



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 319 009**

② Número de solicitud: 200603211

⑤ Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑫ Fecha de presentación: **18.12.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2009**

Fecha de la concesión: **21.09.2009**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **15.10.2009**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**15.10.2009**

⑰ Titular/es:  
**Universidade de Santiago de Compostela**  
**Edif. CACTUS-CITT-Campus Sur**  
**15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

⑱ Inventor/es: **Calo Mata, Pilar;**  
**Pascoal Cumbane, Ananías;**  
**Prado Rodríguez, Marta;**  
**Cepeda Sáez, Alberto y**  
**Barros Velázquez, Jorge**

⑲ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Método de identificación de especies de la superfamilia *Penaeoidea* mediante análisis de ADN.**

㉑ Resumen:

Método de identificación de especies de la superfamilia *Penaeoidea* mediante análisis de ADN.

La presente invención se refiere a un método de identificación de especies de la superfamilia *Penaeoidea* mediante análisis de ADN que comprende:

A. Extracción y aislamiento del ADN a partir de una muestra biológica o alimentaria.

B. La posterior amplificación mediante el uso de cebadores de cualquier secuencia nucleotídica aislada y su complementaria, del ADN aislado en el paso anterior, caracterizada por estar comprendida entre secuencias nucleotídicas con al menos un 90% de identidad con SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2.

C. Digestión de la secuencia nucleotídica amplificada mediante los enzimas de restricción *AluI*, *TaqI* o *HinfI*.

D. Detección de los fragmentos obtenidos en el paso anterior.

E. Identificación de las especies por comparación de los fragmentos detectados en el paso anterior con el patrón de fragmentos característico de cada especie.

ES 2 319 009 B2

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

## DESCRIPCIÓN

Método de identificación de especies de la superfamilia *Penaeoidea* mediante análisis de ADN.

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a un método de identificación de especies de la superfamilia *Penaeoidea* mediante análisis de ADN.

10 **Estado de la técnica**

Diversos países, entre ellos los países integrantes de la Unión Europea, destacan entre sus objetivos prioritarios lograr la transparencia en los mercados pesqueros y ofrecer al consumidor información fiable sobre los productos que va a consumir. Este hecho resulta fundamental en un mercado cada vez más globalizado donde se pueden encontrar varias especies distintas bajo una misma denominación. Este es el caso concreto de las especies pertenecientes a la superfamilia *Penaeoidea*. La incorrecta catalogación, debida a que, entre otras cosas, especies de origen y características muy diversas no son adecuadamente identificadas, puede ocasionar problemas de sustituciones que afectarían tanto al etiquetado como a la actividad comercial del sector y al propio consumidor.

En el mercado existe una notable heterogeneidad de las especies y géneros que constituyen los principales “nombres comerciales” de langostinos peneidos. Cabe destacar que bajo los términos “langostino banana”, “langostino blanco” o “langostino tigre” se encuadran distintas especies de peneidos e incluso distintos géneros. Otro ejemplo es la cada vez más frecuente comercialización de gamba pelada donde se engloban diversas especies de langostinos cuya diferenciación en base a criterios morfológicos es complicada.

Estos ejemplos ilustran la importancia de la correcta identificación de estas especies marinas tanto de origen pesquero como procedentes de la acuicultura.

Sin embargo, la situación actual es de carencia de métodos fiables de identificación de especies de crustáceos pertenecientes al Orden *Decapoda*, que engloba a las principales especies de langostinos y gambones.

Se han realizado con anterioridad estudios filogenéticos con el objetivo de relacionar distintas especies dentro de la superfamilia *Penaeoidea*, en los que se ha trabajado con la clonación, secuenciación y comparación de secuencias nucleotídicas del ADN. En concreto, en el artículo de nombre “*Sequence and Conservation of a RNA and tRNA<sup>Val</sup> Mitochondrial Gene Fragment from *Penaeus californiensis* and Comparison with *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris**” de Luis Enrique Gutiérrez-Millán *et al* (Marine Biotechnology 4, 392-398, 2002) se realizó un estudio donde se utilizaba una secuencia nucleotídica de 1.38 Kb que abarcaba un fragmento de los genes mitocondriales 16S rRNA y 12S rRNA y la secuencia completa del gen mitocondrial tRNA<sup>Val</sup> para el estudio de las relaciones filogenéticas entre las especies *Penaeus californiensis*, *Penaeus vannamei* y *Penaeus stylirostris*. Sin embargo, este estudio no aporta un método para la identificación de las citadas especies.

En el artículo “*Species identification of Five Penaeid Shrimps using PCR-RFLP and SSCP analyses of 16S Ribosomal DNA*” de Bavornlak Khamnamtong *et al*, (Journal of Biochemistry and Molecular Biology Vol 38 No. 4 July 2005, pp 491-499) se cita un método para la identificación de especies de peneideos en base al polimorfismo del gen 16S rRNA en el cual abarcaban únicamente las especies *P. monodon*, *P. semisulcatus*, *Litopenaeus vannamei*, *Fenneropenaeus merguensis* y *Marsupenaeus japonicus*. En dicho método se describe el proceso de obtención de nuevos cebadores específicos por amplificación de las regiones del ADN correspondientes a los genes COI - COII y 16S rRNA mediante PCR utilizando cebadores universales y el posterior alineamiento de las secuencias obtenidas, con el fin de encontrar secuencias conservadas en las distintas especies de peneidos que pudieran servir como cebadores.

Con los nuevos cebadores obtenidos, 16S 312 Forward y 16S 312 Reverse, amplificaron una secuencia de 312 pb del 16S rDNA. Los productos amplificados fueron sometidos a digestión por separado con los enzimas de restricción *AluI*, *SspI* y *VspI* y posteriormente a electroforesis. Se obtuvieron patrones de bandas para la identificación de las especies *P. monodon*, *P. semisulcatus*, *L. vannamei*, *F. merguensis* y *M. japonicus*. Sin embargo, en el caso de algunas de estas especies (*P. semisulcatus*, *M. japonicus* y *L. vannamei*), no lograron dilucidar de qué especie se trataba ya que presentaban los mismos patrones de corte.

A la vista de los intentos anteriormente realizados, podemos observar cómo aún persiste la necesidad de encontrar un sistema que proporcione soluciones a los problemas planteados a la hora de realizar una correcta identificación de especies pertenecientes a la superfamilia *Penaeoidea*.

**Descripción de la invención**

De acuerdo con la presente invención, los autores proporcionan un método de identificación de langostinos capaz de identificar al menos 24 especies pertenecientes a la superfamilia *Penaeoidea* mediante análisis de ADN previamente aislado.

## ES 2 319 009 B2

En la presente invención se logra la correcta identificación de especies comerciales por medio de un método fiable, que cumple con una serie de requisitos entre los que cabe destacar los siguientes: que permite la identificación de un gran número de especies dentro de la misma familia, resulta fiable, se minimiza el margen de confusión, siendo a la vez sencillo y reproducible. Por otro lado, este método utiliza marcadores susceptibles de ser seguidos durante toda la vida útil del producto, con el fin de garantizar su trazabilidad.

En la presente invención se identifican las secuencias nucleotídicas que van a ser utilizadas en los ensayos de identificación de especies pertenecientes a la superfamilia *Penaeoidea* y se desarrollan los cebadores que resultan necesarios para la implantación de sistemas de trazabilidad.

La presente invención versa sobre un método de identificación de especies pertenecientes a la superfamilia *Penaeoidea* cuyos aspectos fundamentales son:

- La extracción y aislamiento del ADN a partir de una muestra biológica o alimentaria,
- La posterior amplificación mediante el uso de cebadores de cualquier secuencia nucleotídica aislada y su complementaria, del ADN aislado en el paso anterior, caracterizada por estar comprendida entre secuencias nucleotídicas con al menos un 90% de identidad con SEQ ID N°1 y SEQ ID N°2
- La digestión de la secuencia nucleotídica amplificada mediante los enzimas de restricción *AluI*, *TaqI* o *HinfI*
- La detección de los fragmentos de restricción obtenidos en el paso anterior
- La identificación de las especies por comparación de los fragmentos detectados en el paso anterior con el patrón de fragmentos de restricción característico de cada especie.

En una realización preferida la secuencia amplificada en la presente invención está comprendida entre SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2.

De aquí en adelante nos referiremos a las secuencias nucleotídicas aisladas susceptibles de ser amplificadas mediante el uso de cebadores y que se encuentran comprendidas entre las SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2 o entre secuencias con un grado de identidad de al menos el 90% con SEQ ID n° 1 y SEQ ID N° 2, y a sus secuencias complementarias, como secuencias nucleotídicas de la invención.

En una realización preferida, los cebadores utilizados para la amplificación de las secuencias nucleotídicas de la invención son un cebador directo que comprende la SEQ ID N° 3 (16S CRUC3), y un cebador reverso que comprende la SEQ ID N° 4 (16S CRUC4).

Estos cebadores permiten la amplificación de todas las especies que habitualmente se pueden encontrar en el mercado y de aquí en adelante nos referiremos a ellos como cebadores de la invención.

En otra realización preferida las secuencias nucleotídicas amplificadas se seleccionan de cualquiera de las secuencias SEQ ID N° 7 a SEQ ID N° 33.

Otra realización preferida de la invención es la amplificación de las secuencias nucleotídicas de la invención mediante PCR. En la PCR, la temperatura de anillamiento varía entre 51°C y 55°C, debido a la variabilidad interespecífica que presentan las secuencias manejadas para los distintos langostinos.

En otra realización preferida la detección e identificación de los fragmentos se realiza mediante electroforesis.

En otra realización preferida de la invención la identificación de las especies se realiza por comparación de los patrones de tamaño de fragmentos de restricción obtenidos, con los reflejados en la tabla 1.

En una realización preferida de la invención el presente método permite identificar al menos cualquiera de las especies de la siguiente lista: *Penaeus monodon*, *Penaeus semisulcatus*, *Penaeus setiferus*, *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, *Farfantepenaeus brevirostris*, *Farfantepenaeus brasiliensis*, *Farfantepenaeus notialis*, *Farfantepenaeus aztecus*, *Farfantepenaeus californiensis*, *Fenneropenaeus indicus*, *Fenneropenaeus merguensis*, *Fenneropenaeus* sp. 29, *Marsupenaeus japonicus*, *Melicertus latusulcatus*, *Melicertus* sp. 30, *Parapenaeus longirostris*, *Metapenaeus* sp. 21, *Metapenaeus* sp. 9, *Solenocera agasizzi*, *Solenocera* sp. 15, *Solenocera* sp. 18, *Pleoticus muelleri* y *Aristeomorpha foliacea*.

Otras especies pertenecientes a la superfamilia *Penaeoidea* susceptibles de ser identificadas mediante el método de la presente invención quedarían dentro de las realizaciones de la presente invención.

La enzima de restricción *AluI*, mediante la digestión de las secuencias nucleotídicas de la invención, genera patrones de bandas que permiten diferenciar al menos cualquiera de las especies citadas a continuación: *Penaeus monodon*, *Penaeus semisulcatus*, *Penaeus setiferus*, *Litopenaeus stylirostris*, *Farfantepenaeus brasiliensis*, *Farfantepe-*

*naeus notialis*, *Fenneropenaeus indicus*, *Marsupenaeus japonicus*, *Melicertus latisulcatus*, *Melicertus* sp. 30, *Metapenaeus* sp. 21, *Solenocera agasizzi*, *Solenocera* sp. 15, *Solenocera* sp. 18, *Pleoticus muelleri* y *Aristeomorpha foliacea*.

5 Por otro lado, para los casos en los que, mediante los ensayos realizados según el método de la presente invención utilizando como enzima de restricción *AluI*, persistan dudas sobre la correcta identificación, existen ensayos complementarios mediante la utilización de los enzimas de restricción *TaqI* o de *HinfI*, que permiten confirmar la especie a la que pertenece la muestra biológica o alimentaria a evaluar.

10 En concreto,

- la utilización de la enzima de restricción *TaqI* en el método de la presente invención, permite la identificación de al menos cualquiera de las siguientes especies: *Farfantepenaeus brevisrostris*, *Farfantepenaeus aztecus* y *Farfantepenaeus californiensis*.
- la utilización de las enzimas de restricción *TaqI* y *HinfI* mediante ensayos independientes realizados según el método de la presente invención, permite la identificación de al menos cualquiera de las siguientes especies: *Litopenaeus vannamei*, *Fenneropenaeus merguensis* y *Fenneropenaeus* sp. 29, las cuales son claramente diferenciables.
- la utilización de la enzima de restricción *HinfI* en el método de la presente invención, permite la identificación de al menos cualquiera de las siguientes especies: *Metapenaeus* sp. 9 y *Parapenaeus longirostris*.

25 Los enzimas de restricción utilizados en la presente invención evitan zonas de corte que presentan variabilidad intraespecífica, lo cual contribuye a minimizar el margen de confusión entre distintas especies.

30 Las secuencias nucleotídicas de la invención están caracterizadas por presentar tamaños variables en especies muy próximas. El tamaño que dichas secuencias amplificadas presentan, por un lado facilita su amplificación y por otro lado permite el análisis e identificación en productos procesados donde el ADN se encuentra parcialmente degradado. Preferiblemente este tamaño se encuentra entre 515 y 535 pb aproximadamente.

35 En este documento se entiende por “secuencia nucleotídica” cualquier polímero de nucleótidos compuesto por dos o más subunidades que son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, unidos entre sí por puentes fosfodiéster. Las “secuencias nucleotídicas” incluyen ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, y fragmentos generados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o por otros métodos que incluyen pero no se limita a ligamiento, escisión, acción de endonucleasas y acción de exonucleasas.

40 Por “nucleótido” se entiende una unidad monomérica de ADN o ARN que contiene un resto de azúcar (pentosa), un fosfato y una base heterocíclica nitrogenada. Las cuatro bases del ADN son adenina (“A”), guanina (“G”), citosina (“C”) y timina (“T”). Las cuatro bases del ARN son A, G, C y uracilo (“U”).

45 Por “secuencia nucleotídica aislada” se entiende una molécula de ácido nucleico que no está integrada en el ADN genómico de un organismo. Dicha molécula de ácido nucleico puede separarse del ADN genómico de una célula, puede producirse usando tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, amplificación por PCR, clonación, etc.), o puede sintetizarse químicamente. La molécula de ácido nucleico aislada puede obtenerse de su fuente natural como gen completo o una parte del mismo capaz de formar un híbrido estable con ese gen. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria.

50 Por “enzimas de restricción” se entiende enzimas endonucleasas que cortan los enlaces fosfodiéster del material genético a partir de una secuencia que reconocen (diana de restricción). Las dianas de restricción cuentan con entre 4 y 12 pares de bases y son palindrómicas. Estas enzimas permiten cortar ADN bicatenario rompiendo 2 enlaces fosfodiéster en la doble cadena y dando lugar a dos extremos del ADN, que pueden ser Romos o Cohesivos/escalonados.

55 Por “PCR”, Reacción en Cadena de la Polimerasa, se entiende una técnica de biología molecular que permite amplificar un fragmento de ADN, gracias a la acción de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternados, para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas.

60 En este documento se entiende por “electroforesis” una técnica para la separación de moléculas (proteínas o ácidos nucleicos) sobre la base de su tamaño molecular, conformación, el tamaño de los poros del gel o la magnitud de la carga neta de la molécula y carga eléctrica. Para la separación se usa un gel de agarosa o poliacrilamida. Las moléculas cargadas son forzadas a ir a través de una matriz debido a un flujo de corriente eléctrica. Al exponer la mezcla de moléculas a un campo eléctrico, éstas se moverán y deberán ir pasando a través del gel, por lo que las pequeñas se moverán mejor, más rápidamente. Así, las más pequeñas avanzarán más y las más grandes quedarán cerca del lugar de partida.

## ES 2 319 009 B2

Los fragmentos generados a partir de una molécula de ADN por corte con enzimas de restricción pueden ser separados en base a su tamaño utilizando un gel de electroforesis. Los fragmentos de ADN migrarán de un modo inversamente proporcional al logaritmo de su tamaño o peso molecular.

5 El movimiento de los fragmentos de ADN genera un “patrón de bandas”, donde cada banda corresponde a un fragmento de un tamaño particular. El tamaño de cada fragmento puede ser determinado utilizando un marcador de ADN cuyos fragmentos tienen pesos moleculares conocidos. Este marcador sirve de control y migrará paralelo a las bandas de ADN que deseamos analizar.

10 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

15

### Exposición detallada de modos de realización

20 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del método de detección anteriormente descrito.

#### Ejemplo 1

25 *Extracción, Purificación y Cuantificación de DNA de langostinos*

El ADN de los langostinos fue extraído a partir de porciones de 250 mg de músculo esquelético de cada una de las muestras investigadas, mediante el método comercial (DNeasy Tissue Isolation kit, QIAGEN, Darmstadt, Germany), que consta de dos fases:

30

#### A) Fase de lisis celular

35 Se cortó el músculo en pequeños pedazos para que la tisis fuera más eficiente. Se pesaron 250 mg. de muestra en un tubo microcentrífuga de 1,5 ml y se le añadieron 180  $\mu$ l de buffer ATL y 20  $\mu$ l de proteinasa K. Se agitó vigorosamente el tubo de microcentrífuga (Mixtub Raypa) y se incubó en el termomezclador (Thermomixer Comfort, Eppendorf) a 55°C durante 1-3 horas o bien toda la noche para que la tisis fuera eficiente. En algunos casos se añadieron 4  $\mu$ l de RNasa (100 mg/ml) y se agitó vigorosamente.

40 Después se mantuvieron las muestras durante 2 minutos a temperatura ambiente (18-20°C), se agitaron durante 15 segundos y se les añadió 200  $\mu$ l de buffer AL a cada muestra. Se agitó cuidadosamente y se incubó a 70°C durante 10 minutos. A continuación se añadieron 200  $\mu$ l de etanol (96-100%) en la muestra y se agitó suavemente.

45

#### B) Fase de purificación del ADN

50 Se transfirieron las muestras que habían completado la tisis a una membrana (*DNeasy Mini Spin column*) en un tubo colector de 2 ml. La muestra se centrifugó en microcentrífuga (modelo 5415 D, Eppendorf) a 8.000 rpm durante 1 minuto. Se transfirió el *DNeasy Mini Spin column* a otro tubo de colector de 2 ml, y se añadieron 500  $\mu$ l de buffer AW1. Se sometió a centrifugación a 8.000 rpm durante 1 minuto y se descartaron el tubo colector y su contenido. Se repitió el paso anterior añadiendo 500  $\mu$ l de buffer AW2 y se centrifugó a 13.000 rpm durante 3 minutos.

55 Finalmente, el *DNeasy Mini Spin Column* fue transferido a un tubo colector de 1,5-2 ml, y se añadieron 100-200  $\mu$ l de buffer AE directamente sobre la membrana DNeasy. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto y después se centrifugó a 8.000 rpm durante 1 minuto. Se descartó el *DNeasy Mini Spin column* y se recuperó el extracto del ADN purificado obtenido.

60 El ADN extraído fue cuantificado mediante fluorimetría utilizando el método de Downs y Wilfinger (Downs y Wilfinger, 1983) y un fluorímetro LS 50 (Perkin Elmer- fluorometer, Applied Biosystems, Foster City, CA) mediante la determinación de la fluorescencia obtenida al mezclar un volumen conocido del extracto del ADN con el reactivo Hoechst 33258 (The Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), compuesto por 1 bis-benzimida, la cual se intercala entre las moléculas de ADN. La longitud de onda de excitación de esta molécula está en el ultravioleta próximo (350 nm) mientras que la longitud de onda de emisión se encuentra en la región azul (450 nm). La sensibilidad del ensayo con el Hoechst 33258 (Sigma) es de 5 ng/ml aproximadamente. Las medidas se llevaron a cabo en un fluorímetro LS 50 (Perkin Elmer).

65

## ES 2 319 009 B2

Para llevar a cabo la medida de la fluorescencia se preparó cada vez 100 ml de disolución fresca de Hoechst de la siguiente manera:

- 10 ml de TNE 10X
- 10  $\mu$ l de Hoechst (1 mg/ml)
- 90 ml de agua Milli-Q

La composición del TNE 10X es la siguiente:

- 12.11 g de Tris; (hidroximetil) aminometano (Merck)
- 3.72 g de EDTA (Calbiochem)
- 116.89 g de cloruro sódico (Merck)
- Hasta 800 ml de agua Milli-Q
- pH=7.4; ajustar con HCl (Merck) concentrado.

Se prepararon soluciones control y estándar. Como solución control, dependiendo de la concentración final que estimamos obtener en las muestras, se prepararon dos tipos de soluciones de ADN de calf-thymus (Sigma), una de bajo rango, con rangos de concentración entre 10 y 150 ng/ml y otra de rango más elevado, con unas concentraciones entre 100 y 1000 ng/ml.

Para calcular la concentración de ADN de cada muestra, se tomaron 4  $\mu$ l de cada muestra de ADN extraído, se añadió el tampón TNE Hoechst 33258 (NaCl 0.2 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4) para un volumen total de 2000  $\mu$ l en la cubeta. Se mezclaron la disolución de Hoechst-TNE y el ADN a fin de medir la intensidad de cada muestra.

### Ejemplo 2

#### *Diseño de cebadores específicos y amplificación de las regiones de interés*

En el presente ejemplo se describe cómo se procedió al diseño de cebadores en una zona conservada del gen 16S rRNA.

Se estudiaron 70 secuencias de ADN del gen 16S rRNA y tRNA<sup>Val</sup> del ADN mitocondrial, que comprenden 20 especies de la superfamilia *Penaeoidea* de interés comercial en el sector alimentario, dentro de las cuales se encuentran las siguientes especies: *Penaeus monodon*, *Penaeus semisulcatus*, *Litopenaeus vannamei*, *Farfantepenaeus brevirostris*, *Farfantepenaeus brasiliensis*, *Farfantepenaeus notialis*, *Fenneropenaeus indicus*, *Fenneropenaeus merguensis*, *Fenneropenaeus* sp. 29, *Marsupenaeus japonicus*, *Melicertus latisulcatus*, *Melicertus* sp. 30, *Parapenaeus longirostris*, *Metapenaeus* sp. 21, *Metapenaeus* sp. 9, *Solenocera agasizii*, *Solenocera* sp. 15, *Solenocera* sp. 18, *Pleoticus muelleri* y *Aristeomorpha foliacea*. Todas estas especies pertenecen a la superfamilia *Penaeoidea*, que a su vez pertenece al Orden Decapoda.

Una vez purificado el ADN según se expone en el ejemplo 1, se procedió a amplificar la zona del ADN mitocondrial de interés. Para ello se buscaron oligonucleótidos en las regiones 16S rRNA, tRNA<sup>Val</sup> y 12S rRNA.

Los cebadores fueron diseñados en base a los alineamientos de secuencias completas publicadas del orden *Decapoda*, buscando zonas conservadas del gen 16S rRNA.

Las secuencias que se alinearon para el diseño de los cebadores se mencionan a continuación, y están depositadas en la base de datos del GenBank: *Penaeus monodon* (NC\_002184), *Penaeus monodon* (AF217843), *Marsupenaeus japonicus* (AP006346), *Marsupenaeus japonicus mitochondrion* (NC\_007010), *Callinectes sapidus* (NC\_006281), *Callinectes sapidus* (AY363392), *Panulirus japonicus* (NC\_004251), *Panulirus japonicus* (AB071201), *Portunus trituberculatus* (NC\_005037) *Portunus trituberculatus* (AB093006), *Pagurus longicarpus* (NC\_003058), *Pagurus longicarpus* (AF150756).

Se seleccionaron los oligonucleótidos 16S CRUF (SEQ ID N° 5) y 16S CRUR (SEQ ID N° 6) como cebadores, que caían en las regiones 16S rRNA y tRNA<sup>Val</sup>, respectivamente. Los cebadores fueron diseñados en base a estos oligonucleótidos mediante el programa PrimerExpress de Applied Biosystems.

## ES 2 319 009 B2

Para la amplificación mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de las secuencias de ADN reconocidas por los cebadores 16S CRUF y 16S CRUR, que amplifican un fragmento de 966 bp, las condiciones seleccionadas fueron:

- 5           • se suplementó la mezcla de reacción con  $MgCl_2$  a una concentración final de 2.0 mM.
- la desnaturalización inicial se realizó a 94°C durante 90 segundos
- se sometió a 35 ciclos (94°C durante 20 segundos, 51-55°C durante 20 s, 72°C durante 30 segundos)
- 10          • la extensión final se realizó a 72°C durante 15 minutos.

15          La temperatura de anillamiento varió entre 51°C y 55°C, debido a la variabilidad interespecífica que exhiben las secuencias manejadas para los distintos langostinos.

20          Los productos obtenidos en la PCR se procesaron, con vista a detectar la presencia de ADN, mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2,5% en tampón *TAE 1X (Tris-acetate-EDTA)* con 0.5  $\mu g/ml$  del bromuro de etidio (*Merck, Darmstadt, Germany*). Se cargaron en el gel 5  $\mu L$  de cada muestra mezclados con 3-4  $\mu l$  de tampón de carga. Las condiciones de electroforesis fueron: 1 hora a 100 V. La visualización de los fragmentos amplificados, o amplicones, se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta (254 nm).

25          La determinación del tamaño de los productos de amplificación producidos mediante la PCR se llevó a cabo en el mismo gel, mediante la comparación con el marcador de peso *EZ Load 100 bp Molecular Ruler (Sigma)*, analizado en paralelo con las muestras. Este patrón de peso presenta 10 fragmentos de ADN con los siguientes tamaños: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100 pb.

30          Por otro lado, los productos de PCR amplificados fueron purificados mediante el kit *ExoSAP-IT (GE Healthcare - Amersham Biosciences)* con el fin de eliminar componentes de la reacción (primers, dNTPs, sales, etc) que pudieran interferir en la reacción de secuenciación.

35          La secuenciación directa de los amplicones purificados se realizó mediante el método comercial *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)*. Para llevar a cabo las reacciones de secuenciación, se emplearon los mismos cebadores de la PCR, realizándose la secuenciación en ambos sentidos de las hebras de ADN con el fin de poder comparar ambas hebras y poder así tener mayor información acerca de las secuencias de las muestras de langostinos. Una vez finalizada la secuenciación se añadieron 4  $\mu L$  de formamida/EDTA-dextran blue (5/1) y las muestras se desnaturalizaron 2 min a 90°C. Las reacciones de secuenciación se analizaron en un secuenciador capilar *ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems)*.

40          Las secuencias obtenidas fueron analizadas por medio de cromatografía. Los cromatogramas de las muestras secuenciadas se visualizaron mediante el programa bioinformático *CHROMAS Versión 1.45 (Technelysium Pty, Tewantin, Australia)*, que permite editar las secuencias nucleotídicas y copiarlas en formato FASTA. En el estudio filogenético se incluyeron las siguientes secuencias del gen 16S rRNA depositadas en las bases de datos publicas (Genbank): *Penaeus monodon* (AF217843), *Marsupenaeus japonicus* (NC\_007010), *Marsupenaeus japonicus* (AP006346), *Litopenaeus stylirostris* (AY046913), *Penaeus stylirostris* (AJ297970), *Penaeus vannamei* (AJ132780), *Litopenaeus vannamei* (AY046914), *Penaeus setiferus* (AJ297971), *Farfantepenaeus californiensis* (AY046912) y *Penaeus notialis* (X84350).

50          Las secuencias en formato FASTA se alinearon con el programa ClustalX 1.83 (Thompson y col., 1997). Posteriormente se realizó el análisis filogenético de las secuencias alineadas. Los árboles filogenéticos se obtuvieron empleando el algoritmo de *Neighbor-Joining* aplicando el modelo de dos parámetros de Kimura en el programa MEGA 3.1 (Kumar y col., 2004). Para evaluar el soporte estadístico de la topología obtenida se realizó un *Bootstrap resampling test* con 1.000 replicaciones.

55          La asignación de genotipos se basó en la relación filogenética con respecto a muestras utilizadas como referencia, cuyos fenotipos fueron previamente determinados mediante análisis morfológico de los caracteres externos.

60          Basándose en el alineamiento de todas las secuencias obtenidas mediante la amplificación con los cebadores que amplifican un fragmento de 966 bp, se llevó a cabo el diseño de unos nuevos cebadores con el fin de obtener unos cebadores en una zona conservada, y que amplificasen un fragmento de ADN más corto. Este fragmento más corto es de gran utilidad para la identificación de los productos procesados, ya que al estar sometidos a altas temperaturas, el ADN está parcialmente degradado.

65          Con los nuevos cebadores diseñados, 16S CRUC3 (SEQ ID N° 3) y 16S CRUC4 (SEQ ID N° 4) se consiguió amplificar el ADN extraído de la totalidad de las muestras utilizadas para este estudio. Con estas amplificaciones se llevó a cabo la posterior digestión con las enzimas de restricción utilizadas en esta invención.

## ES 2 319 009 B2

Los nuevos cebadores específicos para langostinos de la superfamilia *Penaeoidea* (langostinos peneidos) amplifican un fragmento de aproximadamente entre 515 bp y 535 bp del gen 16S rRNA y parte del tRNA<sup>Val</sup>, ambos pertenecientes al ADN mitocondrial.

### 5 Ejemplo 3

#### *Obtención de patrones de bandas característicos*

10 Una vez purificado el ADN según se expone en el ejemplo 1, se procedió a amplificar con los nuevos cebadores específicos 16S CRUC3 y 16S CRUC4, la zona del ADN mitocondrial de interés.

15 Utilizando los cebadores específicos 16S CRUC3 y 16S CRUC4 se amplificó mediante PCR el ADN de *Penaeus monodon*, *Penaeus semisulcatus*, *Penaeus setiferus*, *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, *Farfantepenaeus brevisrostris*, *Farfantepenaeus brasiliensis*, *Farfantepenaeus notialis*, *Farfantepenaeus aztecus*, *Farfantepenaeus californiensis*, *Fenneropenaeus indicus*, *Fenneropenaeus merguensis*, *Fenneropenaeus* sp. 29, *Marsupenaeus japonicus*, *Melicertus latisulcatus*, *Melicertus* sp. 30, *Parapenaeus longirostris*, *Metapenaeus* sp. 21, *Metapenaeus* sp. 9, *Solenocera agasizzi*, *Solenocera* sp. 15, *Solenocera* sp. 18, *Pleoticus muelleri* y *Aristeomorpha foliacea*.

20 Para realizar la amplificación se suplementó la mezcla de reacción con MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 2.0 mM, se desnaturalizó a 94°C durante 90 segundos, y se sometió a 35 ciclos (94°C durante 20 segundos, 51-55°C durante 20 s, 72°C durante 30 segundos), con una extensión final a 72°C durante 15 minutos.

25 La temperatura de anillamiento varió entre 51°C y 55°C, debido a la variabilidad interespecífica que exhiben las secuencias manejadas para los langostinos peneidos.

30 La selección de los enzimas de restricción se llevó a cabo mediante la búsqueda de lugares de restricción en las secuencias de ADN que habían sido alineadas y editadas en formato FASTA. Mediante el programa bioinformático Restrictionmapper versión 3 se seleccionaron las enzimas que permitían la diferenciación de las especies comerciales de langostinos. Las enzimas de restricción seleccionadas fueron *AluI*, *TaqI* y *HinfI*.

Los fragmentos amplificados se sometieron a digestión por separado con cada uno de los enzimas de restricción *AluI*, *TaqI* y *HinfI*. Las condiciones de las reacciones fueron:

- 35 1. 2 µl de la enzima de restricción
2. 2 µl de buffer específico de la enzima
3. 8 µl de amplicón (producto de PCR) y
- 40 4. 8 µl de agua de PCR, para un volumen total de 20 µl.

Las muestras se agitaron y centrifugaron unos segundos y se incubaron durante 1-2 horas a 37°C.

45 La visualización de los fragmentos de restricción se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% o bien mediante electroforesis en geles analíticos de poliacrilamida (15% *ExcelGel Homogeneous SDS-PAGE*, *Amersham Biosciences*, *Uppsala, Sweden*), siguiendo el protocolo que indica el método. Los geles fueron procesados a 15°C en una cubeta de electroforesis Multiphor II equipado con un criostato MultiTemp III, utilizando los ánodos y cátodos comerciales (*ExcelGel Buffer Strips*, *Amersham Biosciences*). Las condiciones en que se llevó a cabo la electroforesis fueron de 600 V/30 mA/30 W durante 140 min. Los fragmentos fueron visualizados según el protocolo de tinción de plata (*Amersham Biosciences*).

Los resultados obtenidos quedan reflejados en la tabla 1.

55

60

65



ES 2 319 009 B2

TABLA 1

Fragmentos que resultan del corte con los enzimas de restricción del ADN amplificado con los cebadores 16SCRUF, 16SCRUR

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Género	Especies	Alul	TaqI	Hinf I	Tamaño/ Secuencia (bp)	
LITOPENAEUS	<i>Litopenaeus vannamei</i> genotipo 1	230	400	403	530	
		130	130	127		
		77				
		62				
		31				
LITOPENAEUS	<i>Litopenaeus vannamei</i> genotipo 2	230	400	403	530	
		161	130	127		
		77				
		62				
LITOPENAEUS	<i>Litopenaeus stylirostris</i>	292	229	404	531	
		131	172	127		
		77	130			
		31				
FARFANTEPENAEUS	<i>Farfantepenaeus notialis</i> genotipo 1	294	174	405	532	
		110	171	127		
		77	130			
			51	57		
	<i>Farfantepenaeus notialis</i> genotipo 2	256	171	402	528	
		110	171	126		
		77	129			
34		57				
		31				
		20				
<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>	294	278	403	532		
	161	132	129			
	71	122				
	6					
<i>Farfantepenaeus brevirostris</i>	293	401	404	531		
	161	130	127			
	77					
<i>Farfantepenaeus aztecus</i>	290	276	401	528		
	161	130	127			
	77	122				
<i>Farfantepenaeus californiensis</i>	292	229	403	530		
	161	171	127			
	77	130				

ES 2 319 009 B2

5	FENNEROPENAEUS	<i>Fenneropenaeus indicus</i>	287 163 74	397 127	400 80 44	524
10		<i>Fenneropenaeus merguensis</i>	255 131 78 33 31	400 128	202 144 125 57	528
15		<i>Fenneropenaeus</i> sp. 29	255 131 78 33 31	227 173 128	202 144 125 57	528
20	PENAEUS	<i>Penaeus monodon</i>	289 131 70 31 6	399 128	402 125	527
25		<i>Penaeus semisulcatus</i>	288 161 75	227 169 128	524	524
30		<i>Penaeus setiferus</i>	271 151 77 31	230 169 131	282 128 120	530
35	MARSUPENAEUS	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	288 122 75 42	451 76	357 170	527
40	MELICERTUS	<i>Melicertus latisulcatus</i>	291 165 38 35	400 129	172 169 126 62	529
45		<i>Melicertus</i> sp. 30	288 164 68 6	526	269 169 88	526
50	ARISTAEIDAE	<i>Aristeomorpha foliacea</i>	441 74	347 168	397 118	515
55	SOLENOCERA	<i>Solenocera</i> sp. 15	163 148 140 58 11 6	325 171 30	526	526
60						
65						

ES 2 319 009 B2

	<i>Solenocera agasizzi</i>	272 143 61 31 11 6	227 173 124	403 121	524
	<i>Solenocera</i> sp. 18	163 150 139 70 6	226 172 130	401 127	528
PLEOTICUS	<i>Pleoticus muelleri</i> genotipo 1	304 85 77 61	228 172 127	403 124	527
	<i>Pleoticus muelleri</i> genotipo 2	304, 146, 77	228, 172, 127	403, 124	527
METAPENAEUS	<i>Metapenaeus</i> sp. 9	459 76	535	535	535
	<i>Metapenaeus</i> sp. 21	448 63 11 9	531	531	531
PARAPENAEUS	<i>Parapenaeus</i> <i>longirostris</i>	448 76	524	306, 175 43	524

REIVINDICACIONES

1. Método de identificación de especies pertenecientes a la superfamilia *Penaeoidea* que comprende:

- A. Extracción y aislamiento del ADN a partir de una muestra biológica o alimentaria.
- B. La posterior amplificación mediante el uso de cebadores de cualquier secuencia nucleotídica aislada y su complementaria, del ADN aislado en el paso anterior, **caracterizada** por estar comprendida entre secuencias nucleotídicas con al menos un 90% de identidad con SEQ ID N°1 y SEQ ID N°2.
- C. Digestión de la secuencia nucleotídica amplificada mediante los enzimas de restricción *AluI*, *TaqI* o *HinfI*.
- D. Detección de los fragmentos obtenidos en el paso anterior.
- E. Identificación de las especies por comparación de los fragmentos detectados en el paso anterior con el patrón de fragmentos característico de cada especie.

2. Método según la reivindicación anterior donde la secuencia amplificada en el paso B está comprendida entre SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2.

3. Método de identificación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la amplificación se realiza utilizando un cebador directo que comprende la SEQ ID N° 3 (16S CRUC3), y un cebador reverso que comprende la SEQ ID N° 4 (16S CRUC4).

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la secuencia amplificada se selecciona de cualquiera de las secuencias SEQ ID N° 7 a SEQ ID N° 33.

5. Método de identificación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la amplificación se realiza mediante PCR.

6. Método de identificación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la detección e identificación de los fragmentos se realiza mediante electroforesis.

7. Método de identificación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la identificación de las especies se realiza por comparación del patrón de fragmentos obtenidos con los reflejados en la tabla 1.

Género	Especies	<i>AluI</i>	<i>TaqI</i>	<i>HinfI</i>	Tamaño/ Secuencia (bp)
LITOPENAEUS	<i>Litopenaeus vannamei</i> genotipo 1	230 130 77 62 31	400 130	403 127	530
	<i>Litopenaeus vannamei</i> genotipo 2	230 161 77 62	400 130	403 127	530
	<i>Litopenaeus stylirostris</i>	292 131 77 31	229 172 130	404 127	531
FARFANTEPENAEUS	<i>Farfantepenaeus notialis</i> genotipo 1	294 110 77 51	174 171 130 57	405 127	532
	<i>Farfantepenaeus notialis</i> genotipo 2	256 110 77 34 31 20	171 171 129 57	402 126	528
	<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>	294 161 71 6	278 132 122	403 129	532
	<i>Farfantepenaeus brevirostris</i>	293 161 77	401 130	404 127	531

ES 2 319 009 B2

	<i>Farfantopenaeus aztecus</i>	290 161 77	276 130 122	401 127	528
5	<i>Farfantopenaeus californiensis</i>	292 161 77	229 171 130	403 127	530
10	<b>FENNEROPENAEUS</b>				
	<i>Fenneropenaeus indicus</i>	287 163 74	397 127	400 80 44	524
15	<i>Fenneropenaeus merguensis</i>	255 131 78 33 31	400 128	202 144 125 57	528
20	<i>Fenneropenaeus sp. 29</i>	255 131 78 33 31	227 173 128	202 144 125 57	528
25	<b>PENAEUS</b>				
	<i>Penaeus monodon</i>	289 131 70 31 6	399 128	402 125	527
30	<i>Penaeus semisulcatus</i>	288 161 75	227 169 128	524	524
	<i>Penaeus setiferus</i>	271 151 77 31	230 169 131	282 128 120	530
35	<b>MARSUPENAEUS</b>				
	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	288 122 75 42	451 76	357 170	527
40	<b>MELICERTUS</b>				
	<i>Melicertus latisulcatus</i>	291 165 38 35	400 129	172 169 126 62	529
	<i>Melicertus sp. 30</i>	288 164 68 6	526	269 169 88	526
45	<b>ARISTAEIDAE</b>				
	<i>Aristeomorpha foliacea</i>	441 74	347 168	397 118	515
50	<b>SOLENCERA</b>				
	<i>Solenocera sp. 15</i>	163 148 140 58 11 6	325 171 30	526	526
55	<i>Solenocera agasizzi</i>	272 143 61 31 11 6	227 173 124	403 121	524
60	<i>Solenocera sp. 18</i>	163 150 139 70 6	226 172 130	401 127	528
65	<b>PLEOTICUS</b>				
	<i>Pleoticus muelleri</i> genotipo 1	304 85 77 61	228 172 127	403 124	527

ES 2 319 009 B2

	<i>Pleoticus muelleri</i> genotipo 2	304, 146, 77	228, 172, 127	403, 124	527
5	<b>METAPENAEUS</b>	<i>Metapenaeus</i> sp. 9	459 76	535	535
		<i>Metapenaeus</i> sp. 21	448 63 11 9	531	531
10	<b>PARAPENAEUS</b>	<i>Parapenaeus longirostris</i>	448 76	524	306, 175 43

15 8. Método de identificación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde las especies identificadas se seleccionan de la lista que comprende: *Penaeus monodon*, *Penaeus semisulcatus*, *Penaeus setiferus*, *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, *Farfantepenaeus brevirostris*, *Farfantepenaeus brasiliensis*, *Farfantepenaeus notialis*, *Farfantepenaeus aztecus*, *Farfantepenaeus calliforniensis*, *Fenneropenaeus indicus*, *Fenneropenaeus merguensis*, *Fenneropenaeus* sp. 29, *Marsupenaeus japonicus*, *Melicertus latisulcatus*, *Melicertus* sp. 30, *Parapenaeus longirostris*, *Metapenaeus* sp. 21, *Metapenaeus* sp. 9, *Solenocera agasizzi*, *Solenocera* sp. 15, *Solenocera* sp. 18, *Pleoticus muelleri* y *Aristeomorpha foliacea*.

25 9. Método de identificación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde las especies identificadas utilizando *AluI* como enzima de restricción son seleccionadas de una lista que comprende *Penaeus monodon*, *Penaeus semisulcatus*, *Penaeus setiferus*, *Litopenaeus stylirostris*, *Farfantepenaeus brasiliensis*, *Farfantepenaeus notialis*, *Fenneropenaeus indicus*, *Marsupenaeus japonicus*, *Melicertus latisulcatus*, *Melicertus* sp. 30, *Metapenaeus* sp. 21, *Solenocera agasizzi*, *Solenocera* sp. 15, *Solenocera* sp. 18, *Pleoticus muelleri* y *Aristeomorpha foliacea*.

30 10. Método de identificación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde las especies identificadas utilizando *TaqI* como enzima de restricción son seleccionadas de una lista que comprende *Farfantepenaeus brevirostris*, *Farfantepenaeus aztecus* o *Farfantepenaeus californiensis*.

35 11. Método de identificación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde las especies identificadas utilizando *HinfI* como enzima de restricción son seleccionadas de una lista que comprende *Metapenaeus* sp. 9 o *Parapenaeus longirostris*.

40 12. Método de identificación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde las especies identificadas mediante ensayos independientes con *TaqI* y *HinfI* son seleccionadas de una lista que comprende *Litopenaeus vannamei*, *Fenneropenaeus merguensis* o *Fenneropenaeus* sp. 29.

40

45

50

55

60

65

# ES 2 319 009 B2

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidade de Santiago de Compostela

5 <120> Método de identificación de diferentes especies de la superfamilia *Penaeoidea* mediante análisis de ADN

<130> ES11596.5

10 <160> 33

<170> PatentIn version 3.4

15 <210> 1

<211> 27

<212> DNA

20 <213> Superfamilia *Penaeoidea*

<220>

<221> misc\_feature

25 <223> Secuencia reconocida por SEQ ID N° 4

<400> 1

30 **tgaattaggc ttaaaaacag ccatatt**

**27**

<210> 2

<211> 21

35 <212> DNA

<213> Superfamilia *Penaeoidea*

<220>

40 <221> misc\_feature

<223> Secuencia reconocida por SEQ ID N° 3

<400> 2

45 **tgcacaatga acttctcaac g**

**21**

50 <210> 3

<211> 21

<212> DNA

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> misc\_feature

60 <223> cebador directo 16SCRUC3

<400> 3

65 **cgttgagaag ttcgttgtgc a**

**21**

<210> 4

ES 2 319 009 B2

<211> 27

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<221> misc\_feature

<223> cebador reverso 16SCRUC4

10

<400> 4

15

**aatatggctg tttttaagcc taattca**

**27**

<210> 5

<211> 24

20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<221> misc\_feature

<223> cebador 16S CRUF

<400> 5

30

**taatgattat gctaccttcg cacg**

**24**

35

<210> 6

<211> 16

<212> DNA

<213> secuencia artificial

40

<220>

<221> misc\_feature

<223> cebador 16s CRUR

45

<400> 6

50

**acacatcgcc cgtcgc**

**16**

<210> 7

<211> 530

55

<212> DNA

<213> *Litopenaeus vannamei* genotipo 1

<220>

60

<221> misc\_feature

<223> Secuencia amplificada por los cebadores SEQ ID N° 3 y SEQ N° 4

65



ES 2 319 009 B2

<400> 7

5 cgttgagaag ttcgttgtgc aatcaatgc atcttgaaaa ttaagtctta ctaatattaa 60  
 gctatcatag tgtatatatt taaaggtaat aaaaagattt tggagtatta ttgttttagt 120  
 agagtgaatc gaaaaaaaaat taaaaagagt tatagaataa agtactgtaa aggaaagatg 180  
 10 aaataaattg aaaatttaaat taaaataaag taaagttaaa tacttgtacc ttgtgtatta 240  
 gggaggatta aaataatctt attagagtaa gtagtcccga aagaaaaaga gctaacataa 300  
 ataaatagtt ttcgtattaa tgaaattatt aaatttatgt tagtagtgaa atgctagacg 360  
 15 atttttcata tctggttgaa ggagaattaa attaaattta gttattttga ggtaaaaaa 420  
 gctttaaaat aataaagagt aggaggggaag agcttcttat tctaataata agtaaaactat 480  
 20 aataaaagta atttaagtat tactgaatta ggcttaaaaa cagccatatt 530

<210> 8

<211> 530

<212> DNA

<213> *Litopenaeus vannamei* genotipo 2

<220>

<221> misc\_feature

<223> secuencia amplificada por los cebadores SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4

<400> 8

40 cgttgagaag ttcgttgtgc aatcaacgc atcttgaaaa ttaagtctta ctaatactaa 60  
 gctatcatag tgtatatatt taaaggtaat aaaaagattt tggagtatta ttgttttagt 120  
 agagtgaatc gaaaaaaaaat taaaaagagt tatagaataa agtactgtaa aggaaagatg 180  
 aaataaattg aaaatttaaat taaaataaag taaagttaaa tacttgtacc ttgtgtatta 240  
 45 gggaggatta aaataatctt attagagtaa gtagtcccga aagaaaaaga gctaacataa 300  
 ataaatagtt ttcgtattaa tgaaattatt aaatttatgt tagtagtgaa atgctagacg 360  
 50 atttttcata tctggttgaa ggagaattaa attaaattta gttattttga ggtaaaaag 420  
 gctttaaaat aataaagagt aggaggggaag agcttcttat tctaataata agtaaaactat 480  
 aataaaagta atttaagtat tactgaatta ggcttaaaaa cagccatatt 530

<210> 9

<211> 531

<212> DNA

<213> *Litopenaeus stylirostris*

<220>

<221> misc\_feature

<223> Secuencia amplificada por SEQ ID N° 3 y SEQ ID n° 4

ES 2 319 009 B2

<400> 9

5 cgttgagaag ttcgttgtgc aaatcaatgc atcttgaaaa ttaaacccttg ctaatataaa 60  
tagtccgcaa taaataaatt taaaagtaat aaaaatattt tgaaatatta ttgttttagt 120  
agagtgaatc gaaaaaaaaat taaaagagt tatagaataa agtactgtaa aggaaagggtg 180  
10 aaataaattg aaaatttaat taatataaag tagagttaaa cacttggtacc ttgtgtatta 240  
gggaaaatca aaataatcctt aataagataa gtaatcccga aagagaaaga gctaataataa 300  
atagatagtt ttcgtattaa tgaaattata aaatttatat tagtagtgaa atgctagtcg 360  
15 atttttcata tctggttgat agagaattaa attaaattta gttgctttga ggttgaagaa 420  
agctttaaag taataaagag taggagggaa gagcttctta ttctaataat aagtttacta 480  
20 taatgaaatg gatttaagta ttattgaatt aggccttaaaa acagccatat t 531

<210> 10

<211> 532

25 <212> DNA

<213> *Farfantepenaeus notialis* genotipo 1

<220>

30 <221> misc\_feature

<223> Secuencia amplificada por SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4

35 <400> 10

cgttgagaag ttcgttgtgc aaatcaatgt atcttgaaaa ttaaactcttg ctatthttgat 60  
caagagtggc ctatataatc gaaaagtaat aaaaacattt tgagggtgta taatthtttagt 120  
40 agaatgaatc gaaaaaaaaat tcttaaaaga gttatagagt aaagtactgt aagggaaaga 180  
tgaaataaag tgaaaagtta actaaagaaa agtagaacta aatattcgtc ccttgtgtat 240  
45 tagggaaaat caaaataaat ttattaagtt aagtattccc gaaagaaaaa gagctaattg 300  
agtcgaatag ttttcgtatt aatgaaatta taaagtctat attagtagtg aaacgctaatt 360  
50 cgatthttca tatctggttg ttggagaatt aaattaaatt tagctatthtt aaggtaagta 420  
aaactthtaa ataagaaaga ataggagggg aaagcttctt attctaataaa taggtaaaatt 480  
acaacaaaag aatcaaaat attactgaat taggccttaaa aacagccata tt 532

55

<210> 11

<211> 528

60 <212> DNA

<213> *Farfantepenaeus notialis* genotipo 2

<220>

65 <221> misc\_feature

<223> secuencia amplificada por SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4

ES 2 319 009 B2

<400> 11

5           cgttgagaag ttcgttgtgc aatcaatgc gtcttgaaaa ttaaacttta ctattingat       60  
           taagagtggc ctacatattt aaaagtaata aaaacatttt gggatattat atttctagta       120  
           gaatgaatcg aaaaaaattt ttaagagtta tagaataaag tactgtaaag gaaagatgaa       180  
 10           ataaactgaa aagttagtta aagaaaagta gagttaaatg cttgtacctt gtgtattagg       240  
           gaaaatcaaa ataagcttat taagttaagt attcccgaag gaaaagagc taatatagtc       300  
           gaacagtttt cgtattaatg aaattataaa gtctatatta gtagtgaaac gctagtcgat       360  
 15           ttttcatatc tggttgttgg agaattaaat taaatttagc tattttaagg taaataaagc       420  
           tttaaaataa gaaagaatag gagggaaaag cttcttattc taaaaataag taaattataa       480  
 20           taaaagaaat caaaatatta ctgaattagg cttaaaaaca gccatatt               528

<210> 12

<211> 530

25 <212> DNA

<213> *Penaeus setiferus*

30 <220>

<221> misc\_feature

<223> Secuencia amplificada por SEQ ID Na 3 y SEQ ID N° 4.

35 <400> 12

          cgttgaggag ttcgttgtgc aatcaatgt atcttgaaaa ttaagtcttg ttaatataatg       60  
           ttattattgt tggataatcc taaaagtaat aaaaatattt ttgaaatatt attgtttttag       120  
 40           tagaatgaat cgaaaaaaaa caaaaagag ctatagaata aagtactgta aaggaaagat       180  
           gaaataagtt gaaaatttaa ttggtgtaaa gtaaagttaa atgcttgtag cttgtgtatt       240  
 45           agggagagat caaataaacc ttgctatggt aagtagtccc gaaagaaaa gagttaatat       300  
           aaatatatag ttctcgtggt aatgagatta taaaatttat tttagtagtg aaatgctagt       360  
           cgatTTTTca tatctggttg gtggagaatt aaattgaatt tagttatttt gaggttaaaa       420  
 50           gctttgaaat agtaaagagt aggagggaaa agcttcttat tctaataata ggtgtattat       480  
           aataaaaata atttagatat tattgaatta ggcttaaaaa cagccatatt               530

55

<210> 13

<211> 532

60 <212> DNA

<213> *Farfantepenaeus brasiliensis*

<220>

65 <221> misc\_feature

<223> Secuencia amplificada por SEQ ID N° 3 y SEQ ID N°4

ES 2 319 009 B2

<400> 13

5           cgttgagaag ttcgttgtgc aatcaatgc atcttgaaaa ttagatctta ctaatttagt       60  
          taaatatggt ttgtataaat ttgaagggtg ataaaaggat tttaaaatat tattgtttta     120  
          gtagaatgaa tcgaaaaagc atataaaaga gttatagagt aaagtactgt aaaggaaaga     180  
10           tgaaataaat tgaaaatttg attgataaaa agtagaatta aatattcgta ctttgtgtat     240  
          taggggaaat caaaataatc ttgttaaatt aagtattccc gaaaaagaaa gagctaacgc     300  
          agataaatag ttttcatatc aatgaaatta taaaatttgt gttagtagtg aaatgctaga     360  
15           cgatttctta tatctggttg tttagagaatt aaattcaatt tagttatttc gaggtaaata     420  
          aaactttgaa ataagaaaga gtaggagggg aaagcttctt attctaataa taggtaaatt     480  
20           ataataaaaa gaattaaaat attattgaat taggcttaaa aacagctata tt           532

<210> 14

<211> 531

<212> DNA

<213> *Farfantepenaeus brevirostris*

<220>

<221> misc\_feature

<223> Secuencia amplificada por SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4

35 <400> 14

          cgttgagaag ttcgttgtgc aatcaatgc atcttgaaag ttagatctta ctaatttaat       60  
40           tgaatgtata ttacaaaact aaaaagtaat aaaaagattt tagaatatta taatttttagt     120  
          agaatgaatc gaaaaagttt taaaaagagt tatagagcaa agtactgtaa aggaaagatg     180  
          aaataagttg aaaaattaat tgataaaaag taaagttaaa tacttgtacc ttgtgtatta     240  
45           gggaaaatta aaataatctt attaaaattg agtattcccg aaagaaaaag agctaataata     300  
          aataaatagt tttcgtgtta atgaaattat aaaatttatg ttagtagtga aatgctagac     360  
          gatttttcat atctggttgt taaagaatta aattgaattt agttattttg aggtggacaa     420  
50           aactttgaaa taaaaaagag taggaggggaa aagcttctta ttctaataat aggtgtatta     480  
          taataaaaag aattaaata ttattgaatt aggcttaaaa acagccatat t           531

55 <210> 15

<211> 528

<212> DNA

<213> *Farfantepenaeus aztecus*

<220>

<221> misc\_feature

65 <223> Secuencia amplificada por SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4

ES 2 319 009 B2

<400> 15

5           cgttgagaag ttcgttgtgc aagtcaatgc gtcttgaaaa ttagatctta ttaatttaat       60  
           taaataatagt ctgtatacca gaaaagtaat aaaaagattt tgaaatgta ttatttttagt     120  
           agaatgaatc gaaaaaactt aaaaagagtt atagtgtaaa gtactgtgaa ggaaagatga     180  
 10           aataaattga aaatttaatt aaaagaaagt agagttaaaa acttgtacct tgtgtattag     240  
           ggaaaatcaa aataatcttg ttaagataag cgttcccga aaaaagagc taatatggtt     300  
           gcagagtttt cgtattaatg aaattgtaaa atctatatta gtagtgaaat gctagccgat     360  
 15           tttttatatc tggttgttgg agaattagat tgaatttadc tatgtcgagg tggagaaaac     420  
           tttgatataa gaaagagtag gagggaaaag cttcttattc taataatagg tgagttataa     480  
 20           taaaaagaat tgaaatatta ttgaattagg cttaaaaaca gccatatt                 528

<210> 16

<211> 530

25 <212> DNA

<213> *Farfantepenaeus californiensis*

<220>

30 <221> misc\_feature

<223> Secuencia amplificada por SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4

<400> 16

35           cgttgagaag ttcgttgtgc aatcaatgc gtcttgaaaa ttaaacttta ttaatttaat       60  
           taaataatagt cggtatcttt aaaaagtaat aaaaagattt taaaatgta ttatttttagt     120  
 40           agaatgaatc gaaaagaaaa gtaagaagag ttatagtgta aagtactgta aaggaaagat     180  
           gaaataagtt gaaaacttaa ttaaaagaaa gtagagttaa aaacttgtac cttgtgtatt     240  
 45           agggaaaatc aaaataacct tattaataa agtattcccg aaaaaaaga gctaatatag     300  
           ttgtagagtt ttcataataa tgaaattgta aaatctatat tagtagtgaa atgctagtcg     360  
           atTTTTtata tctggttgtt ggagaattaa attaaattta tctatgttga ggtggataaa     420  
 50           acttcaatat aagaaagagt aggagggaaa agcttcttat tctaataata ggtgagttat     480  
           aataaaggaa atcaaatat tattgaatta ggcttaaaaa cagccatatt                 530

55

<210> 17

<211> 524

<212> DNA

60 <213> *Fenneropenaeus indicus*

<220>

<221> misc\_feature

65 <223> Secuencia amplificada por SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4

ES 2 319 009 B2

<400> 17

5           cgttgagaag ttcgttgtgc aatcaatgt atcttgagaa ttgaatctta ttaatttgat       60  
           agtgattgta taataattga taataataaa atcattttga gatttcatta ttttagtaga       120  
           gtgaatcgaa aaaagtgtat aagagttata gaataaagta ctgtaaagga aagatgaaat       180  
 10           atattgaaaa cttaatttgt ataaagtaaa gttaaaaact tgtaccttgt gtattagggg       240  
           aaatcaaaat aaacttaata ataaagaaat cccgaaagaa aaagagctaa tgtaaataata       300  
           tagttttcgt cttaatgaaa ttataaaatt tatattagta gtgaaatgct agccgatttt       360  
 15           tcatatctgg ttgttggtga attaaattaa atttagttat tttgtagata taataaaatt       420  
           ataaaataat aaagagtagg agggaaaagc ttcttgttct aaaataggta agttatgata       480  
 20           aaatgaaaaa gtattgttga attaggctta aaaacagcca tatt                       524

<210> 18

<211> 528

25 <212> DNA

<213> *Fenneropenaeus merguensis*

<220>

30 <221> misc\_feature

<223> Secuencia amplificada por SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4

<400> 18

35           cgttgagaag ttcgttgtgc aatcaatgt atcttgaaaa ttaaactcta ttagttaagt       60  
           taataattgt gttgttactg gcagtaataa aattattttt aaatttcatt ttttagtag       120  
           agtgaatcga aaaaaatata taagagttat agagtaaagt actgtaaagg aaagatgaaa       180  
           tatattgaaa attgaattta tataaagtaa agttaaaaac ttgtaccttg tgtattaggg       240  
 45           aaaattaata taagcttaat aaaagaggaa tcccgaaaga gaaagagcta atataaatat       300  
           gtagttttcg tcttaatgaa attataaagt ttatgttagt agtgaaatgc tagtcgattt       360  
           ttcatatctg gttattggtg aattaaatta aatttaatta tctagtggta taataaagct       420  
 50           ataagatagt aaagagtagg agggaaaagc ttcttattct aaaataggtg aatcatgata       480  
           aaagaaaaaa gagaatattg ttgaattagg cttaaaaaca gccatatt                       528

55 <210> 19

<211> 528

<212> DNA

60 <213> *Fenneropenaeus* sp. 29

<220>

<221> misc\_feature

65 <223> Secuencia amplificada por SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4

ES 2 319 009 B2

<400> 19

5 cgttgagaag ttcgttgtgc aatcaatgt atcttgaaaa ttaaacttta ttagttaagt 60  
 taatagttgt gttgttactg gcagtaataa aattatTTTT aaatttcatt ttttagtag 120  
 agtgaatcga aaaaaatata taagagttat agagtaaagt actgtaaagg aaagatgaaa 180  
 10 tatattgaaa attgaattta tataaagtaa agttaaaaac ttgtaccttg tgtattaggg 240  
 aaaatcaaaa taagcttaat aaaagaggaa tcccgaaga gaaagagcta atataaatat 300  
 gtagttttcg ttttaatgaa attataaagt ttatgttagt agtgaaatgc tagtgcgatt 360  
 15 ttcatatctg gttattggtg aattaaatta aatttaatta tctagtggta taataaagct 420  
 gtaagatagt aaagagtagg agggaaaagc ttcttattct aaaatagggtg agtcatgata 480  
 20 aaagaaaaaa gagaatattg ctgaattagg cttaaaaaca gccatatt 528

<210> 20

25 <211> 527

<212> DNA

<213> *Penaeus monodon*

30 <220>

<221> misc\_feature

<223> Secuencia amplificada por SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4

35 <400> 20

40 cgttgagaag ttcattgtgc aatcagtgat atcttgataa ttaaacttta ttaatgtaat 60  
 tgtggTTTT atatatTTAA gacgtaaaaa aattatTTTT gaaatgtggt ttttagtag 120  
 agtgaatcga aatatcttat aataaattat agattaaagt actgtaaagg aaagatgaaa 180  
 taatttgaaa aatatattaa taaatagtaa agttaaatac ttgtaccttg tgtattaggg 240  
 45 aaaatcaaaa taatcttagt atttaaagaa tcccgaag agaaagagct attataaata 300  
 tatagttttc gtattaatga aattattaa tttatactag tagtgaaatg ctaatcgttt 360  
 50 tttcatatct ggttattggt gaattaaatt taatttgatt atattgaggt aatcaaaagc 420  
 ttttaataaa taaagaatag gagggaaaag cttttattc taacataggt gagttatgat 480  
 attataaata aatattttat tgaattaggc ttaaaaacag ctatatt 527

55

<210> 21

<211> 524

60 <212> DNA

<213> *Penaeus semisulcatus*

<220>

65 <221> misc\_feature

<223> Secuencia amplificada por SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4

ES 2 319 009 B2

<400> 21

5 cgttgagaag ttcgttgtgc aattcaatgc atcttgaaaa ttaaacttta ttgataaata 60  
aaataaatgg tgttgatcgc tcagtaataa aattatittg agatattggt attttagtag 120  
agttaatcga aaaaaaaaaag aaagagttat agagtataag tactgtaaag gaaagatgaa 180  
10 atagattgaa aaataaattg atggatagta gaggttaata ctcgtacctt gtgtattagg 240  
gaaaatcaaa ataactctgat tataaaagaa ttcccgaaaa aaaagagcta atataaatat 300  
atagttttcg tattaatgaa attataaaat ttatattagt agtgaaacgc tagtcgattt 360  
15 tttatatctg gttgtaacg aattaaattg aacttagttg ttttaagggtg aatgaaactt 420  
taatgcaata aagaatagga gggaaaagct tcttattcta gcataggtaa attatgataa 480  
20 taaatgtaaa atattactga attaggctta aaaacagcca tatt 524

<210> 22

<211> 527

<212> DNA

<213> *Marsupinaeus japonicus*

30 <220>

<221> misc\_feature

<223> Secuencia amplificada por SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4

35 <400> 22

40 cgttgagaag ttcgttgtgc aatcaatgc atcttgaaat ttaaccttat taataatata 60  
atgtgaagta aaattcgaga agtaataaaa ttattttgga ataatatatt tttagtaaaa 120  
tgaattgaaa aaaaggtaaa aaggaataat agagcagagt actgtaaagg aaagggtgaaa 180  
taaattgaaa aagaaattaa ttaaaagtaa aaataaaagt ttgtaccttg tgtattaggg 240  
45 aagatcaaaa ttagtttata atatgaaaag tcccgaaaa agaagagcta atataatctg 300  
gtagttttcg ttttaatgaa attataaagc ttatattagt agtgaaacgc tagacgattc 360  
50 tttatatctg gttaccagtg aattaaatta aatttagttg ctttaaattg gtgcagaaaa 420  
ctaaaaagca ataaagagca ggagggaaaa gcttcttggt ctaacataaa ggtattataa 480  
tatttcttat aaaacagcat tggattaggc ttgaaaacag ccacatt 527

55

<210> 23

<211> 529

<212> DNA

<213> *Melicertus latisulcatus*

<220>

<221> misc\_feature

<223> secuencia amplificada por SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4

65



ES 2 319 009 B2

<400> 23

5 cgttgagaag ttcgttgtgc aatcaatgc atcttgaat ttaaccttat taataaata 60  
 atgtaaagcg aaataagtct aaaagtaata aaattatfff aaaattgtat agtttttagta 120  
 gaatgaatcg aaataataac aataaagagt aatagaaaag agtactgtaa aggaaaggtg 180  
 10 aaataaattg aaaaagaagt taatagaaag taataataaa aatttgtacc ttgtgtatta 240  
 gggaaaatca aaattggttt attatctaaa agatcccga aaaaagaagag ctaacagaat 300  
 ctggtagttt tcgttttaat gaaattacga agtttatggt agtagtgaaa tgctagacga 360  
 15 ttctttatat ctggttgta gcaattaaa ttaaatttag ttatfffftg ttggtacaaa 420  
 taaactaaaa aataaaaaag agcagaaggg aaaagctfff tgttctaaca taaagatacc 480  
 20 ataataaag ctgcaatc attgaattag gcttgaaaac agccatatt 529

<210> 24

<211> 526

25 <212> DNA

<213> *Melicertus* sp.30

<220>

30 <221> misc\_feature

<223> Secuencia amplificada por SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4

35 <400> 24

cgttgagaag ttcgttgtgc aatcaatgc atcttgaagt caaaccttat taatagcata 60  
 40 taagagtaaa taattagaaa agtaataaaa tcattttgga gttatataac tttagtaggc 120  
 tgaaccgaaa taataataaa aaagagtgat agaaaagagt actgtaaagg aaaggtgaaa 180  
 taaattgaaa agagagttaa tgaaaagtaa taataaaaat ttgtacctg tgtattaggg 240  
 45 aaaatcaaaa ttaatttact attaaaagaa tcccgaaaaa agaagagcta atataatctg 300  
 gtagttttcg tcttaatgaa attacgaagt ttatattagt agtgaaatgc taaacgattc 360  
 50 tttatatctg gttgtagcg aattaaatta aatttagttg ttttggtcgg tgtaagtaaa 420  
 ctgaaaaata aaaaagagca ggaggaaga gcttcttgtt ctaacataaa gatactataa 480  
 tataatctat aaatatcatt gaattaggct tgaaaacagc tatatt 526

55

<210> 25

<211> 515

60 <212> DNA

<213> *Aristeomorpha foliacea*

<220>

65 <221> misc\_feature

<223> Secuencia amplificada por SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4

ES 2 319 009 B2

<400> 25

5           cgttgagaag ttcgttgtgc aaatcaatgc atcttgaaga attaaccttg ctataattat       60  
           tcgggcgтта аатааgттта атаааattat тттtagтттt атттgттаag tagattgaat     120  
           caaaaaaatt атааgттggc аатаgagtaa agtactgtaa aggaaaggтg аатаaggatg   180  
 10          aaaaataaat таааааааag tagtagттта ааттcgtacc ttgtgtatca gggaaaatca   240  
           aaatttgттt tgaaaaaat аатcccgaaa gaaaaagagt таатccaaaa аcaaagттct   300  
           cgtgtтаatg агатттaaaa тттtgттаa gtggtgaaat gctattcgat тттtcatatc   360  
 15          tggttattag cgaattaaat ттаатттatt агgттgгtgг таатtgaaac tataaaccca   420  
           gaaagaaaag gagggaaaag cttctttttc tatcataaat gtcttgcaat тааатgтааа   480  
 20          taaaccgтта аactaggctt aaaagcagcc acgтт                                 515

<210> 26

<211> 526

25 <212> DNA

<213> *Solenocera* sp.15

30 <220>

<221> misc\_feature

<223> Secuencia amplificada por SEQ ID nº 3 y SEQ ID Nº 4

35 <400> 26

          cgttgaggag ttcgttgtgc aaatcaatgt atcttgagaa тааатcttgt tagtgatttt       60  
           tgattgттаa атаtaggaag tgtataataa ааттатттat ggtttaataa тttatttagt     120  
 40          aaagtgaatt gaagtgttgt tgtggagcta tagtgaatag tactgtgaag gaaagatgaa   180  
           atatttgaaa atcaattggg tggaaagtag тattagatat tcgtaccttg tgtatcaggg   240  
 45          aaaactaaaa ttgttttggt атааaggгga tcccgaaga aaaagagcta агtcaataat   300  
           aaggттttcg таттаатgaa атctcgaatt ttgtттtagt ggtgaaatgt tagtcgattt   360  
           tttatatctg gttattaatg ааттаааттt ааттtaggta атtggttgat таааagtagt   420  
 50          tattaattag таааgaaatag gagggaaaag cttcttgttc tataatattt gaactgтаат   480  
           actctgтаат тataggtgta аagttaagct таааaacagc тatatt                     526

55 <210> 27

<211> 524

<212> DNA

60 <213> *Solenocera* agasizzi

<220>

<221> misc\_feature

65 <223> Secuencia amplificada por SEQ ID Nº 3 y SEQ ID Nº 4

ES 2 319 009 B2

<400> 27

	cattggaag ttcgttgtgc aatcaatgt atcttgaat gaaatcttgt ttgaagatga	60
5	gaggaagaaa gagtatataa taaaattatt taaagttgat tacaataatt tagtagagtg	120
	aatcgaaata tatgtattaa agctatagag aaaagtactg tgaaggaaag atgaaataat	180
10	ttgaaaattg atttaataaa aagtaattat ataaatttgt accttgtgta tcaggaaga	240
	ctaaaattat cttgagattt aagaagtccc gaaagaaaa gagttaattc aaaaataaag	300
	ttttcgtgtt aatgaaattt taaattttgt gttagtaatg agatgtagt cgatttttta	360
15	tatctggtta tcagtgaatt aaatttaatt taaatattta atggtaaagt taagctaata	420
	aataggaaag aatgggaggg aagagcttct tattctataa tgattgagtt gtgattaaaa	480
20	gatgagaaaa taattgttaa attaagctta aaaacagcta tatt	524

<210> 28

<211> 527

25 <212> DNA

<213> *Pleoticus mulleri* genotipo 1

<220>

30 <221> misc\_feature

<223> Secuencia amplificada por SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4

<400> 28

	cattggaag ttcattgtgc aattcaatgt atcttgagag ataatcttgt attatgagag	60
40	ctagtgatta aagaagtata taataaaatt attttaaatt aattataatt gtttagtaga	120
	atgaatcgaa atataatagg ataagctata gagaagagta ctgtgaagga aagatgaaat	180
	aaatttgaag attgagttaa taaaagtag ttatataaat tcgtaccttg tgtatcaggg	240
45	aaaactaaaa ttgtctgtaa atttgagaaa tcccgaaaaa agaagagtta attcaaaaag	300
	aaagttttcg tgtaaatgaa attttaaatt ttgttttagt agtgaaatgt tagtgcgattt	360
50	tttatatctg gttattagag aattaaattt aatttagttg cttaatggtt gaatataact	420
	aataagtaat aaagaatagg agggaagagc ttcttattct ataatggtta gattgtgatt	480
	taaaacttat ttagatttgt taaattagc ttaaaaacag ccatatt	527

55

<210> 29

<211> 527

60 <212> DNA

<213> *Pleoticus mulleri* genotipo 2

<220>

65 <221> misc\_feature

<223> Secuencia amplificada por SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4

ES 2 319 009 B2

<400> 29

5 cattgggaag ttcgttgtgc aattcaatgt atcttgagag ataatcttgt attatgagag 60  
 ttagtgatta aagaagtata taataaaatt attttaaatt aattataatt gtttagtaga 120  
 atgaatcgaa atataatagg ataagctata gagaagagta ctgtgaagga aagatgaaat 180  
 10 aaatttgaaa attgagttaa taaaaagtag ttatataaat tcgtaccttg tgtatcaggg 240  
 aaaactaaaa ttgtctgtaa atttgagaaa tcccgaaaaa agaagagtta attcaaaaag 300  
 aaagttttcg tgtaaatgaa attttaaatt ttgttttagt agtgaaatgt tagtcgattt 360  
 15 tttatatctg gttattagag aattaaattt aatttagttg cttaatgggtt gaatataact 420  
 aataagtaat aaagaatagg agggaagagc ttcttattct ataatggtta gattgtgatt 480  
 20 taaaacttat ttagatttgt tgaattaggc ttaaaaaacag ccatatt 527

<210> 30

<211> 528

25 <212> DNA

<213> *Solenocera* sp.18

<220>

30 <221> misc\_feature

<223> Secuencia amplificada por SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4

<400> 30

35 cgttgaggag ttcgttgtgc aatcaatgt atcttgagag ttaatcttgc ttaagttatt 60  
 aagtgtattt aagagtggag agcataataa aattatttat aattaattaa tatattaagt 120  
 40 agaatgaatc gaaatgtatt tgtttagagc tatagagaat agtactgtga gggaaagatg 180  
 aaatatttga aaaataagtg agtgaaaagt aggtctataa attcgtacct tgtgtatcag 240  
 45 ggagaactaa aattatttta atatttaaag gatccccgaaa aaaaagagct aattcaaaaa 300  
 taaagttttc gtgtaaatga gattttaaat tttgttttag tggtgaaatg ttagtcgatt 360  
 ttttatatct ggttatcagt gaattaaatt taatttaagc atttagttgg tttaaatgaa 420  
 50 ctaataaatg gtaaagaata ggaggggaaga gcttcttatt ctataatggt taagttgtaa 480  
 ttattattat aatatggtta ttaaattagg cttaaaaaaca gctatatt 528

55 <210> 31

<211> 535

<212> DNA

60 <213> *Metapenaeus* sp.9

<220>

<221> misc\_feature

65 <223> Secuencia amplificada por SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4

ES 2 319 009 B2

<400> 31

5           cgttgagaag ttcgttgtgc aatcaatgt gccttgaagt gtaaacttgt ttatttgaa       60  
             gaaattgttt agagttaagt atttagttct attaaaatca ttttttaata tagatatttt       120  
             agtaatttga agtaaaaaga ttttgtttaag gctatagtga agagtactgt gaaggaaagg       180  
 10           tgaataata tgaataatt taactggaaa aaagtaaaag ttaagttttg taccttgtgt       240  
             attagggaaa attaaaattt tctttttata ttaagaaatc ccgaaaaaag aagagttaat       300  
             gtaaaataga gtttttcggt ttaaagaaat tttgaatttt atattggtga tgagatgtca       360  
             gtcgtttctt tataatctggt tattaatgaa ttaaatttaa tttagttatt ttttgataga       420  
             gttgaagtta aaaaatagta aagaatagga ggaagagct tcttattcta taataaatta       480  
 20           attgtgagtt gtcattgtaa atttgtatta aattaggctt aaaagcagtc aaatt           535

25 <210> 32

<211> 528

<212> DNA

<213> *Metapenaeus* sp.21

30

<220>

<221> misc\_feature

<223> Secuencia amplificada por SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4

35

<400> 32

40           cgttgagaag ttcgttgtgc aattcaatgt gtcttgaagt aaaatcttgt tttgtaaaat       60  
             ttttgtaaac aaaatagatt tattaaaatc attttttaat attaatgctt tagtaatttg       120  
             aaataaaaaa gcagtaaag actatagtaa aaagtactgt gaaggaatga tgaaatagta       180  
 45           tgaataaat taactaagaa aaagtaaaaa ttaatatttg taccttgtgt atcaggaag       240  
             attaaaatta actacttatg gtagaaatcc cgaaaaaaga agagttaacg taaaataaaa       300  
             gtttttgttt caaaaagatt ttttaatttta tgttagtgat gaaatgtcag tcgtttcttt       360  
             atatctgggt gttaatgaat taaattaaat ttaattgttt tttgataaaa tttaaattaa       420  
             aaaataataa agaatgggag ggaaaagctt cttattctaa aataagtata ctgtgataga       480  
 55           taaaaattgt tgaatttata ttaaattaag cttaaaagca gctaaatt           528

60 <210> 33

<211> 524

<212> DNA

<213> *Parapenaeus longirostris*

65

<220>

## ES 2 319 009 B2

<221> misc\_feature

<223> Secuencia amplificada por SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4

5 <400> 33

	cgttgagaag tacattgtgc aagtcaatgt gttttgaaaa agaatcttgt ttttatatg	60
10	aatattgtat agtaagaggt ttaataaaa ttattttgaa ataattttg ttttagtaaa	120
	ttgaattgaa ataaaagata taaggctata gtgaagagta ctgtaaagga aggatgaaat	180
	atattgaaaa attaattgat ggaaagtagt gtttaagatt cgtaccttgt gtattagga	240
15	atactaaaat tatcttgaaa ttaaggggt cccgaaagaa gaagagttaa ttcaataaga	300
	aagttttcgt ttaaatgaaa ttttaattt tgtgtagtg gtgaaatgtc agtcggttct	360
20	tcatatctgg ttattaacga atagaattaa atttgtttat ttttgataa gaaaagttaa	420
	aggataggta agagtaggag ggaagagctt cttgttctat tataagtaa tggtaatttg	480
	aaatatataa ttagtgtaa attaggctta aaagcagcaa tatt	524

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 319 009

② Nº de solicitud: 200603211

③ Fecha de presentación de la solicitud: 18.12.2006

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	KHAMNAMTONG, B., KLINBUNGA, S., MENASVETA, P. Species identification of five penaeid shrimps using PCR-RFLP and SSCP analyses of 16S ribosomal DNA. Journal of Biochemistry and Molecular Biology. Julio 2005, Vol. 38, Nº 4, páginas 491-499. ISSN 1225-8687.	1-12
A	GUTIÉRREZ-MILLÁN, L. E., PEREGRINO-URIARTE, A. B., SOTELO-MUNDO, R. et al. Sequence and conservation of a rRNA and tRNAl gene fragment from Penaeus californiensis and comparison with Penaeus vannamei and Penaeus stylirostris. Marine Biotechnology. Septiembre 2002, Vol. 4, Nº 4, páginas 392-398. ISSN 1436-2228.	1-12
A	VOLOCH, C. M., FREIRE, P. R., RUSSO, C. A. M. Molecular phylogeny of penaeid shrimps inferred from two mitochondrial markers. Genetics and Molecular Research. 2005, Vol. 4, Nº 4, páginas 668-674. ISSN 1676-5680.	1-12
A	LAVERY, S., CHAN, T. Y., TAM, Y. K., CHU, K. H. Phylogenetic relationships and evolutionary history of the shrimp genus Penaeus s. l. derived from mitochondrial DNA. Molecular Phylogenetics and Evolution. Abril 2004, Vol. 31, Nº 1, páginas 39-49. ISSN 1055-7903.	1-12
A	QUAN, J., ZHUANG, Z., DENG, J. et al. Phylogenetic relationship of 12 Penaeoidea shrimp species deduced from mitochondrial DNA sequences. Biochemical Genetics. Octubre 2004, Vol. 42, Nº 9-10, páginas 331-345. ISSN 0006-2928.	1-12

**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**

31.03.2009

**Examinador**

E. Relaño Reyes

**Página**

1/1