

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 134**

21 Número de solicitud: 201630653

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

19.05.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.12.2017

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2017/070331

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE (80.0%)

Ctra. Utrera, km 1

41013 Sevilla ES y

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (20.0%)**

72 Inventor/es:

CENTENO-CUADROS, Alejandro;

CARRETE, Martina;

DELIBES DE CASTRO, Miguel y

TELLA ESCOBEDO, José Luis

74 Agente/Representante:

MARTÍNEZ HAYA, Bruno

54 Título: **MÉTODO DE DETERMINACIÓN MOLECULAR DEL SEXO DE AVES POR AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLES**

57 Resumen:

Método de determinación molecular del sexo de aves por amplificación isotérmica mediada por bucles.

La invención proporciona secuencias de cebadores, reactivos y protocolos para la determinación del sexo en la clase Aves empleando la técnica de amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP). A diferencia de otras técnicas moleculares basadas en PCR, esta invención no requiere de termocicladores o laboratorios especializados y permite así la determinación del sexo de aves en cualquier lugar donde se permita realizar una incubación a una única temperatura. Su aplicación será extensible a todos los sectores relacionados de algún modo a la ornitología (avicultura, ecología y conservación, principalmente).

ES 2 647 134 A1

DESCRIPCIÓN

Método de determinación molecular del sexo de aves por amplificación isotérmica mediada por bucles**CAMPO DE LA INVENCION**

5

La invención se encuadra en el campo de la biotecnología, más concretamente a la amplificación (realización de múltiples copias) de polinucleótidos. Se proporcionan secuencias de cebadores, composiciones de reactivos y protocolos para la determinación del sexo aplicables a la clase Aves.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

La determinación del sexo en aves (DSA de aquí en adelante) es un paso clave para el manejo de poblaciones silvestres y programas de cría en cautividad, así como en estudios de etología y ecología. Una correcta DSA es, además, básica para desarrollar teorías evolutivas sobre inversión parental diferenciada o sobre cómo las hembras pueden determinar el sexo de su descendencia, teorías que, a pesar de décadas de investigación, aún no se conocen bien sus mecanismos ni sus consecuencias. Este paso es especialmente crítico en aquellas especies de aves que presentan monomorfismo sexual (especies en las que no hay diferenciación fenotípica o comportamental entre machos y hembras), en etapas tempranas del ciclo de vida (embriones, pollos y volantones) y/o cuando se ha realizado un muestreo de material biológico sin posibilidad de capturar a los individuos (como ocurre en muestreos no invasivos). Estos casos tienden a ser problemáticos por mostrar altas tasas de error cuando se aplican metodologías en las que no sea necesario capturar a los individuos, como las basadas en estudios etológicos (Gray & Hamer, 2001; *Anim Behav* 62(1):117–121) o diferencias en cantos (Volodin et al. 2009; *Bioacoustics* 18(3):277–290). Estos errores en la determinación del sexo que muestran las técnicas no invasivas así como las basadas en palpación o visualización de la zona cloacal de las aves se pueden solventar parcialmente mediante la toma de una muestra de sangre para realizar análisis hormonales (Bercovitz et al. 1978; *J Zool Anim Med* 9:114–124) o tomando medidas morfométricas (Reynolds et al. 2007; *J Zool* 274(1): 2-8). En los casos más extremos se han aplicado técnicas más invasivas como laparoscopia (Richner, 1989; *J F Ornithol* 60:137–142), laparatomía (Maron & Myers, 1984;. *J F Ornithol* 55:336–342) o examen de la zona genital (Miller & Wagner, 1955; *Auk*

72:279–285). Si bien estos métodos tradicionales se han demostrado efectivos, su aplicación no ha estado exenta de una logística fuera del alcance de gran parte del público interesado y pone en peligro la integridad física del animal examinado.

La DSA ha sido especialmente estudiada en avicultura al mover millones de euros anuales en el mercado generados por las decenas de miles de determinaciones de sexo solicitadas a diario por avicultores y criadores privados (principalmente) y dependen, por tanto, de la veracidad y velocidad a la que se realice dicha determinación. Se han llegado incluso a seleccionar líneas genéticas que permitan determinar el sexo por coloración de plumas en pollos de una nueva raza de pavo (WO 9719588 A1), algo completamente impracticable en el caso de determinación del sexo en especies silvestres. En el contexto de especies de explotación ganadera, se han desarrollado técnicas para la determinación del sexo en pollos antes de eclosionar gracias a la exploración por ultrasonidos (US 6512839 B1) o análisis hormonales (JP 06153742 A).

La aplicación de técnicas moleculares basadas en el ácido desoxirribonucleico (ADN) ha supuesto una revolución en la DSA. El aislamiento y caracterización del cariotipo de las especies fue la primera técnica de DSA basada en ADN. Mediante el cariotipo se puede diferenciar a los machos de las hembras previa identificación de los cromosomas de cada especie (dos copias del cromosoma Z en el caso de los machos y una sola copia del cromosoma Z y otra del W cuando el cariotipo fuera de una hembra) (Harris & Walters, 1982; *Genética* 60:19–20). Otras técnicas de determinación molecular del sexo se han basado en la medición diferencial entre sexos de variaciones de moléculas de ADN tras ser irradiadas con ultravioleta (DE 102007013107 A1). Sin embargo, ha sido la secuenciación y caracterización génica de los cromosomas sexuales lo que ha permitido un mayor avance en la DSA. Por ejemplo, el diseño e hibridación de secuencias sonda con el ADN y posterior detección con fluorescencia han sido útiles para la diferenciación entre machos y hembras de aves (US 5508165 A). No obstante, la gran mayoría de las técnicas moleculares de DSA se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por su acrónimo en inglés). Como resultado de esta técnica se pueden obtener un número de copias de numerosos órdenes de magnitud superior a la cantidad de copias inicial tras aplicar un ciclado térmico (desnaturalización del ADN, alineamiento de cebadores y síntesis de copias de ADN). La DSA es posible hoy día gracias a la relativa conservación a lo largo de la escala evolutiva en la clase Aves de la proteína cromohelicasa de unión al ADN (CHD) localizada en los cromosomas sexuales Z (CHDZ) y W (CHDW) (WO

1996039505 A1), lo cual ha permitido encontrar oligonucleótidos característicos del sexo (US 8232382 B2) y, en mayor grado, debido a su fácil diagnóstico mediante electroforesis en geles de agarosa. Los intrones del gen CHD varían en tamaño en función del cromosoma sexual en que se localicen, de modo que mediante una PCR y posterior separación de fragmentos utilizando geles de agarosa se puede determinar si el individuo es portador de dos copias de distinto tamaño (ZW, hembras) o del mismo tamaño (ZZ, machos) (e.g. Griffiths et al. 1998; *Mol Ecol* 7(8):1071–1075) (CN 203200273 U). Más recientemente, se ha añadido la amplificación isotérmica mediada por bucles (Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP) (Notomi et al. 2000; *Nucleic Acids Res* 28(12):E63) al conjunto de técnicas moleculares para la síntesis de ADN a la DSA. LAMP amplifica cualquier región del genoma flanqueada por la combinación de dos pares de cebadores que alinean con seis regiones específicas. Se ha aplicado en especies de aves con interés comercial (Kim et al. 2015; *Turkish J Vet Anim Sci* 39(5):583–588) aunque aún no existen marcadores moleculares que permitan determinar el sexo en otras especies de aves de interés comercial (e.g. cría de especies exóticas) o que sean de utilidad en disciplinas dedicadas al estudio de las aves (e.g. ecología, biología de la conservación). Los trabajos publicados hasta la fecha, además, carecen de un marcador apropiado que sirva de control positivo de ADN y determinen la asignación de falsos negativos o bien emplean un marcador mitocondrial inadecuado a tal propósito por un claro sesgo de amplificación a su favor (frente al reducido número de copias de los genes nucleares empleados localizados en los cromosomas sexuales) (Chan et al. 2012; *Theriogenology* 78(6):1329–38).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

25 Cada día se realizan millones de determinaciones de sexo de aves de las cuales dependen decisiones con importantes repercusiones en avicultura y conservación y manejo de la biodiversidad. Una gran mayoría de estas reacciones se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para lo que se necesitan ciclados de 30 temperaturas apropiados para la desnaturalización, alineamiento de cebadores y síntesis de las nuevas copias de ADN. Como resultado se obtiene un número de copias del fragmento de ADN objeto de estudio de numerosos órdenes de magnitud superior a la cantidad de copias inicial aplicando para ello un ciclado térmico (desnaturalización del ADN, alineamiento de cebadores y síntesis de copias de ADN). 35 Los resultados de estas amplificaciones se suelen interpretar aplicando técnicas

electroforéticas en geles de agarosa y posterior tinción del ADN mediante agentes intercalantes.

La determinación del sexo en aves es posible hoy día gracias a la amplificación mediante PCR y posterior separación de fragmentos de la proteína cromohelicasa de unión al ADN (CHD) localizada en los cromosomas sexuales Z (CHDZ) y W (CHDW) utilizando geles de agarosa. Los intrones del gen CHD varían en tamaño en función del cromosoma sexual en el que se localicen, de modo que se puede determinar si el individuo es portador de dos copias de distinto tamaño (ZW, hembras) o del mismo tamaño (ZZ, machos) tras aplicar técnicas electroforéticas al producto de amplificación. Esta técnica resultó sin duda una revolución en la determinación del sexo en aves, especialmente en especies monomórficas (i.e. aquellas en las que machos y hembras no pueden diferenciarse por ningún carácter morfológico o comportamental) aunque se encuentra limitada a laboratorios especializados equipados tanto para las pruebas moleculares como la separación y visualización de los fragmentos diagnósticos en geles de agarosa. En consecuencia, la determinación molecular del sexo en aves es únicamente posible hoy día lejos del lugar de muestreo y dificulta la obtención de los resultados hasta unos días después del envío o transporte de la muestra.

La determinación molecular del sexo basada en el ADN descrita a continuación presenta tres características fundamentales que la diferencian, a su vez, de los métodos basados en PCR: sencillez, portabilidad y rapidez. La sencillez de la invención permite realizar la determinación del sexo en aves fuera de laboratorios especializados y minimiza la posibilidad de error y contaminación, característica que la hace especialmente atractiva tanto para científicos en sus trabajos de campo como para criadores de aves. Una consecuencia directa de la sencillez y característica de la técnica es la portabilidad, permitiendo determinar el sexo y realizar aproximaciones experimentales en escenarios hasta la fecha impensables (e.g. en el área de estudio con la ayuda de la batería de un coche). La invención se caracteriza, además, por la rapidez con que se determina el sexo (menos de 90 minutos en el propio lugar de muestreo) frente a las varias horas de trabajo de laboratorio especializado que ascienden a días o semanas si se considera el tiempo de envío de la muestra desde el lugar de muestreo hasta el laboratorio.

La invención se basa en la amplificación isotérmica mediada por bucles (Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP) de un fragmento del gen de la proteína cromohelicasa de unión al ADN localizada en el cromosoma sexual femenino en aves

(cromosoma W) (CHDW) y de un fragmento de un elemento ultraconservado (UCE) en el genoma de la clase Aves tanto en machos como en hembras. Dicho UCE se utiliza a modo de control positivo para identificar falsos negativos en el marcador CHDW y, por tanto, minimiza la posibilidad de asignar erróneamente el sexo a los individuos examinados. La combinación de los resultados de LAMP para ambos marcadores será diagnóstica del sexo de la muestra analizada, siendo CHDW+/UCE+ el resultado observado en hembras y CHDW-/UCE+ el de los machos. El diagnóstico de cada reacción LAMP se realiza tras el cambio o no de color (reacciones positiva y negativa, respectivamente) del agente de tinción añadido que reacciona con los iones de pirofosfato desprendidos en cantidad proporcional a la cantidad de ADN sintetizada. Dado que LAMP es una reacción isotérmica, tan sólo se necesita un termobloque para la reacción de incubación y debido a las propiedades colorimétricas del agente de tinción añadido no se requiere de ningún dispositivo para ver los resultados de la reacción. Los cebadores diseñados son versátiles y extensibles a los órdenes de aves testados.

Así pues, la invención se refiere a un método para la determinación molecular del sexo en aves, que comprende en una primera etapa la extracción y preparación de ADN mediante cualquier protocolo de extracción del material genético de las muestras, seguido de una etapa de amplificación por métodos moleculares de un fragmento de la secuencia nucleotídica del gen de la proteína cromohelicasa de unión al ADN (CHD) comprendido entre las posiciones 2246 y 2445 de la secuencia de referencia del mismo gen secuenciado en *Gallus gallus* localizado en el cromosoma W (CHDW) de especies de la clase Aves y determinante por sí misma del sexo. En otra etapa se realiza una reacción de amplificación de referencia del elemento ultraconservado (UCE) localizado en el cromosoma 6 de las aves y presente en ambos sexos a través de cebadores específicos según secuencias SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8. La determinación del sexo en aves se realiza comparando los resultados de las amplificaciones de CHDW y de UCE antes descrito, de tal forma que un resultado positivo de las amplificaciones de la región concreta de CHDW y de UCE es diagnóstico, característico y determinante de las hembras de las aves; un resultado negativo de la amplificación de la región concreta de CHDW y positivo de la amplificación de UCE es diagnóstico, característico y determinante de los machos de las aves; y un resultado negativo de la amplificación de la región concreta de CHDW y negativo de la amplificación de UCE requiere una réplica de extracción de ADN y/o de amplificación de CHDW y UCE para la determinación del sexo.

Las amplificaciones de CHDW y de UCE se realizan preferentemente utilizando la técnica LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification).

En una realización preferente de la invención, la amplificación del fragmento de la secuencia nucleotídica del gen de la proteína cromohelicasa de unión al ADN (CHD) se realiza mediante la utilización de un grupo de cebadores específicos según secuencias SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4 para determinar el sexo en aves.

En otra forma preferente de realización se utilizan cebadores específicos según secuencias SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11 y SEQ ID NO 12 para determinar el sexo en aves del orden Falconiformes.

La invención también se refiere a un kit para la determinación del sexo en aves, que comprende al menos los medios y reactivos necesarios para la extracción, preparación, amplificación del ADN mediante la técnica LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) y la determinación del sexo mediante técnicas electroforéticas o de fluorescencia, y un conjunto de cebadores seleccionados de los grupos de cebadores específicos SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4 para determinación del sexo en aves y/o SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11 y SEQ ID NO 12 para la determinación del sexo en aves del orden Falconiformes.

20

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se refiere a un método de determinación molecular del sexo basada en la amplificación isotérmica mediada por bucles (Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP) la cual amplifica cualquier región del genoma flanqueada por la combinación de dos pares de cebadores (es decir, una cadena de ácido nucleico que sirve como punto de partida para la replicación del ADN) que alinean con seis regiones específicas. Este método utiliza la polimerasa Bst, obtenida de *Bacillus stearothermophilus* caracterizada por una actividad polimerasa 5'-3' y actividad de desplazamiento que permite la síntesis de la nueva cadena de ADN mediante un sistema de desplazamiento autocíclico de la doble cadena. Esta actividad de desplazamiento junto con la característica estructura de bucle generada como resultado del diseño de cebadores sintetiza grandes cantidades de producto de ADN en una única reacción y a una única temperatura.

La invención comprende las siguientes fases:

35 1. Extracción y preparación de ADN

2. Amplificación del marcador específico de las hembras (CHDW) y del control positivo de ADN (UCE)
 3. Diagnóstico del resultado de amplificación por LAMP
 4. Determinación del sexo
- 5 En una realización de la primera fase de la invención se requiere cualquier protocolo de extracción del material genético de las muestras, si bien protocolos basados en la purificación y aislamiento del ADN (como los basados en fenol cloroformo o los protocolos que emplean columnas de membrana de sílica) aseguran una menor interacción de inhibidores con la enzima (Bst polimerasa) y mayor rendimiento de la
- 10 reacción de amplificación.
- La segunda fase de la invención comprende la amplificación mediante LAMP de un fragmento del gen de la proteína cromohelicasa de unión al ADN localizada en el cromosoma sexual específico de las hembras (cromosoma W) (CHDW) y un fragmento de un elemento ultraconservado (UCE) localizado en el genoma de machos
- 15 y hembras de la clase Aves. La combinación de los resultados de LAMP para ambos marcadores es el criterio diagnóstico del sexo de la muestra analizada.
- El marcador específico de hembras se define por una secuencia de nucleótidos localizada entre las posiciones 2246 y 2445 del primer fragmento del gen codificante de la proteína cromohelicasa de unión al ADN (CHD1) secuenciado en *Gallus gallus*
- 20 (GenBank Acc.No. AF181826) en el cromosoma sexual W específico de hembras de la clase Aves. Dicha región presenta un promedio del 92% de homología entre las secuencias de CHDW del total de especies de aves disponibles en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>) y se sintetiza empleando los cebadores específicos diseñados a tal efecto.
- 25 En una realización preferida de la invención, se han diseñado los cebadores SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4 a partir de las secuencias del fragmento CHDW disponibles en GenBank. Este conjunto de cebadores se ha seleccionado frente a otros cebadores diseñados (e.g. el conjunto de cebadores SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 16 o el conjunto de cebadores
- 30 formado por SEQ ID NO 17, SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 19 y SEQ ID NO 20) al no funcionar en ninguna de las especies de los diversos órdenes taxonómicos evaluados. Si bien la síntesis de este fragmento específico de la región de CHDW se amplifica utilizando los cebadores SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4, es posible diseñar otros conjuntos de cebadores específicos para un determinado
- 35 orden como, por ejemplo, los cebadores SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11

y SEQ ID NO 12 que amplifican específicamente esta misma región del fragmento CHDW en especies del orden Falconiformes.

Los cebadores para amplificar el marcador UCE (SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8) se diseñan utilizando la secuencia del elemento ultraconservado 4126 localizado en el cromosoma 6 presentando un 99.9% de homología al considerar treinta especies de distintos órdenes dentro del superorden Neoaves (McCormack et al. 2013; *PLoS One* 8(1):e54848). Dicho marcador sirve para identificar falsos negativos en el marcador CHDW y, por tanto, minimiza la posibilidad de asignar erróneamente el sexo a los individuos examinados. Los cebadores específicos para UCE se diseñan empleando el software Primer Explorer v.4 (<http://primerexplorer.jp/e/>) y las recomendaciones especificadas en el manual. La invención requiere de dos reacciones LAMP por individuo (una por cada marcador anteriormente descrito) y la determinación del sexo se hará considerando conjuntamente el resultado de ambas reacciones.

La tercera fase de la invención (diagnóstico del resultado de la reacción de amplificación de cada marcador) se puede realizar mediante dos técnicas no necesariamente excluyentes. Por un lado, se pueden visualizar los fragmentos amplificados mediante técnicas electroforéticas. Las reacciones de amplificación positivas mostrarán el patrón en escalera característico de las reacciones LAMP (resultado de la amplificación concatenada del producto de amplificación) mientras que las reacciones negativas no mostrarán ningún fragmento amplificado salvo los posibles dímeros de cebadores. Por otro lado, los resultados de amplificación de las reacciones LAMP se pueden visualizar añadiendo un agente fluorescente al microtubo de ensayo donde se haya realizado la reacción de amplificación. Dicho agente fluorescente tiene la propiedad de interactuar con los iones de pirofosfato de magnesio producidos en cantidad proporcional a la cantidad de ADN sintetizada. Esta interacción provoca un cambio de color del agente fluorescente que indica una reacción LAMP positiva. En el caso en que no se haya sintetizado un producto de amplificación con los cebadores específicos no se producirá un cambio de color en el microtubo de ensayo y la reacción LAMP se determinará como negativa..

La cuarta fase de la invención (determinación del sexo) comprende la interpretación conjunta de los resultados de las reacciones LAMP específicas para cada marcador (CHDW y UCE) descritas en las fases anteriores. Los individuos en los que haya habido reacción de amplificación en las reacciones LAMP específicas para los marcadores CHDW (CHDW+) y UCE (UCE+) serán asignados como hembras

mientras que los individuos donde no haya amplificación en el marcador CHDW (CHDW-) pero sí en UCE (UCE+) serán asignados como machos. Para aquellos casos en que una misma muestra sea CHDW-/UCE- se deberá repetir el análisis para evitar asignaciones erróneas de machos debido a la mala calidad del ADN o problemas asociados a la síntesis de ADN en LAMP (falsos negativos).

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Electroforesis en gel con una concentración de 2,5% de agarosa de la amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP) del fragmento del gen CHD del cromosoma W de una hembra y un macho de alcatraz atlántico (*Sula bassana*) (Sba), halcón peregrino (*Falco peregrinus*) (Fpe), periquito turquesa (*Neophema pulchella*) (Npu), papamoscas (*Ficedula hypoleuca*) (Fhy), búho real (*Bubo bubo*) (Bbu), vencejo real (*Apus melba*) (Ame) y mochuelo excavador (*Athene cunicularia*) (Acu). Las líneas impares (1 a 13) muestran el patrón en escalera característico de la amplificación por LAMP. Dado que los cebadores específicos CHDW están diseñados para amplificar el fragmento del gen CHD del cromosoma W presente únicamente en hembras, una reacción LAMP positiva con los cebadores CHDW es diagnóstico, característico y determinante de las hembras de la clase Aves. Las no amplificación de las muestras localizadas en las líneas pares (2 a 14) con los cebadores CHDW (una vez descartados los falsos negativos, ver figura 2) es diagnóstico, característico y determinante de los machos de la clase Aves. La última línea en el gel de agarosa (S) es el marcador de tamaños desde las 100 hasta las 1000 pares de bases.

Figura 2. Electroforesis en gel con una concentración de 2,5% de agarosa de la amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP) del elemento ultraconservado UCE4126 localizado en el cromosoma 6 de las aves de una hembra y un macho de alcatraz atlántico (*Sula bassana*) (Sba), halcón peregrino (*Falco peregrinus*) (Fpe), periquito turquesa (*Neophema pulchella*) (Npu), papamoscas (*Ficedula hypoleuca*) (Fhy), búho real (*Bubo bubo*) (Bbu), vencejo real (*Apus melba*) (Ame) y mochuelo excavador (*Athene cunicularia*) (Acu) testadas en la figura 1. Estos elementos muestran un 99,9% de homología en todas las especies de la clase Aves, independientemente del sexo, de modo que todos los individuos testados con los cebadores UCE deberán de amplificar con la técnica LAMP. El marcador UCE sirve, por tanto, de control positivo de amplificación y diagnóstico de la calidad del ADN. En

combinación con la figura 1, por tanto, puede confirmarse que las muestras localizadas en las líneas impares (1 a 13) son hembras mientras que aquellas en las líneas pares (2 a 14) son machos. La última línea en el gel de agarosa (S) es el marcador de tamaños desde las 100 hasta las 1000 pares de bases.

5

Figura 3. Irradiación con luz ultravioleta de los catorce microtubos con la reacción LAMP de CHDW de las hembras (muestras impares: 1 a 13) y machos (muestras pares: 2 a 14) de las siete especies de distintos órdenes de la clase Aves testados (ver leyenda de figura 1). La fluorescencia emitida es el resultado de la interacción de los
10 residuos de pirofosfato producidos por la reacción de síntesis de ADN con el agente fluorescente Sybr Green. De este modo de puede determinar visualmente si la reacción LAMP ha sido positiva (i.e. emite fluorescencia: muestras en líneas impares 1 a 13) o negativa (i.e. no emite fluorescencia: muestras en líneas pares 2 a 14).

15 **Figura 4.** Irradiación con luz ultravioleta de la reacción LAMP de CHDW realizada para 24 individuos de papamoscas (*Ficedula hypoleuca*). Las muestras 1, 2, 3, 4, 6, 7, 13, 14 y 16 corresponden a hembras de papamoscas donde se produce reacción de amplificación y se produce interacción entre los residuos de pirofosfato y el agente fluorescente.

20

EJEMPLOS

**EJEMPLO 1: Método de determinación molecular del sexo de aves por amplificación isotérmica mediada por bucles y diagnóstico de resultados
25 mediante técnicas electroforéticas y fluorescentes**

Se extrae el ADN del individuo para el que se desee determinar el sexo partiendo de una lisis celular con proteinasa K de 10-100 μ L de sangre. Al lisado resultante se somete a un protocolo de extracción y purificación de ADN basado en cloroformo y
30 alcohol isoamílico, resuspendiendo el ADN resultante en 100 μ L de TLE (Tris-HCl 1 M, EDTA 0,5 M) a una concentración final de 25-50 ng/ μ L.

A continuación, se preparan reactivos para dos reacciones por muestra (una para amplificar CHDW y otra para amplificar UCE). Para cada reacción se añaden dNTP 0,4
35 mM, betaína 1-2 M, 8 unidades de Bst, tampón 1x (20 mM Tris-HCl, 10 mM

(NH₄)₂SO₄, 50 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0,1% Tween[®] 20, pH 8,8), 1-2 μM de los cebadores internos (FIP-BIP; CHDW: SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4; UCE: SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8) y una concentración entre 5 y 10 veces menor de los cebadores externos (F3-B3; CHDW: SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2; UCE: SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6), 2 μL del extracto de ADN y H₂O hasta completar 25 μL en microtubos. Estos se incuban a las temperaturas especificadas en la tabla 1 en un termociclador durante 80 minutos. Los resultados de amplificación se visualizan en un transiluminador de luz ultravioleta tras separar mediante técnicas electroforéticas 5 μL de producto en un gel de agarosa teñido con Sybr Safe (ThermoFisher Scientific). Las hembras muestran el patrón en escalera característico de las reacciones LAMP en las reacciones hechas con el conjunto de cebadores específico para amplificar CHDW y UCE mientras que los machos tan sólo mostrarán un patrón similar en las reacciones que amplifiquen UCE (figuras 1 y 2). Para la comprobación de los resultados de amplificación mediante fluorescencia, se añaden 5 μL de Sybr Green I Nucleic Acid Stain (Life Technologies) a cada microtubo y se irradia con una lámpara portátil de luz ultravioleta. Los microtubos que muestren fluorescencia serán positivos, mientras que la ausencia de la misma denotará falta de amplificación (figura 3).

TABLA 1

Relación de temperaturas de incubación para la amplificación mediante LAMP de los marcadores CHDW y UCE para siete especies pertenecientes a seis órdenes distintos de la clase Aves.

Orden	Familia	Especie	Nombre común	CHDW (°C)	UCE (°C)
Suliformes	Sulidae	<i>Sula bassana</i>	Alcatraz atlántico	51	59-61
Falconiformes	Falconidae	<i>Falco peregrinus</i>	Halcón peregrino	53	61
Psittaciformes	Psittacidae	<i>Neophema pulchella</i>	Periquito turquesa	59	61
Passeriformes	Muscicapidae	<i>Ficedula hypoleuca</i>	Papamoscas	59	57
Strigiformes	Strigidae	<i>Bubo bubo</i>	Búho real	55	59
Apodiformes	Apodidae	<i>Apus melba</i>	Vencejo real	55	59
Strigiformes	Strigidae	<i>Athene cunicularia</i>	Mochuelo excavador	59-61	57-63

EJEMPLO 2: Amplificación del fragmento CHDW mediante amplificación isotérmica mediada por bucles aplicada a extractos de ADN obtenidos con NaOH y diagnóstico de resultados empleando agentes fluorescentes.

5 1. Extracción y preparación de ADN.

Se añade NaOH 100mM a una muestra de entre 10-100 μ L de sangre de 24 individuos de papamoscas (*Ficedula hypoleuca*) y se lleva a ebullición a 100°C durante 10 minutos. El extracto obtenido se deja enfriar a temperatura ambiente y se hace una dilución 1:100.

10 2. Amplificación del marcador específico de las hembras (CHDW).

Se preparan por un lado i) cebadores liofilizados (o evaporados empleando una bomba de vacío) en un mismo microtubo a concentraciones 1,6 mM (FIP, BIP; SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4) y 0,2 mM (F3, B3; SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2), y, por otro lado, ii) tampón 10x compuesto por KCl 750 mM, MgCl₂ 35 mM y Tris (pH=8,3) 100 mM. La
15 mezcla de reactivos que se preparará para cada reacción se hará en microtubos y para un total de 24 muestras de modo que cada reacción deberá tener una composición final de tampón 1x, dNTP 0,4 mM, betaina 1-2 M, sacarosa 2-10% y 8 unidades de Bst. Los cebadores liofilizados se rehidratan con un volumen de H₂O igual al de partida (previo a la liofilización) y se le añaden a la mezcla de reactivos.
20 Finalmente, se dispensan 23 μ L a cada microtubo donde se realizará la amplificación LAMP y se le añaden 2 μ L de la dilución 1:100 del extracto de ADN. La incubación de las reacciones se realiza a 55-70°C entre 60 y 90 minutos en un termobloque.

3. Diagnóstico del resultado de amplificación por LAMP.

Una vez concluida la incubación, se añaden 5 μ L de Sybr Green I Nucleic Acid Stain
25 (Life Technologies) y se irradia con una lámpara portátil de luz ultravioleta. Los microtubos que irradian fluorescencia indicarán una reacción de amplificación positiva y serán hembras (por haber interacción entre los residuos de pirofosfato y el agente fluorescente), mientras que la ausencia de la misma denotará falta de amplificación y, por tanto, serán asignados como machos (figura 4).

30

REIVINDICACIONES

1. Método para la determinación molecular del sexo en aves, que comprende:
 - i. extracción y preparación de ADN mediante cualquier protocolo de extracción del material genético de las muestras.
 - 5 ii. la amplificación mediante la técnica LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) de un fragmento de la secuencia nucleotídica del gen de la proteína cromohelicasa de unión al ADN (CHD) comprendido entre las posiciones 2246 y 2445 de la secuencia de referencia del mismo gen secuenciado en *Gallus gallus* localizado en el cromosoma W (CHDW) de especies de la clase Aves y determinante por sí misma del sexo; y
 - 10 iii. una reacción de amplificación de referencia mediante la técnica LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) del elemento ultraconservado (UCE) localizado en el cromosoma 6 de las aves y presente en ambos sexos a través de cebadores específicos según secuencias SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8; en donde
 - 15 a. un resultado positivo de las amplificaciones de la región concreta de CHDW y de UCE es diagnóstico, característico y determinante de las hembras de las aves;
 - b. un resultado negativo de la amplificación de la región concreta de CHDW y positivo de la amplificación de UCE es diagnóstico, característico y determinante de los machos de las aves;
 - 20 c. un resultado negativo de la amplificación de la región concreta de CHDW y negativo de la amplificación de UCE requiere una réplica de extracción de ADN y/o de amplificación de CHDW y
 - 25 UCE para la determinación del sexo.
2. Método según reivindicación 1, caracterizado porque la amplificación del fragmento de la secuencia nucleotídica del gen de la proteína cromohelicasa de unión al ADN (CHD) es realizada mediante la utilización de los cebadores específicos SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4 para determinación del sexo en aves.
- 30 3. Método según reivindicación 1, caracterizado porque la amplificación del fragmento de la secuencia nucleotídica del gen de la proteína cromohelicasa de unión al ADN (CHD) es realizada mediante la utilización de los cebadores

específicos SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11 y SEQ ID NO 12 para la determinación del sexo en aves del orden Falconiformes.

4. Kit para la determinación del sexo en aves mediante un método según se define en
5 las reivindicaciones 1 a 3, que comprende al menos:
- i. medios y reactivos necesarios para la extracción, preparación, amplificación del ADN mediante la técnica LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) y la determinación del sexo mediante técnicas electroforéticas o de fluorescencia; y
 - 10 ii. un conjunto de cebadores seleccionados de los grupos de cebadores específicos:
 - a. SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4 para determinación del sexo en aves; y/o
 - 15 b. SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11 y SEQ ID NO 12 para la determinación del sexo en aves del orden Falconiformes.

Figura 1

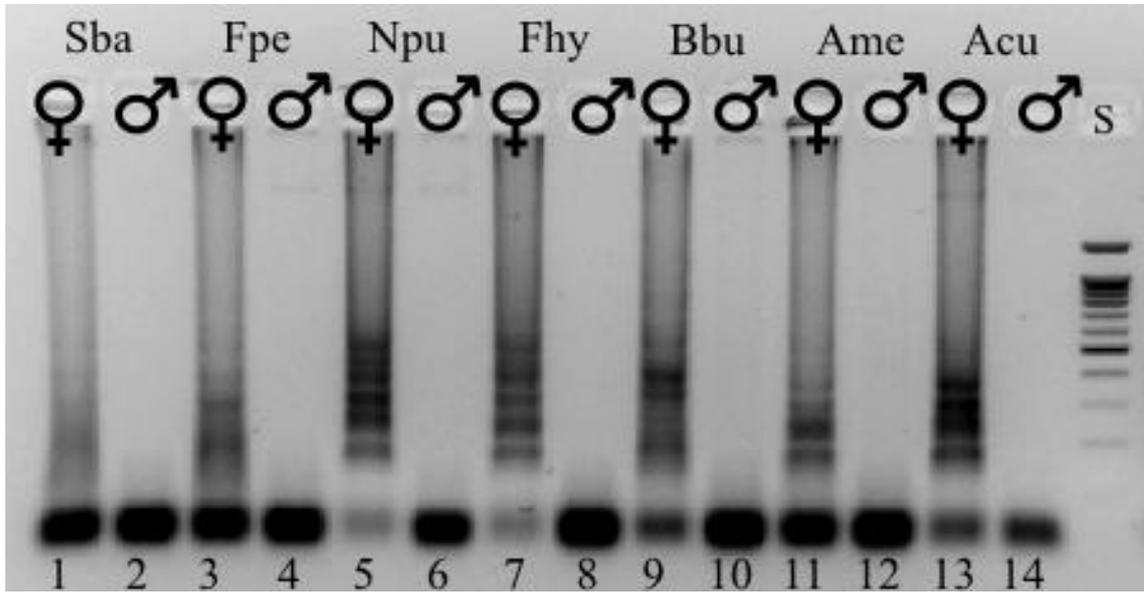


Figura 2

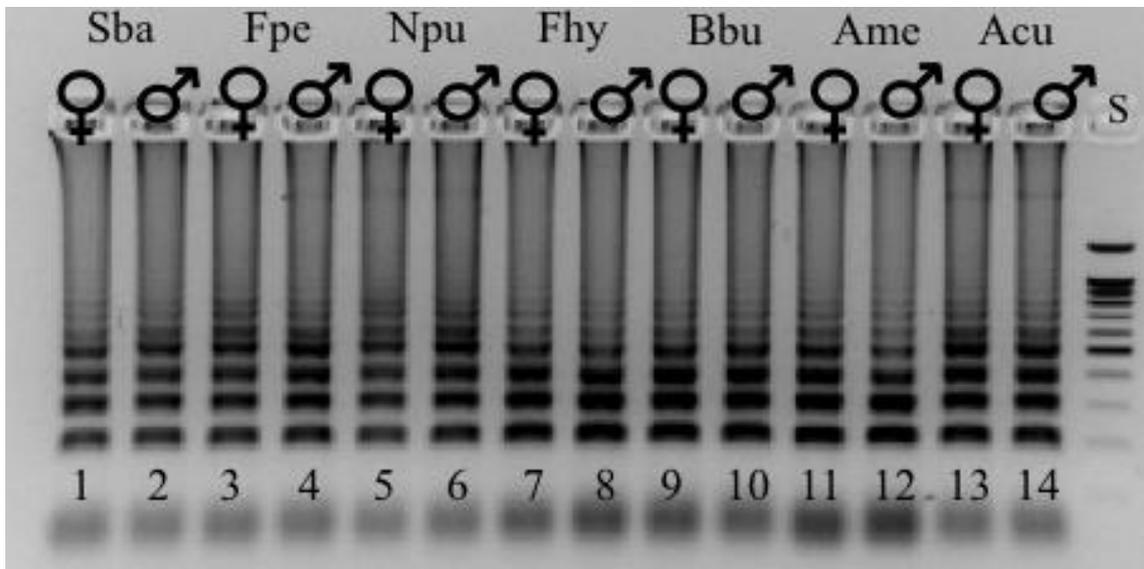


Figura 3

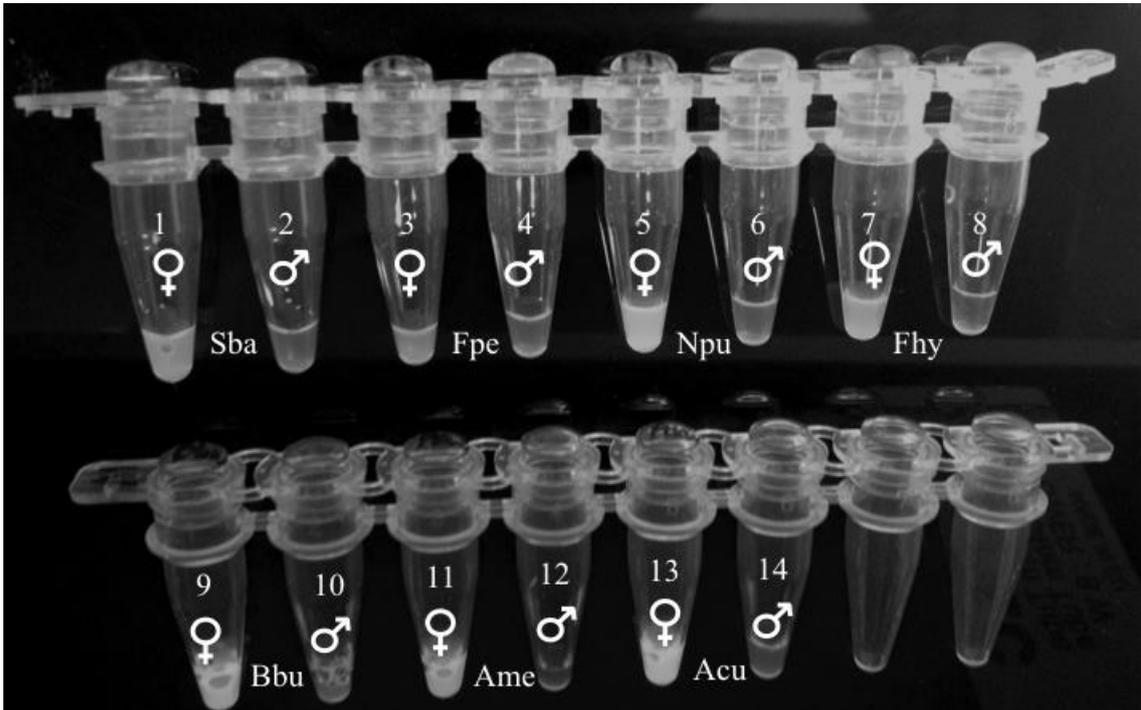
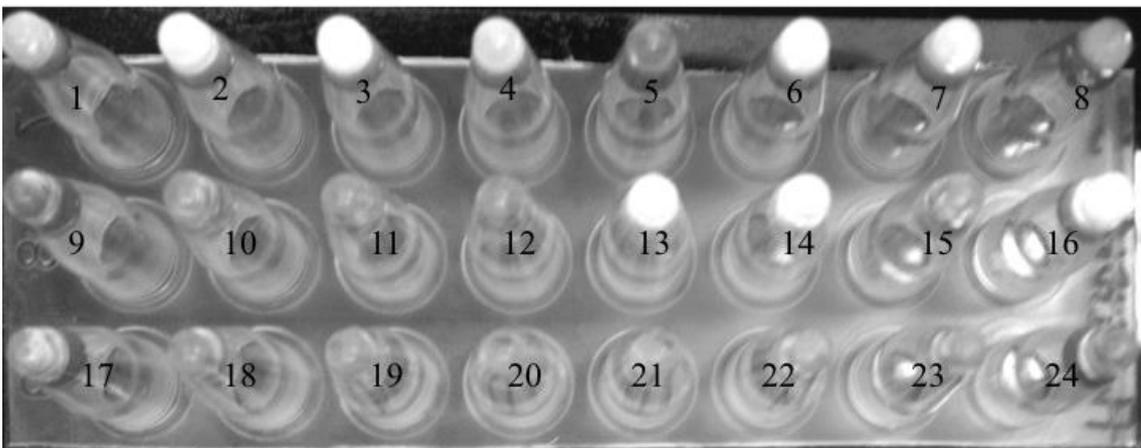


Figura 4



LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

5 <120> Método de determinación molecular del sexo de aves por amplificación isotérmica mediada por bucles
 <130> ES2016OTR
 <160> 20
 <170> PatentIn version 3.5

10 <210> 1
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

15 <220>
 <223> Cebador F3 para amplificación del marcador CHDW

<400> 1
 20 catgtagctt tgaactactt aatct 25

<210> 2
 <211> 18
 <212> DNA
 25 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cebador B3 para amplificación del marcador CHDW

30 <400> 2
 tgcacgcgcta aatccttt 18

<210> 3
 <211> 54
 35 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cebador FIP para amplificación del marcador CHDW

40 <400> 3
 gagtcactat cagatccaga atatcttctt ttgatcagct ttaatggaag tgaa
 54

45 <210> 4
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

ES 2 647 134 A1

<220>
<223> Cebador BIP para amplificación del marcador CHDW

5 <400> 4
agtgactcca tctcagaaag aaaacttttc tcggtcttcc acgtttt 47

<210> 5
<211> 24
10 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador F3 para amplificación del marcador UCE4126

15 <400> 5
gggaaacaag gataaaatta ctcc 24

<210> 6
20 <211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
25 <223> Cebador B3 para amplificación del marcador UCE4126

<400> 6
tgcccagaaa attccattc 19

30 <210> 7
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

35 <220>
<223> Cebador FIP para amplificación del marcador UCE4126

<400> 7
cgagtgtggt aagcacagtt ttatttttta tggttaatga cctatagtat ctcc
40 54

<210> 8
<211> 47
<212> DNA
45 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador BIP para amplificación del marcador UCE4126

ES 2 647 134 A1

<400> 8
gaggactggt ctgcagggtta tttttttgct atctgattcg aaaagtc 47

5 <210> 9
211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

10 <220>
<223> Cebador F3 para la amplificación del marcador CHDW
en Falconiformes

<400> 9
15 aaatgtttta gtcacgtagc t 21

<210> 10
<211> 19
<212> DNA
20 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador B3 para la amplificación del marcador CHDW
en Falconiformes

25 <400> 10
tctgcatcgc taaatcctt 19

<210> 11
30 <211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
35 <223> Cebador FIP para la amplificación del marcador CHDW
en Falconiformes

<400> 11
40 cttctgctcc tactgcggtt cttttttaat ctgaaattcc agatcagct 49

<210> 12
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

45 <220>
<223> Cebador BIP para la amplificación del marcador CHDW
en Falconiformes

ES 2 647 134 A1

<400> 12
attctggatc tgatagtgac tccattttat tttctcgacg agtagttcg 49

5 <210> 13
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

10 <220>
<223> Cebador F3 degenerado y que no funciona para la
amplificación del marcador CHDW

<400> 13
15 cayrtarctt traactastt amtct 25

<210> 14
<211> 18
<212> DNA
20 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador B3 degenerado y que no funciona para la
amplificación del marcador CHDW

25 <400> 14
tgcacrcrcta aatccttt 18

<210> 15
30 <211> 54
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
35 <223> Cebador FIP degenerado y que no funciona para la
amplificación del marcador CHDW

<400> 15
40 gartcactat cagatccrga atatcttctt ttgatcarct ttaatggaar tgaa 54

<210> 16
<211> 47
<212> DNA
45 <213> Artificial Sequence

<220>

ES 2 647 134 A1

<223> Cebador BIP degenerado y que no funciona para la
amplificación del marcador CHDW

<400> 16
5 agtgaytcmr tctcagaaag aaaacttttc gyggtcktcc acgtttt 47

<210> 17
<211> 23
<212> DNA
10 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador F3 que no funciona para la amplificación del
marcador CHDW

15 <400> 17
tgtttattca tgtagctttg aac 23

<210> 18
20 <211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
25 <223> Cebador B3 que no funcional para la amplificación
del marcador CHDW

<400> 18
30 tctgcatcgc taaatcctt 19

<210> 19
<211> 50
<212> DNA
35 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador FIP que no funciona para la amplificación
del marcador CHDW

40 <400> 19
ctcctcctac tgtgtttccc ttttttactt aatctgaaat tccagatcag 50

<210> 20
<211> 45
45 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

ES 2 647 134 A1

<223> Cebador BIP que no funciona para la amplificación del
marcador CHDW

<400> 20

5 atagtgactc ggtctcagaa agattttgag gaatagttcg cggtc 45