

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 497 291**

21 Número de solicitud: 201300286

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

22.03.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.09.2014

Fecha de la concesión:

23.06.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

30.06.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(51.0%)**

Avenida de Séneca, 2

28040 Madrid (Madrid) ES;

UNIÓN DE CRIADORES DE TOROS DE LIDIA

(40.0%) y

ASOCIACIÓN DE GANADERÍAS DE LIDIA (9.0%)

72 Inventor/es:

CAÑÓN FERRERAS, Javier;

DUNNER BOXBERGER, Susana;

CARPIO GARCÍA, Isabel y

GARCÍA MONTERO-RÍOS, José Ignacio

54 Título: **Método para conocer la proporción que de las diferentes castas/encastes o líneas incluidas en el Prototipo Racial de la Raza Bovina de Lidia hay en animales o muestras de animales de dicha raza**

57 Resumen:

Método para conocer la proporción que de las diferentes castas/encastes o líneas incluidas en el prototipo Racial de la Raza Bovina de Lidia hay en animales o muestras de animales de dicha raza.

La presente invención se refiere a un método eficaz para afirmar con elevada fiabilidad que un ejemplar es de la raza de Lidia, para saber a qué casta, encaste o línea pertenece, y para conocer qué proporción de su genoma tiene origen en diferentes castas/encastes o líneas reconocidos en el Prototipo Racial de la Raza Bovina de Lidia del RD 60/2001 del Ministerio del Interior y cuáles son éstos. El método comprende caracterizar en la muestra problema determinadas secuencias de ADN correspondientes a marcadores (microsatélites), comparar la fórmula genética obtenida con una base de datos específica y original, y calcular la probabilidad de asignación de cada muestra a cada población de referencia, o la proporción de representación en el genoma de la muestra problema de cada casta, encaste o línea.

ES 2 497 291 B1

DESCRIPCIÓN

Método para conocer la proporción que de las diferentes castas/encastes o líneas incluidas en el Prototipo Racial de la Raza Bovina de Lidia hay en
5 animales o muestras de animales de dicha raza

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se encuadra en el sector de la Genética Animal. Más
10 concretamente se encuadra en la utilización de métodos genéticos para asignar ejemplares bovinos a la raza de Lidia y, dentro de ésta, a las distintas castas, encastes, y líneas de la raza.

ANTECEDENTES Y ESTADO DE LA TÉCNICA

15 La raza de Lidia es una de las razas bovinas más singulares por su histórico aislamiento reproductivo y especialización hacia caracteres de comportamiento relacionados con agresividad, lo que ha dado lugar a una población actual con reducida *Posibilidad de Intercambio (Exchangeability*, en su terminología inglesa) tanto genético como ecológico. El intercambio
20 genético se refiere a la existencia de flujo de genes, lo cual puede ser medido mediante el análisis del comportamiento de la frecuencia de alelos en determinados marcadores de ADN, mientras que el intercambio ecológico se refiere a la diferenciación a través de los procesos de deriva genética o selección. La aplicación de estos criterios asigna una especial singularidad a
25 la raza de lidia: es la única que se cría en un medio extensivo mediterráneo para un objetivo, la lidia, por lo que es la única raza bovina seleccionada por caracteres de comportamiento.

El flujo de genes entre esta raza y cualquier otra de la especie bovina es,
30 como se ha demostrado en varias publicaciones científicas (Cañón, Tupac-Yupanqui, et al., 2008; Cortés, Tupac-Yupanqui, et al., 2008, Cortés, Tupac-

Yupanqui, et al., 2011), muy inferior al flujo de genes entre dos razas bovinas, cualesquiera que éstas sean. La especial estructura genética de esta raza, consecuencia de un sistema de cría a lo largo de los últimos 250 años, ha conformado un conjunto de líneas, y castas o encastes claramente
5 divergentes, no sólo cuando observamos caracteres morfológicos, también cuando lo hacemos sobre caracteres de comportamiento.

En la formación de estas castas/encastes o líneas ha podido intervenir un reducido número de reproductores (“efecto fundador” por el que los animales
10 que han llegado a nuestros días de un encaste proceden de pocos animales de la ganadería fundadora) o habiendo intervenido un número relativamente elevado de reproductores durante su constitución, en algún momento se ha utilizado profusamente un toro “especial” (raceador) que ha tenido una importante contribución en la conformación genética actual de esa
15 casta/encaste o línea. Además, a lo largo de la historia de algunas ganaderías han podido influir hechos como particiones de ganaderías, epidemias, estragos de la Guerra Civil Española, o decisiones drásticas en la selección que las han llevado al borde de la extinción (cuello de botella). Ambos fenómenos, efecto fundador y cuellos de botella, llevan a una
20 reducción del tamaño efectivo y aumento, por lo tanto, de la deriva genética, la cual junto con la selección practicada para unas características tan diferentes al resto de razas bovinas la hacen difícilmente intercambiable con cualquier otra raza. Estos fenómenos tienen unas consecuencias genéticas que pueden ser detectadas mediante el análisis de marcadores de ADN.

25

Aunque sin seguir un procedimiento con base científica objetiva y cuantificable, esta división de la raza de Lidia en subpoblaciones está oficialmente reconocida mediante un procedimiento administrativo a través de una Real decreto: RD 60/2001 (B.O.E. de 13 de febrero de 2001) del
30 Ministerio del Interior sobre el “Prototipo Racial de la Raza Bovina de Lidia”, en el que se reconoce la existencia en dicha raza de castas, encastes y líneas (Tabla 1). De esta forma, el ANEXO de dicho RD es una

reglamentación por la que se establecen los criterios básicos de determinación del prototipo racial del bovino de lidia, y en su artículo 3 (*Prototipo racial por encastes*) se establece la clasificación que figura en la Tabla 1 por castas, encastes y líneas, utilizando como criterios aspectos morfológicos tales como “ejemplares de gran alzada, con cabeza y cuellos largos, mirada muy expresiva...”, que carecen de la precisión necesaria para establecer asignaciones con suficiente precisión.

La situación actual de muchos de estas castas, encastes o líneas incluidos en el ANEXO del RD 60/2001 sobre *prototipo racial de la raza bovina de lidia*, objetivamente identificables mediante herramientas moleculares de ADN, se podrían clasificar como en peligro de extinción, utilizando criterios tradicionales de clasificación del riesgo de extinción de las poblaciones, como los utilizados por la FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) (Tabla 1).

TABLA 1

Prototipo racial por encastes (Artículo 3 del RD 60/2001 de 26 de enero)

CASTA/ENCASTE	LÍNEA	Nº Ganaderías	Vacas	Sementales	% Vacas	Ranking por censo vacas a 31-12-09	Situación de riesgo según criterios de la FAO	
1- Casta Cabrera / Miura		1	228	10	0,20		En peligro	
		1	116	3	0,10		Crítica	
3- Casta Navarra		34	2.652	129	2,33	23		
	4- Concha y Sierra	1	97	6	0,09		Crítica	
	5- Veragua	8	676	28	0,59		En peligro	
6- Murube-Urquijo		44	4.744	219	4,17	26		
7- Contreras		22	963	23	0,85		En peligro	
8- Saltillo		3	106	8	0,09		En peligro	
Santa Coloma	9- Buendía	25	1.715	73	1,51	18		
	10- Graciliano Pérez-Tabernero	12	723	30	0,63		En peligro	
	11- Coquilla	10	707	22	0,62		En peligro	
	12 - Cruces, otros	34	1.814	55	1,59	19		
13- Albaserrada		4	708	43	0,62		En peligro	
14- Urcola		5	316	10	0,28		En peligro	
Derivados de Partadé	15- Gamero-Cívico	25	2.167	117	1,90	22		
	16- Pedrajas	3	205	7	0,18		En peligro	
	17- Conde de la Corte	3	191	17	0,17		En peligro	
	Atanasio Fernández	18- Atanasio Fernández	29	1.908	69	1,68	20	
		19- Lisardo Sánchez	25	2.123	81	1,86	21	
		20- Cruces	23	1.395	38	1,22	17	
	Juan Pedro Domecq	21- Juan Pedro Domecq	204	21.609	1.246	18,97	29	
		22- Marqués de Domecq	36	2.815	123	2,47	24	
		23- Osborne	13	968	43	0,85		En peligro
		24- Cruces, otros	165	13.520	659	11,87	28	
25- Núñez	86	6.591	337	5,79	27			
26- Torrestrella	36	3.301	159	2,90	25			
Cruces Vistahermosa	27- Hidalgo Barquero	6	653	37	0,57		En peligro	
	28- Vega-Villar	10	743	38	0,65		En peligro	
	29- Villamarta	10	533	54	0,47		En peligro	
30- Cruces entre castas fundacionales y encastes		529	39.612	2.176	34,78	30		

5

De acuerdo con la normativa del Libro Genealógico de la Raza Bovina de Lidia, para que un animal inscrito en el Libro Genealógico pueda ser considerado como reproductor, debe inscribirse en el Registro Definitivo. Para ello el ganadero debe solicitar a la asociación a la que pertenezca su

inscripción en el Registro Definitivo, reuniendo los criterios necesarios para su inscripción a juicio de la asociación a que pertenezca. Los criterios mínimos para dicha inscripción son que sean seleccionados y aprobados por el ganadero como reproductores con su criterio personal de selección.

5

Aceptada oficialmente la existencia de una estratificación en la raza de Lidia (RD 60/2001), y existiendo criterios objetivos para definir muchas de dichas subpoblaciones como en grave riesgo de extinción, sería de gran utilidad disponer de un procedimiento o método que permita asignar a un ejemplar como perteneciente a alguna de las oficialmente reconocidas subpoblaciones de dicha raza, de tal forma que actuaciones futuras encaminadas a favorecer la conservación de castas o encastes se dediquen a los ejemplares o ganaderías que cumplan la condición de pertenencia genética a dichas casta o encastes meritorias de dichas actuaciones de conservación.

15

Por otro lado, muchas ganaderías actuales, que son el resultado de mezclas de castas, encastes o líneas, tienen dificultades para dirigir el futuro genético de las mismas hacia alguna de las castas, encastes o líneas de elección, resultando la selección basada en los criterios morfológicos del RD 60/2001 poco eficiente por la reducida capacidad predictiva de dichos criterios.

20

No se conoce ninguna patente que describa un método objetivo informatizado para realizar la asignación de ejemplares a la raza de Lidia, y dentro de ella a las diferentes castas/encastes o líneas oficialmente reconocidas.

25

Existe, por lo tanto, la necesidad de un método para realizar asignaciones de ejemplares a las diferentes castas y encastes definidos en la raza de Lidia, que permita garantizar el origen genético de un ejemplar o conjunto de ejemplares en una ganadería con el fin de poder participar en posibles futuros programas de conservación del patrimonio genético de la raza de Lidia.

30

El objeto de la presente invención es definir un método objetivo y eficaz tanto para garantizar aspectos de trazabilidad de los ejemplares, como para garantizar el origen genético de los mismos.

5 DESCRIPCION DE LA INVENCION

Método para conocer la proporción que de las diferentes castas/encastes o líneas incluidas en el Prototipo Racial de la Raza Bovina de Lidia hay en animales o muestras de animales de dicha raza.

10

General

El método de la invención permite realizar la asignación de ejemplares y productos de la especie bovina a la raza de Lidia y a castas/encastes o líneas apoyada en una base de datos específica y original. Este método es eficaz para poder afirmar con fiabilidad que un ejemplar bovino es de raza de Lidia o está cruzado, así como para saber a qué casta, encaste o línea pertenece un ejemplar de la raza de Lidia, o qué proporción de su composición genética proviene de diferentes orígenes genéticos. El método comprende caracterizar determinadas secuencias de ADN pertenecientes a marcadores genéticos, denominados microsatélites, en la muestra problema, comparar la "firma" o huella genética obtenida con una base de datos de referencia, y calcular la probabilidad de asignación de la muestra a las diferentes poblaciones de referencia, o la proporción de representación en el genoma de la muestra problema de cada casta, encaste o línea, mediante programas y equipos informáticos.

El método de la presente invención permite, por lo tanto, certificar la composición genética tanto de animales *in vivo* como de productos o restos (astas, huesos, piel, pelo, etc.) provenientes de dichos animales de una forma objetiva y eficaz. También es posible detectar mezclas de castas/encastes o líneas genéticas de forma que permite una gestión adecuada de los

reproductores mediante la selección de aquellos que presenten una composición genética adecuada a intereses concretos. Se trata de un sistema eficiente y objetivo para trazar genéticamente ejemplares de Lidia permitiendo asignarlos a castas/encastes o líneas para llevar a cabo gestiones de conservación o de selección.

El elevado grado de conocimiento del genoma bovino proporciona información de marcadores de ADN que permiten la identificación inequívoca de cualquier individuo de esta especie. La organización de los individuos en poblaciones con estructuras genéticas subyacentes permiten, primero que estas sean detectadas y, como consecuencia, conocer la proporción de genoma individual que proviene o tiene su origen en dichas estructuras genéticas previamente detectadas. El problema del análisis del origen genético de muestras anónimas puede ser enfocado desde dos perspectivas diferentes. En la primera el problema se plantea como una cuestión categórica, no probabilística, en el sentido de que, descartados errores de laboratorio, la presencia de determinadas huellas de ADN en la muestra (o mezcla de muestras) permite rechazar un origen genético determinado, por ejemplo una determinada casta/encaste o línea. La otra perspectiva plantea esta cuestión como un problema de asignación del ejemplar a una determinada población. La asignación es probabilística y puede a su vez tener dos enfoques: 1) La muestra problema se asignará a la población en la que su composición genética proporcione una mayor probabilidad, no se excluye la asignación del ejemplar a otras poblaciones aunque con probabilidades más bajas; 2) En el segundo enfoque se trata de calcular para la muestra problema la probabilidad de que cada una de las poblaciones de referencia consideradas en el análisis sea su población de origen, e incluso, qué proporción de su genoma tiene origen en cada una de ellas.

Los métodos estadísticos basados en máxima verosimilitud, inferencia bayesiana o regresión logística son tradicionalmente los utilizados para llevar a cabo la asignación de muestras anónimas a poblaciones de referencia.

En el método de la presente invención se analizan 24 marcadores microsatélites, 19 de ellos seleccionados y recomendados por la FAO para estudios de diversidad genética en la especie bovina y los otros 5 son utilizados por su gran potencia de discriminación específicamente en la raza bovina de Lidia. Los microsatélites se analizan en un secuenciador automático previa adecuada preparación que consiste en una amplificación mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Mullis, Falcoma et al., 1986), mediante procedimientos estándar establecidos internacionalmente a través de la coordinación amparada por el ISAG (*International Society of Animal Genetics*), y el genotipado de los fragmentos (alelos) se realiza mediante programas informáticos adecuados.

Construcción de la base de datos de la raza bovina de Lidia

Desde el año 1997 hemos llevado a cabo un proceso de creación de un banco de ADN con muestras provenientes de ganaderías, que han sido utilizadas para caracterizar y definir poblaciones de referencia, las cuales estaban *a priori* definidas oficialmente mediante el RD 60/2001 sobre prototipo racial de la raza bovina de lidia.

Como quiera que la inmensa mayoría del ganado lidia procede de ganaderías que son o fueron de la Unión de Criadores de Toros de Lidia (UCTL), entidad que entre 1905 y 1936 englobó prácticamente al 100 % de las ganaderías de lidia de España y Portugal, en 1997 se inició un estudio histórico de las ganaderías contemporáneas de la UCTL por parte de su personal técnico, utilizando distintos documentos del Archivo Histórico de la UCTL, amplia y diversa bibliografía taurina y la información sobre animales que aparece en el Libro Genealógico de la Raza Bovina de Lidia, que aunque oficialmente se puso en marcha en 1992, contiene información genealógica que se remonta incluso 50 años. Además de la bibliografía empleada, se contó con el testimonio de numerosos ganaderos, que a través del contenido de sus libros de ganaderías y de los de sus antecesores, nos ha permitido completar o

matizar la historia de la formación de las ganaderías para la selección del material de referencia.

5 Como consecuencia de dicho proceso, se pudo identificar ganaderías, y dentro de ellas animales, con orígenes definidos, que contaban con un aislamiento genético superior a los 40 años, en que no se había introducido ganado de otras procedencias. Una vez definidas dichas poblaciones puras que existían en las ganaderías de la UCTL, el personal técnico de la UCTL seleccionó las ganaderías más representativas de cada población, dando
10 prioridad a las ganaderías madres que habían vendido reses a otros ganaderos, que se suponía albergaban la mayor parte de diversidad genética de cada población.

Protocolo de toma de muestras

15

Las muestras de sangre fueron tomadas por los veterinarios en tubos de sangre con conservante de ADN Magic Buffer® (BIOGEN Diagnostica, España). Cada muestra se identificaba individualmente con el código genealógico del animal y antes de su envío al Laboratorio de Genética se
20 comprobaba su identificación y que cada animal muestreado figuraba inscrito en el Libro Genealógico con toda su información genealógica.

En la mayoría de las ocasiones, se tomaron muestras de sangre de becerros aprovechando la operación del herradero, de al menos 25 machos y 25
25 hembras en el caso de que alguna ganadería fuera la única representante de una población, y al menos 15 machos y 15 hembras por ganadería cuando una población estaba representada por más de una ganadería. Se buscaba que los animales fueran contemporáneos para que la muestra fuera representativa de los genes que albergaba cada ganadería. Por este motivo,
30 las muestras se recogieron en el herradero, salvo en el caso de 5 ganaderías, en las que los animales se eligieron entre los que pertenecían a la población objeto de estudio, al tener, a diferencia del resto de ganaderías estudiadas,

ganado puro y cruzado o de otras procedencias. En dos de las ganaderías, dado el escaso número de efectivos de la población, se tomaron muestras de animales de diferentes edades para reunir el mínimo número necesario de muestras para su estudio.

5

Se pudo, de esta forma, definir perfiles genéticos precisos para el conjunto de poblaciones de referencia que integran nuestra base de datos, lo que representa el soporte técnico para asignar eficientemente individuos anónimos a la raza de Lidia y a sus subpoblaciones (castas/encastes o líneas).

10

Material Animal

Se han analizado y estudiado muestras de la raza bovina de Lidia que representan de forma significativa a las principales castas/encastes y líneas de esta raza definidas en el RD 60/2001. Se incluyeron, además, muestras de otras razas bovinas mansas que hipotéticamente son consideradas como ancestralmente próximas. En resumen, se analizaron 28 castas/encastes o líneas de la raza de Lidia de las que figuran en el RD 60/2001, y además se incluyeron perfiles genéticos de otras 9 variedades que presentan un grado de aislamiento genético como para poder ser considerados encastes o líneas.

15

20

El número de muestras por población se muestra en la siguiente tabla:

	CASTA/ENCASTE	LÍNEA	Nº de muestras	
	1- Casta Cabrera / Miura		46	
	2- Casta Gallardo / Pablo-Romero		50	
	3- Casta Navarra		63	
	Casta Vazqueña	4- Concha y Sierra	46	
		5- Veragua	32	
5	Derivados de Parladé	6- Murube-Urquijo	120	
		7- Contreras	118	
		8- Saltiilo	82	
		Santa Coloma	9- Buendía	30
			10- Graciliano Pérez-Tabernero	15
			11- Coquilla	31
			12- Cruces, otros	200
		13- Albaserrada	83	
		14- Urcola	60	
10		Derivados de Parladé	15- Gamero-Cívico	93
			16- Pedrajas	60
			17- Conde de la Corte	50
	Atanasio Fernández		18- Atanasio Fernández	81
			19- Lisardo Sánchez	31
			20- Cruces	118
	Juan Pedro Domecq		21- Juan Pedro Domecq	120
			22- Marqués de Domecq	30
			23- Osborne	51
			24- Cruces, otros	99
15		25- Núñez	181	
		26- Torrestrella	50	
	Cruces Vistahermosa	27- Hidalgo Barquero	164	
		28- Vega-Villar	110	
		29- Villamarta	91	
20	30- Cruces entre castas fundacionales y encastes			
	Otros encastes fuera del RD 60/2001	31- Antonio Pérez	63	
		32- Cuadri	61	
		33- Baltasar Ibán	73	
		34- José Marzal	50	
		35- Braganza	50	
		36- Araúz de Robles	52	
		37- María Montalvo	28	
25			38- Manuel Arranz	61
			39- Félix Gómez	72
	Número total de muestras de la raza de Lidia		2815	
	Otras Razas bovinas mansas			
	Raza Retinta		50	
	Raza Morucha		50	
	Raza Avileña-Negra-Ibérica		50	
30	Número total de muestras de otras razas		150	

La principal dificultad en este proceso es la adecuada elección de los ejemplares como representantes de las poblaciones de referencia. En este

sentido se dispuso de la precisa información que sobre la historia genealógica de las ganaderías está disponible en los archivos de la UCTL. El proceso de constitución de la base de datos se llevó a cabo en dos etapas, siendo la primera el muestreo de los animales en las ganaderías utilizando la información genealógica disponible en la UCTL tal y como se explica en el apartado sobre el Protocolo de toma de muestras, y la segunda la eliminación de todos aquellos ejemplares que mostraron un comportamiento significativamente alejado del promedio del conjunto de ejemplares de la casta, encaste o línea.

10

Obtención y preparación de las muestras

Se recogieron entre 5 y 10 ml de sangre en tubos que contienen un conservante de ADN, Magic Buffer® (BIOGEN Diagnostica, España), que es capaz de mantener intacto el ADN a temperatura ambiente hasta su análisis en el laboratorio, lo que facilita el manejo y gestión de las muestras.

El ADN de la muestra de sangre se extrajo siguiendo un protocolo estándar de lisis celular y fenol cloroformo (Sambrook y col. 1989).

20

Se analizaron 24 marcadores genéticos del tipo denominado microsatélite (Tabla 2), de los que 19 pertenecen al conjunto de los seleccionados y recomendados por la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) para estudios de diversidad genética en la especie bovina y los otros 5 son utilizados por su gran potencia de discriminación específicamente en la raza bovina de Lidia. Los microsatélites se amplificaron mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador PTC 100 según el método de Mullis, Falcoma et al., (1986) utilizando como cebadores y condiciones de hibridación para su amplificación lo reflejado en la tabla 3. Para separar los fragmentos generados mediante la PCR, éstos se sometieron a una electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI 3130.

TABLA 2

Denominación de los microsatélites utilizados y su ubicación cromosómica

<i>Nombre del marcador</i>	<i>Cromosoma</i>	<i>Temperatura de hibridación</i>	<i>Nombre del marcador</i>	<i>Cromosoma</i>	<i>Temperatura de hibridación</i>
BM1824	1	57°C	CSSM66	14	55°C
BM2113	2	55°C	HEL1	15	55°C
INRA23	3	55°C	INRA35	16	57°C
RM188	4	55°C	TGLA53	16	57°C
ETH10	5	55°C	ETH185	17	57°C
BM143	6	57°C	TGLA227	18	55°C
ILSTS006	7	57°C	ETH3	19	57°C
HEL9	8	57°C	TGLA126	20	57°C
ETH225	9	55°C	HEL5	21	55°C
INRA37	10	57°C	TGLA122	21	57°C
BMS2057	12	55°C	HAUT24	22	57°C
AGLA232	13	55°C	DRB	23	55°C

Genotipado de las muestras

5

El análisis de los fragmentos y su clasificación alélica se realizó mediante los programas informáticos GENESCAN ANALYSIS versión 4.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

10

El programa GENESCAN ANALYSIS analiza los datos en forma de picos recogidos del secuenciador automático y proporciona información del tamaño de los fragmentos obtenidos gracias a la electroforesis simultánea de un estándar de tamaños. Una vez que se obtiene el tamaño de cada pico se procede a definir los rangos en los que aparecen picos correspondientes a cada marcador y a seleccionar aquellos que representan un alelo y a descartar picos secundarios e inespecíficos.

15

Los datos generados (los dos alelos de cada uno de los 24 marcadores para cada ejemplar) se almacenaron en una base de datos y fueron constituyendo la base de datos de las poblaciones de referencia, en nuestro caso de las castas/encastes o líneas de la raza de lidia.

20

TABLA 3: Cebadores y condiciones utilizadas para la amplificación de cada uno de los microsatélites utilizados

Nombre del marcador	Cebador (3'-5'): directo	SEQ ID NO	Reverso	SEQ ID NO	Temperatura de hibridación	Fluorocromo	Lote	CIMg	Tamaño
BM1824	GAGCAAGGTGTTTTCCAATC	1	CATTCTCCAAGTCTTCCCTTG	2	57°C	Vic	II	1,5	179-189
BM2113	GCTGCCTTCTACCAAATACCC	3	CTTCCTGAGAGAAGCAACACC	4	55°C	Vic	I	1,5	128-142
INRA23	TAACTACAGGGTGTAGATGAACTC	5	GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC	6	55°C	Ned	I	1,5	199-217
RM188	GGGTTCAAAAAGAGCTGGAC	7	GCACTATTGGGCTGGTGATT	8	55°C	Ned	I	1,5	118-140
ETH10	GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA	9	CCTCCAGCCCACTTCTCTCTC	10	55°C	Fam	I	1,5	215-223
BM143	ACCTGGGAAGCCTCCATATC	11	CTGCAGGCAGATTCITTTATCG	12	57°C	Ned	II	1,5	87-111
ILSTS006	TGCTGTATTTCTGCTGTGG	13	ACACGGAAGCGATCTAAACG	14	57°C	Fam	II	1,5	289-307
HEL9	CCCATTCAAGTCTCAGAGGT	15	CACATCCATGTTCTCACCCAC	16	57°C	Ned	II	1,5	151-171
ETH225	GATCACCTTGGCCACTATTTCT	17	ACATGACAGCCAGCTGTACT	18	55°C	Fam	I	1,5	139-149
INRA37	GATCCTGTATATTTAAACCAC	19	AAAATTCATGGAGAGAGAAAC	20	57°C	Vic	II	1,5	124-132
BMS2057	CAAGGTGACACTGAGGAACC	21	GAAGAAAGATTATCAACCCTGC	22	55°C	Fam	I	1,5	94-104
AGLA232	CCTTTGCAAATACCTCTGACCAG	23	AATGGTCTACATTTGCTAGGTGC	24	55°C	Ned	I	1,5	155-177
CSSM66	ACAAAAATCCTTTCTGCCAGCTGA	25	AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG	26	55°C	Ned	IV	1,5	179-199
HEL1	CAACAGCTATTTAACAAGGA	27	AGGCTACAGTCCATGGGATT	28	55°C	Vic	I	1,5	103-115
INRA35	ATCCTTTGCAGCCTCCACATTG	29	TTGTGCTTTATGACACTATCCG	30	57°C	Vic	II	1,5	102-112
TGLA53	GCTTTCAGAAATAGTTGCATTCA	31	ATCTTCACATGATATTACAGCAGA	32	57°C	Pet	III	1,5	149-181
ETH185	TGCATGGACAGAGCAGCCTGGC	33	GCACCCCAACGAAAGCTCCCG	34	57°C	Ned	II	1,5	220-236
TGLA227	CGAATCCAAAATCTGTTAAATTTGCT	35	ACAGACAGAAACTCAATGAAAGCA	36	55°C	Ned	I	1,5	79-99
ETH3	GAACCTGCCTCTCTGCAATTGG	37	ACTCTGCCTGTGGCCAAAGTAGG	38	57°C	Fam	V	1,5	117-125
TGLA126	CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT	39	TTGGTCTCTATCTCTGAATATCC	40	57°C	Ned	III	1,5	119-127
HEL5	GCAGGATCACTGTTAGGGA	41	AGACGTTAGTGACATTAAC	42	55°C	Fam	I	1,5	151-167
TGLA122	CCCTCCTCCAGGTAATCAGC	43	AATCACATGGCAAATAAGTACATAC	44	57°C	Fam	II	1,5	138-170
HAUT24	CTCTCTGCCTTTGCTCCTGT	45	AATACACTTTAGGAGAAAAATA	46	57°C	Fam	III	1,5	106-124
DRB	GAGAGTTTCACTGTGCAG	47	CGTACCCAGA(GóT)TGAGTGAAGTATC	48	55°C	Vic	I	1,5	154-190

La eficiencia de la asignación depende de la fiabilidad de la base de datos de referencia. En nuestro caso, la base de datos de referencia comprende 2815 muestras de castas/encastes o líneas representativas de la actual raza de Lidia que han mostrado diferencias genéticas significativas con el conjunto de marcadores utilizado, así como un número representativo de tres razas bovinas mansas (Morucha, Retinta y Avileña-Negra-Ibérica) filogenéticamente próximas a lo que actualmente se considera raza de Lidia. Los niveles de efectividad están relacionados con el grado de diferenciación genética entre las castas/encastes o líneas y la potencia de discriminación del conjunto de marcadores moleculares utilizados, siendo una forma de medir esta última, la tasa de éxito en la asignación de muestra anónimas al grupo genético al que pertenecen (*clustering success rate*). En nuestro caso, debido al elevado grado de diferenciación genética entre las castas, encastes o líneas, la efectividad, utilizando el procedimiento descrito por Rosenberg et al. (2001), es en promedio del 95,3 %, y para la mitad de las castas, encastes o líneas (Arauz Robles, Baltasar Ibán, Conde de la Corte, Cuadri, Gamero Cívico, Manuel Arranz, Albasarreda, Miura, Murube, Pablo Romero, Pedrajas, Saltillo, Veragua) dicha efectividad es del 100 %, valores difícilmente alcanzables por otros métodos basados en criterios morfológicos como los descritos en el RD 60/2001.

Proceso para la verificación del origen genético de animales de la raza de lidia

Con este método podemos asignar individuos (bovinos) a poblaciones (castas/encastes o líneas). También podemos identificar si en un individuo problema existe una mezcla de castas/encastes o líneas y en qué proporción relativa.

Utilizamos un método basado en inferencia bayesiana instalado en el programa informático STRUCTURE (Pritchard, Stephen, et al, 2000) que permite asignar a muestras de animales de la raza de lidia coeficientes de

pertenencia (probabilidades) a cada una de las castas/encastes o líneas genéticas incluidas como poblaciones de referencia. Este coeficiente corresponde al porcentaje de genoma del ejemplar que tiene su origen en una determinada casta/encaste o línea genética. El coeficiente referido es la
5 distribución posterior de cada porcentaje de genoma que tiene su origen en las diferentes poblaciones de referencia. El procedimiento de análisis utiliza las opciones del programa informático STRUCTURE que asume la existencia de “mezclas” entre las diferentes poblaciones de referencia, así como correlación entre las frecuencias alélicas de los grupos genéticos.

10

Para la validación utilizamos el algoritmo propuesto por Rosenberg, Burke, *et al.* (2001) para la aplicación de STRUCTURE a la asignación de individuos a poblaciones y cuya secuencia se describe a continuación:

15

PASO 1:

Elección de K , el número de grupos genéticos con el que trabajar.

PASO 2:

Se ejecuta STRUCTURE con el K elegido.

Cada ejemplar se asocia con el grupo genético en el que tiene mayor
20 porcentaje de representación.

PASO 3:

Para cada grupo genético se determinan las poblaciones que tienen en él a más del 25% de sus individuos.

Si sólo hay una población en esas condiciones, se asocia unívocamente ese
25 grupo genético con esa población, de forma que en el paso 4, todo individuo que caiga en ese grupo genético se identificará como perteneciente a esa población asociada, aunque realmente no provenga de ella (lo que llevará a contabilizar un error en el paso 5).

Si no hay ninguna población en esas condiciones, NO se asocia ninguna
30 población concreta a ese grupo genético.

Si hay más de una población en esas condiciones, se vuelve a ejecutar el programa Structure con todos los individuos del grupo genético, tanto los que

pertenecen a las poblaciones que cumplen las condiciones, como los que pertenecen a otras, pero que han sido asignados a ese grupo genético. Para cada sub-grupo genético obtenido así, se identifican las poblaciones que tienen en él (en el sub-grupo genético) más del 60% de sus miembros presentes en el grupo genético “padre”.

PASO 4:

Se asignan individuos a poblaciones.

Para cada individuo se busca el grupo genético al que pertenece.

10 Si en el paso 3 no se asoció ninguna población a ese grupo genético, entonces el individuo se asigna aleatoriamente a una de las N poblaciones conocidas, siendo la probabilidad de asignación a una determinada población proporcional al tamaño de ésta en la muestra original.

15 Si en el paso 3 se asoció una única población a ese grupo genético, el individuo se asigna a esa población, pertenezca o no a ella.

Si en el paso 3 se asociaron varias poblaciones al grupo genético, se utiliza la salida correspondiente a la ejecución del programa STRUCTURE realizada con los individuos de ese grupo genético y el número de sub-grupos genéticos correspondientes (e igual al número de poblaciones identificadas para el grupo genético). Se asocia el individuo al sub-grupo genético en el que tiene mayor porcentaje de representación.

20 Si para ese sub-grupo genético no se ha identificado ninguna población, se asigna aleatoriamente el individuo a una de las poblaciones identificadas en el grupo genético “padre”, siendo la probabilidad de asignación a una determinada población proporcional al tamaño de ésta en la muestra original.

25 Si para ese sub-grupo genético sólo se ha identificado una única población al final del paso 3, se asigna ese individuo a esa población.

30 Si para ese sub-grupo genético se ha identificado más de una población, se asigna aleatoriamente el individuo a una de estas poblaciones identificadas en el sub-grupo genético, siendo la probabilidad de asignación a una determinada población proporcional al tamaño de ésta en la muestra original.

PASO 5:

Se cuentan los individuos asignados correctamente a su población de origen y se calcula el porcentaje de asignaciones correctas.

5 *Bibliografía*

Boletín Oficial del Estado, 2001. Real Decreto 60/2001, de 26 de enero, sobre prototipo racial de la raza bovina de lidia. Boletín Oficial del Estado 38, 5255–61.

10

Cañón, J., Tupac-Yupanqui, I., García-Atance, M. A., Cortes, O., García, D., Fernández, J., Dunner, S., 2008. Genetic variation within the Lidia bovine breed. *Animal Genetics*, 39: 439-445.

15

Cortés, O., Tupac-Yupanqui, I., Dunner, S., García-Atance, M.A., García, D., Fernández, J., Cañón, J., 2008. Ancestral matrilineages and mitochondrial DNA diversity of the Lidia cattle breed. *Animal Genetics*, 39: 649-954.

20

Cortés, O., Tupac-Yupanqui, I., Dunner, S., Fernández, J., Cañón, J., 2011. Y chromosome genetic diversity in the Lidia bovine breed: a highly fragmented population. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 128:491-498.

25

Food and Agriculture Organization (FAO), 1993. Secondary guidelines for development of National Farm Animal Genetic Resources Management Plans for measurement of domestic animal diversity (MoDAD). FAO, Original Working Group Report, Rome, Italy.

Pritchard J.K., Stephens M. & Donnelly P., 2000. Inference of population structure from multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–59.

30

Rosenberg N.A., Burke T., Elo K., Feldman M.W., Freidlin P.J., Groen M.A.M., Hillel J., Mäki-Tanila A., Tixier-Boichard M., Vignal A., Wimmers K. & Weigend S., 2001. Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. *Genetics* 159, 699–713.

Mullis, K., F. Falcoma, *et al.*, 1986. "Specific amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction". *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 51: 260.

- 5 Sambrook J, Fritsch, EF & Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Volumen 1. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

REIVINDICACIONES

1. Método para conocer la proporción que de las diferentes castas/encastes o líneas incluidas en el Prototipo Racial de la Raza Bovina de Lidia hay en animales o muestras de animales de dicha raza, que comprende:
- 5
- a) Analizar una muestra de un animal o de un producto de un animal que contenga material genético, mediante la obtención en las muestras problema de las 24 secuencias de ADN de marcadores del tipo microsatélite definidas por las secuencias de los cebadores (SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 48), realizándose la separación de los fragmentos generados por PCR y su clasificación alélica, obteniéndose su genotipo para los 24 marcadores, utilizando como parámetro la longitud de los fragmentos medidos en pares de bases (pb).
- 10
- b) Comparar el genotipo obtenido en a) con los perfiles genéticos poblacionales obtenidos para la población bovina de Lidia global y precisando su pertenencia a las castas, encastes o líneas de referencia (Miura; Pablo-Romero; Casta Navarra; Concha y Sierra; Veragua; Murube-Urquijo; Contreras; Saltillo; Buendía; Graciliano Pérez-Tabernero; Coquilla; Albaserrada; Urcola; Gamero-Cívico; Pedrajas; Conde de la Corte; Atanasio Fernández; Lisardo Sánchez; Juan Pedro Domecq; Marqués de Domecq; Osborne; Núñez; Torrestrella; Hidalgo Barquero; Vega-Villar; Villamarta; Antonio Pérez; Cuadri; Baltasar Ibán; José Marzal; Braganza; Araúz de Robles; María Montalvo; Manuel Arranz; Félix Gómez).
- 15
- 20
- 25
- c) Asignar a la muestra los coeficientes de pertenencia a cada una de las castas/encastes o líneas genéticas de la raza de Lidia incluidas como poblaciones de referencia en el análisis, en función del parecido genético obtenido de la comparación del paso b) entre la muestra problema y los diferentes perfiles genéticos poblacionales.
- 30

Listado de Secuencias

<110> Universidad Complutense de Madrid; Unión de Criadores de Lidia; Asociación de Ganaderías de Lidia

<120> Método para conocer la proporción que de las diferentes castas/encastes o líneas incluídas en el Prototipo Racial de la Raza Bovina de Lidia hay en animales o muestras de animales de dicha raza

<160> 48

<170> BISSAP 1.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Bos taurus

<220>

<221> source

<222> 1..21

<223> /mol_type="DNA"
/organism="Bos taurus"

<400> 1

gagcaaggtg tttttccaat c

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Bos taurus

<220>

<221> source

<222> 1..21

<223> /mol_type="DNA"
/organism="Bos taurus"

<400> 2

cattctcaa ctgcttcctt g

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Bos taurus

<220>

<221> source

<222> 1..21

<223> /mol_type="DNA"
/organism="Bos taurus"

<400> 3

gctgccttct accaaatacc c

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Bos taurus

<220>

<221> source

<222> 1..21

<223> /mol_type="DNA"

```

    /organism="Bos taurus"
<400> 4
cttcctgaga gaagcaacac c
21

<210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
    /organism="Bos taurus"

<400> 5
taactacagg gtgtagatg aactc
25

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..24
<223> /mol_type="DNA"
    /organism="Bos taurus"

<400> 6
gagtagagct acaagataaa cttc
24

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
    /organism="Bos taurus"

<400> 7
gggttcacaa agagctggac
20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
    /organism="Bos taurus"

<400> 8
gcactattgg gctggtgatt
20

<210> 9
<211> 23

```

```

<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..23
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Bos taurus"

<400> 9
gttcaggact ggccctgcta aca                                     23

<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..23
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Bos taurus"

<400> 10
cctccagccc actttctctt ctc                                     23

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Bos taurus"

<400> 11
acctggaag cctccatatc                                         20

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..21
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Bos taurus"

<400> 12
ctgcaggcag attctttatc g                                       21

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Bos taurus"

```

<400> 13
tgtctgtatt tctgctgtgg 20

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
/organism="Bos taurus"

<400> 14
acacggaagc gatctaaacg 20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
/organism="Bos taurus"

<400> 15
cccattcagt cttcagaggt 20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
/organism="Bos taurus"

<400> 16
cacatccatg ttctcaccac 20

<210> 17
<211> 22
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..22
<223> /mol_type="DNA"
/organism="Bos taurus"

<400> 17
gatcaccttg ccactatttc ct 22

<210> 18
<211> 21
<212> DNA

```

<213> Bos taurus
<220>
<221> source
<222> 1..21
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Bos taurus"

<400> 18
acatgacagc cagctgctac t                                21

<210> 19
<211> 22
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..22
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Bos taurus"

<400> 19
gatcctgctt atatttaacc ac                                22

<210> 20
<211> 22
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..22
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Bos taurus"

<400> 20
aaaattccat ggagagagaa ac                                22

<210> 21
<211> 21
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..21
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Bos taurus"

<400> 21
caaagtgac actgaggaac c                                  21

<210> 22
<211> 22
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..22
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Bos taurus"

```

<400> 22
gaaggaagat tatcaaccct gc 22

<210> 23
<211> 24
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..24
<223> /mol_type="DNA"
/organism="Bos taurus"

<400> 23
cctttgcaaa tacctcctga ccag 24

<210> 24
<211> 25
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
/organism="Bos taurus"

<400> 24
aatggttcta catttgctag gtgtc 25

<210> 25
<211> 24
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..24
<223> /mol_type="DNA"
/organism="Bos taurus"

<400> 25
acacaaatcc tttctgccag ctga 24

<210> 26
<211> 24
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..24
<223> /mol_type="DNA"
/organism="Bos taurus"

<400> 26
aatttaatgc actgaggagc ttgg 24

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> Bos taurus

```

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Bos taurus"

<400> 27
caacagctat ttaacaagga                                20

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Bos taurus"

<400> 28
aggctacagt ccatgggatt                                20

<210> 29
<211> 22
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..22
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Bos taurus"

<400> 29
atcctttgca gcctccacat tg                            22

<210> 30
<211> 22
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..22
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Bos taurus"

<400> 30
ttgtgcttta tgacactatc cg                            22

<210> 31
<211> 24
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..24
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Bos taurus"

<400> 31

```

gctttcagaa atagtttgca ttca 24

<210> 32
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Bos taurus

<220>
 <221> source
 <222> 1..24
 <223> /mol_type="DNA"
 /organism="Bos taurus"

<400> 32
 atcttcacat gatattacag caga 24

<210> 33
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Bos taurus

<220>
 <221> source
 <222> 1..22
 <223> /mol_type="DNA"
 /organism="Bos taurus"

<400> 33
 tgcattggaca gagcagcctg gc 22

<210> 34
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Bos taurus

<220>
 <221> source
 <222> 1..22
 <223> /mol_type="DNA"
 /organism="Bos taurus"

<400> 34
 gcacccaac gaaagctccc ag 22

<210> 35
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Bos taurus

<220>
 <221> source
 <222> 1..25
 <223> /mol_type="DNA"
 /organism="Bos taurus"

<400> 35
 cgaattccaa atctgttaat ttgct 25

<210> 36
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Bos taurus

```

<220>
<221> source
<222> 1..24
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Bos taurus"

<400> 36
acagacagaa actcaatgaa agca                                24

<210> 37
<211> 22
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..22
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Bos taurus"

<400> 37
gaacctgcct ctctgcatt gg                                  22

<210> 38
<211> 22
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..22
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Bos taurus"

<400> 38
actctgcctg tggccaagta gg                                22

<210> 39
<211> 25
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Bos taurus"

<400> 39
ctaatttaga atgagagagg cttct                              25

<210> 40
<211> 25
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Bos taurus"

<400> 40
ttggtctcta ttctctgaat attcc                              25

```

<210> 41
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Bos taurus

<220>
 <221> source
 <222> 1..20
 <223> /mol_type="DNA"
 /organism="Bos taurus"

<400> 41
 gcaggatcac ttgtaggga 20

<210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Bos taurus

<220>
 <221> source
 <222> 1..20
 <223> /mol_type="DNA"
 /organism="Bos taurus"

<400> 42
 agacgttagt gtacattaac 20

<210> 43
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Bos taurus

<220>
 <221> source
 <222> 1..21
 <223> /mol_type="DNA"
 /organism="Bos taurus"

<400> 43
 ccctcctcca ggtaaatacag c 21

<210> 44
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Bos taurus

<220>
 <221> source
 <222> 1..25
 <223> /mol_type="DNA"
 /organism="Bos taurus"

<400> 44
 aatcacatgg caaataagta catac 25

<210> 45
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Bos taurus

<220>

```

<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Bos taurus"

<400> 45
ctctctgcct ttgtccctgt                                     20

<210> 46
<211> 22
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..22
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Bos taurus"

<400> 46
aatacacttt aggagaaaaa ta                                 22

<210> 47
<211> 18
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..18
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Bos taurus"

<400> 47
gagagtttca ctgtgcag                                     18

<210> 48
<211> 24
<212> DNA
<213> Bos taurus

<220>
<221> source
<222> 1..24
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Bos taurus"

<400> 48
cgtaccaga ktgagtgaag tatc                               24

```



21 N.º solicitud: 201300286

22 Fecha de presentación de la solicitud: 22.03.2013

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

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

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CAÑÓN, J. et al., 'Genetic variation within the Lidia bovine breed', ANIMAL GENETICS, 2008, Vol. 39, No. 4, páginas 439-445, ISSN: 0268-9146, Materiales y Métodos, Tabla S1; Resultados y Discusión.	1
A	MARTÍNEZ, A.M. et al., 'Genetic footprints of Iberian cattle in America 500 years after the arrival of Columbus', PLOS ONE, 2012, Vol. 7, No.11, página e49066, ISSN: 1932-6203 (electronic), todo el documento.	1
A	CAÑÓN, J. et al., 'Relative breed contributions to neutral genetic diversity of a comprehensive representation of Iberian native cattle.', ANIMAL, 2011, Vol. 5, No. 9, páginas 1323-1334, todo el documento.	1
A	MARTÍN-BURRIEL, I. et al., 'Genetic diversity, structure, and breed relationships in Iberian cattle', JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE, 2011, Vol. 89, No. 4, páginas 893-906, ISSN 0021-8812, todo el documento.	1
A	BICALHO, H.M. et al., 'Determination of ancestral proportions in synthetic bovine breeds using commonly employed microsatellite markers', GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH, 2006, Vol. 5, No.3, páginas 432-437, ISSN:1676-5680 (print), todo el documento.	1
A	FAO (2011). 'Molecular genetic characterization of animal genetic resources'. FAO Animal Production and Health Guidelines [on line], No 9. Roma. Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO) [recuperado el 05.06.2013]. Recuperado de internet: <URL: http://www.fao.org/docrep/014/i2413e/i2413e00.pdf >, Apéndice 7, páginas 68-69.	1
A	PRITCHARD, J.K. et al., 'Inference of population structure using multilocus genotype data', GENETICS, 2000, Vol. 155, No. 2, páginas 945-959, ISSN: 0016-6731, todo el documento	1

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
05.06.2013

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

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, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 05.06.2013

Declaración

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

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CAÑÓN, J. et al., 'Genetic variation within the Lidia bovine breed', ANIMAL GENETICS, 2008, Vol. 39, No. 4, páginas 439-445, ISSN: 0268-9146, Materiales y Métodos, Tabla S1; Resultados y Discusión.	
D02	MARTÍNEZ, A.M. et al., 'Genetic footprints of Iberian cattle in America 500 years after the arrival of Columbus', PLOS ONE, 2012, Vol. 7, No.11, página e49066, ISSN: 1932-6203 (electronic), todo el documento.	
D03	CAÑÓN, J. et al., 'Relative breed contributions to neutral genetic diversity of a comprehensive representation of Iberian native cattle.', ANIMAL, 2011, Vol. 5, No. 9, páginas 1323-1334, todo el documento.	
D04	MARTÍN-BURRIEL, I. et al., 'Genetic diversity, structure, and breed relationships in Iberian cattle', JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE, 2011, Vol. 89, No. 4, páginas 893-906, ISSN 0021-8812, todo el documento.	
D05	BICALHO, H.M. et al., 'Determination of ancestral proportions in synthetic bovine breeds using commonly employed microsatellite markers', GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH, 2006, Vol. 5, No.3, páginas 432-437, ISSN: 1676-5680 (print), todo el documento.	
D06	FAO (2011). 'Molecular genetic characterization of animal genetic resources'. FAO Animal Production and Health Guidelines [on line], No 9. Roma. Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO) [recuperado el 05.06.2013]. Recuperado de internet: URL:< http://www.fao.org/docrep/014/i2413e/i2413e00.pdf >, Apéndice 7, páginas 68-69.	
D07	PRITCHARD, J.K. et al., 'Inference of population structure using multilocus genotype data', GENETICS, 2000, Vol. 155, No. 2, páginas 945-959, ISSN: 0016-6731, todo el documento.	

En D1-D6 se describen procedimientos para analizar la diversidad genética de diferentes razas bovinas autóctonas de la península Ibérica. .

En D7 se describe un procedimiento estadístico que permite llevar a cabo la asignación de muestras anónimas a poblaciones de referencia.

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

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1. Reivindicación independiente 1.

1.1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste en un método para asignar ejemplares bovinos y/o productos de origen bovino a las distintas castas, encastes y/o líneas de la raza de Lidia que comprende básicamente la clasificación alélica de 24 secuencias de ADN microsatélites (cf.Tabla 2), utilizadas como marcadores genéticos, y que vienen definidas por las secuencias de los cebadores SEQ ID No 1 a SEQ ID No 48 de la invención, empleados para su amplificación PCR. Sin embargo, ya ha sido descrito en el documento D1 un procedimiento para determinar la variación genética en las distintas castas, encastes y/o líneas de la raza bovina de Lidia cuyas características técnicas coinciden con las reivindicadas en la solicitud, es decir, es un procedimiento que también está basado en la clasificación alélica de las mismas secuencias de ADN microsatélites descritas en la solicitud (cf. D1: Materiales y Métodos, Tabla S1; Resultados y Discusión). Por consiguiente, el objeto de protección de la reivindicación independiente 1 se considera que no es nuevo ni tiene actividad inventiva sobre la base del documento D1.

1.2. La presente solicitud no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de la reivindicación 1 no es nuevo ni tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes.