

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 598 907**

21 Número de solicitud: 201531118

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

28.07.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.01.2017

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

19.04.2017

Fecha de concesión:

29.08.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

05.09.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA (100.0%)
Avenida Medina Azahara, 5
14071 CORDOBA (Córdoba) ES**

72 Inventor/es:

**MEMBRILLO DEL POZO, Alberto;
MOLINA ALCALÁ, Antonio;
DORADO PÉREZ, Gabriel;
CLEMENTE LÓPEZ, Ignacio De Loyola y
RODERO FRANGANILLO, Antonio**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

54 Título: **MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PUREZA RACIAL DE UN EJEMPLAR DE ESPECIE PORCINA Y/O PRODUCTOS DERIVADOS DEL MISMO**

57 Resumen:

Método para la determinación de la pureza racial de un ejemplar de especie porcina y/o productos derivados del mismo.

La presente invención se refiere a un método para la determinación de la pureza racial de un ejemplar de especie porcina y/o productos derivados del mismo mediante la detección en una muestra obtenida del animal o del producto a analizar, de al menos un SNP nuclear seleccionado de entre situados en las posiciones 1318 del gen mc1r y 3072 el gen igf2 y del al menos un SNP mitocondrial seleccionado de entre 4777 del gen nd1, 10672 del gen coa y 16279 del gen cyb.

ES 2 598 907 B2

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PUREZA RACIAL DE UN EJEMPLAR DE ESPECIE PORCINA Y/O PRODUCTOS DERIVADOS DEL MISMO

Sector de la técnica

La presente invención se encuadra en el campo general del sector agroalimentario y en particular, se refiere a un método para la determinación de la pureza racial de un ejemplar de la especie porcina o de los productos derivados del mismo.

Estado de la técnica

El Cerdo Ibérico representa una agrupación racial de enorme heterogeneidad interna, que está íntimamente ligada a la dehesa desde hace siglos, formando un binomio cerdo - bellota de gran importancia para el mantenimiento de este ecosistema tan singular. La alta calidad de sus productos ha determinado que en las últimas décadas estemos asistiendo a una creciente demanda de clarificación del mercado por parte de los consumidores. Para ello, y con el objetivo de preservar los derechos de los productores y los consumidores y de clarificar algo el mercado de los productos del ibérico, se publicó en 2001 la Norma de Calidad (Real Decreto 10831 2001 del 15 de octubre de 2001), en la que se regulaban la raza y los cruces (al 50% y al 75% de ibérico con Duroc-Jersey) que se podían comercializar con el distintivo de "producto del Cerdo Ibérico" y los requisitos para encuadrar los productos en una de las tres calidades comerciales siguientes: "de bellota", "de recebo" y "de pienso".

En los años que estuvo funcionando esta Norma de Calidad se detectaron importantes fuentes de fraude, por lo que fue sustituida por una nueva Norma de Calidad publicada en Noviembre de 2007 (Real Decreto 14691 2007 del 2 de Noviembre de 2007), esta última norma fue derogada por la que actualmente se encuentra en vigor (Real Decreto 412014 de 10 de enero de 2014) que en lo referente a aspectos relativos al componente animal no aporta ninguna novedad y se mantiene igual que la anterior norma.

Para intentar detectar los posibles fraudes por incumplimiento de los aspectos relativos al origen racial se han intentado usar diferentes estrategias para determinar el origen genético de los animales en la aplicación de la Norma de Calidad. Entre las que destacan:

Caracterización etnológica. Consiste en la descripción de características morfológicas de los animales. Dicha metodología no es capaz de diferenciar en muchos casos los animales puros de los cruzados, ni el porcentaje ni dirección de este cruce.

Metodologías moleculares. Esta estrategia consiste en la caracterización de cada raza utilizando diferentes marcadores moleculares de ADN para asegurar el cumplimiento y aplicación de la Norma de Calidad del Cerdo Ibérico. Históricamente se han ensayado diferentes tipos de marcadores moleculares, como el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD; del inglés, "Random Amplified Polymorphic DNA"), minisatélites, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP; del inglés, "Restriction Fragment Length Polymorphisms"), polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP; del inglés, "Amplified Fragment Length Polymorphism") que solos o en combinación entre ellos pueden generar porcentajes de adscripción muy altos aunque a costa de un elevado número de marcadores y por lo tanto, mayores requerimientos de mano de obra, tiempo y precio.

Los marcadores moleculares que más destacan por su uso en las investigaciones de caracterización genética y molecular son los microsatélites también llamados STR (del inglés, "Short Tandem Repeats"), que son repeticiones cortas en tándem de un número pequeño de bases. Aunque son los marcadores moleculares más apropiados para los estudios de caracterización y determinación de la variabilidad genética en poblaciones animales, son incapaces de determinar con una certeza o probabilidad aceptable la presencia o ausencia de otras razas, y mucho menos determinar la raza paterna o materna. En este sentido, son numerosos los estudios de caracterización genética de diferentes razas porcinas , incluida la ibérica (Membrillo, A.; Clemente, I.; Azor, P. J.; Jiménez, A.; Santos, E.; Dorado, G.; Molina, A. (2007b). Polimorfismo del gen stearyl CoA desaturasa en Cerdo Ibérico: Resultados preliminares Libro de Actas de las IV Jornadas Ibéricas de razas autóctonas y sus productos tradicionales: innovación, seguridad y cultura alimentaria. Sevilla Noviembre de 2007.123 - 125.), en los que se ha intentado determinar el origen racial del ibérico con este tipo de marcadores e incluso basada en este tipo de marcadores genéticos ES2324065. Pero el carácter evolutivamente neutro de este tipo de marcadores en la mayoría de los casos hace que los resultados obtenidos dependan, en gran medida, de la adecuación de las muestras utilizadas para la elaboración del patrón genético de comparación, así como del historial de las ganaderías de donde proceden las muestras a evaluar . De este modo, además de ser un método probabilístico, cuyas probabilidades de asignación correcta de los microsatélites están muy limitadas en ganaderías que hayan mantenido cierto aislamiento genético , estos marcadores son incapaces de determinar la dirección del cruce (raza paterna y materna) en los animales cruzados y sus productos. Además, se ha concedido una patente para caracterizar al

cerdo ibérico según su dieta ES210013 que puede presentar cierto interés para la certificación de la norma en su componente de alimentación.

Por ello, y dado que la Norma de Calidad actual sólo permite el cruzamiento de ibérico con Duroc-Jersey cuando este último actúa como padre, también se ha estudiado la utilización de marcadores que permitan discriminar la dirección de dicho cruce (conocer la raza del padre o la madre) analizando marcadores del ADN mitocondrial en animales de las razas Ibérica y Duroc (Membrillo, A. (2011). Desarrollo de una herramienta genómica basada en los polimorfismos de bases individuales (SNP), para la identificación del cerdo ibérico, la trazabilidad de sus productos y la certificación de la Norma de Calidad del mismo. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.).

El ADNmt presenta una herencia citoplásmica (materna), haploide y no recombinante. Además, su tasa de mutación es 10 veces mayor que la del ADN nuclear, lo que hace que el análisis de su polimorfismo sea una herramienta ideal para la caracterización genética de las poblaciones, la determinación de las relaciones entre individuos de la misma población y de diferentes poblaciones, particularmente cuando éstas presentan una relación estrecha entre sí, y el estudio de la dinámica de las poblaciones en las que pueda existir un fuerte cruzamiento, como suele ser el caso de las poblaciones con bajo tamaño censal.

Estas mismas características hacen del polimorfismo del ADNmt una herramienta ideal para la determinación del origen racial paterno en el caso de animales cruzados, al permitir determinar la dirección del cruce. Las investigaciones llevadas a cabo con ADNmt del cerdo se han centrado en estudios filogenéticos de razas silvestres, estudiando tanto la totalidad del genoma mitocondrial como fragmentos del mismo, entre los que se encuentran el citocromo b y el lazo D. En el caso del Cerdo Ibérico, este tipo de estudios han abordado tanto el estudio del genoma completo de la mitocondria, como regiones específicas de dicho ADN como el citocromo b, el lazo D, y la subunidad 16S del ADNr que codifica el ARNr.

Por otra parte, el gran desarrollo de nuevas metodologías de análisis para la detección de polimorfismos de bases individuales (SNP; del inglés, "Single Nucleotide Polymorphism") ha abierto nuevas posibilidades para la detección de diferencias en genes concretos, que puede ser de gran utilidad para la certificación del cumplimiento de la Norma de Calidad del Cerdo Ibérico. Diversos autores han señalado la posible utilidad de los marcadores del gen *mc1r* que junto con marcadores localizados en el gen *kit*, podrían asegurar la trazabilidad genética y la

detección de la introgresión de capas no ibéricas en la población de estudio. No obstante, no se obtuvieron resultados concluyentes (Fernández *et al.* (2004). DNA tests based on coat colour genes for authentication of the raw material of meat products from iberian pigs. J. Sci. Food Agric 84: 1855-1860).

5 Por lo tanto, el análisis de SNP específicos de raza que permita la certificación de la trazabilidad de los productos y el cumplimiento de la Norma de Calidad en cuanto al origen genético del animal, de forma fiable, rápida y barata contribuirá de forma eficaz a la clarificación del mercado del ibérico y a la protección de los derechos de los consumidores. Asimismo, estas tecnologías pueden jugar un papel esencial en la certificación de las Denominaciones de Origen Protegida
10 (DOP).

Por lo tanto, existe pues la necesidad de proporcionar una herramienta genómica eficaz que permita la identificación de los individuos de cerdo ibérico, la trazabilidad de sus productos y la certificación racial en el ámbito de la actual Norma de Calidad de la raza (Real Decreto 412014 de 10 de enero de 2014).

15 **Breve descripción de la invención**

La presente invención soluciona los problemas descritos en el estado de la técnica ya que proporciona un método que permite discriminar el origen racial de animales y sus productos cárnicos (ya sean frescos, curados o elaborados) presuntamente pertenecientes a la raza ibérica o a cruces de dicha raza con el Duroc-Jersey de unas características determinadas,
20 utilizando marcadores genéticos de tipo SNP situados en el ADN nuclear y el ADN mitocondrial, de tal forma que d:

Utilizando los marcadores SNP nucleares, el método que se describe es útil para diferenciar de una forma clara y diagnóstica que un cerdo o sus productos son ibéricos puros 100% o cruzados al 75, o al 50% con la raza Duroc o no cumplen esta norma.

25 Utilizando los marcadores SNP mitocondriales, este método permite determinar la dirección del cruce (la norma actual sólo permite el cruzamiento con la raza Duroc cuando ésta actúa por la vía paterna, nunca materna) de una manera probabilística comparando la fórmula genética de las muestras problema con una base de datos de referencia.

Así pues, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para la
30 determinación de la pureza racial de un ejemplar de especie porcina y/o productos derivados

del mismo (de aquí en adelante, método de la presente invención) que comprende:

- 5 a) detección en una muestra obtenida del animal o del producto a analizar, de al menos un SNP nuclear seleccionado de entre situados en las posiciones 1318 del gen mc1r y 3072 del gen igf2 y del al menos un SNP mitocondrial seleccionado de entre 4777 del gen nd1, 10672 del gen coa y 16279 del gen cyb,
- b) obtención del genotipo de la muestra en base al SNP nuclear, donde el genotipo ibérico se relaciona con el alelo G para el SNP en la posición 1318 del gen mc1r y el genotipo C para el SNP en la posición 3072 del gen igf2,
- 10 c) determinación del origen materno de la muestra en base al los SNP mitocondriales mediante el porcentaje de asignación, donde un porcentaje de asignación comprendido entre 40-50% es indicativo de cruce.

En una realización preferente, la determinación de los genotipos se determina mediante PCR.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso de los SNP nucleares situados en la posición 1318 del gen mc1r y 3072 del gen igf2 y de los SNP mitocondriales situados en la posición 4777 del gen nd1, 10672 del gen coa y 16279 del gen cyb para la determinación de la pureza racial de un ejemplar de especie porcina o de un producto derivado del mismo.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un kit para la determinación de la pureza racial de un ejemplar de especie porcina o de un producto derivado del mismo que comprende las sondas y cebadores necesarios para detectar los SNP mitocondriales situados en la posición 4777 del gen nd1, 10672 del gen coa y 16279 del gen cyb.

En otro aspecto de la presente invención, se refiere al uso del kit según la reivindicación 4 para la determinación de la pureza racial de un ejemplar de especie porcina o de un producto derivado del mismo.

Descripción detallada de la invención

25 El método de la presente invención permite certificar el grado de pureza genética tanto de cerdos de la raza ibérica vivos como de sus productos derivados, ya sean frescos, curados o elaborados, utilizando para ello el análisis de marcadores genéticos de tipo SNP. La invención consta de la utilización de dos metodologías diferentes con dos objetivos diferentes, una para el análisis de los marcadores genéticos nucleares y otra para el de los mitocondriales. Utilizando

los marcadores genéticos nucleares, la certificación de la pureza se realiza de una manera objetiva y diagnóstica siempre y cuando se quieran certificar productos "ibéricos 100%" y los diferentes tipos de "ibéricos" reconocidos por la norma (50 y 75%). El uso de estos marcadores también permite detectar cruces de cerdo Ibérico con otras razas diferentes al Duroc y que por tanto no cumplirían la Norma de Calidad del Cerdo Ibérico.

La utilización de marcadores moleculares situados en el ADN mitocondrial permite conocer el origen materno del producto analizado utilizando una metodología probabilística de asignación al comparar la fórmula genética de la muestra problema con una base de datos de referencia.

Se trata por lo tanto de un sistema de detección de fraudes al consumidor que puede estar adquiriendo productos con un alto valor comercial que no presenten la calidad exigida por la Norma de Calidad.

En el método de la presente invención, los dos SNP nucleares se analizan mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real específica de alelo (PCR-RT específica de alelo) utilizando sondas Taqman ®. La combinación del genotipo de ambos SNP permite la determinación de la pureza racial de la muestra.

En el caso de los marcadores del ADN mitocondrial, el análisis de los tres marcadores de tipo SNP utilizados se realiza mediante un análisis SNaPshot. Esta técnica consiste en la amplificación de los fragmentos que contienen los polimorfismos y posteriormente realizar una minisequenciación mediante Snapshot.

20 Material Animal

Con el fin de determinar la especificidad de marcadores con posibles alelos útiles para la diferenciación del Cerdo Ibérico y poder proceder a la detección de marcadores específicos, se trabajó con las estirpes más representativas de este grupo, seleccionando ganaderías que ofrecieran las mayores garantías de pureza. La selección de poblaciones de animales se realizó siguiendo un cuidadoso muestreo de las distintas estirpes del Cerdo Ibérico incluidas en el Catálogo Nacional de Razas (Real Decreto 212912008, de 26 de Diciembre).

Del mismo modo, también se obtuvieron muestras de razas porcinas no ibéricas que pudieran suponer un riesgo potencial de fraude o bien para emplearlas como contraste. Éstas razas fueron seleccionadas en base a su influencia a lo largo de la historia en el Cerdo Ibérico, por su relevancia actual, o incluso en previsión de que pudieran ser susceptibles de ser cruzadas en el

futuro con el Cerdo Ibérico o bien comercializarse (sus productos) de manera fraudulenta como de "ibérico", concluyendo que debíamos trabajar con las razas: Duroc-Jersey, Mangalitza y razas de interés cárnico como Large White, Hampshire, Landrace y Pietrain (denominadas cruce industrial cerdo blanco) ya que en el mercado encontramos productos que si bien no proceden de estas razas en pureza, sí de sus cruces industriales.

Tras una exhaustiva prospección de las ganaderías candidatas (Ibéricas y no Ibéricas), la selección definitiva de las mismas se hizo conjugando fundamentalmente los criterios: historial de la explotación, años en que existe constancia de la cría en explotación cerrada y el flujo genético con otras explotaciones.

Para evitar errores en la toma de muestra y evitar seleccionar individuos ibéricos cruzados con la raza Duroc-Jersey u otras razas, la asociación española de criadores de ganado porcino selecto ibérico puro y tronco ibérico (AECERIBER) garantizó en todo momento que las ganaderías y animales seleccionados de las razas Duroc-Jersey e ibéricos fueran de pura raza (inscritas en sus respectivos libros genealógicos) poniendo a disposición nuestra a técnicos de su plantilla para facilitar el trabajo en el campo.

En el caso de la raza Mangalitza, las muestras fueron proporcionadas por el instituto francés de investigación agraria (INRA). Para el resto de razas, las muestras las facilitaron diferentes empresas ganaderas garantizando en todo momento su pureza.

Para la localización, descripción y selección definitiva de los dos polimorfismos de tipo SNP localizados en los dos genes nucleares diferentes, se realizó un análisis de polimorfismos en diferentes genes candidatos relacionados con el color de la capa (gen codificante del receptor 1 de la melanocortina, *mc1r*; gen del color agoutí, *asip*) y el metabolismo lipídico (gen codificante del receptor 4 de la melanocortina, *mc4r*; gen codificante de proteínas de unión con ácidos grasos sintetizadas en adipositos, *fabp4*; gen de la esteroil-CoA desaturasa, *SCD*; gen del factor de crecimiento 2 similar a la insulina, *IGF-2*). Para ello se utilizaron cinco individuos Ibéricos por cada estirpe, 10 individuos Duroc-Jersey y cinco animales de las razas Mangalitza y cerdo Blanco Industrial.

Una vez analizados los polimorfismos de los genes candidatos y según los resultados de las frecuencias de cada uno de los alelos en los polimorfismos localizados, se seleccionaran los SNP situados en las posiciones 1318 del gen *mc1r* y 3072 del gen *igf2* ya que presentaron un

alelo fijado en el 100% de los individuos en las razas Duroc e Ibérico respectivamente.

Para la selección de los tres marcadores SNP mitocondriales, el análisis del ADNmt se llevó a cabo en dos fases: una primera en la que se amplificó y secuenció completamente el ADN mitocondrial de los individuos de las razas y estirpes indicadas, con el objetivo de localizar posibles puntos polimórficos, y una segunda fase, en la que en un mayor número de individuos, se utilizaron cebadores que flanquean las zonas con los marcadores moleculares de tipo SNP más informativos identificados y localizados en la primera fase, con el fin de confirmar los polimorfismos localizados y comprobar su utilidad como herramienta para su utilización en la trazabilidad genética del individuo al poder conocer el origen materno del animal o producto.

10 Los tres polimorfismos seleccionados en el ADNmt para su utilización en la diferenciación del origen racial materno (4777 del gen *nd1*, 10672 del gen *coa* y 16279 del gen *cyb*).

Alves *et al.* (2009) propusieron, además de los que ya se han comentado, un polimorfismo más en la raza ibérica localizado en el gen codificante de la ATPasa 6 y para la raza Duroc cuatro polimorfismos (a parte de los seleccionados en la región del lazo D como específicos de esta raza).

Debido a que ninguno de estos polimorfismos está fijado en la raza ibérica o Duroc, la utilización de los marcadores mitocondriales para conocer el origen racial materno de las muestras problema será probabilística, en lugar de ser diagnóstica. Para ello, se comparan las fórmulas genéticas halladas con una base de datos de referencia utilizando la metodología de Pritchard *et al.* (2000) (implementado en el software Structure 2.2).

Selección de polimorfismos nucleares

Gen del factor de crecimiento 2 similar a la insulina (del inglés, "insulin-like growth factor 2; IGF-2).

El gen *igf2* está involucrado en la biogénesis, siendo el responsable de entre el 15 y el 30% de la variación fenotípica de la masa muscular y el 10 y 20% de la variación en el espesor de grasa dorsal de los cerdos (Nezer *et al.*, 1999). La sustitución c. 3072G>A localizada en el intrón tres del gen *igf2*, se ha descrito como la responsable de un QTL (Van Laere *et al.*, 2003) relacionado con los caracteres anteriormente comentados. Esta mutación se encuentra en una región reguladora altamente conservada entre especies, a la que se une un represor de la transcripción. Este represor se une al alelo q (G), pero no al alelo Q (A).

Debido a la implicación de este gen y en concreto el SNP descrito en el metabolismo, se seleccionó como polimorfismo para ser utilizado en esta invención.

El estudio de este marcador molecular SNP se realizó mediante PCR a tiempo real específica de alelo utilizando la metodología, secuencias de cebadores y sondas descritas por Carrodegua *et al.* (2005). Las frecuencias alélicas de este punto en cada una de las razas se muestran en la Tabla 2.

Cebadores:

IGF2F: SEQ ID NO: 1

IGF2R: SEQ ID NO: 2

10 Sondas Taqman:

IGF2V1: SEQ ID NO: 3, marcado con el fluoróforo VIC

IGF2M1: SEQ ID NO:4, marcado con el fluoróforo FAM

Tabla 1. Frecuencias del polimorfismo detectado en la posición c. 3072 G>A del gen *igf2* en las diferentes razas porcinas analizadas

15

			FRECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS			
POSICIÓN	FRAGMENTO	POLIMORFISMO	IBE	DUR	MAN	IND
3072	IGF2	A	0	1	1	1
		G	1	0	0	0

DUR: Duroc; IBE: Ibérico; IND: Cruce industrial; MAN: Mangalitzá.

Como se observa, el alelo G se encuentra fijado en la población ibérica de manera exclusiva, mientras que en el resto de las razas, el alelo que se encuentra fijado es el alelo A. La relación de este gen con el mayor o menor crecimiento magro (Ruiz *et al.*, 2002; Carrodegua *et al.*, 2005) explicaría el hecho de que se presente fijado en el Cerdo Ibérico un alelo (A) mientras que en el Duroc lo haga el otro (G). Esto hace que hayamos considerado a este marcador de extremo interés para nuestros objetivos (especialmente cuando se quiera certificar pureza racial). No obstante, dado que la norma permite el cruce con Duroc (siempre que éste no se presente vía materna ni en una proporción superior al 50%) es necesario incluir otros marcadores moleculares.

25

Gen del receptor 1 de la melanocortina (*mc1r*)

El gen que codifica el receptor de la melanocortina (*mc1r*) forma parte del principal sistema regulador conocido de síntesis de pigmentos, junto con la proteína G acoplada y la proteína agoutí. La unión de la hormona estimulante de melanocitos (MSH) al MC1R inicia la señal que es transducida a través de la enzima tirosinasa al interior celular, lo cual conlleva la síntesis de eumelanina (pigmento negro-marrón).

De todas las posiciones polimórficas detectadas (posiciones 603, 608, 668, 759, 802, 878, 896, 1110, 1197, 1318 y 1154), los SNP que presentan mayor interés para nuestros objetivos son los localizados en las posiciones 1318 y 1554 (descrito por Kijas et al., 1998), referidas a la secuencia con número de acceso GenBank AF326520 que están fijadas en la raza Duroc y que conforman el haplotipo MC1R*4. Se ha seleccionado la posición 1318 (Kijas et al., 1998) como polimorfismo de detección de la raza Duroc, ya que, por la cercanía entre ambos puntos, es improbable que segreguen de forma independiente.

El estudio de este marcador molecular SNP se realizó mediante PCR a tiempo real específica de alelo utilizando la metodología y secuencias de cebadores y sondas Taqman diseñadas por los autores de la presente invención.

Cebadores:

PigMc1r-1F: SEQ ID NO:5

PigMc1r-1R: SEQ ID NO:6 Sondas Taqman:

Mc1rPig1C.- SEQ ID NO:7, marcado con el fluoróforo FAM

Mc1rPig1T: SEQ ID NO:8, marcado con el fluoróforo HEX

Tabla 2. Frecuencias del polimorfismo detectado en la posición c. 1318 C>T del gen *mc1r* en las diferentes razas porcinas analizadas.

FRECUENCIA NUCLEOTÍDICA

POSICIÓN	FRAGMENTO	POLIMORFISMO	IBE	DUR	MAN	IND
1318	MC1R4	C	1	0	1	1
		T	0	1	0	0

DUR: Duroc; IBE: Ibérico; IND: Cruce industrial; MAN: Mangalíza

Selección de polimorfismos mitocondriales. (4777 del gen *nd1*, 10672 del gen *coa* y 16279 del gen *cyb*).

Gen codificante de la NADH deshidrogenasa complejo 1, subunidad 1.

El complejo NADH deshidrogenasa es el mayor de la cadena respiratoria e interviene en la transferencia de electrones hasta el citocromo C, para crear el gradiente con el que se obtendrá ATP (Voet y Voet, 2004), también proporciona poder reductor que se utiliza en la síntesis de nuevas moléculas útiles para la obtención de energía.

De los polimorfismos detectados en este gen, el situado en la posición 4777 presenta frecuencias superiores del alelo C en las razas Duroc y cruce industrial (67%), estando el alelo T fijado en las razas ibérica y Mangalitz. Por lo que este polimorfismo se ha seleccionado para su uso en la certificación del origen racial materno.

Tabla 3. Frecuencias del polimorfismo detectado en la posición 4777 del gen *nd1* en las diferentes razas porcinas analizadas.

FRECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS

POSICIÓN	POLIMORFISMO	IBE	DUR	MAN	IND
4777	C	0	0,67	0	0,67
	T	1	0,33	1	0,33

DUR: Duroc; IBE: Ibérico; IND: Cruce industrial; MAN: Mangalitz

Gen codificante del citocromo b

El gen *cyb* codifica la subunidad del Complejo III de la membrana interna denominada CYT B. Junto con otras proteínas forma el complejo citocromo BC1. En total, este complejo proteico posee 11 subunidades, siendo su función la de servir de transporte de electrones en la cadena respiratoria celular (Voet y Voet 2004).

De los polimorfismos detectados en este gen, el situado en la posición 16279 presenta frecuencias útiles para su uso en la presente invención; en la raza ibérica, el alelo A se presenta con una frecuencia del 92% mientras que en la raza Duroc se presenta en un 22% y en Mangalitz y cruce industrial no aparece (está fijado el nucleótido G). Alves *et al.* (2009) lo propusieron también al presentarse en un 72% en ibérico.

Tabla 4. Frecuencias del polimorfismo detectado en la posición 16279 del gen *cytb1* en

las diferentes razas porcinas analizadas.

POSICIÓN	POLIMORFISMO	FRECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS			
		IBE	DUR	MAN	IND
16279	A	0,92	0,22	0	0
	G	0,08	0,78	1	1

DUR: Duroc; IBE: Ibérico; IND: Cruce industrial; MAN: Mangalitza

Gen codificante de la Citocromo C Oxidasa complejo IV, subunidad 3

Es el último complejo de la cadena respiratoria, captando electrones de las moléculas de citocromo c y transfiriéndolos al oxígeno, translocando al mismo tiempo protones al espacio intermembrana que forman el gradiente de protones para la obtención de energía en forma de ATP (Voet y Voet, 2004).

De los polimorfismos detectados en este gen, se ha seleccionado situado en la posición 10672 ya que presenta el alelo T en una frecuencia del 86% en la raza ibérica, mientras que el nucleótido C se presenta con 14%, en las demás razas, la frecuencia de este último alelo es mucho más elevada (78% en Duroc, 71% en cruce industrial y fijado en la raza Mangalitza). Alves *et al.* (2009) también recomendaron este polimorfismo como candidato a la diferenciación del ibérico, determinando una frecuencia del alelo T del 72%.

Tabla 1. Frecuencias del polimorfismo detectado en la posición 10672 del gen coa en las diferentes razas porcinas analizadas.

POSICIÓN	POLIMORFISMO	FRECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS			
		IBE	DUR	MAN	IND
10672	C	0,14	0,78	1	0,71
	T	0,86	0,22	0	0,29

DUR: Duroc; IBE: Ibérico; IND: Cruce industrial; MAN: Mangalitza

Debido a que ninguno de estos polimorfismos mitocondriales está fijado en la raza ibérica, la utilización de estos marcadores para ver la asignación de los diferentes individuos problema a su raza de origen será probabilística, en lugar de ser diagnóstica, como en el caso anterior de marcadores nucleares. Por lo tanto, para la evaluación del poder discriminante de los tres SNP seleccionados se ha de utilizar la metodología de asignación de Pritchard *et al.* (2000) (implementado en el software Structure 2.2) utilizando como referencia las muestras analizadas en la tesis doctoral Membrillo 2011 y los parámetros de software para una correcta asignación simulando 400000 individuos (runlength), y un calentamiento de 100000. Para determinar K se

implementa el criterio DK propuesto por Evanno *et al.* (2005).

El resultado de obtenidos de este programa nos indica el porcentaje de asignación a cada una de las razas de cerdo (ibérico o duroc) y se determina el origen racial siempre que el porcentaje de asignación a unas de las razas sea sin ambigüedades, es decir, que el porcentaje de asignación sea del 90% o más (Negrini *et al.*, 2008). Si los porcentajes de asignación están comprendidos entre el 40% y el 50% se entenderá que al individuo es cruzado.

La utilización de estos tras polimorfismos para la asignación del origen racial materno de productos de cerdo permite la discriminación de individuos Duroc-Jersey en la raza Ibérica es mayor del 90%.

10 La principal ventaja que presenta la utilización de solamente tres polimorfismos de una sola base es que permite utilizar metodologías más rápidas y baratas que la secuenciación directa de fragmentos amplificados como es Snapshot.

Diseño primers para SNAPSHOT de los tres puntos SNP mitocondriales utilizados:

15 Para el análisis de estos tres polimorfismos de una sola base (SNP). Se han diseñado tras parejas de cebadores para la amplificación de las zonas que contienen dichos polimorfismos y al diseño de tres cebadores para el genotipado de estos SNP mediante minisequenciación (SNAPSHOT).

Las secuencias de las parejas de cebadores se muestran en la tabla 6:

Tabla 6. Secuencias de los cebadores de amplificación de los marcadores SNP del ADNmt

20

NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA (5'=3')	T ^a hibridación (°C)	Amplicón (pb)
SE-mtDNA-5(F)	SEQ ID NO:9	63,0	1204
SE-mtDNA-5(R)	SEQ ID NO:10		
COX3-F	SEQ ID NO:11	60,4	893
COX3-R	SEQ ID NO:12		

CYTB1-F	SEQ ID NO:13	55,8	850
CYTB1-R	SEQ ID NO:14		

Los cebadores para el genotipado de los 3 SNP mitocondriales son:

NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA (5'=>3')	Tª hibridación (°C)	Posición
SNP1 (CYTB1)	SEQ ID NO:15	66.17	16279
SNP2 (COX3)	SEQ ID NO:16	64.9	10672
SNP3 (MIT5)	SEQ ID NO:17	63.52	4777

5

5. EJEMPLO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION.

EJEMPLO USO SNP NUCLEARES

Genotipado de muestras de jamón curado de cerdo para confirmación de pureza racial ibérica de las muestras y posible fraude a la Norma de Calidad del Cerdo ibérico.

10 Extracción de ADN de las muestras facilitadas. De cada una de las piezas enviadas se extrae la cantidad de tejido suficiente para el aislamiento de ADN necesario para la realización de las reacciones de amplificación por PCR a tiempo real específica de alelo. Una vez extraído el ADN se comprueba la integridad en gel de agarosa al 2% y se cuantifica la concentración del ADN.

15 A todas muestras se les realiza el análisis de los marcadores moleculares de tipo SNP situados en los genes Insulin-like growth factor 2 (igf-2) c. 3072 G>A y Melanocortin 1 receptor (mc1r) c. 1318 C>T, utilizando las secuencias de cebadores y sondas descritas en el apartado anterior.

Las cantidades de reactivos para ambos SNP han sido:

Reactivo	Cantidad (µl)
Master mix	6,5
Cloruro Magnésico (50 µM)	1

Cebador F (10 µM)	0,2
Cebador R (10 µM)	0,2
Sonda 1 (alelo 1)	0,4
Sonda 2 (alelo 2)	0,4
Agua mQ	4,3
Total	13

Los protocolos térmicos para la amplificación de cada SNP nuclear han sido:

Amplificación Insulin-like growth factor 2 (igf-2) c. 3072 G>A		
Tª	Tiempo (segundos)	Nº ciclos
95 °C	600	1
95 °C	15	40
61 °C	60	

5

Amplificación Melanocortin 1 receptor (mc1r) c. 1318 C>T		
Tª	Tiempo (segundos)	Nº ciclos
95 °C	180	1
95 °C	20	40
60 °C	40	

El genotipo resultante de la combinación de ambos SNP, determinaran la presencia o no de sangre Duroc (o de otras razas no ibéricas), así como el porcentaje de sangre Ibérica o Duroc que presenta la muestra teniendo en cuenta los cruces más frecuentes que se producen en las ganaderías productoras de porcino ibérico (Membrillo, 2011).

10

Los posibles genotipos y compatibilidades que se pueden obtener se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Genotipos, nombre según norma de calidad y compatibilidad.

GENOTIPO IGF2	GENOTIPO MC1R	TIPO NORMA	COMPATIBILIDAD
GG	CC	IBÉRICO 100%	100% ibérico
AG	CT	IBÉRICO	50% ibérico
AG	CC	IBÉRICO	75% ibérico
GG	CT	IBÉRICO	75% ibérico
AG	TT	IBÉRICO	75% duroc
AA	CC	IBÉRICO	75% duroc
AA	TT	-	100%duroc

EJEMPLO USANDO SNP MITOCONDRIALES

Determinación del origen materno del animal o producto comparándolo con una muestra de referencia.

- 5 Extracción de ADN de las muestras facilitadas. De cada una de las piezas enviadas se extrae la cantidad de tejido suficiente para el aislamiento de ADN necesario para la realización de las reacciones de amplificación por PCR convencional. Una vez extraído el ADN se comprueba su integridad en gel de agarosa al 2% y se cuantifica la concentración del ADN.

- 10 A todas muestras se les realiza el análisis de los marcadores moleculares de tipo SNP situados en los genes Cytochrome c oxidase subunit III (coa) c. 10672 C>T, Cytochrome b (cyb) c. 16279 C>T y NADH dehydrogenase complejo 1, subunidad 1 (nd1) c. 4777 C>T. Cada uno de los fragmentos se ha amplificado utilizando los cebadores y cebadores de genotipado indicados en el apartado anterior mediante Snapshot ® (Membrillo, 2011).

- 15 Una vez obtenidos los genotipos de cada una de las muestras y la asignación de individuos a poblaciones, se utilizó el software Structure 2.2 (Pritchard et al., 2000) simulando 400000 individuos (runlength), y un calentamiento de 100000. Para determinar K se implementó el criterio DK propuesto por Evanno et al. (2005).

- 20 La salida de este programa nos indica el porcentaje de asignación a cada una de las razas de cerdo (ibérico o duroc) y se determina el origen racial siempre que el porcentaje de asignación a unas de las razas sea sin ambigüedades, es decir, que el porcentaje de asignación sea del 90% o más (Negrini et al., 2008). Si los porcentajes de asignación están comprendidos entre el 40% y el 50% se entenderá que el individuo es cruzado.

REIVINDICACIONES

1. Método para la determinación de la pureza racial de un ejemplar de especie porcina y/o productos derivados del mismo que comprende:

5 a) detección en una muestra obtenida del animal o del producto a analizar, de al menos un SNP nuclear seleccionado de entre situados en las posiciones 1318 del gen mc1r y 3072 del gen igf2 y del al menos un SNP mitocondrial seleccionado de entre 4777 del gen nd1, 10672 del gen coa y 16279 del gen cyb,

10 b) obtención del genotipo de la muestra en base al SNP nuclear, donde el genotipo ibérico se relaciona con el alelo G para el SNP en la posición 1318 del gen mc1r y el genotipo C para el SNP en la posición 3072 del gen igf2

c) determinación del origen materno de la muestra en base al los SNP mitocondriales mediante el porcentaje de asignación, donde un porcentaje de asignación comprendido entre 40-50% es indicativo de cruce.

15 2. Método según la reivindicación 1 donde la determinación de los genotipos se determina mediante PCR.

3. Uso de los SNP nucleares situados en la posición 1318 del gen mc1r 3072 del gen igf2 y de los SNP mitocondriales situados en la posición 4777 del gen nd1, 10672 del gen coa y 16279 del gen cyb para la determinación de la pureza racial de un ejemplar de especie porcina o de un producto derivado del mismo.

20 .

ES 2 598 907 B2

Listado de Secuencias

<110> UNIVERSIDAD DE CORDOBA
<120> Procedimiento para determinar la pureza racial en un ejemplar de especie porcina y /o en productos derivados del mismo
<130> PT2015/0015
<160> 17
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Cebador IGF2F
<400> 1
agccaggac gacct 16

<210> 2
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Cebador IGF2R
<400> 2
gaggcccgcg gactc 15

<210> 3
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Sonda IGF2 V1
<400> 3
ctaggctcgc agcgc 15

<210> 4
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Sonda IGF2 M1
<400> 4
ctaggctcac agcgc 15

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Cebador PigMc1r-1F

<400> 5
ctccacaaga cgcagcac 18

<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PigMc1r-1R

<400> 6
aagacgccca gcaggatg 18

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mc1rPig1C

<400> 7
tggccgcgcc cttgaggc 18

<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mc1rPig1T

<400> 8
tggccgtgcc cttgaggc 18

<210> 9
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SE-mtDNA·5(F)

<400> 9
gctcataacg ccttgctcaa ccaca 25

<210> 10
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SE-mtDNA·5(R)

<400> 10
tcactatitt gccacataga tgagttggt 29

<210> 11
<211> 19
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> COX3-F
 <400> 11
 ccgaggttct gttcttcac 19

<210> 12
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> COX3-R
 <400> 12
 aggcttgctg ctagtagg 18

<210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CYTB1-F
 <400> 13
 aaacttcggt tccctcttag gc 22

<210> 14
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CYTB1-R
 <400> 14
 agaataggca ttgacttagt ggtcg 25

<210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> SNP1 (CYTB1)
 <400> 15
 cgagggcggg aatgatgaat gg 22

<210> 16
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> SNP2 (COX3)
 <400> 16
 ttttttttta gtgcaatggg gatggata 28

<210> 17
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SPN3 (MIT5)

<400> 17
tttttttttt ttttttgata gagtatatga tcc

33



- ②① N.º solicitud: 201531118
②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.07.2015
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

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

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	Alves, E., et al. Is it possible the breed origin traceability of Iberian pigs?. 7th International Symposium on the Mediterranean Pig. 2012. CIHEAM Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens. N°. 101, páginas. 565-571..	4,5
A		1-3
A	Alves, E., et al. Identification of mitochondrial markers for genetic traceability of European wild Boars and Iberian and Duroc pigs. Animal 2009. Vol. 3, N° 9, páginas 1216-1223.	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe
01.12.2016

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/4

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

C12Q, C12N

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, INTERNET.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.12.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-5	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-3	SI
	Reivindicaciones 4,5	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	Alves, E., et al. Is it possible the breed origin traceability of Iberian pigs?. 7th International Symposium on the Mediterranean Pig. 2012. CIHEAM Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens. Nº. 101, páginas. 565-571..	2012
D02	Alves, E., et al. Identification of mitochondrial markers for genetic traceability of European wild boars and Iberian and Duroc pigs. Animal 2009. Vol. 3, Nº 9, páginas 1216-1223.	2009

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

El objeto de las reivindicaciones 1-5 sería nuevo puesto que no es divulgado por ninguno de los documentos del estado de la técnica anterior. Por lo tanto, tales reivindicaciones cumplirían con lo mencionado en el art. 6 de la ley 11/1986.

En cuanto al requisito de actividad inventiva, D01 puede ser considerado como el documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la invención puesto que divulga una estrategia para la verificación del origen de la raza ibérica, tanto en animales vivos como en productos cárnicos, que se basa en la detección de SNPs en dos genes que presentan polimorfismos con alelos que son exclusivos (MC1R * 4), o presentan altas frecuencias (IGF2 g.3072A) en Duroc, y están ausentes en el ibérico. El uso de estos marcadores permite discriminar a los animales de raza pura ibérica. En este documento se menciona que el análisis de los alelos MC1R e IGF2 son utilizados con regularidad para este propósito y que el uso adicional de marcadores de ADN mitocondriales podría resultar particularmente de utilidad en la validación del origen materno (página 566, líneas 20-22).

D02 divulga una serie de paneles de SNPs, y la frecuencia de ciertos haplotipos en el gen cytB para investigar el origen materno de muestras de animales porcinos de raza ibérica, Duroc, o Salvaje (tablas 1-3).

El objeto de la reivindicación 1 difiere de lo divulgado en D01 en que las posiciones detectadas son al 1318 en el gen nuclear mc1r y las posiciones 4777, 10672, 16279 de los genes mitocondriales nd1, coa y cyb, respectivamente. El efecto técnico producto de esta diferencia es la provisión de 5 marcadores SNPs que, utilizados conjuntamente, permiten trazar el origen de la raza de un animal o producto cárnico derivado, y la determinación del origen materno del mismo. El problema a resolver por la presente invención puede considerarse como la provisión de marcadores SNPs asociados a la pureza racial del animal o un producto derivado del mismo. La solución sería el conjunto de los 5 marcadores SNPs de la reivindicación 1. Esta solución puede considerarse que sí tiene actividad inventiva puesto que ninguno de los documentos del estado de la técnica tomados solos o en combinación permiten deducir de manera obvia que el conjunto de los dos SNPs en los genes nucleares MC1R e IGF2, y los tres mitocondriales sean capaces de discriminar el origen racial y materno de una muestra obtenida del animal o de un producto elaborado a partir del animal. Los SNPs mencionados en el objeto de la invención serían marcadores más apropiados que los paneles de SNPs divulgados hasta ahora en el estado de la técnica.

Así pues, el objeto de las reivindicaciones 1-3 sí que cumpliría con lo mencionado en el art. 8 de la ley 11/1986.

Dado que el objeto de las reivindicaciones 4, 5 abarca cualquier sonda o cebador que sea capaz de detectar los SNPs del método de la reivindicación 1, se considera que esta reivindicación pretende proteger un compuesto por el resultado a obtener sin mencionar su secuencia concreta que haga posible el efecto técnico que se reivindica.

Así pues, el objeto de tales reivindicaciones no supone una solución al problema técnico que se plantea, por lo que carecería de actividad inventiva, no cumpliendo lo mencionado en el art. 8 de la ley 11/1986.