estas regiones hasta el otoño. Después, regresan al Atlántico central por las rutas del Sur de Portugal, Islas Canarias e Islas Azores. Los atunes blancos adultos, al llegar los meses estivales, realizan la migración con fines reproductivos a las zonas de pesca situadas en la parte oeste del Atlántico Central frente a Venezuela y Mar de los Sargazos.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

Un objeto de la invención consiste en un conjunto de moléculas de ADN de secuencias SEQ ID NO 01 a SEQ ID NO 17 caracterizadas por que comprende los siguientes 18 SNP: SNP1 (SEQ ID NO 01), SNP2 (SEQ ID NO 02), SNP3 (SEQ ID NO 03), SNP4 (SEQ ID NO 04), SNP5 (SEQ ID NO 05), SNP6 (SEQ ID NO 06), SNP7 (SEQ ID NO 07), SNP8 y SNP16 (SEQ ID NO 08), SNP9 (SEQ ID NO 09), SNP10 (SEQ ID NO 10), SNP11 (SEQ ID NO 11), SNP12 (SEQ ID NO 12), SNP13 (SEQ ID NO 13), SNP14 (SEQ ID NO 14), SNP15 (SEQ ID NO 15), SNP17 (SEQ ID NO 16) y SNP18 (SEQ ID NO 17) (TABLA 1). Asimismo, son objeto de la invención las moléculas de ADN de SEQ ID NO 18 a SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 24 a SEQ ID NO 31, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 41 y SEQ ID NO 50 a SEQ ID NO 83 para la amplificación de los fragmentos que contienen los SNP1 a SNP18. Y las moléculas de ADN de secuencias SEQ ID NO 84 a SEQ ID NO 117 para el genotipado de los SNP1 a SNP18.

Por otro lado, es objeto de la presente invención el uso de las moléculas de ADN de secuencias SEQ ID NO 01 A SEQ ID NO 17 y de los SNP1 a SNP18 como marcadores para identificar la especie *Thunnus alalunga* y su origen geográfico o población.

Los marcadores SNP1 y SNP2 se encontraron tras alinear secuencias de Citocromo b (*Cytochrome b*, *CytB*) de atunes pertenecientes al género *Thunnus* publicadas en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y en la base de datos de AZTI-Tecnalia. Tras dicho análisis se obtuvieron dos secuencias consenso de la especie *Thunnus alalunga* de 76 y 54 pares de bases (pb) cada una, denominadas CytB-76 (SEQ ID NO 01) y CytB-54 (SEQ ID NO 02), respectivamente. Los SNP1 y SNP2 se encuentran en la posición 36 de dichas secuencias (posiciones 303 y 1023 del gen mitocondrial "Citocromo b", respectivamente) y corresponden a C y G, respectivamente. La secuencia consenso que contiene el SNP1 (SEQ ID NO 1) se amplifica con los cebadores CytB-76-F (SEQ ID NO 18) y CytB-76-R (SEQ ID NO 19). La secuencia consenso que contiene el SNP2 (SEQ ID NO 2) se amplifica con los cebadores CytB-54-F (SEQ ID NO 20) y CytB-54-R (SEQ ID NO 21).

El SNP3 está localizado en la secuencia del gen "Citocromo C" (*Cytochrome C*, *CytC*), el cual se amplificó mediante cebadores consenso degenerados obtenidos por el equipo de Cancio y colaboradores (UPV/EHU) comparando todas las secuencias publicadas de este gen de distintas especies de teleósteos. La secuencia consenso denominada CytC (SEQ ID NO 3) se amplifica con los cebadores CytC-F (SEQ ID NO 22) y CytC-R (SEQ ID NO 23).

El SNP4 está localizado en la secuencia del gen "Factor de Maduración de Oocitos" (*Maturation Oocyte Factor*, MOS), el cual se encontró tras secuenciar un fragmento de este gen mediante cebadores diseñados a partir de la secuencia del NCBI DQ874861.1 de *Thunnus albacares*. Dicho fragmento, denominado C-MOS (SEQ ID NO 4), se amplifica mediante el uso de los cebadores C-MOS-F (SEQ ID NO 24) y C-MOS-R (SEQ ID NO 25).

El SNP5 está localizado en la secuencia del gen "Factor Inducible por Hipoxia 1 $\alpha$ " (*Hypoxia Inducible Factor 1 alpha*, HIF-1 $\alpha$ ) (exón 4, intrón 4, exón 5) amplificada usando los cebadores diseñados a partir de la secuencia del NCBI EU300942.1 que codifica el HIF-1 $\alpha$  de *Thunnus orientalis*. La secuencia amplificada denominada HIF-4 (SEQ ID NO 05) se amplifica mediante el uso de los cebadores HIF-4-F (SEQ ID NO 26) e HIF-4-R (SEQ ID NO 27).

El SNP6 está localizado en la secuencia intrónica del gen "Polipéptido Interno de Fibrinógeno Gamma" (*Internal Fibrinogen Gamma Polypeptide*), el cual se encontró tras secuenciar un fragmento de este gen mediante cebadores diseñados al alinear las siguientes secuencias del NCBI CA352559 y BX510913.9 de distintas especies de *Tunnus*. La secuencia consenso denominada INTFGP (SEQ ID NO 06) se amplifica mediante el uso de los cebadores INTFGP-F (SEQ ID NO 28) e INTFGP-R (SEQ ID NO 29).

El SNP7 localizado en la secuencia del gen "Mioglobina Interna" (*Internal Myoglobin*), se encontró tras secuenciar un fragmento de este gen mediante cebadores diseñados al alinear las siguientes secuencias del NCBI de *Tunnus*: AF291832 de *T. alalunga*, AF291838 de *T. albacares*, AB104433.1 de *T. obesus*, AF291836.1 de *T. thynnus orientalis*. La secuencia consenso denominada INTMYO (SEQ ID NO 07) se amplifica mediante el uso de los cebadores INTMYO-F (SEQ ID NO 30) y INTMYO-R (SEQ ID NO 31).

Los SNP8 y SNP16 están localizados en la secuencia del gen de la "Proteína ribosomal L12", el cual se amplificó mediante cebadores consenso degenerados obtenidos por el equipo de Cancio y colaboradores

(UPV/EHU) comparando todas las secuencias publicadas de este gen de distintas especies de teleósteos. La secuencia consenso denominada L12 (SEQ ID NO 08) se amplifica mediante el uso de los cebadores L12-F (SEQ ID NO 32) y L12-R (SEQ ID NO 33).

5 El SNP9 localizado en la secuencia del intrón 25a del gen "Leucemia Mieloide Linfoide" (*Myeloid/Lymphoid* o *Mixed Lineage Leukemia*) se encontró tras secuenciar este fragmento empleando los cebadores diseñados y publicados por Venkatesh *et al.* (1999) a partir de la secuencia del NCBI AF137262 de *Balistes sp.*. La secuencia consenso denominada MII25a (SEQ ID NO 09) se amplifica con los cebadores MII25a-F (SEQ ID NO 34) y MII25a-R (SEQ ID NO 35).

10 El SNP10 localizado en la secuencia del gen "*Metal Transcription Factor*" se amplificó mediante cebadores consenso degenerados obtenidos por el equipo de Cancio y colaboradores (UPV/EHU) comparando todas las secuencias publicadas de este gen de distintas especies de teleósteos. La secuencia consenso denominada MTF (SEQ ID NO 10) se amplifica mediante el uso de los cebadores MTF-F (SEQ ID NO 36) y MTF-R (SEQ ID NO 37).

15 El SNP11 localizado en la secuencia 3'-UTR del gen homólogo de MYC se encontró tras secuenciar un fragmento de este gen mediante cebadores diseñados a partir de la secuencia del NCBI S79770 de *Onchorhynchus mykiss*. La secuencia amplificada denominada MYCA (SEQ ID NO 11) se amplifica con los cebadores MYCA-F (SEQ ID NO 38) y MYCA-R (SEQ ID NO 39) publicados por Panno y McKeown (1995).

20 El SNP12 localizado en la secuencia del gen "*Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase*" se encontró tras secuenciar un fragmento de este gen mediante cebadores diseñados a partir de la secuencia del NCBI EF452498.3 de *Thunnus maccoyii*. La secuencia consenso se denominada PHGP (SEQ ID NO 12) y se amplifica con los cebadores PHGP-F (SEQ ID NO 40) y PHGP-R (SEQ ID NO 41).

25 El SNP13 está localizado en la secuencia del gen de la "Subunidad N3 del Proteosoma" (*Proteosome Subunit N3*) el cual se amplificó mediante cebadores consenso degenerados obtenidos por el equipo de Cancio y colaboradores (UPV/EHU) comparando todas las secuencias publicadas de este gen de distintas especies de teleósteos. La secuencia consenso denominada PSN-3 (SEQ ID NO 13) se amplifica mediante el uso de los cebadores PSN-3-F (SEQ ID NO 42) y PSN-3-R (SEQ ID NO 43).

30 El SNP14 localizado en la secuencia del gen de la Rodopsina se encontró tras secuenciar un fragmento de este gen mediante cebadores diseñados al alinear las siguientes secuencias del NCBI AF148142.1 de *Chanos chanos*, AF148143 de *Psettodes sp.*, AF148144 de *Lates calcarifer*. La secuencia consenso denominada RHOD (SEQ ID NO 14) se amplifica con los cebadores publicados por Venkatesh *et al.* (1999) y que aquí se denominan RHOD-F (SEQ ID NO 44) y RHOD-R (SEQ ID NO 45).

35 El SNP15 está localizado en la secuencia del gen "Ciclooxigenasa 2", el cual se amplificó mediante cebadores consenso degenerados obtenidos por el equipo de Cancio y colaboradores (UPV/EHU) comparando todas las secuencias publicadas de este gen de distintas especies de teleósteos. La secuencia consenso denominada CY1 (SEQ ID NO 15) se amplifica mediante el uso de los cebadores CY1-F (SEQ ID NO 46) y CY1-R (SEQ ID NO 47).

40 El SNP17 está localizado en la secuencia del gen "Matriz Metaloproteína 9", el cual se amplificó mediante cebadores consenso degenerados obtenidos por el equipo de Cancio y colaboradores (UPV/EHU) comparando todas las secuencias publicadas de este gen de distintas especies de teleósteos. La secuencia consenso denominada MM-9 (SEQ ID NO 16) se amplifica mediante el uso de los cebadores MM-9-F (SEQ ID NO 48) y MM-9-R (SEQ ID NO 49).

45 El SNP18 localizado en la secuencia del gen de la "*Titin-like Protein*" se encontró tras secuenciar un fragmento de este gen mediante cebadores diseñados a partir de la secuencia del NCBI DQ388108.1 de *Thunnus alalunga*. La secuencia consenso denominada TM04c4 (SEQ ID NO 17) se amplifica mediante el uso de los cebadores TM04c4-F (SEQ ID NO 50) y TM04c4-R (SEQ ID NO 51).

**TABLA 1.-** Descripción de los 18 marcadores genéticos de la invención.

<b>A nivel de especie <i>Thunnus</i> (2 SNP, etapa b))</b>					
<b>Gen Polin</b>	<b>ucleótido con SNP</b>	<b>SNP</b>			<b><i>Thunnus alalunga</i></b>
		<b>Nº b</b>	<b>ase</b>	<b>Posición</b>	
CytB-76	SEQ ID NO 1	1	C/A	36	C
CytB-54	SEQ ID NO 2	2	G/A	36	G

<b>A nivel de población <i>Thunnus alalunga</i> (12 SNP; fase i), etapa c)</b>					
Gen Polin	ucleótido con SNP	SNP Población			<b>Mediterráneo vs Atlántico/ Índico/Pacífico</b>
		Nº b	ase	Posición	
CytC	SEQ ID NO 3	3	[C/T]	33	
C-MOS	SEQ ID NO 4	4	[C/G]	278	
HIF-4	SEQ ID NO 5	5	[C/T]	206	
INTFGP	SEQ ID NO 6	6	[C/T]	242	
INTMYO	SEQ ID NO 7	7	[C/T]	289	
L12	SEQ ID NO 8	8	[G/T]	178	
MII25a	SEQ ID NO 9	9	[A/T]	144	
MTF	SEQ ID NO 10	10	[A/C]	263	
MYCA	SEQ ID NO 11	11	[A/G]	91	
PHGP	SEQ ID NO 12	12	[A/T]	528	
PSN-3	SEQ ID NO 13	13	[A/C]	138	
Rhod	SEQ ID NO 14	14	[G/T]	111	
<b>A nivel de población <i>Thunnus alalunga</i> (11 SNP, fase iii), etapa c)</b>					
Gen Polin	ucleótido con SNP	SNP Población			<b>Atlántico vs Índico/Pacífico</b>
		Nº b	ase	Posición	
C-MOS	SEQ ID NO 4	4	[C/G]	278	
INTFGP	SEQ ID NO 6	6	[C/T]	242	
INTMYO	SEQ ID NO 7	7	[C/T]	289	
MTF	SEQ ID NO 10	10	[A/C]	263	
PHGP	SEQ ID NO 12	12	[A/T]	528	
PSN-3	SEQ ID NO 13	13	[A/C]	138	
Rhod	SEQ ID NO 14	14	[G/T]	111	
CY1	SEQ ID NO 15	15	[A/G]	96	
L12	SEQ ID NO 8	16	[A/G]	388	
MM-9	SEQ ID NO 16	17	[C/T]	385	
TM04c4	SEQ ID NO 17	18	[A/G]	188	

Otro aspecto de la invención consiste en el uso de las secuencias SEQ ID NO 01 a SEQ ID NO 17 que comprenden los SNP: SNP1 a SNP18, como marcadores para identificar la especie *Thunnus alalunga* y su origen geográfico o población.

5 Asimismo, la invención consiste en un método de identificación genética del origen geográfico y poblaciones del atún blanco (*Thunnus alalunga*) que comprende:

- a) Extracción del ADN de la muestra de un producto derivado de atún,
- b) Identificación de la especie *Thunnus alalunga* frente al resto de especies de atún pertenecientes al género *Thunnus* que comprende la amplificación y genotipado del SNP1 (SEQ ID NO 01) y del SNP2 (SEQ ID NO 02), donde la presencia en las posiciones 303 y 1023 del gen mitocondrial citocromo b de una C y una G, respectivamente, es indicativa de la especie *Thunnus alalunga*,
- 10 c) Identificación del origen geográfico o poblaciones del atún blanco (*T. alalunga*) que comprende:
  - i. amplificación y genotipado de los siguientes 12 SNP: SNP3 a SNP14, comprendidos en las secuencias SEQ ID NO 3 a SEQ ID NO 14
  - 15 ii. análisis de los resultados obtenidos en la fase i) y asignación del genotipo problema a una población de referencia: Mediterráneo o Atlántico /Índico/Pacífico
  - iii. amplificación y genotipado de los siguientes 11 SNP: SNP4, SNP6, SNP7, SNP10 y SNP12 a SNP18
  - iv. análisis de los resultados obtenidos en la fase iii) y asignación de la muestra problema a una población de referencia: Atlántico o Índico/Pacífico.

20 La etapa a) del método de la invención comprende la extracción del ADN de la muestra a analizar. Dicha muestra de ADN se puede obtener de pescado fresco, congelado, salazones, semiconservas, procesado o de una mezcla de los mismos. Cualquier método de extracción comúnmente utilizado por un experto medio en la materia es apropiado en el contexto de la presente invención, como por ejemplo los kits comerciales *Wizard DNA Clean Up* (Promega), *Nucleospin* (Clontech), *GenomicPrep* (Amersham Pharmacia Biotech) tal y como se describe en Chapela *et al.* (2007).

25 El ADN extraído debe estar en cantidad y calidad suficientes para el análisis. Los métodos para calcular la cantidad y la calidad del ADN extraído son conocidos por el experto en la materia. Así, la cantidad y calidad del ADN de las muestras se puede calcular, por ejemplo, utilizando el ratio absorbancia a 260nm/absorbancia a 280nm (A260/A280) (Chapela *et al.* 2007).

30 La etapa b) del método de la invención comprende la identificación de la especie *T. alalunga* frente a otras especies de atún pertenecientes al género *Thunnus*. Para ello, se examinan dos marcadores genéticos del tipo SNP situados en las posiciones 303 y 1023 del gen mitocondrial citocromo b; SNP1 y SNP2, respectivamente. La amplificación y detección de los SNP1 por diferentes metodologías, permite la identificación de la especie *T. alalunga* de otras especies de atún pertenecientes al género *Thunnus*, como por ejemplo, *T. albacares* y *T. obesus* entre otros. La presencia del genotipo C en la posición 303 del gen mitocondrial citocromo b (posición 36 en la SEQ ID NO 1) y G en la posición 1023 del gen mitocondrial citocromo b (posición 36 en la SEQ ID NO 2) es indicativa de la especie *T. alalunga*. Una vez identificada la especie *T. alalunga* se realiza la etapa c) del método de la invención para identificar el origen geográfico o población del atún blanco. En caso de que la muestra problema no sea identificada como *T. alalunga*, no se llevará a cabo la etapa c) del método de la invención y se concluirá que la muestra problema no se corresponde con *Thunnus alalunga*.

En una realización particular de la etapa b) del método de la invención la amplificación del fragmento que contiene el SNP1 se lleva a cabo con los cebadores SNP1-F (SEQ ID NO 18) y SNP1-R (SEQ ID NO 19). Asimismo, en otra realización particular, la amplificación del fragmento que contiene el SNP2 se lleva a cabo con los cebadores SNP2-F (SEQ ID NO 20) y SNP2-R (SEQ ID NO 21).

45 En otra realización particular de la etapa b) del método de la invención, el genotipado del SNP1 incluye el uso de las sondas SNP1-FAM (SEQ ID NO 84) y SNP1-VIC (SEQ ID NO 85).

La etapa c) del método de la invención comprende examinar, en dos fases distintas, un total de 16 marcadores genéticos del tipo SNP situados en diferentes posiciones del genoma (TABLA 1).

50 La amplificación y genotipado por diferentes metodologías, comúnmente utilizadas por el experto en la materia (entre otras, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la PCR a tiempo real mediante sondas Taqman específicas de alelo o la tecnología *Taqman® OpenArray®*) de los 16 marcadores genéticos SNP3 a SNP18 mencionados, permiten identificar el origen geográfico o poblaciones del atún blanco.

En la fase i) de la etapa c) del método de la invención se amplifican y genotipan los siguientes 12 SNP: SNP3 a SNP14, comprendidos en las secuencias SEQ ID NO 3 a SEQ ID NO 14, respectivamente (TABLA 1).

5 En una realización particular de la fase i) de la etapa c) del método de la invención, el genotipado de los SNP3 a SNP14 se lleva a cabo con los siguientes cebadores: SNP3 con los cebadores SNP3-F (SEQ ID NO 52) y SNP3-R (SEQ ID NO 53); SNP4 con los cebadores SNP4-F (SEQ ID NO 54) y SNP4-R (SEQ ID NO 55); SNP5 con los cebadores SNP5-F (SEQ ID NO 56) y SNP5-R (SEQ ID NO 57); SNP6 con los cebadores SNP6-F (SEQ ID NO 58) y SNP6-R (SEQ ID NO 59); SNP7 con los cebadores SNP7-F (SEQ ID NO 60) y SNP7-R (SEQ ID NO 61); SNP8 con los cebadores SNP8-F (SEQ ID NO 62) y SNP8-R (SEQ ID NO 63); SNP9 con los cebadores SNP9-F (SEQ ID NO 66) y SNP9-R (SEQ ID NO 67); SNP10 con los cebadores SNP10-F (SEQ ID NO 68) y SNP10-R (SEQ ID NO 69);  
10 SNP11 con los cebadores SNP11-F (SEQ ID NO 70) y SNP11-R (SEQ ID NO 71); SNP12 con los cebadores SNP12-F (SEQ ID NO 72) y SNP12-R (SEQ ID NO 73); SNP13 con los cebadores SNP13-F (SEQ ID NO 74) y SNP13-R (SEQ ID NO 75); SNP14 con los cebadores SNP14-F (SEQ ID NO 76) y SNP14-R (SEQ ID NO 77).

15 En otra realización particular de la fase i) de la etapa c) del método de la invención, el genotipado de los SNP3 a SNP14 se lleva a cabo con las siguientes sondas: SNP3 con las sondas SNP3-FAM (SEQ ID NO 86) y SNP3-VIC (SEQ ID NO 87); SNP4 con las sondas SNP4-FAM (SEQ ID NO 88) y SNP4-VIC (SEQ ID NO 89); SNP5 con las sondas SNP5-FAM (SEQ ID NO 90) y SNP5-VIC (SEQ ID NO 91); SNP6 con las sondas SNP6-FAM (SEQ ID NO 92) y SNP6-VIC (SEQ ID NO 93); SNP7 con las sondas SNP7-FAM (SEQ ID NO 94) y SNP7-VIC (SEQ ID NO 95); SNP8 con las sondas SNP8-FAM (SEQ ID NO 96) y SNP8-VIC (SEQ ID NO 97); SNP9 con las sondas SNP9-FAM (SEQ ID NO 98) y SNP9-VIC (SEQ ID NO 99); SNP10 con las sondas SNP10-FAM (SEQ ID NO 100) y SNP10-VIC (SEQ ID NO 101); SNP11 con las sondas SNP11-FAM (SEQ ID NO 102) y SNP11-VIC (SEQ ID NO 103); SNP12 con las sondas SNP12-FAM (SEQ ID NO 104) y SNP12-VIC (SEQ ID NO 105); SNP13 con las sondas SNP13-FAM (SEQ ID NO 106) y SNP13-VIC (SEQ ID NO 107); SNP14 con las sondas SNP14-FAM (SEQ ID NO 108) y SNP14-VIC (SEQ ID NO 109).

25 En otra realización de la fase i) de la etapa c) el genotipado de los SNP3 a SNP14 se lleva a cabo con los siguientes cebadores y sondas: para el SNP3 los cebadores SNP3-F (SEQ ID NO 52) y SNP3-R (SEQ ID NO 53) y las sondas SNP3-FAM (SEQ ID NO 86) y SNP3-VIC (SEQ ID NO 87); para el SNP4 los cebadores SNP4-F (SEQ ID NO 54) y SNP4-R (SEQ ID NO 55) y las sondas SNP4-FAM (SEQ ID NO 88) y SNP4-VIC (SEQ ID NO 89); para el SNP5 los cebadores SNP5-F (SEQ ID NO 57) y SNP5-R (SEQ ID NO 58) y las sondas SNP5-FAM (SEQ ID NO 90) y SNP5-VIC (SEQ ID NO 91); para el SNP6 los cebadores SNP6-F (SEQ ID NO 58) y SNP6-R (SEQ ID NO 59) y las sondas SNP6-FAM (SEQ ID NO 92) y SNP6-VIC (SEQ ID NO 93); para el SNP7 los cebadores SNP7-F (SEQ ID NO 60) y SNP7-R (SEQ ID NO 61) y las sondas SNP7-FAM (SEQ ID NO 94) y SNP7-VIC (SEQ ID NO 95); para el SNP8 los cebadores SNP8-F (SEQ ID NO 62) y SNP8-R (SEQ ID NO 63) y las sondas SNP8-FAM (SEQ ID NO 96) y SNP8-VIC (SEQ ID NO 97); para el SNP9 los cebadores SNP9-F (SEQ ID NO 66) y SNP9-R (SEQ ID NO 67) y las sondas SNP9-FAM (SEQ ID NO 98) y SNP9-VIC (SEQ ID NO 99); para el SNP10 los cebadores SNP10-F (SEQ ID NO 68) y SNP10-R (SEQ ID NO 69) y las sondas SNP10-FAM (SEQ ID NO 100) y SNP10-VIC (SEQ ID NO 101); para el SNP11 los cebadores SNP11-F (SEQ ID NO 70) y SNP11-R (SEQ ID NO 71) y las sondas SNP11-FAM (SEQ ID NO 102) y SNP11-VIC (SEQ ID NO 103); para el SNP12 los cebadores SNP12-F (SEQ ID NO 72) y SNP12-R (SEQ ID NO 73) y las sondas SNP12-FAM (SEQ ID NO 104) y SNP12-VIC (SEQ ID NO 105); para el SNP13 los cebadores SNP13-F (SEQ ID NO 74) y SNP13-R (SEQ ID NO 75) y las sondas SNP13-FAM (SEQ ID NO 106) y SNP13-VIC (SEQ ID NO 107); para el SNP14 los cebadores SNP14-F (SEQ ID NO 76) y SNP14-R (SEQ ID NO 77) y las sondas SNP14-FAM (SEQ ID NO 108) y SNP14-VIC (SEQ ID NO 109).

En la siguiente fase del método de la invención, fase ii) de la etapa c), se lleva a cabo el análisis de los resultados obtenidos en la fase i), mediante programas informáticos de asignación de individuos a una población.

45 Cualquier algoritmo implementado en un programa informático de análisis poblacional puede ser utilizado para analizar los resultados de genotipado del panel de marcadores incluidos en la invención (fases de análisis ii) y iv) de la etapa c) del método de la invención), así como los programas informáticos de asignación que implementan estos algoritmos. Los métodos más usados en asignación son los basados en frecuencias, métodos Bayesianos, Distancias y *Clustering* (Hauser *et al.*, 2006). Los siguientes programas son un ejemplo y por lo tanto no excluyen otros programas actuales o que pudieran aparecer en el futuro: WHICHRUN 3.2, GENECLASS 1.0.02, ASSIGNMENT CALCULATOR, G-STAR, ARLEQUIN2.00, IMMANC, STRUCTURE, GMA, BAYES y BAPS (Banks y Eichert, 2000; Cornuet *et al.*, 1996; Paetkau *et al.*, 1995; Siefismund, 1995; Schneider *et al.*, 2000; Rannala y Mountain, 1997; Pritchard *et al.*, 2000; Bernatchez y Duchesne, 2000; Kalinowski, 2003; Pella y Masuda, 2001; Corander *et al.*, 2003).

55 En el caso de la presente invención, el procedimiento a seguir para la obtención de porcentajes de asignación correcta de individuos a su población de origen se basa en la comparación entre dos tipos de paneles: "panel de referencia" y "panel de asignación". En el "panel de referencia" se incluyen individuos tomados al azar que pertenecen a las diversas poblaciones estudiadas: Mediterráneo, Atlántico, Pacífico o Índico. Los paneles de referencia incluyen de 50-100 individuos en cada uno de los grupos, siendo importante que estén equilibrados, es decir, que tengan el mismo número de individuos, donde el número mínimo de individuos lo marca aquella población que tenga el número más bajo de individuos en cada caso particular.



Los individuos del “panel de asignación” (individuos problema) son cotejados, en base a su genotipo, con los individuos del “panel de referencia”. Dependiendo de la etapa del método de la invención que se esté llevando a cabo, en el “panel de referencia” se incluyen unas poblaciones u otras.

5 Con objeto de minimizar el error a la hora de asignar un origen a un individuo problema, se determina un *score* umbral de probabilidad de asignación (*score* umbral, de aquí en adelante). Dicho *score* umbral se define como el valor mínimo que debe alcanzar el *score* de probabilidad de asignación para que el programa de asignación considere una muestra como asignada a alguna de las poblaciones de referencia. Asimismo, se define el *score* de probabilidad de asignación (*score*, de aquí en adelante) como la probabilidad de pertenencia a cada una de las poblaciones de referencia calculada a partir del resultado de los SNP analizados. El resultado obtenido del análisis para cada individuo problema consiste en un *score* de asignación (o probabilidad de pertenencia), para cada grupo poblacional incluido en el “panel de referencia”, siendo la suma de todos ellos 100%. Por último, destacar que si la probabilidad de pertenencia a la población es inferior al umbral (*score* inferior al *score* umbral), la muestra se considerará como no asignada.

15 Se define por “asignación incorrecta” el hecho de que perteneciendo un individuo problema a una población de referencia se haya clasificado incorrectamente como perteneciente a otra población. A mayor *score* umbral, en general, menor error de asignación incorrecta, pero también menor porcentaje de individuos asignados, ya que los individuos que no superen el valor de *score* umbral no serán asignados a ninguna de las poblaciones de referencia. De esta manera, el *score* umbral puede ser distinto dependiendo del error de asignación incorrecta que se quiera asumir, así como de la proporción de individuos que se quiera asignar. Tras la realización de distintos análisis, se han elegido una serie de *scores* umbrales para cada una de las fases de análisis (fases ii) y iv)) de la etapa c) del método de la invención), tratando de elegir los óptimos en cuanto a asignación correcta y número de individuos asignados.

25 En la fase ii) de la etapa c) del método de la invención, el “panel de referencia” consta de la población Mediterráneo versus la población Atlántico/Índico/Pacífico. Cuando se opta por un *score* umbral de fiabilidad mayor o igual a 50%, es posible asignar la muestra problema pescada en el Mediterráneo a su población correspondiente en un 83,1% de los casos o una muestra capturada en una zona distinta del Mediterráneo con un porcentaje de asignación del 87,0%. Cuando se incrementa el *score* umbral de fiabilidad al 90%, es posible asignar la muestra problema pescada en el Mediterráneo a su población correspondiente en un 95,8% de los casos, o una muestra capturada en una zona distinta del Mediterráneo con un porcentaje de asignación del 94,6%. El aumento del *score* umbral de fiabilidad implica una disminución en la cantidad de individuos asignados a algún grupo. En el caso de *score* umbral de fiabilidad mayor o igual a 90%, es posible clasificar el 50,9% de los individuos en algún grupo (correcta o incorrectamente según los porcentajes descritos más arriba), mientras que el otro 49,1% de los individuos quedan sin asignar a ningún grupo.

35 Cuando el genotipo problema se asigna a la población del Atlántico/Índico/Pacífico se lleva a cabo la siguiente fase iii) del método de la invención. En caso contrario, se concluye que el genotipo problema pertenece a la población Mediterráneo y no se realiza la siguiente fase.

40 La fase iii) de la etapa c) del método de la invención se realiza a aquellos individuos problema que hayan sido identificados en la fase ii) dentro de la población Atlántico/Índico/Pacífico. En esta fase iii) se amplifican y genotipan los siguientes 11 SNP: SNP4, SNP6, SNP7, SNP10 y SNP12 a SNP18, comprendidos en las SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 12 a SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 16 y SEQ ID NO 17, respectivamente, tal y como se indica en la TABLA 1.

45 En una realización particular de la fase iii) de la etapa c) del método de la invención, la amplificación de los SNP4, SNP6, SNP7, SNP10 y SNP12 a SNP18 se lleva a cabo con los cebadores: SNP4-F (SEQ ID NO 54) y SNP4-R (SEQ ID NO 55) para el SNP4; SNP6-F (SEQ ID NO 58) y SNP6-R (SEQ ID NO 59) para el SNP6; SNP7-F (SEQ ID NO 60) y SNP7-R (SEQ ID NO 61) para el SNP7; SNP10-F (SEQ ID NO 68) y SNP10-R (SEQ ID NO 69) para el SNP10; SNP12-F (SEQ ID NO 72) y SNP12-R (SEQ ID NO 73) para el SNP12; SNP13-F (SEQ ID NO 74) y SNP13-R (SEQ ID NO 75) para el SNP13; SNP14-F (SEQ ID NO 76) y SNP14-R (SEQ ID NO 77) para el SNP14; SNP15-F (SEQ ID NO 78) y SNP15-R (SEQ ID NO 79) para el SNP15; SNP16-F (SEQ ID NO 64) y SNP16-R (SEQ ID NO 65) para el SNP16; SNP17-F (SEQ ID NO 80) y SNP17-R (SEQ ID NO 81) para el SNP17; SNP18-F (SEQ ID NO 82) y SNP18-R (SEQ ID NO 83) para el SNP18.

55 En otra realización particular de la fase iii) de la etapa c) del método de la invención, el genotipado de los SNP4, SNP6, SNP7, SNP10 y SNP12 a SNP18 se lleva a cabo con las siguientes sondas: SNP4 con las sondas SNP4-FAM (SEQ ID NO 88) y SNP4-VIC (SEQ ID NO 89); SNP6 con las sondas SNP6-FAM (SEQ ID NO 92) y SNP6-VIC (SEQ ID NO 93); SNP7 con las sondas SNP7-FAM (SEQ ID NO 94) y SNP7-VIC (SEQ ID NO 95); SNP10 con las sondas SNP10-FAM (SEQ ID NO 100) y SNP10-VIC (SEQ ID NO 101); SNP12 con las sondas SNP12-FAM (SEQ ID NO 104) y SNP12-VIC (SEQ ID NO 105); SNP13 con las sondas SNP13-FAM (SEQ ID NO 106) y SNP13-VIC (SEQ ID NO 107); SNP14 con las sondas SNP14-FAM (SEQ ID NO 108) y SNP14-VIC (SEQ ID NO 109); SNP15 con las sondas SNP15-FAM (SEQ ID NO 110) y SNP15-VIC (SEQ ID NO 111); SNP16 con las sondas SNP16-FAM

(SEQ ID NO 112 ) y SNP16-VIC (SEQ ID NO 113); SNP17 con las sondas SNP17-FAM (SEQ ID NO 114) y SNP17-VIC (SEQ ID NO 115); SNP18 con las sondas SNP18-FAM (SEQ ID NO 116) y SNP18-VIC (SEQ ID NO 117).

5 En otra realización de la fase iii) de la etapa c) el genotipado de los SNP4, SNP6, SNP7, SNP10 y SNP12 a SNP18 se lleva a cabo con los siguientes cebadores y sondas: para el SNP4 los cebadores SNP4-F (SEQ ID NO 54) y SNP4-R (SEQ ID NO 55) y las sondas SNP4-FAM (SEQ ID NO 88) y SNP4-VIC (SEQ ID NO 89); para el SNP6 los cebadores SNP6-F (SEQ ID NO 58) y SNP6-R (SEQ ID NO 59) y las sondas SNP6-FAM (SEQ ID NO 92) y SNP6-VIC (SEQ ID NO 93); para el SNP7 los cebadores SNP7-F (SEQ ID NO 60) y SNP7-R (SEQ ID NO 61) y las sondas SNP7-FAM (SEQ ID NO 94) y SNP7-VIC (SEQ ID NO 95); para el SNP10 los cebadores SNP10-F (SEQ ID NO 68) y SNP10-R (SEQ ID NO 69) y las sondas SNP10-FAM (SEQ ID NO 100) y SNP10-VIC (SEQ ID NO 101); para el  
10 SNP12 los cebadores SNP12-F (SEQ ID NO 72) y SNP12-R (SEQ ID NO 73) y las sondas SNP12-FAM (SEQ ID NO 104) y SNP12-VIC (SEQ ID NO 105), para el SNP13 los cebadores SNP13-F (SEQ ID NO 74) y SNP13-R (SEQ ID NO 75) y las sondas SNP13-FAM (SEQ ID NO 106) y SNP13-VIC (SEQ ID NO 107); para el SNP14 los cebadores SNP14-F (SEQ ID NO 76) y SNP14-R (SEQ ID NO 77) y las sondas SNP14-FAM (SEQ ID NO 108) y SNP14-VIC (SEQ ID NO 109); para el SNP15 los cebadores SNP15-F (SEQ ID NO 78) y SNP15-R (SEQ ID NO 79) y las sondas  
15 SNP15-FAM (SEQ ID NO 110) y SNP15-VIC (SEQ ID NO 111); para el SNP16 los cebadores SNP16-F (SEQ ID NO 64) y SNP16-R (SEQ ID NO 65) y las sondas SNP16-FAM (SEQ ID NO 112) y SNP16-VIC (SEQ ID NO 113); para el SNP17 los cebadores SNP17-F (SEQ ID NO 80) y SNP17-R (SEQ ID NO 81) y las sondas SNP17-FAM (SEQ ID NO 114) y SNP17-VIC (SEQ ID NO 115); para el SNP18 los cebadores SNP18-F (SEQ ID NO 82) y SNP18-R (SEQ ID NO 83) y las sondas SNP18-FAM (SEQ ID NO 116) y SNP18-VIC (SEQ ID NO 117).

20 En la última fase del análisis, la fase iv) de la etapa c) del método de la invención el objetivo es discriminar el origen de la muestra problema entre el Atlántico y el Índico/Pacífico. Si se escoge un *score* umbral mayor o igual a 50%, es posible asignar la muestra problema pescada en el Atlántico a su población correspondiente en un 71,57% de los casos o una muestra capturada en el Índico o Pacífico con un porcentaje de asignación del 81,13%. Cuando se incrementa el *score* umbral de fiabilidad al 90%, es posible asignar la muestra problema pescada en el Atlántico a su población correspondiente en un 82,83% de los casos, o una muestra capturada en el Índico o Pacífico correctamente en el 94,93% de los casos. El aumento del *score* de fiabilidad implica una disminución en la cantidad de individuos asignados a algún grupo. En el caso de *score* umbral de fiabilidad mayor o igual a 90%, es posible clasificar el 40% de los individuos en algún grupo (correcta o incorrectamente según los porcentajes descritos más arriba), mientras que el otro 60% de los individuos quedan sin asignar a ningún grupo.

30 En una realización preferida del método de la invención, la amplificación y detección de los SNP1 a SNP18 (etapas b) y c)), se lleva a cabo utilizando los cebadores SEQ ID NO 18 a SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 52 a SEQ ID NO 83 y las sondas SEQ ID NO 84 a SEQ ID NO 117, tal y como se indica a continuación y como se especifica en la TABLA 2. Para la amplificación y genotipado del SNP1 se utilizan los cebadores SNP1-F (SEQ ID NO 18) y SNP1-R (SEQ ID NO 19) y las sondas SNP1-FAM (SEQ ID NO 84) y SNP1-VIC (SEQ ID NO 85); para el SNP2 se utilizan los  
35 cebadores SNP2-F (SEQ ID NO 20) y SNP2-R (SEQ ID NO 21); para el SNP3 los cebadores SNP3-F (SEQ ID NO 52) y SNP3-R (SEQ ID NO 53) y las sondas SNP3-FAM (SEQ ID NO 86) y SNP3-VIC (SEQ ID NO 87); para el SNP4 los cebadores SNP4-F (SEQ ID NO 54) y SNP4-R (SEQ ID NO 55) y las sondas SNP4-FAM (SEQ ID NO 88) y SNP4-VIC (SEQ ID NO 89); para el SNP5 los cebadores SNP5-F (SEQ ID NO 57) y SNP5-R (SEQ ID NO 58) y las sondas SNP5-FAM (SEQ ID NO 90) y SNP5-VIC (SEQ ID NO 91); para el SNP6 los cebadores SNP6-F (SEQ ID NO 58) y SNP6-R (SEQ ID NO 59) y las sondas SNP6-FAM (SEQ ID NO 92) y SNP6-VIC (SEQ ID NO 93); para el  
40 SNP7 los cebadores SNP7-F (SEQ ID NO 60) y SNP7-R (SEQ ID NO 61) y las sondas SNP7-FAM (SEQ ID NO 94) y SNP7-VIC (SEQ ID NO 95); para el SNP8 los cebadores SNP8-F (SEQ ID NO 62) y SNP8-R (SEQ ID NO 63) y las sondas SNP8-FAM (SEQ ID NO 96) y SNP8-VIC (SEQ ID NO 97); para el SNP9 los cebadores SNP9-F (SEQ ID NO 66) y SNP9-R (SEQ ID NO 67) y las sondas SNP9-FAM (SEQ ID NO 98) y SNP9-VIC (SEQ ID NO 99); para el  
45 SNP10 los cebadores SNP10-F (SEQ ID NO 68) y SNP10-R (SEQ ID NO 69) y las sondas SNP10-FAM (SEQ ID NO 100) y SNP10-VIC (SEQ ID NO 101); para el SNP11 los cebadores SNP11-F (SEQ ID NO 70) y SNP11-R (SEQ ID NO 71) y las sondas SNP11-FAM (SEQ ID NO 102) y SNP11-VIC (SEQ ID NO 103); para el SNP12 los cebadores SNP12-F (SEQ ID NO 72) y SNP12-R (SEQ ID NO 73) y las sondas SNP12-FAM (SEQ ID NO 104) y SNP12-VIC (SEQ ID NO 105), para el SNP13 los cebadores SNP13-F (SEQ ID NO 74) y SNP13-R (SEQ ID NO 75) y las sondas  
50 SNP13-FAM (SEQ ID NO 106) y SNP13-VIC (SEQ ID NO 107); para el SNP14 los cebadores SNP14-F (SEQ ID NO 76) y SNP14-R (SEQ ID NO 77) y las sondas SNP14-FAM (SEQ ID NO 108) y SNP14-VIC (SEQ ID NO 109); para el SNP15 los cebadores SNP15-F (SEQ ID NO 78) y SNP15-R (SEQ ID NO 79) y las sondas SNP15-FAM (SEQ ID NO 110) y SNP15-VIC (SEQ ID NO 111); para el SNP16 los cebadores SNP16-F (SEQ ID NO 64) y SNP16-R (SEQ ID NO 65) y las sondas SNP16-FAM (SEQ ID NO 112) y SNP16-VIC (SEQ ID NO 113); para el SNP17 los cebadores  
55 SNP17-F (SEQ ID NO 80) y SNP17-R (SEQ ID NO 81) y las sondas SNP17-FAM (SEQ ID NO 114) y SNP17-VIC (SEQ ID NO 115); para el SNP18 los cebadores SNP18-F (SEQ ID NO 82) y SNP18-R (SEQ ID NO 83) y las sondas SNP18-FAM (SEQ ID NO 116) y SNP18-VIC (SEQ ID NO 117).

**TABLA 2.-** Cebadores y sondas que permiten amplificar y genotipar los marcadores genéticos SNP1 a SNP18. F indica el cebador *forward* y R indica el cebador *reverse*.

ES 2 392 293 A1

<b>SNP Ce</b>	<b>badores</b>	<b>Sondas</b>
1	SNP1-F (SEQ ID NO 18)	SNP1-FAM (SEQ ID NO 84)
	SNP1-R (SEQ ID NO 19)	SNP1-VIC (SEQ ID NO 85)
2	SNP2-F (SEQ ID NO 20)	
	SNP2-R (SEQ ID NO 21)	
3	SNP3-F (SEQ ID NO 52)	SNP3-FAM (SEQ ID NO 86)
	SNP3-R (SEQ ID NO 53)	SNP3-VIC (SEQ ID NO 87)
4	SNP4-F (SEQ ID NO 54)	SNP4-FAM (SEQ ID NO 88)
	SNP4-R (SEQ ID NO 55)	SNP4-VIC (SEQ ID NO 89)
5	SNP5-F (SEQ ID NO 56)	SNP5-FAM (SEQ ID NO 90)
	SNP5-R (SEQ ID NO 57)	SNP5-VIC (SEQ ID NO 91)
6	SNP6-F (SEQ ID NO 58)	SNP6-FAM (SEQ ID NO 92)
	SNP6-R (SEQ ID NO 59)	SNP6-VIC (SEQ ID NO 93)
7	SNP7-F (SEQ ID NO 60)	SNP7-FAM (SEQ ID NO 94)
	SNP7-R (SEQ ID NO 61)	SNP7-VIC (SEQ ID NO 95)
8	SNP8-F (SEQ ID NO 62)	SNP8-FAM (SEQ ID NO 96)
	SNP8-R (SEQ ID NO 63)	SNP8-VIC (SEQ ID NO 97)
9	SNP9-F (SEQ ID NO 66)	SNP9-FAM (SEQ ID NO 98)
	SNP9-R (SEQ ID NO 67)	SNP9-VIC (SEQ ID NO 99)
10	SNP10-F (SEQ ID NO 68)	SNP10-FAM (SEQ ID NO 100)
	SNP10-R (SEQ ID NO 69)	SNP10-VIC (SEQ ID NO 101)
11	SNP11-F (SEQ ID NO 70)	SNP11-FAM (SEQ ID NO 102)
	SNP11-R (SEQ ID NO 71)	SNP11-VIC (SEQ ID NO 103)
12	SNP12-F (SEQ ID NO 72)	SNP12-FAM (SEQ ID NO 104)
	SNP12-R (SEQ ID NO 73)	SNP12-VIC (SEQ ID NO 105)
13	SNP13-F (SEQ ID NO 74)	SNP13-FAM (SEQ ID NO 106)

	SNP13-R (SEQ ID NO 75)	SNP13-VIC (SEQ ID NO 107)
14	SNP14-F (SEQ ID NO 76)	SNP14-FAM (SEQ ID NO 108)
	SNP14-R (SEQ ID NO 77)	SNP14-VIC (SEQ ID NO 109)
15	SNP15-F (SEQ ID NO 78)	SNP15-FAM (SEQ ID NO 110)
	SNP15-R (SEQ ID NO 79)	SNP15-VIC (SEQ ID NO 111)
16	SNP16-F (SEQ ID NO 64)	SNP16-FAM (SEQ ID NO 112)
	SNP16-R (SEQ ID NO 65)	SNP16-VIC (SEQ ID NO 113)
17	SNP17-F (SEQ ID NO 80)	SNP17-FAM (SEQ ID NO 114)
	SNP17-R (SEQ ID NO 81)	SNP17-VIC (SEQ ID NO 115)
18	SNP18-F (SEQ ID NO 82)	SNP18-FAM (SEQ ID NO 116)
	SNP18-R (SEQ ID NO 83)	SNP18-VIC (SEQ ID NO 117)

El método de la invención se puede llevar a cabo partiendo de muestras de ADN obtenidas de pescado fresco, congelado, salazones, semiconservas, procesado o de una mezcla de los mismos.

- 5 Otro objeto de la presente invención es un kit caracterizado por que comprende los oligonucleótidos SEQ ID NO 18 a SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 24 a SEQ ID NO 31, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 41 y SEQ ID NO 50 a SEQ ID NO 83. Asimismo, es objeto de la presente invención un kit caracterizado por que comprende el set de sondas SEQ ID NO 84 a SEQ ID NO 117. Y un kit que comprende tanto los cebadores SEQ ID NO 18 a SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 24 a SEQ ID NO 31, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 41 y SEQ ID NO 50 a SEQ ID NO 83 como las sondas SEQ ID NO 84 a SEQ ID NO 117.
- 10 Por último, es objeto de la presente invención un kit para llevar a cabo el método de identificación genética del origen geográfico y poblaciones del atún blanco (*Thunnus alalunga*), tal y como se ha descrito anteriormente, caracterizado por que comprende los cebadores SEQ ID NO 18 a SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 24 a SEQ ID NO 31, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 41, SEQ ID NO 50 a SEQ ID NO 83, las sondas SEQ ID NO 84 a SEQ ID NO 117, y/o *microarrays* con dichos cebadores y sondas.
- 15 A continuación se describen una serie de ejemplos que ilustran la presente invención, pero no limitan su alcance en modo alguno.

### **EJEMPLOS**

#### **EJEMPLO 1.- Análisis del origen geográfico de “Bonito del Norte” en conserva.**

- 20 El objetivo de este ejemplo es el de identificar la muestra problema como atún blanco (*Thunnus alalunga*) capturado en el Atlántico, descartando por tanto que la muestra etiquetada como Bonito del Norte haya sido pescada en el Mediterráneo, Pacífico o Índico. Al tratarse de una muestra en conserva, y por lo tanto muy procesada, se requiere una metodología que permita el genotipado a partir de fragmentos de ADN de pequeño tamaño (< 150 pb).

#### **Etapa a) Extracción del ADN de la muestra de tejido**

- 25 En primer lugar se procede a la digestión del tejido para permitir llevar a cabo la extracción de ADN. Para digerir el tejido se toma una muestra de tejido de aproximadamente 0,25 y 0,3 g en un tubo eppendorf de 1,5 ml. Si la muestra presenta varios fragmentos o lomos de pescado se muestrean por duplicado. En ambos casos, si procede, se les elimina el exceso de líquido mediante papel secante. A cada alícuota se le realiza un proceso de extracción de ADN independiente generándose dos réplicas. Al tubo se le añaden:

- 0,45 ml de tampón de extracción [SDS 1% (p/v), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 8,0], suplementado con 50 µl de una solución de tiocianato de guanidinio 5 M.
- 40 µl de una solución de proteinasa k (600 U ml<sup>-1</sup>) (Bioline).

5 La mezcla se incuba a 56°C durante un mínimo de 2 horas. Si el tejido no se ha digerido completamente se puede dejar más tiempo. Tras el tiempo de incubación se elimina el material no digerido mediante centrifugación (Centrífuga refrigerada 5417 C/R, Eppendorf) a 13.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. La centrifugación se repite tantas veces como sea necesario hasta conseguir un sobrenadante limpio de restos orgánicos en suspensión. El sobrenadante resultante se trata con un kit comercial de extracción de ADN (*Wizard-DNA Clean-Up System*, Promega) siguiendo las especificaciones del fabricante, con la finalidad de extraer el ADN. El ADN extraído se eluye en 50 µl de H<sub>2</sub>O MilliQ estéril, se alícuota y se almacena a -20°C hasta su uso posterior.

15 El ADN extraído debe estar en cantidad y calidad suficientes para el análisis. La concentración de ADN de las muestras se calcula mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm. En cuanto a la calidad del ADN, aunque se trate de muestras altamente procesadas en las cuales el ADN está muy degradado, esto no supone un problema ya que los tamaños de los fragmentos que se amplifican en el sistema *Real Time PCR* y *Taqman Open Array* presentan la suficiente longitud (<150 pb) como para encontrarse abundantemente incluso en las muestras más degradadas.

#### Etapa b) Identificación de la especie *Thunnus alalunga* frente a otros atunes del género *Thunnus*

20 La amplificación y genotipado del fragmento específico del gen mitocondrial citocromo b CytB-76 (SEQ ID NO 01), que contiene el marcadores SNP1, se lleva a cabo en un volumen de reacción de 25 µl que contiene 2,25 µl de una solución 300 nM del cebador SNP1-F (SEQ ID NO 18), 2,25 µl de una solución 300 nM del cebador SNP1-R (SEQ ID NO 19), 2,5 µl de una solución 2,50 µM de la sonda SNP1-FAM (SEQ ID NO 84), 2,5 µl de una solución 2,50 µM de la sonda SNP1-VIC (SEQ ID NO 85), 12,5 µl de la solución TaqMan™ Universal Master Mix (con Rox/Applied Biosystems), 40 ng de la solución de ADN extraído de la muestra problema y finalmente agua destilada milliQ estéril para ajustar el volumen final de la reacción a 25 µl. En el *software* del equipo de *Real Time PCR* se emplea el programa denominado "*Absolute amplification*" que consiste en un ciclo inicial a 50°C durante 2 min seguido de 10 min a 95°C, para posteriormente hacer 40 ciclos de 95°C durante 15 s y 60°C durante 1 min. Al finalizar la reacción, se consideran posibles positivos para *Thunnus alalunga* aquellas muestras que tengan un nucleótido C en la posición 303 (SNP1) del gen mitocondrial citocromo b (posición 36 de la SEQ ID NO 1). Esto se debe a que la sonda está diseñada para unirse específicamente a ese genotipo, que es exclusivo de *Thunnus alalunga*. La detección se realiza observando los valores de Ct o la fluorescencia FAM de la sonda TaqMan, concluyéndose que si hay fluorescencia esa muestra puede pertenecer a la especie *Thunnus alalunga*. En caso de resultado positivo se continúa el proceso analizando el SNP2.

35 En el supuesto de que no haya amplificación, la muestra problema se vuelve a analizar dopándola con 40 ng de ADN de la especie *T. alalunga* para evaluar el efecto negativo de inhibidores de la amplificación de PCR (control de inhibición). De este modo, si el resultado del control de inhibición es positivo indica que la muestra, efectivamente no es la especie *Thunnus alalunga* y no es necesario continuar y analizar el SNP2. En caso contrario se repite la extracción de ADN para intentar obtener un ADN de mayor calidad y exento de inhibidores de la reacción de amplificación.

40 Por otro lado, la amplificación y genotipado del fragmento específico del gen mitocondrial citocromo b CytB-54 (SEQ ID NO 2), que contiene el marcadores SNP2, se lleva a cabo en un volumen de reacción de 25 µl que contiene 2,25 µl de una solución 300 nM del cebador SNP2-F (SEQ ID NO 20), 2,25 µl de una solución 300 nM del cebador SNP2-R (SEQ ID NO 21), 12,5 µL de la solución SybrGreen Master Mix, 40 ng de la solución de ADN extraído de la muestra problema y finalmente agua destilada MilliQ estéril para ajustar el volumen final de la reacción a 25 µL. El programa de amplificación en el equipo de PCR a Tiempo Real con el programa "*Absolute amplification*" que consiste en un ciclo inicial a 50°C durante 2 minutos seguido de 10 minutos a 95°C, para posteriormente hacer 25 ciclos de 95°C durante 15 s y 60°C durante 1 minuto. Al finalizar la reacción, se consideran posibles positivos para *Thunnus alalunga* aquellas muestras que tengan un nucleótido G en la posición 1023 (SNP2) del gen mitocondrial citocromo b (posición 36 de la SEQ ID NO 2).

50 Cada una de las muestras es analizada por duplicado. En el análisis se incluye un control negativo duplicado sin ADN y control positivo con ADN de *Thunnus alalunga* previamente secuenciado, también duplicado.

#### Etapa c) Identificación del origen geográfico o poblaciones de *Thunnus alalunga*

55 Una vez asegurado que se trata de *Thunnus alalunga*, se procede al genotipado de los 16 SNPs seleccionados mediante la tecnología de genotipado masivo TaqMan® OpenArray® (Applied Biosystems). Esta tecnología se basa en la detección de genotipos mediante una amplificación inicial por PCR y una detección de fluorescencia a tiempo final mediante sondas Taqman marcadas con fluorocromos VIC y FAM. Los resultados de intensidad de estos dos fluorocromos se analizan mediante las aplicaciones informáticas "Autocaller" y "OpenArray™ SNP Genotyping

Analysis". El genotipado se lleva a cabo en placas de 384 pocillos y se emplea el TaqMan® OpenArray® Genotyping Master Mix y 5ng de ADN problema. En la TABLA 2 se detallan los cebadores y sondas empleados en el análisis.

5 La clasificación de las muestras basada en sus genotipos se realizó mediante el uso del programa informático GENECLASS v2.0 que tiene implementado un método de clasificación de tipo bayesiano atendiendo a los genotipos obtenidos (Rannala y Mountain, 1997). La clasificación requiere del empleo de los paneles de muestras de referencia ya genotipadas para su comparación con la muestra problema. La comparación de genotipos de los individuos problema frente a los de las poblaciones del panel de referencia, permiten obtener un *score* de asignación a cada una de las poblaciones de referencia. En primer lugar se introduce en el programa el panel de genotipos correspondientes a los marcadores SNP3 a SNP14 obtenidos en las muestras de referencia correspondientes a la población Mediterráneo frente al resto (población Atlántico/Índico/Pacífico). Estas muestras se etiquetan como poblaciones de referencia o "*reference populations*". Posteriormente se introduce el panel de genotipos de las muestras problema y se etiquetan como "muestras a asignar" o "*samples to be assigned*". La función clasificatoria del *software*, produce una tabla de resultados de probabilidad de pertenencia de la muestra problema a alguna de las poblaciones de referencia. Cuando se emplea un *score* umbral de asignación igual o superior al 90% puede concluirse si la muestra pertenece o no al grupo de población Mediterráneo, quedando excluidas del grupo de población Atlántico/Índico/Pacífico. Si la muestra ha quedado asignada al grupo de población Atlántico/Índico/Pacífico, es necesario continuar con los análisis, procediendo tal y como se describe a continuación.

20 En la segunda fase de análisis (fase iv) de la etapa c)) se introduce el genotipo correspondiente a los siguientes 11 SNPs: SNP4, SNP6, SNP7, SNP10 y SNP12 a SNP18. En este caso se emplea como paneles de referencia o "*reference populations*" las muestras de la población Atlántico frente a la población Índico/Pacífico, y las muestras problema se introducen como muestras a asignar o "*samples to be assigned*". A continuación se ejecuta la aplicación de clasificación en el programa informático GeneClass para obtener la tabla de resultados de asignación. Si la muestra problema se asigna a la población Atlántico con una puntuación o *score* mayor o igual al 80%, puede concluirse que la muestra pertenece a la población Atlántico. Si la muestra se asigna a la población Índico/Pacífico con una puntuación superior al 80% se concluye que la muestra no pertenece a la población Atlántico. Si la muestra no alcanza el *score* del 80%, queda sin asignar a ninguna población.

## EJEMPLO 2.- Confirmación del origen geográfico de "Bonito del Norte" en una muestra de atún fresco

30 El objetivo de este ejemplo es el de identificar una muestra problema como Bonito del Norte pescado en el Atlántico. Al tratarse de una muestra fresca, y por lo tanto no procesada, se puede utilizar la secuenciación como metodología de genotipado.

### Etapa a) Extracción del ADN de la muestra de tejido

En primer lugar se procede a la digestión del tejido para permitir llevar a cabo la extracción de ADN. Para digerir el tejido se toma una muestra de tejido de aproximadamente 0,25-0,3 g en un tubo eppendorf de 1,5 ml. Al tubo se le añaden:

- 35 • 0,45 ml de tampón de extracción [SDS 1% (p/v), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8,0], suplementado con 50 µl de una solución de tiocianato de guanidinio 5 M.
- 40 µl de una solución de proteinasa k (600 U ml<sup>-1</sup>) (*Bioline*).

40 La mezcla se incuba a 56°C durante al menos 1 h. Si el tejido no se ha digerido completamente se puede dejar más tiempo. Tras el tiempo de incubación se elimina el material no disuelto mediante centrifugación (Centrífuga refrigerada 5417 C/R, Eppendorf) a 13.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. La centrifugación se repite tantas veces como sea necesario hasta conseguir un sobrenadante limpio de restos orgánicos en suspensión. El sobrenadante resultante se trata con un kit comercial de extracción de ADN (*Wizard-DNA Clean-Up*, Promega) siguiendo las especificaciones del fabricante, con la finalidad de aislar el ADN. El ADN se alícuota y almacena en agua estéril a -20°C hasta su uso posterior.

45 El ADN extraído debe estar en cantidad y calidad suficientes para el análisis. La concentración de ADN de las muestras se calcula mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm.

### Etapa b) Identificación de la especie *Thunnus alalunga*

50 Se amplifican dos fragmentos del gen mitocondrial citocromo b de 76 y 54 pares de bases (pb) cada una, denominadas CytB-76 (SEQ ID NO 01) y CytB-54 (SEQ ID NO 02), respectivamente. Los SNP1 y SNP2 se encuentran en las 303 y 1023 del gen mitocondrial citocromo b, respectivamente.

Antes de purificar el producto amplificado se realiza una comprobación de tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Si el tamaño estimado es adecuado, el fragmento se purifica con un kit comercial *GFX-PCR-DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences AB) siguiendo las especificaciones del fabricante, con el

objetivo de eliminar restos de cebadores y enzimas que puedan afectar al proceso de secuenciación. El amplicón se eluye en agua bidestilada estéril.

5 La secuenciación se lleva a cabo directamente sobre el amplicón previamente purificado, en la unidad de secuenciación y genotipado del servicio de genómica (SGIKER) de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) con un *ABI PRISM 3130XL DNA Analyzer* utilizando el kit *ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit version 3.0* (Applied Biosystems). Se envían a la unidad de secuenciación dos tubos con 10 µl del amplicón junto con cada uno de los cebadores a 3.2 µM, con el objeto de poder secuenciar ambas hebras. La secuenciación se lleva a cabo a la temperatura de amplificación de los fragmentos, que es de 50°C.

10 Específicamente se analizan los nucleótidos en las posiciones 303 de fragmento CytB-76 (SEQ ID NO 01) y 1023 del fragmento CytB-54 (SEQ ID NO 02). Si ambos nucleótidos se corresponden con los nucleótidos G y C respectivamente, se concluye que la muestra problema es la especie *Thunnus alalunga* y se continúa con el análisis.

Etapa c) Identificación del origen geográfico o poblaciones de *Thunnus alalunga*

El siguiente paso es identificar la población de la muestra problema previamente identificada como *Thunnus alalunga*.

15 Para ello se amplifican 15 fragmentos del ADN en donde se sitúan los 16 marcadores genéticos del tipo SNP ((fases i) y iii) de la etapa c)) tal y como se detalla a continuación:

La secuencia consenso denominada CytC (SEQ ID NO 3) se amplifica con los cebadores CytC-F (SEQ ID NO 22) y CytC-R (SEQ ID NO 23).

20 El fragmento denominado C-MOS (SEQ ID NO 4), se amplifica mediante el uso de los cebadores C-MOS-F (SEQ ID NO 24) y C-MOS-R (SEQ ID NO 25).

El fragmento HIF-4 (SEQ ID NO 05) se amplifica mediante el uso de los cebadores HIF-4-F (SEQ ID NO 26) e HIF-4-R (SEQ ID NO 27).

El fragmento INTFGP (SEQ ID NO 06) se amplifica mediante el uso de los cebadores INTFGP-F (SEQ ID NO 28) e INTFGP-R (SEQ ID NO 29).

25 El fragmento INTMYO (SEQ ID NO 07) se amplifica mediante el uso de los cebadores INTMYO-F (SEQ ID NO 30) e INTMYO-R (SEQ ID NO 31).

El fragmento L12 (SEQ ID NO 08) se amplifica mediante el uso de los cebadores L12-F (SEQ ID NO 32) y L12-R (SEQ ID NO 33).

30 El fragmento MII25a (SEQ ID NO 09) se amplifica con los cebadores MII25a-F (SEQ ID NO 34) y MII25a-R (SEQ ID NO 35) publicados por Venkatesh *et al.* (1999).

El fragmento MTF (SEQ ID NO 10) se amplifica mediante el uso de los cebadores MTF-F (SEQ ID NO 36) y MTF-R (SEQ ID NO 37).

El fragmento MYCA (SEQ ID NO 11) se amplifica con los cebadores MYCA-F (SEQ ID NO 38) y MYCA-R (SEQ ID NO 39) publicados por Panno y McKeown (1995).

35 El fragmento PHGP (SEQ ID NO 12) y se amplifica con los cebadores PHGP-F (SEQ ID NO 40) y PHGP-R (SEQ ID NO 41).

El fragmento PSN-3 (SEQ ID NO 13) se amplifica mediante el uso de los cebadores PSN-3-F (SEQ ID NO 42) y PSN-3-R (SEQ ID NO 43).

40 El fragmento RHOD (SEQ ID NO 14) se amplifica con los cebadores publicados por Venkatesh *et al.* (1999) y que aquí se denominan RHOD-F (SEQ ID NO 44) y RHOD-R (SEQ ID NO 45).

El fragmento CY1 (SEQ ID NO 15) se amplifica mediante el uso de los cebadores CY1-F (SEQ ID NO 46) y CY1-R (SEQ ID NO 47).

El fragmento MM-9 (SEQ ID NO 16) se amplifica mediante el uso de los cebadores MM-9-F (SEQ ID NO 48) y MM-9-R (SEQ ID NO 49).

45 El fragmento TM04c4 (SEQ ID NO 17) se amplifica mediante el uso de los cebadores TM04c4-F (SEQ ID NO 50) y TM04c4-R (SEQ ID NO 51).

La reacción se lleva a cabo empleando la mezcla descrita a continuación: 2,5 µl 10X AmpliTaq Gold® Buffer II (Applied Biosystems, Foster City, CA), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0,8 mM GeneAmp®

dNTP Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0,7 µM de cada cebador (Thermo Fisher Scientific, Germany), 1,5U AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA) y 40-80ng DNA.

5 La reacción para CytC (SEQ ID NO 3) y para MM-9 (SEQ ID NO 16) consta de los siguientes pasos: un paso de activación inicial de 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos consistentes en desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, anillamiento a 58°C durante 45 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos. Para finalizar se realiza una extensión final de 10 minutos a 72°C.

10 La reacción para C-MOS (SEQ ID NO 4), comienza con un paso de activación de la enzima a 95°C durante 10 minutos, seguido de 20 ciclos consistentes en una desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, un paso de anillamiento en gradiente que comienza a 60°C en el primer ciclo y va disminuyendo a razón de 0,5°C por ciclo, y una extensión de 30 segundos a 72°C. Posteriormente se llevan a cabo otros 20 ciclos con desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, anillamiento a una temperatura fija de 48°C y extensión a 72°C durante 30 segundos. La reacción acaba con una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

15 La reacción para HIF-4 (SEQ ID NO 05) e INTMYO (SEQ ID NO 07) consta de los siguientes pasos: un paso de activación inicial de 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos consistentes en desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, anillamiento a 62°C durante 45 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos. Para finalizar se realiza una extensión final de 10 minutos a 72°C.

20 La reacción para INTFGP (SEQ ID NO 06) consta de los siguientes pasos: un paso de activación inicial de 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos consistentes en desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, anillamiento a 50°C durante 45 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos. Para finalizar se realiza una extensión final de 10 minutos a 72°C.

La reacción para L12 (SEQ ID NO 08) y para CY1 (SEQ ID NO 15) consta de los siguientes pasos un paso de activación inicial de 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos consistentes en desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, anillamiento a 56°C durante 45 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos. Para finalizar se realiza una extensión final de 10 minutos a 72°C.

25 La reacción para MII25a (SEQ ID NO 09), MYCA (SEQ ID NO 11) y para RHOD (SEQ ID NO 14) comienza con un paso de activación del enzima a 95°C durante 10 minutos, seguido de 20 ciclos consistentes en una desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, un paso de anillamiento en gradiente que comienza a 58°C en el primer ciclo y va disminuyendo a razón de 0,5°C por ciclo, y una extensión de 30 segundos a 72°C. Posteriormente se llevan a cabo otros 20 ciclos con desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, anillamiento a una temperatura fija de 46°C y extensión a 72°C durante 30 segundos. La reacción acaba con una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

35 La reacción para MTF (SEQ ID NO 10) consta de los siguientes pasos: un paso de activación inicial de 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos consistentes en desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, anillamiento a 66°C durante 45 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos. Para finalizar se realiza una extensión final de 10 minutos a 72°C.

40 La reacción para PHGP (SEQ ID NO 12) comienza con un paso de activación del enzima a 95°C durante 10 minutos, seguido de 20 ciclos consistentes en una desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, un paso de anillamiento en gradiente que comienza a 64°C en el primer ciclo y va disminuyendo a razón de 0,5°C por ciclo, y una extensión de 30 segundos a 72°C. Posteriormente se llevan a cabo otros 20 ciclos con desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, anillamiento a una temperatura fija de 52°C y extensión a 72°C durante 30 segundos. La reacción acaba con una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

45 La reacción para PSN-3 (SEQ ID NO 13) y para TM04c4 (SEQ ID NO 17) consta de los siguientes pasos: un paso de activación inicial de 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos consistentes en desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, anillamiento a 60°C durante 45 segundos, extensión a 72°C durante 2 minutos. Para finalizar se realiza una extensión final de 10 minutos a 72°C.

50 La comprobación del tamaño de los fragmentos amplificados se realiza mediante electroforesis en gel de agarosa. Una vez comprobado su tamaño se procede a purificarlos con un kit comercial *GFX-PCR-DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences AB) siguiendo las especificaciones del fabricante, con el objetivo de eliminar restos de cebadores y enzimas que puedan afectar al proceso de secuenciación. El amplicón se eluye en agua bidestilada estéril y la secuenciación se lleva a cabo directamente sobre el amplicón previamente purificado, en la unidad de secuenciación y genotipado del servicio de genómica (SGIKER) de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) con un ABI PRISM 3130XL DNA Analyzer utilizando el kit ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit version 3.0 (Applied Biosystems). Se envían a la unidad de secuenciación dos tubos con 10 µl del amplicón junto con cada uno de los cebadores a 3,2 µM con el objeto de poder secuenciar ambas hebras. La secuenciación se lleva a cabo a la temperatura de *annealing* especificada para cada pareja de

55



cebadores. En cada una de las secuencias obtenidas se interrogan los nucleótidos correspondientes a los 16 SNP de la invención: SNP3-SNP18.

- 5 La clasificación de las muestras basada en sus genotipos se realizó mediante el uso del programa informático GENECLASS v2.0 que tiene implementado un método de clasificación de tipo bayesiano atendiendo a los genotipos obtenidos (Rannala y Mountain, 1997). Se introduce en el programa el panel de genotipos correspondientes a los marcadores SNP3 a SNP14 obtenidos en las muestras de referencia correspondientes a la población Mediterráneo frente al resto (población Atlántico/Índico/Pacífico). Estas muestras se etiquetan como poblaciones de referencia o "reference populations". Posteriormente se introduce el panel de genotipos de las muestras problema y se etiquetan como "muestras a asignar" o "samples to be assigned". La función clasificatoria del software, produce una tabla de resultados de probabilidad de pertenencia de la muestra problema a alguna de las poblaciones de referencia. Cuando se emplea un score umbral de asignación igual o superior al 90% pueden concluirse si la muestra pertenece o no al grupo de población Mediterráneo, quedando excluidas del grupo de población Atlántico/Índico/Pacífico. Si la muestra ha quedado asignada al grupo de población Atlántico/Índico/Pacífico, es necesario continuar con los análisis, procediendo tal y como se describe a continuación.
- 10
- 15 En la segunda fase de análisis (fase iv) de la etapa c)) se introduce el genotipo correspondiente a los siguientes 11 SNPs: SNP4, SNP6, SNP7, SNP10 y SNP12 a SNP18. En este caso se emplea como paneles de referencia o "reference populations" las muestras de la población Atlántico frente a la población Índico/Pacífico, y las muestras problema se introducen como muestras a asignar o "samples to be assigned". A continuación se ejecuta la aplicación de clasificación en el programa informático GeneClass para obtener la tabla de resultados de asignación.
- 20 Si la muestra problema se asigna a la población Atlántico con una puntuación o score igual o superior al 80%, puede concluirse que la muestra pertenece a la población Atlántico. Si la muestra se asigna a la población Índico/Pacífico con una puntuación o score igual o superior al 80% se concluye que la muestra no pertenece a la población Atlántico. Si la muestra no alcanza el score del 80%, queda sin asignar a ninguna población.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- 25 **Arrizabalaga** H, Costas E, Juste J, González-Garcés A, Nieto, López-Rodas V (2004). Population structure of albacore *Thunnus alalunga* inferred from blood groups and tag-recapture analyses. Marine Ecology Progress Series 282: 245-52.
- Arrizabalaga** H, López-Rodas V, Costas E González-Garcés A (2007). Use of genetic data to assess the uncertainty in stock assessments due to the assumed stock structure: the case of albacore (*Thunnus alalunga*) from the Atlantic Ocean. Fish Bull 105: 140-6.
- 30 **Banks** MA, Eichert W (2000). WHICHRUN (version 3.2): a computer program for population assignment of individuals based on multilocus genotype data. J Hered 91(1):87-9.
- Bard** FX (1981). Le thon germon (*Thunnus alalunga* Bonnaterre 1788) de l'Océan Atlantique. De la dynamique des populations á la strategie demographique. PhD thesis, Université de Paris.
- 35 **Chow** S, Ushiyama H (1995) Global population structure of albacore (*Thunnus alalunga*) inferred by RFLP analysis of the mitochondrial ATPase gene. Mar Biol 123:39-45.
- Cornuet** JM, Piry S, Luikart G, Estoup A (1999). New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. Genetics 153: 1989-2000.
- 40 **Glaubitz** JC, Rhodes E, DeWoody A (2003). Prospects for inferring pairwise relationships with single nucleotide polymorphisms. Mol. Ecol., 12: 1039-47.
- ICCAT** (2010). Report of the 2009 ICCAT Albacore Stock Assessment Session (Madrid, Spain, July 13 to 18, 2009). Collect Vol Sci Pap ICCAT 65(4):1113-1253.
- Landegren** U, Nilsson M, Kwok PY (1998). Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis. Genome Res 8: 769-76.
- 45 **Lockley** AK, Bardsley RG (2000). Novel method for the discrimination of tuna (*Thunnus thynnus*) and bonito (*Sarda sarda*) DNA. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 4463-8.
- López** I, Pardo MA (2005). Application of Relative Quantification TaqMan™ Real-Time Polymerase Chain Reaction Technology for the Identification and Quantification of *Thunnus alalunga* and *Thunnus albacares*. Journal of Agricultural Food Chemistry. Jun 1; 53(11):4554-4560.
- 50 **Nielsen** R (2000). Estimation of population parameters and recombination rates from single nucleotide polymorphism. Genetics 154: 931-42.

- Paetkau D, Calvert W, Sterling I, Strobeck C (1995).** Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4: 347-54.
- Panno JP, McKeown BA (1995).** Cloning and expression of a myc family member from the pituitary gland of the Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochim Biophys Acta* 1264(1): 7-11.
- 5 **Pardo MA, Pérez-Villareal B (2004).** Identification of commercial canned tuna species by restriction site analysis of mitochondrial DNA products obtained by nested primer PCR. *Food Chemistry*, 86, 143-50.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet, JM., Paetkau D, Baudouin, L., Estoup, A (2004).** GeneClass2: A software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity* 95: 536-39.
- 10 **Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000).** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2): 945-59.
- Pujolar JM, Roldán MI, Pla C (2003).** Genetic analysis of tuna populations of *Thunnus thynnus* and *T. alalunga*. *Mar Biol* 143: 613-21.
- Ram JL, Ram ML, Baidoun FF (1996).** Authentication of canned tuna and bonito sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2460-7.
- 15 **Rannala B, Mountain JL (1997).** Detecting immigration by using multilocus genotypes. *PNAS USA* 94: 9197-201.
- Rehbein H, Mackie IM, Pryde S, Gonzales-Sotelo C, Medina I, Pérez-Martín R, Quinteiro J, Rey-Méndez M (1999).** Fish species identification in canned tuna by PCR-SSCP: validation by a collaborative study and investigation of intra-species variability of the DNA-patterns. *Food Chemistry*, 64, 263-8.
- 20 **Rengmark AH, Slettan A, Skalla O, Lie O, Lingaas F (2006).** Genetic variability in wild and farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) strains estimated by SNP and microsatellites. *Aquaculture* 253: 229-37.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000).** Arlequin: a software for population genetics data analysis User manual ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva; Geneva.
- 25 **Takagi M, Okamura T, Chow S, Taniguchi N (2001)** Preliminary study of albacore (*Thunnus alalunga*) stock identification inferred from microsatellite DNA analysis. *Fish Bull* 99: 697-701.
- Terol J, Mascarell R, Fernández-Pedrosa V, & Pérez-Alonso M (2002).** Statistical validation of the identification of tuna species: bootstrap analysis of mitochondrial DNA sequences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 963-9.
- 30 **Venkatesh B., Ning,Y. and Brenner,S (1999).** Late changes in spliceosomal introns define clades in vertebrate evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(18): 10267-71.
- Viñas J, Santiago J, Pla C (1999).** Genetic characterization and Atlantic-Mediterranean stock structure of albacore, *Thunnus alalunga*, ICCAT Collect Vol Sci Pap 49: 188-91.
- Viñas J, Alvarado Bremer JR, Pla C (2004).** Inter-oceanic genetic differentiation among albacore (*Thunnus alalunga*) populations. *Marine Biology* 145: 225-32.

35

## REIVINDICACIONES

- 1) Conjunto de moléculas de ADN de secuencias SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 17 caracterizadas por que comprenden los siguientes 18 SNP: SNP1 (SEQ ID NO 01), SNP2 (SEQ ID NO 02), SNP3 (SEQ ID NO 03), SNP4 (SEQ ID NO 04), SNP5 (SEQ ID NO 05), SNP6 (SEQ ID NO 06), SNP7 (SEQ ID NO 07), SNP8 y SNP16 (SEQ ID NO 08), SNP9 (SEQ ID NO 09), SNP10 (SEQ ID NO 10), SNP11 (SEQ ID NO 11), SNP12 (SEQ ID NO 12), SNP13 (SEQ ID NO 13), SNP14 (SEQ ID NO 14), SNP15 (SEQ ID NO 15), SNP17 (SEQ ID NO 16) y SNP18 (SEQ ID NO 17).
- 2) Moléculas de ADN de secuencias SEQ ID NO 18 a SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 24 a SEQ ID NO 31, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 41 y SEQ ID NO 50 a SEQ ID NO 83 para la amplificación de los fragmentos que contienen los SNP1 a SNP18 según la reivindicación 1.
- 3) Moléculas de ADN de secuencias SEQ ID NO 84 a SEQ ID NO 117 para el genotipado de los SNP1 a SNP18 según la reivindicación 1.
- 4) Uso de las moléculas de ADN de acuerdo a la reivindicación 1 y de los SNP incluidos en ellas como marcadores para identificar la especie *Thunnus alalunga* y su origen geográfico o población.
- 5) Método de identificación genética del origen geográfico y poblaciones del atún blanco (*Thunnus alalunga*) que comprende:
- Extracción del ADN de la muestra de un producto derivado de atún,
  - Identificación de la especie *Thunnus alalunga* frente al resto de especies de atún pertenecientes al género *Thunnus* que comprende la amplificación y genotipado del SNP1 (SEQ ID NO 01) y del SNP2 (SEQ ID NO 02), donde la presencia en las posiciones 303 y 1023 del gen mitocondrial citocromo b de una C y una G, respectivamente, es indicativa de la especie *Thunnus alalunga*,
  - Identificación del origen geográfico o poblaciones del atún blanco (*T. alalunga*) que comprende:
    - amplificación y genotipado de los siguientes 12 SNP: SNP3 a SNP14, comprendidos en las secuencias SEQ ID NO 3 a SEQ ID NO 14,
    - análisis de los resultados obtenidos en la fase i) y asignación del genotipo problema a una población de referencia: Mediterráneo o Atlántico /Índico/Pacífico,
    - amplificación y genotipado de los siguientes 11 SNP: SNP4, SNP6, SNP7, SNP10 y SNP12 a SNP18,
    - análisis de los resultados obtenidos en la fase iii) y asignación de la muestra problema a una población de referencia: Atlántico o Índico/Pacífico.
- 6) Método según la reivindicación 5, caracterizado por que la amplificación del SNP1 y del SNP2 de la etapa b) del método de la invención se lleva a cabo con los oligonucleótidos SNP1-F (SEQ ID NO 18) y SNP1-R (SEQ ID NO 19), y SNP2-F (SEQ ID NO 20) y SNP2-R (SEQ ID NO 21), respectivamente.
- 7) Método según la reivindicación 6, caracterizado por que el genotipado del SNP1 de la etapa b) del método de la invención se lleva a cabo con las sondas SNP1-FAM (SEQ ID NO 84) y SNP1-VIC (SEQ ID NO 85).
- 8) Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizado por que los oligonucleótidos utilizados en las fases i) de la etapa c) del método de la invención son los siguientes: SNP3-F (SEQ ID NO 52) y SNP3-R (SEQ ID NO 53) para el SNP3; SNP4-F (SEQ ID NO 54) y SNP4-R (SEQ ID NO 55) para el SNP4; SNP5-F (SEQ ID NO 56) y SNP5-R (SEQ ID NO 57) para el SNP5; SNP6-F (SEQ ID NO 58) y SNP6-R (SEQ ID NO 59) para el SNP6; SNP7-F (SEQ ID NO 60) y SNP7-R (SEQ ID NO 61) para el SNP7; SNP8-F (SEQ ID NO 62) y SNP8-R (SEQ ID NO 63) para el SNP8; SNP9-F (SEQ ID NO 66) y SNP9-R (SEQ ID NO 67) para el SNP9; SNP10-F (SEQ ID NO 68) y SNP10-R (SEQ ID NO 69) para el SNP10; SNP11-F (SEQ ID NO 70) y SNP11-R (SEQ ID NO 71) para el SNP11; SNP12-F (SEQ ID NO 72) y SNP12-R (SEQ ID NO 73) para el SNP12; SNP13-F (SEQ ID NO 74) y SNP13-R (SEQ ID NO 75) para el SNP13; SNP14-F (SEQ ID NO 76) y SNP14-R (SEQ ID NO 77) para el SNP14.
- 9) Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, donde el genotipado de los SNP3 a SNP14 de la fase i) de la etapa c) se lleva a cabo con las siguientes sondas; SNP3 con las sondas SNP3-FAM (SEQ ID NO 86) y SNP3-VIC (SEQ ID NO 87); SNP4 con las sondas SNP4-FAM (SEQ ID NO 88) y SNP4-VIC (SEQ ID NO 89); SNP5 con las sondas SNP5-FAM (SEQ ID NO 90) y SNP5-VIC (SEQ ID NO 91); SNP6 con las sondas SNP6-FAM (SEQ ID NO 92) y SNP6-VIC (SEQ ID NO 93); SNP7 con las sondas SNP7-FAM (SEQ ID NO 94) y SNP7-VIC (SEQ ID NO 95); SNP8 con las sondas SNP8-FAM (SEQ ID NO 96) y SNP8-VIC (SEQ ID NO 97); SNP9 con las sondas SNP9-FAM (SEQ ID NO 98) y SNP9-VIC (SEQ ID NO 99); SNP10 con las sondas SNP10-FAM (SEQ ID NO 100) y SNP10-VIC (SEQ ID NO 101); SNP11 con las sondas SNP11-FAM (SEQ ID NO 102) y SNP11-VIC (SEQ ID NO 103); SNP12

con las sondas SNP12-FAM (SEQ ID NO 104) y SNP12-VIC (SEQ ID NO 105); SNP13 con las sondas SNP13-FAM (SEQ ID NO 106) y SNP13-VIC (SEQ ID NO 107); SNP14 con las sondas SNP14-FAM (SEQ ID NO 108) y SNP14-VIC (SEQ ID NO 109).

5 10) Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, caracterizado por que los oligonucleótidos utilizados en las fases iii) de la etapa c) del método de la invención son los siguientes: SNP3-F (SEQ ID NO 52) y SNP3-R (SEQ ID NO 53) para el SNP3; SNP6-F (SEQ ID NO 58) y SNP6-R (SEQ ID NO 59) para el SNP6; SNP7-F (SEQ ID NO 60) y SNP7-R (SEQ ID NO 61) para el SNP7; SNP10-F (SEQ ID NO 68) y SNP10-R (SEQ ID NO 69) para el SNP10; SNP12-F (SEQ ID NO 72) y SNP12-R (SEQ ID NO 73) para el SNP12; SNP13-F (SEQ ID NO 74) y SNP13-R (SEQ ID NO 75) para el SNP13; SNP14-F (SEQ ID NO 76) y SNP14-R (SEQ ID NO 77) para el SNP14; SNP15-F (SEQ ID NO 78) y SNP15-R (SEQ ID NO 79) para el SNP15; SNP16-F (SEQ ID NO 64) y SNP16-R (SEQ ID NO 65) para el SNP16; SNP17-F (SEQ ID NO 80) y SNP17-R (SEQ ID NO 81) para el SNP17; SNP18-F (SEQ ID NO 82) y SNP18-R (SEQ ID NO 83) para el SNP18.

15 11) Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, donde el genotipado de los SNP4, SNP6, SNP7, SNP10 y SNP12 a SNP18 de la fase iii) de la etapa c) se lleva a cabo con las siguientes sondas: SNP4 con las sondas SNP4-FAM (SEQ ID NO 88) y SNP4-VIC (SEQ ID NO 89); SNP6 con las sondas SNP6-FAM (SEQ ID NO 92) y SNP6-VIC (SEQ ID NO 93); SNP7 con las sondas SNP7-FAM (SEQ ID NO 94) y SNP7-VIC (SEQ ID NO 95); SNP10 con las sondas SNP10-FAM (SEQ ID NO 100) y SNP10-VIC (SEQ ID NO 101); SNP12 con las sondas SNP12-FAM (SEQ ID NO 104) y SNP12-VIC (SEQ ID NO 105); SNP13 con las sondas SNP13-FAM (SEQ ID NO 106) y SNP13-VIC (SEQ ID NO 107); SNP14 con las sondas SNP14-FAM (SEQ ID NO 108) y SNP14-VIC (SEQ ID NO 109); SNP15 con las sondas SNP15-FAM (SEQ ID NO 110) y SNP15-VIC (SEQ ID NO 111); SNP16 con las sondas SNP16-FAM (SEQ ID NO 112) y SNP16-VIC (SEQ ID NO 113); SNP17 con las sondas SNP17-FAM (SEQ ID NO 114) y SNP17-VIC (SEQ ID NO 115); SNP18 con las sondas SNP18-FAM (SEQ ID NO 116) y SNP18-VIC (SEQ ID NO 117).

25 12) Método según la reivindicación 5, caracterizado por que los oligonucleótidos y las sondas utilizados en las etapas b) y c) del método de la invención son los siguientes: SNP1-F (SEQ ID NO 18) y SNP1-R (SEQ ID NO 19) y SNP1-FAM (SEQ ID NO 84) y SNP1-VIC (SEQ ID NO 85) para el SNP1; SNP2-F (SEQ ID NO 20) y SNP2-R (SEQ ID NO 21) para el SNP2; SNP3-F (SEQ ID NO 52) y SNP3-R (SEQ ID NO 53) y SNP3-FAM (SEQ ID NO 86) y SNP3-VIC (SEQ ID NO 87) para el SNP3; SNP4-F (SEQ ID NO 54) y SNP4-R (SEQ ID NO 55) y SNP4-FAM (SEQ ID NO 88) y SNP4-VIC (SEQ ID NO 89) para el SNP4; SNP5-F (SEQ ID NO 57) y SNP5-R (SEQ ID NO 58) y SNP5-FAM (SEQ ID NO 90) y SNP5-VIC (SEQ ID NO 91) para el SNP5; SNP6-F (SEQ ID NO 58) y SNP6-R (SEQ ID NO 59) y SNP6-FAM (SEQ ID NO 92) y SNP6-VIC (SEQ ID NO 93) para el SNP6; SNP7-F (SEQ ID NO 60) y SNP7-R (SEQ ID NO 61) y SNP7-FAM (SEQ ID NO 94) y SNP7-VIC (SEQ ID NO 95) para el SNP7; SNP8-F (SEQ ID NO 62) y SNP8-R (SEQ ID NO 63) y SNP8-FAM (SEQ ID NO 96) y SNP8-VIC (SEQ ID NO 97) para el SNP8; SNP9-F (SEQ ID NO 66) y SNP9-R (SEQ ID NO 67) y SNP9-FAM (SEQ ID NO 98) y SNP9-VIC (SEQ ID NO 99) para el SNP9; SNP10-F (SEQ ID NO 68) y SNP10-R (SEQ ID NO 69) y SNP10-FAM (SEQ ID NO 100) y SNP10-VIC (SEQ ID NO 101) para el SNP10; SNP11-F (SEQ ID NO 70) y SNP11-R (SEQ ID NO 71) y SNP11-FAM (SEQ ID NO 102) y SNP11-VIC (SEQ ID NO 103) para el SNP11; SNP12-F (SEQ ID NO 72) y SNP12-R (SEQ ID NO 73) y SNP12-FAM (SEQ ID NO 104) y SNP12-VIC (SEQ ID NO 105) para el SNP12; SNP13-F (SEQ ID NO 74) y SNP13-R (SEQ ID NO 75) y SNP13-FAM (SEQ ID NO 106) y SNP13-VIC (SEQ ID NO 107) para el SNP13; SNP14-F (SEQ ID NO 76) y SNP14-R (SEQ ID NO 77) y SNP14-FAM (SEQ ID NO 108) y SNP14-VIC (SEQ ID NO 109) para el SNP14; SNP15-F (SEQ ID NO 78) y SNP15-R (SEQ ID NO 79) y SNP15-FAM (SEQ ID NO 110) y SNP15-VIC (SEQ ID NO 111) para el SNP15; SNP16-F (SEQ ID NO 64) y SNP16-R (SEQ ID NO 65) y SNP16-FAM (SEQ ID NO 112) y SNP16-VIC (SEQ ID NO 113) para el SNP16; SNP17-F (SEQ ID NO 80) y SNP17-R (SEQ ID NO 81) y SNP17-FAM (SEQ ID NO 114) y SNP17-VIC (SEQ ID NO 115) para el SNP17; SNP18-F (SEQ ID NO 82) y SNP18-R (SEQ ID NO 83) y SNP18-FAM (SEQ ID NO 116) y SNP18-VIC (SEQ ID NO 117) para el SNP18.

13) Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12 caracterizado por que la fase ii) de la etapa c) se lleva a cabo con cualquier método de asignación eligiendo un *score* umbral mayor o igual a 50%, donde la asignación del genotipo problema con una de las poblaciones de referencia Mediterráneo o Atlántico/Índico/Pacífico con un *score* mayor o igual a 50% es indicativa de pertenencia a dicha población.

50 14) Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13 caracterizado por que la fase iv) de la etapa c) se lleva a cabo con cualquier método de asignación eligiendo un *score* umbral mayor o igual a 50%, donde la asignación del genotipo problema con una de las poblaciones de referencia Atlántico o Índico/Pacífico con un *score* mayor o igual a 50% es indicativa de pertenencia a dicha población.

55 15) Kit caracterizado por que comprende el set de cebadores SEQ ID NO 18 a SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 24 a SEQ ID NO 31, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 41 y SEQ ID NO 50 a SEQ ID NO 83.

16) Kit caracterizado por que comprende el set de sondas SEQ ID NO 84 a SEQ ID NO 117.

17) Kit según las reivindicaciones 15 y 16 caracterizado por que comprende los cebadores SEQ ID NO 18 a SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 24 a SEQ ID NO 31, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 41 y SEQ ID NO 50 a SEQ ID NO 83 y las sondas SEQ ID NO 84 a SEQ ID NO 117.

5 18) Kit para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 14 caracterizado por que comprende los cebadores SEQ ID NO 18 a SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 24 a SEQ ID NO 31, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 41, SEQ ID NO 50 a SEQ ID NO 83, las sondas SEQ ID NO 84 a SEQ ID NO 117, y/o *microarrays* con estos cebadores y sondas.

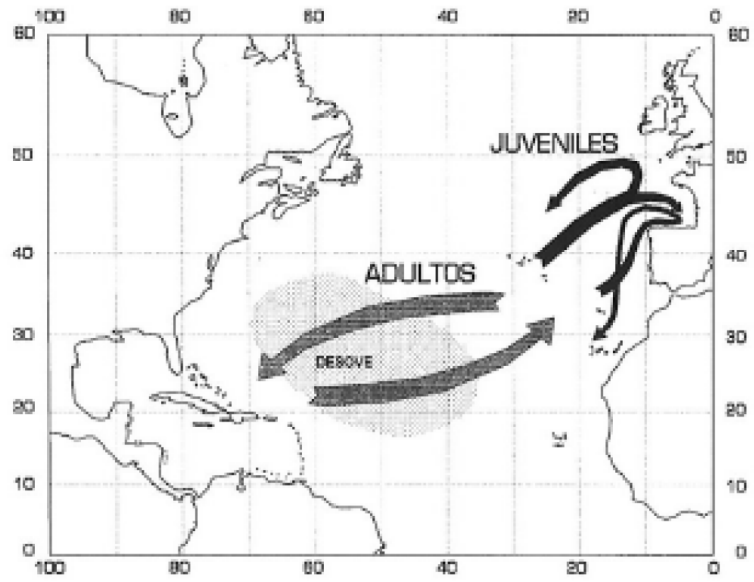


FIGURA 1

# ES 2 392 293 A1

## Listado de Secuencias

<110> Fundación AZTI/AZTI Fundazioa  
Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

<120> Sistema genético de identificación de distintas poblaciones de atún blanco (Thunnus alalunga)

<130> 023/11

<160> 117

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 76  
<212> DNA  
<213> Thunnus alalunga

<400> 1  
ttctttatct gcatctactt ccacatcggc cgaggmcttt actacggctc ttacctgtac 60  
aaagaaacat gaaaca 76

<210> 2  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Thunnus alalunga

<400> 2  
gcagacgtag ccattcttac atgaatcggg ggtatrccag cggaacaacc cttc 54

<210> 3  
<211> 263  
<212> DNA  
<213> Thunnus alalunga

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (56)..(56)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (62)..(62)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (106)..(106)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (115)..(115)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (123)..(123)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (132)..(132)  
<223> n is a, c, g, or t

ES 2 392 293 A1

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (161)..(161)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (170)..(170)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (174)..(175)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (177)..(177)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (179)..(179)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (218)..(218)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (227)..(227)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 3  
 tggggcccaa tctctggggt ctgtttggac gyaaaacagg ccaggcagag ggctantcct 60  
 anactgatgc caacaaaagc aaaggtaaact actggatattg tatatnaaca gtatnataca 120  
 tanaaatcat gntattttga ttaaacatt attcttattt ntgtttgctn actnnantnc 180  
 taggcattat ctgggatgac gacaccctga atgtttanct ggaaaanccc aagaaataca 240  
 ttccaggaac aaagatgatc ttc 263

<210> 4  
 <211> 331  
 <212> DNA  
 <213> Thunnus alalunga

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (13)..(13)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (40)..(41)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (44)..(51)  
 <223> n is a, c, g, or t



ES 2 392 293 A1

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (53)..(53)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (62)..(62)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (77)..(77)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (114)..(114)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (116)..(116)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (122)..(122)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (130)..(130)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (143)..(143)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (242)..(242)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 4  
 gcagcatcgg aangatactg atggagttgg tcgggagcan naannnnnn nanactatatt 60  
 anggctgtgc agagccnctg gaggcagaca ggtggctcag gtactcctca gacntngttc 120  
 anggattgcn gttccttcac tcncacagta ttgtgcatct ggacataaaa ccagccaacg 180  
 tgttggtgtc cagtgaggac gtctgcaaaa tcgccgattt cggctgttct ctgaaactgg 240  
 ancgtgggtg cgaggatacc gccatcagcc cctatctsag ccacgtaggc ggcacgtaca 300  
 cgcacagagc cccggagctg ctgaaaggag a 331

<210> 5  
 <211> 446  
 <212> DNA  
 <213> Thunnus alalunga

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (58)..(58)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (327)..(327)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (330)..(330)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (435)..(435)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (438)..(438)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 5  
 acggccacac acaagcgctc tgtaggtct gccagtgctc cagtcagcag ggagcccngt 60  
 tcactctgag ctggcaaata cagactagga ggctgtcaga acaagttatc attgtcccca 120  
 ctgaggtcgc agtactttgg ccagtgtgtg aacttcagtg acccttcact ctgctttact 180  
 ggaagagtac gctacatcac tggcayattt cctgcttcgt ttgaacaaca cagtttttgt 240  
 tttgagtcag tggacagaat ttgttttcat ttagctaaaa ctctggtgct tgcctctgaa 300  
 atgtacttca taactaact tggaggncan tgtggctttt tctgccagga attgcacttt 360  
 agtagacgct gatattatct cagccataac ggctggtaat gccacttcct ttattcaact 420  
 tgctgcagct catcntantg caaagg 446

<210> 6  
 <211> 307  
 <212> DNA  
 <213> Thunnus alalunga

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (65)..(65)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (80)..(81)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (105)..(105)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (111)..(111)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (189)..(189)  
 <223> n is a, c, g, or t

ES 2 392 293 A1

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (228)..(228)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (288)..(288)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 6  
 tgatacagga ggagagaact gacagtgaat gtaaatacag tacccttta gctgattaga 60  
 gtgcnatatg cagtctaacn ngacaaaata tagacgacca atccnagtcc nggggtgcaa 120  
 aaagtgccac aaataatgca tctgtctacc aagaacaggt ctcaagagag aatgacaggt 180  
 ttatgtacng attttaattg gtgtgtgtcc ttcataaaga aagtaagngc aaagtcaca 240  
 cygaatgact tgccatcata accaatatga caaactgagg ttgcagcngg gaatacctaaa 300  
 tgggtgaa 307

<210> 7  
 <211> 454  
 <212> DNA  
 <213> Thunnus alalunga

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (11)..(11)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(17)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (37)..(37)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (41)..(41)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (59)..(59)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (90)..(90)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (121)..(121)

ES 2 392 293 A1

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (170)..(170)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (187)..(187)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (191)..(191)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (202)..(203)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (210)..(210)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 7

ctttcntgta ngtcanntgg tatgcagagc tatagcnagg nttttagaaa tactgaggnc 60

ccataaatgc atttcctgta agatcatgtn tcaaagtctt cttcacattg ccataaataa 120

nattttggtg ggaaaacact gtttcctttg ttaaaaacat ctcctcaacn taggtatgat 180

cctggtntgt nttatctctg gnaatcctn tccttttctc cacagtttat tcaaagagca 240

ccctgatacc cagaagctgt tccccaatt cgctggcatc gcccaggcyg acttagccgg 300

taacgcagct atttctgctc atggtgccac tgtgctgaag aaacttgag agctgctgaa 360

ggccaaaggc agtcatgctt ccatacctaaa accaatggca aacagccatg ccactaagca 420

caagattccc attaataact tcaaggtgag atcg 454

<210> 8

<211> 515

<212> DNA

<213> Thunnus alalunga

<220>

<221> misc\_feature

<222> (9)..(10)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (72)..(72)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (82)..(82)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (84)..(85)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (112)..(112)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (114)..(114)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (126)..(126)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (132)..(132)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (144)..(146)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (150)..(150)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (161)..(161)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (164)..(165)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (170)..(170)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (198)..(198)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (221)..(221)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (228)..(229)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (232)..(232)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (234)..(234)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (239)..(239)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (243)..(243)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (248)..(250)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (252)..(252)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (282)..(282)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (289)..(290)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (297)..(297)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (329)..(329)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (335)..(335)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (337)..(338)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (363)..(365)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (367)..(367)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (371)..(371)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>

ES 2 392 293 A1

<221> misc\_feature  
 <222> (461)..(464)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (466)..(466)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (500)..(500)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (503)..(504)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (506)..(506)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (510)..(511)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 8  
 ctccctcacnn cctgctgtgt tgagtcagga tgatgaacat tgatttaatt actagagctg 60  
 caatgattag tnggacagaa antnнатggc aattactttg actattgatc antngtttgc 120  
 caaacntttg ancccagatc ctcnнтgan tttgctgttt nttntatgn cagtaaaktg 180  
 aatatcttaa cattttangt gttaatcaga caaacaagc naactggna cntnactgng 240  
 gantgccnnn tncccctcca attatttaaа aacacttcat anattaaann attgagnaаа 300  
 taatcagcag gttaaacagt aataactgnt tgcancntc ataatgacac tcttggtttt 360  
 ctnnnangtt nagtggttc cctctgrtc tgctctgatc atcaaggctc tgaaggagcc 420  
 tcctcgtgac aggaagaagg tcaagaacag taagtgactt nnnntngcat tcttgaacca 480  
 atcagtattt caaacttttn ttnntntttn ntttt 515

<210> 9  
 <211> 552  
 <212> DNA  
 <213> Thunnus alalunga

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (4)..(6)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(17)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (23)..(23)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (37)..(37)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (43)..(43)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (48)..(48)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (66)..(66)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (93)..(93)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (126)..(126)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (140)..(140)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (183)..(183)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (225)..(225)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (337)..(337)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (343)..(343)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (346)..(346)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (348)..(348)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (373)..(373)



ES 2 392 293 A1

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (375)..(375)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (381)..(381)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (391)..(392)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (408)..(408)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (503)..(503)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (550)..(550)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 9

ggannnggag ccgtgnntaa gangaggact ggtggtngca agnagtcngc tgaggggcag	60
gtgganggag cagatgatat gagcacctcc tcntcttccg gggacagcgg agaggatgag	120
gatagnggaa tgaacagan gggwaaagac ctttactact acaacttctc acgaacaata	180
atnaaccag gtgagggcct gccatccata gaagggatag accantgtct gggacggggc	240
tcccagctcc aacgctttct taaagatgag gagcagcaac aacagagggc acaaggaaaa	300
gctgaagaag acatgctgag cgctttgtaa gtacacnaa tanttnnaa ttgattattt	360
ttccatgctc tcnantaaca ncctaata nngtctttgc tgtgtttnat aggaccttgg	420
gcaagcagcg tattggccag ctcgatggcg ttgatgatgg gtcagagagc gacacaagca	480
tctgcaccac cagcaccaca acnactacag ccacctcctc ttccaccca cataagagca	540
ctcctaagan aa	552

<210> 10

<211> 636

<212> DNA

<213> Thunnus alalunga

<220>

<221> misc\_feature

<222> (51)..(51)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (78)..(78)

<223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (84)..(84)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (90)..(90)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (93)..(93)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (99)..(99)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (152)..(152)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (163)..(163)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (176)..(176)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (196)..(196)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (258)..(258)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (283)..(283)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (290)..(290)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (339)..(339)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (352)..(352)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (364)..(364)

ES 2 392 293 A1

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (383)..(383)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (394)..(394)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (434)..(434)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (521)..(521)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (565)..(565)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (579)..(579)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 10

ccagcagggc tgtggaaggc cttcctcacc tcttacagtc tcaagatcca nggccgtgta	60
cacacgaagg agaaaccntt tgantgtgan gtncaaggnt gcgagaaggc cttcaacacc	120
ctatacaggt gagcctacac ccagttttgt tnttttgtgc ttnatttctc ctcatngtgc	180
tgttgttaca aagctntggg cactatgagg caagttcaag tcatttatca tcaactgtggg	240
atctgttgag ttagcagngt ctmgtttgtc gtccttgaga ctnagagccn atgtgtggtc	300
acctagaatg gttgagaaac tgtagtataa gtaaataana ttagattgtg tnattatata	360
acanatattt ggcaggtaca acnacgtgac ttnatacat acatagaaca gacacaaaat	420
gagtgtttaa gcanaattaa aatactacat tttgctttat atagaggtgt actatgtttt	480
gtgtgtaaaa tttcctccaa ccaaagttag tatttccaag nattttcctt gtagcccatc	540
aaaactgcag aaaatttgta tttgnacaat tttatattnt cagagaaggc aagaagtgc	600
acagtggatg ttttgataaa gtatgtcagc tgtgac	636

<210> 11

<211> 170

<212> DNA

<213> Thunnus alalunga

<220>

<221> misc\_feature

<222> (5)..(5)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

ES 2 392 293 A1

<222> (15)..(15)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (24)..(25)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (30)..(30)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (43)..(44)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (51)..(51)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (58)..(58)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (104)..(104)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (145)..(145)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (148)..(148)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (157)..(157)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (159)..(162)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 11  
 agtanagact tgagntgaat gacnntcan atgctattca acnngctgca naggcgancc 60  
 gacaatatga acacaatggc tgcattgacac ratgtttaca tttngaatag ttgccataca 120  
 tgcattcacc tgtagctaatt taccntanatt tgcattgann nnttcaggca 170

<210> 12  
 <211> 625  
 <212> DNA  
 <213> Thunnus alalunga

<220>  
 <221> misc\_feature

<221> (13)..(13)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (22)..(23)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (34)..(34)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (54)..(54)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (56)..(56)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (62)..(62)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (67)..(67)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (77)..(79)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (90)..(90)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (108)..(108)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (115)..(115)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (131)..(131)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (133)..(134)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (143)..(143)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>

<221> misc\_feature  
 <222> (160)..(160)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (172)..(173)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (191)..(191)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (201)..(201)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (209)..(209)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (232)..(232)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (248)..(248)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (253)..(254)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (261)..(261)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (273)..(273)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (283)..(283)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (336)..(337)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (341)..(341)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (347)..(347)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (431)..(431)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (458)..(458)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (464)..(465)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (467)..(467)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (512)..(512)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (555)..(555)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (566)..(566)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (586)..(586)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (594)..(595)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (598)..(598)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (606)..(606)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (610)..(610)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (619)..(619)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 12  
 tgaaacatat tancacctgg anntacataa caanacacaa tattagttat aagntntaat 60  
 tnattcnaat tctctcnnnt ttggtgattn atttcagtta ttaatctnat ttttncctgt 120

ES 2 392 293 A1

ctcatattca nannacaaca gcngagtttt cagttgtccn cagttttata tningactggt 180  
 tttatgacag ngaatgaaaa natttgttnt ccatgtttag acaatgtagc tntgccagga 240  
 aaaataanga canngccaca ngggagagat gangataaga gangatatca aaacatttaa 300  
 accagctaaa tttagaacat ttgtgtaaaa agtganntgt nttgtangta cgcttggatc 360  
 atccaagggt ccgtatctct tcaccacctg cccctctttg ttgatcaaaa actagacaga 420  
 aaaggaaaag naggaaacat gaaattttaa caatagtntt tttnnanaat atactttaaa 480  
 gcatttacat aattctatat cttcaaatat gntttagcca gctatatwgc attcatagct 540  
 gtactgataa tacanaggag ataacnctgg cttatcactg acgcanaaga atannagnac 600  
 agctgngtan ctgtcagcnc tataa 625

<210> 13  
 <211> 198  
 <212> DNA  
 <213> Thunnus alalunga

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (21)..(21)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (33)..(33)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (79)..(79)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (112)..(112)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (117)..(117)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 13  
 tagctgtgac cgtcaccag nagctcctcg tcnatactga caacaccaa aacattacaa 60  
 actcaagtac tgaaccgnt tattaaagac aataaaacaa ggtagacaga cngatanatg 120  
 aagcagctct gatgtamac tgagataaat gtaacctgga gcagcaatac aaatcaaagt 180  
 ttgacccttg ggtggttt 198

<210> 14  
 <211> 525  
 <212> DNA  
 <213> Thunnus alalunga

<220>  
 <221> misc\_feature



ES 2 392 293 A1

<222> (27)..(27)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (515)..(516)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (525)..(525)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 14  
 atgtttttac tcatccttct tggcttnccc atcaacttcc tcactctgta cgtcaccatc 60  
 gaacacaaga agctgcgaac ccctctaaac tacatcctgc tgaatctcgc kgtggctgac 120  
 ctcttcatgg tgttcggagg attcacgaca acgatgtaca cctctatgca tggctacttc 180  
 gtccttggac gccttggctg caatctggaa ggattctttg ctacccatgg tggtcagatt 240  
 gccctctggt cactggttgt tctggctggt gagaggtggg tggttgtctg caagcccttc 300  
 agcaacttcc gctttgggga gaaccacgca atcatgggct tggccctcac ctggggttatg 360  
 gcttgctctt gttccgtgcc ccctcttggt ggctgggtccc gttacatccc tgagggcatg 420  
 cagtgctcat gtggaatcga ctactacaca cgggcagaag gtttcaacaa tgagtccttc 480  
 gttatctaca tgttcacatg ccacttcctc atccnncact gattn 525

<210> 15  
 <211> 567  
 <212> DNA  
 <213> Thunnus alalunga

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (37)..(37)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (41)..(41)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (59)..(59)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (65)..(65)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (69)..(69)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (83)..(83)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (85)..(85)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (89)..(89)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (115)..(115)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (117)..(117)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (124)..(125)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (135)..(135)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (187)..(187)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (193)..(193)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (206)..(206)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (209)..(209)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (213)..(213)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (216)..(216)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (232)..(237)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (242)..(242)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (244)..(244)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (246)..(247)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (298)..(298)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (301)..(301)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (305)..(305)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (344)..(344)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (350)..(351)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (389)..(389)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (425)..(425)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (465)..(465)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (472)..(472)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (484)..(486)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (492)..(492)

ES 2 392 293 A1

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (498)..(498)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (517)..(517)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (541)..(541)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (550)..(550)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (567)..(567)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 15

ngaaaggctc tttcagacca cagcactcat tctgatnggt nagttgattt tctcagtnt 60

tcaanagtna aaccatagtt gtngngtanc tcagartaaa gcacttgca tggtnctg 120

aaanntttca ggggnatttt caatggagga agttgtactt ttcattttgg taatcacct 180

ccaaganctc tgnacacacc agtagngcnt ttnagnttgc acgtcttgca gnnnnnctg 240

cnananntga gaatttcttt tcaacatcag aaagaggaaa tggttacaaa ctattacngt 300

naaanaaatg aatattcaat acatttactg caactccctt actnaaaan nttgaatcta 360

taaatacact agtatttttt gtttcaaang tttaactacc ttcaaactcct aaactcagat 420

ttagnctgag cacagcgaaa ctgcagctga atgtgaaaac agcnccttag tntcaaactc 480

tgcnnntata tnattaantt ttgagttgag tttaaanatt gataatgtca gcattatatt 540

naatatttan tcatttgtcc tgtaggn 567

<210> 16

<211> 525

<212> DNA

<213> Thunnus alalunga

<220>

<221> misc\_feature

<222> (49)..(49)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (64)..(64)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (68)..(68)

<223> n is a, c, g, or t

ES 2 392 293 A1

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (111)..(111)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (159)..(159)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (175)..(175)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (177)..(178)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (198)..(198)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (223)..(223)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (294)..(294)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (306)..(306)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (320)..(322)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (415)..(415)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 16  
 ctcatgggca gccaccagga agaggctgta acctgcaaca tgtatagant attaattaat 60  
 gatnaggnta aatacaaatt tatagcattt tccctgctct acctattcta nttgttctct 120  
 tattaccac cctggtcagg acagaagccc ctttcttng tcctcatcat agttnnncg 180  
 gtggtagccg accacaantt gccatctcct cgtccctcac tantgcagga gtcatactct 240  
 ttaccagga acacgaagg gaaatggcag ggctctccct ctgaatttcc accngttaca 300  
 gcagtntctg ccaaacaan nnacataaca aaaacagtaa gaaaacaagc tattgcagca 360  
 aactccaca ttgtttatgc attgyagttc ctgccactca ccacgactgg gacanaatcc 420  
 atatttcaca tccttgtcaa agtttctgt ggtggcacac cagcggtagc cgtcagtgcg 480  
 gccctcagtg gtacagctgt catattcctc cccctggaag atgaa 525

ES 2 392 293 A1

<210> 17  
 <211> 249  
 <212> DNA  
 <213> Thunnus alalunga

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (11)..(12)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 17  
 cccaactggt nncagacgac agagtcaaaa tggagagaga tggcgatagc atctcactaa 60  
 caattcaciaa tgtcactaaa gctgaccagg gagagtatat ttgtgaggct gtgaactatg 120  
 tcggggaagc cagaagtgtt gctttagtgg tagttgtatc gcaggaagtg aggttcatgc 180  
 ctgctccrcc tgctgtcacc catcagcatg tgatggagtt tgatgtggag gaagatgact 240  
 cctctcgtt 249

<210> 18  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador CytB-76-F

<400> 18  
 ttctttatct gcatctactt ccacatc 27

<210> 19  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador CytB-76-R

<400> 19  
 tgtttcatgt ttctttgtag aggtaagag 29

<210> 20  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador CytB-54-F

<400> 20  
 gcagacgtag ccattcttac atga 24

<210> 21  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador CytB-54-R

<400> 21 gaagggttgt tccgctggc	19
<210> 22 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Cebador CytC-F	
<400> 22 ttygtccaga agtgtgccca gtg	23
<210> 23 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Cebador CytC-R	
<400> 23 ttcttyttga tgccrgcgaa gatcat	26
<210> 24 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Cebador C-MOS-F	
<400> 24 aacatcgttc gcgtcatc	18
<210> 25 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Cebador C-MOS-R	
<400> 25 cagacacccc ttctcctttc	20
<210> 26 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Cebador HIF-4-F	
<400> 26 ggagatgctg gtccacaaaa c	21
<210> 27 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence	

<220>  
 <223> Cebador HIF-4-R  
 <400> 27  
 ttcattcgca ggaagaagct g 21

<210> 28  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador INTFGP-F  
 <400> 28  
 agacggacta tctgttggat ttg 23

<210> 29  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador INTFGP-R  
 <400> 29  
 tcctttcctt tttcaccatt tg 22

<210> 30  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador INTMYO-F  
 <400> 30  
 attggaggcc tggttctgac 20

<210> 31  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador INTMYO-R  
 <400> 31  
 tctctgatat acaccgatct cacc 24

<210> 32  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador L12-F  
 <400> 32  
 gactggaagg gyctgaggat cac 23

<210> 33  
 <211> 23



<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador L12-R  
  
 <400> 33  
 ctgtygatgt cmtcgatgay rtc 23  
  
 <210> 34  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador MII25a-F  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(3)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (9)..(9)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <400> 34  
 gcncgntcna ayatgttytt ygg 23  
  
 <210> 35  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador MII25a-R  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <400> 35  
 atrttncrc artcrtcrct rtt 23  
  
 <210> 36  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador MTF-F  
  
 <400> 36  
 tacagcarg crgaaacct gcg 23  
  
 <210> 37

<211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador MTF-R  
  
 <400> 37  
 gtacttkgtg catccctckg attcacag 28

<210> 38  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador MYCA-F  
  
 <400> 38  
 ccggaggtgg ctaacaatg 19

<210> 39  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador MYCA-R  
  
 <400> 39  
 tgctgaact tcctgacaat 20

<210> 40  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador PHGP-F  
  
 <400> 40  
 ggcaaaacc cagtaaacta c 21

<210> 41  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador PHGP-R  
  
 <400> 41  
 ggaagatcct tctccaccac 20

<210> 42  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador PSN-3-F  
  
 <400> 42  
 aacatctcyc gcctcatgaa 20

<210> 43  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Cebador PSN-3-R  
 <400> 43  
 gctgcgggcg ttgtacatka c 21

<210> 44  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Cebador Rhod-F  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(3)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(15)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <400> 44  
 ccntaygayt aycncarta yta 23

<210> 45  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Cebador Rhod-R  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(3)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(15)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (18)..(18)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <400> 45  
 ttncrcarc ayaangtngt 20

<210> 46  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador CY1-F  
 <400> 46  
 caccagttct tcaartchga 20

<210> 47  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador CY1-R  
 <400> 47  
 tgatgtaygc yacyatygg ct 22

<210> 48  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador MM9-F  
 <400> 48  
 tttgadggag acctcaaag gga 23

<210> 49  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador MM9-R  
 <400> 49  
 tgtacatdgg gtacatgagh gcmtctc 27

<210> 50  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador TM04c4-F  
 <400> 50  
 gttttacgcc gaggtgtttg 20

<210> 51  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador TM04c4-R  
 <400> 51  
 gaggggatgg agaacgagag 20

<210> 52

<211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Cebador SNP3-F  
 <400> 52  
 gggcccaatc tctggg 16

<210> 53  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Cebador SNP3-R  
 <400> 53  
 cctttgcttt tgttggcatc agt 23

<210> 54  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Cebador SNP4-F  
 <400> 54  
 gcgaggatac cgccatcag 19

<210> 55  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Cebador SNP4-R  
 <400> 55  
 ggctctgtgc gtgtacgt 18

<210> 56  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Cebador SNP5-F  
 <400> 56  
 cccttcactc tgctttactg gaa 23

<210> 57  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Cebador SNP5-R  
 <400> 57  
 caaattctgt ccactgactc aaaacaa 27

<210> 58  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador SNP6-F  
  
 <400> 58  
 ttggtgtgtg tccttcataa agaaagt 27  
  
 <210> 59  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador SNP6-R  
  
 <400> 59  
 tgcaacctca gtttgcata ttggt 25  
  
 <210> 60  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador SNP7-F  
  
 <400> 60  
 cagaagctgt tccccaatt cg 22  
  
 <210> 61  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador SNP7-R  
  
 <400> 61  
 ggcacatga gcagaaatag ct 22  
  
 <210> 62  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador SNP8-F  
  
 <400> 62  
 atggcaatta ctttgactat tgatca 26  
  
 <210> 63  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador SNP8-R

<400> 63  
gcttgtttg tctgattaac ac 22

<210> 64  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Cebador SNP16-F

<400> 64  
aaataatcag caggtaaac agtaataact g 31

<210> 65  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Cebador SNP16-R

<400> 65  
ctccttcaga gccttgatga tca 23

<210> 66  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Cebador SNP9-F

<400> 66  
acagcggaga ggatgaggat ag 22

<210> 67  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Cebador SNP9-R

<400> 67  
aggccctcac ctgggtt 17

<210> 68  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Cebador SNP10-F

<400> 68  
ctgtgggatc tgttgagta gca 23

<210> 69  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Cebador SNP10-R  
 <400> 69  
 caaccattct agtgaccac acat 24

<210> 70  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador SNP11-F  
 <400> 70  
 ccgacaatat gaacacaatg gc 22

<210> 71  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador SNP11-R  
 <400> 71  
 ggtgatgcat gtatggcaac tattc 25

<210> 72  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador SNP12-F  
 <400> 72  
 actttaagc attacataa ttctatatct tcaaa 35

<210> 73  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador SNP12-R  
 <400> 73  
 tgcgtcagtg ataagccag 19

<210> 74  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador SNP13-F  
 <400> 74  
 acaacaccaa aacattaca aactcaagt 29

<210> 75



<211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador SNP13-R  
  
 <400> 75  
 tgatttgtat tgctgctcca ggta 25  
  
 <210> 76  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador SNP14-F  
  
 <400> 76  
 ctgcgaacc ctctaaacta catc 24  
  
 <210> 77  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador SNP14-R  
  
 <400> 77  
 aatcctccga acacatgaa gag 23  
  
 <210> 78  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador SNP15-F  
  
 <400> 78  
 ctttcagacc acacgactca ttct 24  
  
 <210> 79  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador SNP15-R  
  
 <400> 79  
 ccaaaatgaa aagtacaact tcctccatt 29  
  
 <210> 80  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador SNP17-F  
  
 <400> 80  
 gcagcaacac tccacattgt 20

<210> 81  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador SNP17-R  
  
 <400> 81  
 tgtcccagtc gtggtgagt 19

<210> 82  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador SNP18-F  
  
 <400> 82  
 tcgaggaag tgagttcat g 21

<210> 83  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador SNP18-R  
  
 <400> 83  
 ccacatcaaa ctccatcaca tgct 24

<210> 84  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Sonda SNP1-FAM  
  
 <400> 84  
 ccgaggactt tactacg 17

<210> 85  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Sonda SNP1-vic  
  
 <400> 85  
 ccgaggcctt tactacg 17

<210> 86  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Sonda SNP3-FAM

<400> 86  
 tggcctgttt tacgtcca 18

<210> 87  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Sonda SNP3-VIC

<400> 87  
 tggcctgttt tgcgtcca 18

<210> 88  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Sonda SNP4-FAM

<400> 88  
 ctacgtggct cagatag 17

<210> 89  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Sonda SNP4-VIC

<400> 89  
 ctacgtggct gagatag 17

<210> 90  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Sonda SNP5-FAM

<400> 90  
 aagcaggaaa tatgccag 18

<210> 91  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Sonda SNP5-VIC

<400> 91  
 aagcaggaaa tgtgccag 18

<210> 92  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Sonda SNP6-FAM  
 <400> 92  
 caagtcattc agtgtgcac 19

<210> 93  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Sonda SNP6-VIC  
 <400> 93  
 caagtcattc ggtgtgcac 19

<210> 94  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Sonda SNP7-FAM  
 <400> 94  
 cggctaagtc agcctg 16

<210> 95  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Sonda SNP7-VIC  
 <400> 95  
 cggctaagtc ggcctg 16

<210> 96  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Sonda SNP8-FAM  
 <400> 96  
 atgttaagat attcaattta ct 22

<210> 97  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Sonda SNP8-VIC  
 <400> 97  
 aatgttaag atattcactt tact 24

<210> 98

<211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Sonda SNP9-FAM  
  
 <400> 98  
 agtaagggtc tttaccc 17

<210> 99  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Sonda SNP9-VIC  
  
 <400> 99  
 tagtaagggt cttttccc 18

<210> 100  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Sonda SNP10-FAM  
  
 <400> 100  
 aggacgaaa acgagac 17

<210> 101  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Sonda SNP10-VIC  
  
 <400> 101  
 aaggacgaca aactagac 18

<210> 102  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Sonda SNP11-FAM  
  
 <400> 102  
 tgcacgacac gatggt 16

<210> 103  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Sonda SNP11-VIC  
  
 <400> 103  
 tgcacgacac aatggt 16

<210> 104  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Sonda SNP12-FAM  
  
 <400> 104  
 ccagctatat tgcattca 18

<210> 105  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Sonda SNP12-VIC  
  
 <400> 105  
 ccagctatat agcattca 18

<210> 106  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Sonda SNP13-FAM  
  
 <400> 106  
 tttatctcag tgtaacatc 19

<210> 107  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Sonda SNP13-VIC  
  
 <400> 107  
 catttatctc agtttaacat c 21

<210> 108  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Sonda SNP14-FAM  
  
 <400> 108  
 aatctcgctg tggctg 16

<210> 109  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Sonda SNP14-VIC

<400> 109  
aatctcgcgg tggctg 16

<210> 110  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Sonda SNP15-FAM

<400> 110  
caagtgcttt actctgag 18

<210> 111  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Sonda SNP15-VIC

<400> 111  
acaagtgctt tattctgag 19

<210> 112  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Sonda SNP16-FAM

<400> 112  
ccctctgcgt ctgct 15

<210> 113  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Sonda SNP16-VIC

<400> 113  
ccctctgcat ctgct 15

<210> 114  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Sonda SNP17-FAM

<400> 114  
caggaactac aatgcat 17

<210> 115  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Sonda SNP17-VIC  
 <400> 115  
 aggaactgca atgcat 16

<210> 116  
 <211> 14  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Sonda SNP18-FAM  
 <400> 116  
 ctgctccgcc tgct 14

<210> 117  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Sonda SNP18-VIC  
 <400> 117  
 cctgctccac ctgct 15





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130837

②② Fecha de presentación de la solicitud: 23.05.2011

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	KITAOKA M. et al. Simultaneous visual detection of single-nucleotide variations in tuna DNA using DNA/RNA chimeric probes and ribonuclease A. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. 2009. Vol. 389, Nº. 1, páginas 6-11. ISSN 0003-2697.	1-3
A		4-18
X	VIÑAS J. et al. A Validated Methodology for Genetic Identification of Tuna Species (Genus Thunnus). PLoS One. 27.10.2009. Vol. 4, Nº. 10. ISSN 1932-6203.	1-3
A	ES 2161137 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 16.11.2001	1-18
A	US 2005233334 A1 (NAT INST OF AGROBIO SCIENCES) 20.10.2005	1-18

#### 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  
20.11.2012

Examinador  
J. Manso Tomico

Página  
1/4

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, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 20.11.2012

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-18	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 4-18	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-3	<b>NO</b>

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	KITAOKA M. et al. Simultaneous visual detection of single-nucleotide variations in tuna DNA using DNA/RNA chimeric probes and ribonuclease A. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. 2009. Vol. 389, Nº. 1, páginas 6-11. ISSN 0003-2697.	
D02	VIÑAS J. et al. A Validated Methodology for Genetic Identification of Tuna Species (Genus Thunnus). PLoS One. 27.10.2009. Vol. 4, Nº. 10. ISSN 1932-6203.	
D03	ES 2161137 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTIFICAS)	16.11.2001
D04	US 2005233334 A1 (NAT INST OF AGROBIO SCIENCES)	20.10.2005

**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 divulga un método de identificación genética e identificación del origen geográfico del atún blanco Thunnus alalunga mediante la amplificación y genotipado de una serie de polimorfismos de base única (SNPs).

Las reivindicaciones 1-3 caracterizan un conjunto de moléculas de ADN. La reivindicación 4 caracteriza el uso de tales moléculas y de los SNPs incluidos en ellas como marcadores genéticos.

Las reivindicaciones 4-14 reivindican el uso de las moléculas reivindicadas y un método de identificación genética y las reivindicaciones 15-18 caracterizan un Kit que comprende las secuencias necesarias para llevar a cabo el método.

D01 divulga un método para la confirmación, en productos alimenticios, del contenido en atún haciendo uso de la identificación de tres SNPs en un ensayo FRIP que permite la visualización mediante señales de color, de hasta tres especies diferentes simultáneamente.

D02 divulga un método de identificación de especies de atún haciendo uso de la metodología FINS, que se basa en el estudio de la hipervariabilidad de algunas regiones del ADN mitocondrial y nuclear de cada especie.

D03 divulga un procedimiento para la identificación de albacora (Thunnus alalunga) en conservas de atún blanco, albacora o bonito del norte. El procedimiento se caracteriza por amplificar un fragmento de 187 pb denominado BDR, del gen del citocromo b, localizado en el ADN mitocondrial, por la utilización secuencial de dos endonucleasas de restricción sobre dicho fragmento amplificado, y por el análisis de los fragmentos resultantes que permiten diferenciar la especie Albacora de otras especies.

D04 divulga un método para la identificación de especies animales, comprendiendo dicho método la amplificación de fragmentos de ADN por PCR

Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulga el objeto de la invención contenido en las reivindicaciones 1-18, por lo que la solicitud cumpliría con el requisito de novedad tal y como se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986.

Tomando en consideración D01 como el documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la solicitud, la diferencia entre el objeto de la invención contenido en las reivindicaciones 1-3 y este documento serían los polimorfismos identificados. Sin embargo el mero hecho de identificar polimorfismos alternativos a los divulgados, en el genoma de una especie, de sobre conocida, por ejemplo mediante alineación de secuencias ya publicadas en distintas bases de datos, se considera de realización obvia en el campo de la identificación genética de especies, por lo que no cumplirían con el requisito de actividad inventiva tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986. La diferencia entre el objeto de la invención y el documento D01 sería la combinación de 18 marcadores tipo SNP para la identificación de la especie Thunnus alalunga frente a otras especies y en segundo lugar la identificación de su origen geográfico. Esta diferencia traería consigo una mayor exactitud en la caracterización geográfica de la especie a identificar. Ninguno de los documentos del estado de la técnica tomados solos o en combinación permiten deducir de manera obvia el método y el kit objeto de las reivindicaciones 4-18 por lo que cumplirían con el requisito de actividad inventiva tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986.