

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 354 343**

21 Número de solicitud: 200930098

51 Int. Cl.:
A01K 61/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación: **24.04.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **14.03.2011**

Fecha de la concesión: **10.10.2011**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
05.05.2011

45 Fecha de anuncio de la concesión: **21.10.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
21.10.2011

73 Titular/es:
**Universidade de Santiago de Compostela
CACTUS-CITT - Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES
Universidad Politécnica de Madrid y
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología
Agraria y Alimentaria (INIA)**

72 Inventor/es: **Bouza Fernández, Carmen;
Gómez Pardo, Belén;
Martínez Portela, Paulino;
Toro Ibáñez, Miguel Ángel;
Fernández Martín, Jesús;
Viñas Díaz, Ana María;
Vera Rodríguez, Manuel;
Hermida Prieto, Miguel;
Fernández López, Carlos y
Sánchez Piñón, Laura**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Método de identificación precoz del sexo en especies del género *Scophthalmus*.**

57 Resumen:

Método de identificación precoz del sexo en especies del género *Scophthalmus*.

Método para identificar el sexo en especies del género *Scophthalmus* antes de que tenga lugar la maduración sexual, que comprende: la extracción de DNA de una muestra biológica aislada de un individuo; poner en contacto la muestra a analizar con una mezcla de reacción, que contiene cebadores capaces de amplificar el marcador microsatélite M-SmaSD; amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa el marcador microsatélite M-SmaSD; y realizar el genotipado del individuo. Además se refiere a los dos cebadores mencionados utilizados en dicho método, así como a un kit de diagnóstico que comprende los elementos adecuados para llevar a cabo este método.

ES 2 354 343 B2

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

DESCRIPCIÓN

Método de identificación precoz del sexo en especies del género *Scophthalmus*.

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología molecular y la acuicultura y se refiere a un método para identificar el sexo en especies del género *Scophthalmus* antes de que tenga lugar la maduración sexual, lo que permite la selección precoz de los individuos de mayor interés productivo, en este caso, las hembras.

Estado de la técnica anterior

10 El rodaballo (*Scophthalmus maximus*) posee un alto valor comercial y ha sido cultivado intensivamente durante la última década. Con el fin de conseguir el éxito en la acuicultura a gran escala, es necesaria la mejora genética de esta especie y/o la selección asistida por marcadores genéticos de los individuos más interesantes para los cultivos.

15 La evaluación de los recursos genéticos en poblaciones naturales constituye una herramienta esencial que se ha venido aplicando en diferentes especies, y en particular en rodaballo (Bouza *et al.*, 2002, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59: 1460-1473), mediante el análisis de las variantes alélicas de diferentes marcadores (isoenzimas, AFLP, RAPD, microsátélites, etc.) o mediante el análisis de secuencias mitocondriales (Moritz, 1994, *Trends in Ecology and Evolution* 9: 373-375). La estimación de parentescos moleculares tiene gran interés para los programas de selección genética, y para ello se precisa de marcadores genéticos altamente polimórficos, técnicamente fiables y preferentemente codominantes. Los candidatos idóneos son los loci microsátélites que se han usado ampliamente para tal fin (Liu y Cordes, 2004, *Aquaculture* 238: 1-37), y en particular en rodaballo (Castro *et al.*, 2004, *Aquaculture*, 242: 119-135). Los marcadores moleculares, además suponen un método para confirmar la herencia exclusiva paterna o materna en individuos androgenéticos y ginogenéticos, respectivamente (Felip *et al.*, 2000, *Marine Biotechnology* 2: 301-306), metodología que también se ha aplicado a rodaballo (Castro *et al.*, 2003, *Marine Biotechnology*, 5: 584-592). Estos marcadores moleculares, tienen múltiples aplicaciones en la fundación de stocks de reproductores y en el desarrollo de planes de selección.

30 Aunque los marcadores genéticos son una herramienta empleada en acuicultura para llevar a cabo la selección asistida por marcadores de individuos de interés productivo dentro de una población en cultivo (Thomas Moen *et al.*, 2008, *BMC Genetics*. 9:18), nunca habían sido empleados para seleccionar individuos de rodaballo en base a su sexo, porque se desconocían los marcadores asociados a su determinación.

35 En aquellas especies en cultivo en que las ventajas de crecimiento, maduración o adaptación al mercado estén asociadas a uno de los sexos, el estudio de los mecanismos de determinación sexual es esencial para poder obtener poblaciones monosexo. El conocimiento del sexo a edades tempranas es necesario en el manejo de las poblaciones en cultivo y en el establecimiento de *stocks* de reproductores. No obstante, la determinación del sexo en peces presenta características peculiares dado que existe una mayor labilidad y versatilidad que en el resto de los vertebrados (Bull, 1983, *Benjamin Cumming Pub.* Menlo Park, California. EE UU: 316 pp): son poco frecuentes los heteromorfismos cromosómicos asociados al sexo, se han descrito mecanismos poligénicos de determinación sexual, es factible la reversión sexual mediante tratamientos hormonales, es frecuente el hermafroditismo y los factores ambientales pueden influir en la determinación sexual. Sin embargo, hay indicios de mecanismos genéticos de determinación sexual similares a los de los vertebrados (Hunter y Donaldson, 1983, *Fish Physiology* 9 B: 223-303. Academic Press. Nueva York; Nanda *et al.*, 1992, *Chromosoma* 101: 301-310).

45 Como en otras especies de peces teleósteos, en el rodaballo las hembras crecen más rápidamente que los machos alcanzando el tamaño comercial entre tres y seis meses antes que estos. Además, las hembras maduran sexualmente más tarde (a los 24 meses de edad frente a los 15-18 meses de los machos). Dicha maduración está asociada con una pérdida de calidad de la carne, una mayor susceptibilidad a enfermedades y una ralentización del crecimiento. Por todo ello, en el cultivo intensivo de esta especie es de gran interés incrementar la proporción de hembras, ya que presentan un mayor valor económico.

50 Sin embargo, la determinación del sexo en rodaballo es compleja y no se puede realizar con fiabilidad hasta después de que se produzca la maduración sexual, lo que imposibilita la detección precoz de machos y hembras necesaria para llevar a cabo los planes de selección. El gen o genes responsables de que la gónada esté predeterminada a convertirse en ovario o testículo pueden estar en un solo par cromosómico, en el par sexual, o distribuidos en distintos lugares del genoma.

60 Con anterioridad, se ha detectado la existencia de un comportamiento cromosómico diferencial durante la meiosis entre machos y hembras triploides, que podría explicar la diferencia en la maduración gonadal entre ambos sexos de rodaballo (Cuñado *et al.*, 2001, *Genome* 44: 1143-1147; Cuñado *et al.*, 2002, *Heredity* 89: 460-464). Además se ha visto que los triploides de esta especie tienen la ventaja de evitar los problemas asociados a la maduración gonadal y muestran una proporción superior de hembras (Piferrer *et al.*, 2000, *Aquaculture* 188: 79-90; Cal *et al.*, 2006, *Aquaculture*, 251: 99-108), lo cual es interesante en las poblaciones de rodaballo, en las que las hembras crecen más rápidamente que los machos. Sin embargo, la metodología de obtención de triploides aún ha de ser valorada y adaptada para su aplicación a escala industrial.

Algo similar ocurre en el caso de los ginogenéticos (individuos de constitución genética matrilineal). El análisis de la proporción de sexos en ginogenéticos ha aportado información relevante en relación con la elucidación de los mecanismos de determinación sexual en diferentes especies, y en particular en rodaballo (Cal *et al*, 2006, *Journal of Fish Biology*, 68: 401-413).

Otra de las aproximaciones a esta cuestión ha sido la búsqueda de secuencias de ADN específicas asociadas al sexo en otras especies de peces (Nakayama *et al*, 1994, *Chromosoma* 103: 31-39). Así, en el lenguado japonés se han logrado asociar determinadas regiones genéticas con la determinación del sexo y se ha desarrollado un método basado en la técnica de PCR para amplificar estas regiones de ADN, las cuales posteriormente son analizadas en un gel en el que la diferencia de tamaños de los fragmentos obtenidos permite determinar el sexo del individuo analizado (W02008117715 A1). No obstante, no existe ninguna técnica similar a esta que permita una identificación sexual en *Scophthalmus maximus*, por no haberse encontrado ninguna región genética asociada con la determinación sexual, de manera que la selección en base al sexo asistida por marcadores se ha podido desarrollar en otras especies de peces pero no así en el rodaballo.

En rodaballo, se han realizado aproximaciones citogenéticas con cromosomas mitóticos (Bouza, Sánchez y Martínez, 1994, *Mar. Biol.* 120: 609-613) y meióticos (Cuñado, Terrones, Sánchez, Martínez y Santos, 2001, *Genome*, 44: 1143-1147) para tratar de evidenciar heteromorfismos asociados al sexo, pero sin resultados positivos.

Se han aplicado técnicas de genómica estructural (mapas genéticos y “quantitative trait loci” o QTL) y proteómica para detectar regiones genómicas o genes específicos relacionados con los mecanismos de diferenciación gonadal en esta especie (Martínez, P., 2005, *Boletín Instituto Español de Oceanografía*. 21 (1-4): 225-238). En relación a ello, se ha construido un mapa genético con microsatélites de *Scophthalmus maximus* (Bouza, 2007, *Genetics* 177: 2457-2467), que ha aportado la posibilidad de identificar QTLs relacionados con el crecimiento y la resistencia a enfermedades y con la detección de regiones genómicas asociadas con la determinación sexual, que pueden tener aplicación en la selección asistida por marcadores. No obstante, hasta la fecha no se había conseguido asociar ninguna región genética concreta a la determinación sexual.

Debido a todas estas dificultades, hasta el momento la selección se realiza a una edad en la que todavía no se puede identificar el sexo, por lo que no es posible seleccionar a aquellos individuos de interés en los casos en que las ventajas en términos de producción estén asociadas a uno de los sexos.

Breve descripción de la invención

Un primer aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos para la identificación precoz del sexo en especies del género *Scophthalmus*, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

- a) la extracción de DNA de una muestra biológica aislada de un individuo,
- b) poner en contacto la muestra a analizar con una mezcla de reacción, que contiene cebadores capaces de amplificar el marcador microsatélite M-SmaSD que se encuentra incluido en la SEQ ID NO: 3,
- c) amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa el marcador microsatélite M-SmaSD,
- d) realizar el genotipado del individuo.

En una realización preferida de este aspecto de la invención los cebadores para el marcador microsatélite M-SmaSD son los que se recogen en la SEQ ID NO: 1, de ahora en adelante primera secuencia nucleotídica de la invención, y en la SEQ ID NO: 2, de ahora en adelante segunda secuencia nucleotídica de la invención. En otra realización preferida, la muestra biológica aislada del paso (a) proviene de la aleta caudal. En otra realización preferida uno de los cebadores capaces de amplificar el marcador microsatélite M-SmaSD del paso (b) está marcado con un fluorocromo. En otra realización más preferida el marcador microsatélite M-SmaSD incluye una o más secuencias de tipo: (TA)_n. En otra realización aún más preferida de este aspecto de la invención, la especie del género *Scophthalmus* es *Scophthalmus maximus*.

Método de identificación precoz del sexo en especies del género *Scophthalmus*, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos del método de obtención de datos (primer método de la invención), y además:

- e. asociar un determinado genotipo del paso (d) al sexo masculino y otro al sexo femenino.

En una realización preferida de este aspecto de la invención los cebadores para el marcador microsatélite M-SmaSD son los que se recogen en la primera secuencia nucleotídica de la invención (SEQ ID NO: 1) y en la segunda secuencia nucleotídica de la invención (SEQ ID NO: 2). En otra realización preferida, la muestra biológica aislada del paso (a) proviene de la aleta caudal. En otra realización preferida uno de los cebadores capaces de amplificar el marcador microsatélite M-SmaSD del paso (b) está marcado con un fluorocromo. En otra realización más preferida el

ES 2 354 343 B2

marcador microsatélite M-SmaSD incluye una o más secuencias de tipo: (TA)_n. En otra realización aún más preferida de este aspecto de la invención, la especie del género *Scophthalmus* es *Scophthalmus maximus*.

5 Método de selección de individuos del sexo femenino en especies del género *Scophthalmus*, de ahora en adelante tercer método de la invención, que comprende los pasos del método de obtención de datos (primer método de la invención) y/o del método de identificación precoz del sexo (segundo método de la invención), y que además comprende testar la presencia de un QTL (quantitative trait loci) relacionado con el sexo y asociado con el marcador microsatélite M-SmaSD.

10 En una realización preferida de este aspecto de la invención los cebadores para el marcador microsatélite M-SmaSD son los que se recogen en la primera secuencia nucleotídica de la invención (SEQ ID NO: 1) y en la segunda secuencia nucleotídica de la invención (SEQ ID NO: 2). En otra realización preferida, la muestra biológica aislada del paso (a) proviene de la aleta caudal. En otra realización preferida uno de los cebadores capaces de amplificar el marcador microsatélite M-SmaSD del paso (b) está marcado con un fluorocromo. En otra realización más preferida 15 el marcador microsatélite M-SmaSD incluye una o más secuencias de tipo: (TA)_n. En otra realización aún más preferida de este aspecto de la invención, la especie del género *Scophthalmus* es *Scophthalmus maximus*.

Otro aspecto de la invención se refiere a los dos cebadores recogidos en la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

20 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de los dos cebadores recogidos en la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos de tipo microsatélite que se incluye en la SEQ ID NO: 3, de ahora en adelante tercera secuencia nucleotídica de la invención, capaz de ser amplificada por los cebadores cuyas secuencias se recogen en la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, en el genoma de las especies del género *Scophthalmus*.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la tercera secuencia nucleotídica de la invención para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención.

30 Otro aspecto se refiere a un kit de diagnóstico precoz del sexo en especies del género *Scophthalmus*, de ahora en adelante kit de la invención, que comprende los medios adecuados para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención. En una realización preferida de este aspecto, el kit de la invención comprende los cebadores para el marcador microsatélite M-SmaSD cuya secuencia se recoge en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2.

35

Descripción de la invención

40 La presente invención proporciona un método de obtención de datos para la identificación precoz del sexo en especies del género *Scophthalmus*, y en concreto del rodaballo (*Scophthalmus maximus*). La ventaja del método propuesto en la invención radica en que permite identificar de manera precoz (antes de que se produzca la maduración sexual) el sexo del rodaballo, lo que posibilita la selección de los individuos más interesantes desde el punto de vista productivo, las hembras, para su cultivo. La identificación precoz del sexo en las especies de este género supone una valiosa herramienta para los programas de selección y producción de poblaciones en cultivo.

45

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos para la identificación precoz del sexo en especies del género *Scophthalmus*, que comprende:

- a. la extracción de DNA de una muestra biológica aislada de un individuo,
- 50 b. poner en contacto la muestra a analizar con una mezcla de reacción, que contiene los cebadores capaces de amplificar el marcador microsatélite M-SmaSD que se encuentra incluido en la SEQ ID NO: 3,
- c. amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa el marcador microsatélite M-SmaSD,
- 55 d. realizar el genotipado del individuo.

60 En la presente memoria se entiende como “identificación precoz del sexo” aquella que se realiza a cualquier edad del individuo a analizar con anterioridad a la maduración sexual.

Dado que las especies del género *Scophthalmus* son afines en cuanto a su evolución, la homología global de los genomas al nivel de la secuencia de nucleótidos es elevada. Esto ha permitido la amplificación del marcador microsatélite M-SmaSD, útil para la identificación del sexo en rodaballo, en otra especie del género *Scophthalmus* de valor comercial, *S. rhombus*, denominado rémol o coruxo. Por tanto, aunque la presente invención se ejemplifica con individuos de la especie *Scophthalmus maximus*, los métodos que aquí se proporcionan podrían servir para la obtención de datos útiles y para el diagnóstico precoz del sexo en otras especies del género *Scophthalmus*, como por ejemplo pero sin limitarnos, *Scophthalmus rhombus*.

65

ES 2 354 343 B2

El término “Género”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la categoría de la clasificación biológica (categoría taxonómica) que comprende una o más especies relacionadas filogenéticamente y morfológicamente similares. También se espera que compartan, características bioquímicas y metabólicas similares. Por “categoría taxonómica” se entiende el nivel de jerarquía utilizado para la clasificación de los organismos. El término “filogenia” como aquí se usa se refiere a la relación histórica verdadera entre un conjunto de taxones.

En la presente memoria se entiende por individuo un organismo de cualquiera de las especies del género *Scophthalmus*, pez perteneciente a la familia *Scophthalmidae*, del orden *Pleuronectiformes*, de la clase *Actinopterygios*.

Una muestra biológica aislada incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin.

En una realización preferida de la invención, la muestra biológica aislada procede de la aleta caudal del individuo, entendiéndose como aleta caudal la aleta única vertical en la parte posterior del pez, en la cola. Para la amplificación del marcador microsatélite M-SmaSD se pueden diseñar numerosos cebadores. Sin embargo, cuando se diseñan cebadores es necesario hacer una serie de predicciones, como la temperatura de fusión (T_m), la presencia de pares indeseables (a) o la posibilidad de formación de horquillas (b) que puedan reducir, por competencia, la efectividad de emparejamiento con la secuencia de ADN diana. Así pues, en otra realización preferida los cebadores para el marcador microsatélite M-SmaSD son los que se recogen en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2.

La metodología empleada en la presente invención, se basa en el principio de “selección asistida por marcadores” que consiste en utilizar como criterio de selección una variable genética, en este caso marcadores moleculares, asociados a la característica de interés, en este caso el sexo. Se trata de identificar previamente en el genoma marcadores próximos a las regiones cromosómicas implicadas en la manifestación de caracteres de interés dentro de las familias. Estas regiones se llaman “QTL” o “*Quantitative Trait Loci*”.

La contribución de estas regiones QTL que están involucradas en la expresión de un carácter se puede evaluar seleccionando genes candidatos (aquellos involucrados en la fisiología del carácter). La secuencia de ADN de la región QTL candidata permite identificar marcadores que se encuentran en ella, o cerca de ella. Estos marcadores son entonces utilizados para posicionar a la región QTL en el mapa de ligamiento, y para establecer su asociación con el carácter de interés. Como ejemplo, si un marcador se identifica en una región QTL determinante del sexo, las diferentes formas del marcador (conocidas como alelos) se utilizan para establecer qué alelo del marcador genético está asociado al fenotipo correspondiente con el sexo femenino, y qué alelo está asociado con el fenotipo correspondiente al sexo masculino. Esta estrategia permite establecer el efecto de una región QTL en la expresión de un carácter productivo.

Para asociar un fenotipo a un alelo concreto del marcador asociado a la región determinante del carácter estudiado, se hace un análisis del marcador dentro de las familias, de los descendientes y/o ascendientes, para ello se establece por medio de técnicas de biología molecular, como por ejemplo, pero sin limitarnos, el análisis de fragmentos, qué alelos ha heredado de los progenitores cada miembro de la familia.

Los inventores han identificado una región genética o QTL implicada en la determinación sexual, que se recoge en la SEQ ID NO: 3. En concreto, han localizado el gen SmaSD (del inglés “*Scophthalmus maximus* sex determinant”), principal responsable de la determinación del sexo en la especie. A una distancia de 1 centimorgan de este gen se ha detectado un marcador microsatélite, M-SmaSD, cuyo motivo de repetición es $(TA)_n$. Los autores de la presente invención han diseñado dos cebadores específicos de las secuencias adyacentes a este marcador (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2) que permiten la amplificación por PCR de la secuencia recogida en la SEQ ID NO: 3.

Por tanto, un segundo aspecto de la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos de tipo microsatélite que se incluye en la secuencia SEQ ID NO: 3, capaz de ser amplificada por los cebadores cuyas secuencias se recogen en la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, en el genoma de las especies del género *Scophthalmus*.

En esta memoria se entiende por “secuencia microsatélite” una región del genoma formada por repeticiones nucleotídicas de 1-6 pares de bases, que difiere de un genoma a otro en función del número de repeticiones, es decir, cuya longitud varía entre genomas, y que puede ser empleada como marcador, por permitir la discriminación entre individuos. El análisis de estos marcadores puede aplicarse, por ejemplo, a estudios de herencia familiar o al mapeo del genoma. En base a esto, dicha secuencia es utilizada en la invención para llevar a cabo el método descrito.

En esta memoria se entiende por “*Quantitative Trait Loci*” ó “QTL” aquella región del ADN cuya información genética es capaz de influenciar en la expresión de un carácter, en el individuo o en su descendencia. Por ello, como se ha explicado anteriormente, el análisis en individuos emparentados de un marcador microsatélite asociado a una región QTL, permite hacer un seguimiento familiar del carácter o caracteres influenciados por esta región y así asociar un determinado fenotipo a un alelo del marcador, de manera que dicho marcador puede ser usado en los planes de selección.

El método proporcionado por la presente invención permite analizar el marcador M-SmaSD, independientemente de la procedencia de las muestras. Dichas muestras pueden proceder, por ejemplo, pero sin limitarnos, de cualquier región de tejido epitelial que no afecte a la viabilidad del pez. La muestra una vez tomada es pretratada para poder llevar a cabo una PCR y un posterior análisis de los fragmentos obtenidos mediante el genotipado de los mismos.

En base a este marcador, los machos y las hembras presentan un genotipo distinto, y es precisamente esto lo que permite la discriminación entre sexos. Este genotipo además no es igual para todos los rodaballos, por lo que es necesario genotipar a cada individuo mediante el análisis del marcador M-SmaSD así como a otros parientes (los abuelos, los hermanos de la madre o a otros descendientes o ascendientes de la misma progenie analizada), sexados con anterioridad, para identificar qué alelo de este marcador está asociado al sexo masculino o femenino en su progenie. El análisis de este marcador ha permitido también evidenciar que la determinación del sexo en las progenies depende únicamente de la madre, de manera que dependiendo de qué alelo materno porten los descendientes pueden ser identificados como machos o hembras.

Para llevar a cabo este estudio, los fragmentos obtenidos en la PCR se analizan, por ejemplo pero sin limitarse, en un secuenciador automático, que permite identificar las variantes alélicas del marcador en función de su tamaño en pares de bases. El locus microsatélite de M-SmaSD, es codominante, por lo que se puede determinar el tamaño de los dos alelos.

Por tanto, el marcador M-SmaSD es de gran valor a la hora de predecir el sexo de las progenies conociendo información adicional del genotipo de otros parientes, según la metodología de “selección asistida por marcadores”.

La visualización de los microsatélites puede realizarse por medios bien conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, pero sin limitarse, mediante electroforesis en geles de acrilamida, tiñendo con nitrato de plata, o empleando radioisótopos. Actualmente suele realizarse con secuenciadores automáticos, empleando cebadores pre-marcados con fluorescencia. Así, en otra realización preferida de la invención, uno de los cebadores empleados en la reacción de PCR está unido a un fluorocromo, que permitirá detectar los fragmentos de la PCR en el secuenciador y visualizar el tamaño de los mismos en un software de imagen.

En la presente memoria se define fluorocromo como el grupo funcional de una molécula fluorescente que absorbe energía de una longitud de onda específica y la vuelve a emitir en otra determinada de mayor longitud de onda, por ejemplo, pero sin limitarnos, el isotiocianato de fluoresceína o la rodamina.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit de diagnóstico adecuado para llevar a cabo el método de la invención. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit de diagnóstico comprende los cebadores de la invención, específicos para la amplificación de la secuencia recogida en SEQ ID NO: 3, u otras secuencias homologas a la SEQ ID NO: 3, que incluyan el marcador M-SmaSD.

En la presente descripción, el termino “específicos” implica que los cebadores comprenden una secuencia nucleotídica totalmente complementaria a las secuencias adyacentes al marcador M-SmaSD empleado por el método de la presente invención.

Dicho kit puede comprender cebadores, sondas y todos aquellos reactivos necesarios para llevar a cabo el método de la invención. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, el uso de tampones, polimerasas, cofactores para obtener una actividad óptima de éstas, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención. A título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, el kit contendrá todos los elementos necesarios para la identificación del sexo en el rodaballo, o en otras especies del género *Scophthalmus*, por la técnica que se ha descrito anteriormente.

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.

Descripción de las figuras

Fig. 1. Análisis de fragmentos del locus microsatélite M-SmaSD en 4 hembras de la especie *Scophthalmu maximus*. Los individuos hembras son heterocigóticos (dos picos) muestran dos alelos.

Fig. 2. Análisis de fragmentos del locus microsatélite M-SmaSD en 4 machos de la especie *Scophthalmus maximus*. Los individuos machos son homocigóticos, presentan un único tipo alélico (un sólo pico).

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la especificidad y efectividad del método de obtención de datos para la identificación del sexo en especies del género *Scophthalmus* mediante el análisis del marcador microsatélite M-SmaSD.

ES 2 354 343 B2

Ejemplo 1

Identificación del marcador asociado a la región genética o QTL implicada en la determinación del sexo en rodaballo

5 Selección de marcadores genéticos

Para la identificación de la región genómica asociada con el sexo, se utilizó el mapa genético del rodaballo (Bouza *et al.*, 2007, *Genetics* 177: 2457-246) con 248 marcadores microsatélite anónimos. De ellos, se seleccionaron 99 marcadores distribuidos homogéneamente a lo largo de todo el genoma a distancias mayoritariamente alrededor de 10 cM.

Genotipado del rodaballo a partir de los marcadores

15 Estos marcadores previamente seleccionados fueron genotipados en abuelos, padres y descendientes de tres familias sexadas con anterioridad. Las tres familias estaban constituidas por 96 (F-1), 50 (F-2) y 50 (F-3) individuos sexados respectivamente, con proporciones equilibradas de machos y hembras.

20 Búsqueda de asociación entre los marcadores y el sexo

La búsqueda de asociaciones significativas entre el sexo de los descendientes y los marcadores genotipados a lo largo de todo el genoma se realizó usando el programa QTL Express. La significación de la asociación se realizó mediante un análisis de la varianza. En la familia más amplia (F-1) se identificó un marcador con una asociación muy elevada ($F=7815,63$; $g.l.=3229$; $P=0$). Además, se detectaron otras 4 asociaciones de mucho menor efecto, algunas de ellas significativas después de la corrección para múltiples test. En las otras dos familias de 50 individuos (F-2 y F-3), se detectó únicamente la fuerte asociación previamente observada en la familia F-1.

La utilización del marcador SmaSD, que presentaba el valor de asociación más elevado, permitió sexar correctamente el 97% de los individuos de la familia F-1 y el 100% de los individuos de las familias F-2 y F-3. Globalmente, esto representa un 98.5% de individuos correctamente sexados. El análisis de segregación en las familias indicó igualmente que el sexo de la progenie venía determinado únicamente por la madre. De manera que dependiendo del alelo del marcador que la madre transmitía a sus descendientes, estos eran machos o hembras.

35 Ejemplo 2

Identificación del sexo en rodaballo

40 Extracción del ADN

Para la extracción de ADN se tomó una muestra epitelial de la aleta caudal del rodaballo, *Scophthalmus maximus*. Una vez tomada la muestra, se almacenó a 4°C en un tubo de 1,5 mL con alcohol de 96° hasta su análisis. Para la extracción del ADN genómico se aplicó el método de Chelex-100. El protocolo se describe en detalle a continuación:

- 45 1. Precalentar a 60°C la solución Chelex al 10%.
2. Cortar un pequeño trozo de tejido muestral conservado en etanol absoluto a 4°C.
3. Disponer el fragmento muestral (aleta) en un tubo estéril de 2 mL (con tapa enroscada) y añadir 500 μ L de Chelex al 10%.
4. Agitar utilizando un vortex.
5. Añadir 15 μ L de Proteínasa K (20 mg/mL).
- 55 6. Incubación a 56°C durante 1 hora en el horno de hibridación con frecuentes agitaciones, cada 10 minutos.
7. Incubar 15 minutos a 100°C.
- 60 8. Conservar a 4°C.
9. Antes de cada uso:
 - 65 i) Agitar con vortex durante 10 segundos.
 - ii) Centrifugar 10 minutos a 10.000 r.p.m.
 - iii) Cargar 1 μ L para cada reacción de PCR.

ES 2 354 343 B2

Amplificación del marcador M-SmaSD

Para el análisis del marcador M-SmaSD, es necesaria su amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del ADN genómico. A continuación se detalla la mezcla de reacción:

- 5 - H₂O-miliQ, 35,5 μ L.
- Tampón, 5 μ L buffer 10x.
- 10 - dNTPs, 2 μ L (stock 10 mn) - 0,4 mn final.
- Cebador forward (SEQ. ID NO: 1), 2 μ L (200 ng).
- Cebador reverse (SEQ. ID NO: 2), 2 μ L (200 ng).
- 15 - MgCl₂, 1,5 μ L (stock 50 mn).
- Taq polimerasa, 1 μ L (0,5 un).
- 20 - ADN genómico, 1 μ L (50 ng).
- Volumen total: 50 μ L.

25 Las secuencias de los dos cebadores específicos desarrollados en la presente invención para la amplificación de M-SmaSD, son las recogidas en las SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y la secuencia amplificada es la recogida en la SEQ ID NO: 3.

A uno de los dos cebadores se le añade un fluorocromo.

30 Las condiciones de la reacción de amplificación son las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C 10 minutos; 35 ciclos de desnaturalización (94°C 45 segundos), anillamiento (58°C 50 segundos), y elongación (72°C 50 segundos); finalmente un paso de extensión a 72°C durante 10 minutos.

35 *Análisis molecular del marcador M-SmaSD*

A continuación se realiza el genotipado del individuo mediante el análisis de 50 ng de la solución de amplificación. Los fragmentos de la reacción de amplificación se analizan en un secuenciador automático. Este análisis permite 40 identificar las variantes alélicas del marcador en función de su tamaño en pares de bases.

El fluorocromo añadido en el paso anterior a uno de los cebadores empleados en la reacción de PCR, permite la detección de los fragmentos con el láser del secuenciador y la visualización en el software de imagen.

45 Siguiendo el principio de la selección asistida por marcadores, es necesario genotipar adicionalmente a: i) los abuelos, ii) los hermanos de la madre, iii) otros descendientes de la misma progenie analizada, sexados con anterioridad. Cualquiera de las tres opciones es válida.

50 *Identificación del sexo*

Una vez genotipado el individuo a analizar y cualquiera de sus familiares descritos en el apartado anterior, previamente sexado, se puede asociar un genotipo al sexo femenino o masculino en la progenie analizada.

55 En el ejemplo de la presente invención, dicho análisis permitió asociar la heterocigosis con las hembras, como se muestra en la Figura 1, y la homocigosis con los machos, como se muestra en la Figura 2.

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Método de obtención de datos para la identificación precoz del sexo en especies del género *Scophthalmus*, que comprende:

- a. la extracción de DNA de una muestra biológica aislada de un individuo,
- b. poner en contacto la muestra a analizar con una mezcla de reacción, que contiene cebadores capaces de amplificar el marcador microsatélite M-SmaSD que se encuentra incluido en la SEQ ID NO: 3,
- c. amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa el marcador microsatélite M-SmaSD,
- d. realizar el genotipado del individuo.

15 2. Método de obtención de datos para la identificación precoz del sexo en especies del género *Scophthalmus* según la reivindicación 1, donde los cebadores para el marcador microsatélite M-SmaSD son los que se recogen en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2.

20 3. Método de identificación precoz del sexo en especies del género *Scophthalmus*, que comprende el método de obtención de datos según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, y además:

- e. asociar un determinado genotipo del paso (d) al sexo masculino y otro al sexo femenino.

25 4. Método de selección de individuos del sexo femenino en especies del género *Scophthalmus*, que comprende los pasos del método de obtención de datos según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y/o del método de identificación precoz del sexo según la reivindicación 3, y que además comprende testar la presencia de un QTL (quantitative trait loci) relacionado con el sexo y asociado con el marcador microsatélite M-SmaSD.

30 5. Método de obtención de datos según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, método de identificación precoz del sexo según la reivindicación 3, o método de selección de especies del género *Scophthalmus* según la reivindicación 4, donde la muestra biológica aislada proviene de la aleta caudal.

35 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que uno de los cebadores capaces de amplificar el marcador microsatélite M-SmaSD del paso (b) está marcado con un fluorocromo.

40 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 donde el marcador microsatélite M-SmaSD incluye una o más secuencias de tipo: (TA)_n.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 donde la especie del género *Scophthalmus* es *Scophthalmus maximus*.

45 9. Uso de los cebadores recogidos en las SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 para llevar a cabo cualquiera de los métodos de las reivindicaciones 1-8.

10. Uso de la secuencia de nucleótidos de tipo microsatélite recogida en la SEQ ID NO: 3 para llevar a cabo los métodos de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

50 11. Kit de diagnóstico precoz del sexo en especies del género *Scophthalmus* que comprende los cebadores para el marcador microsatélite M-SmaSD cuya secuencia se recoge en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2.

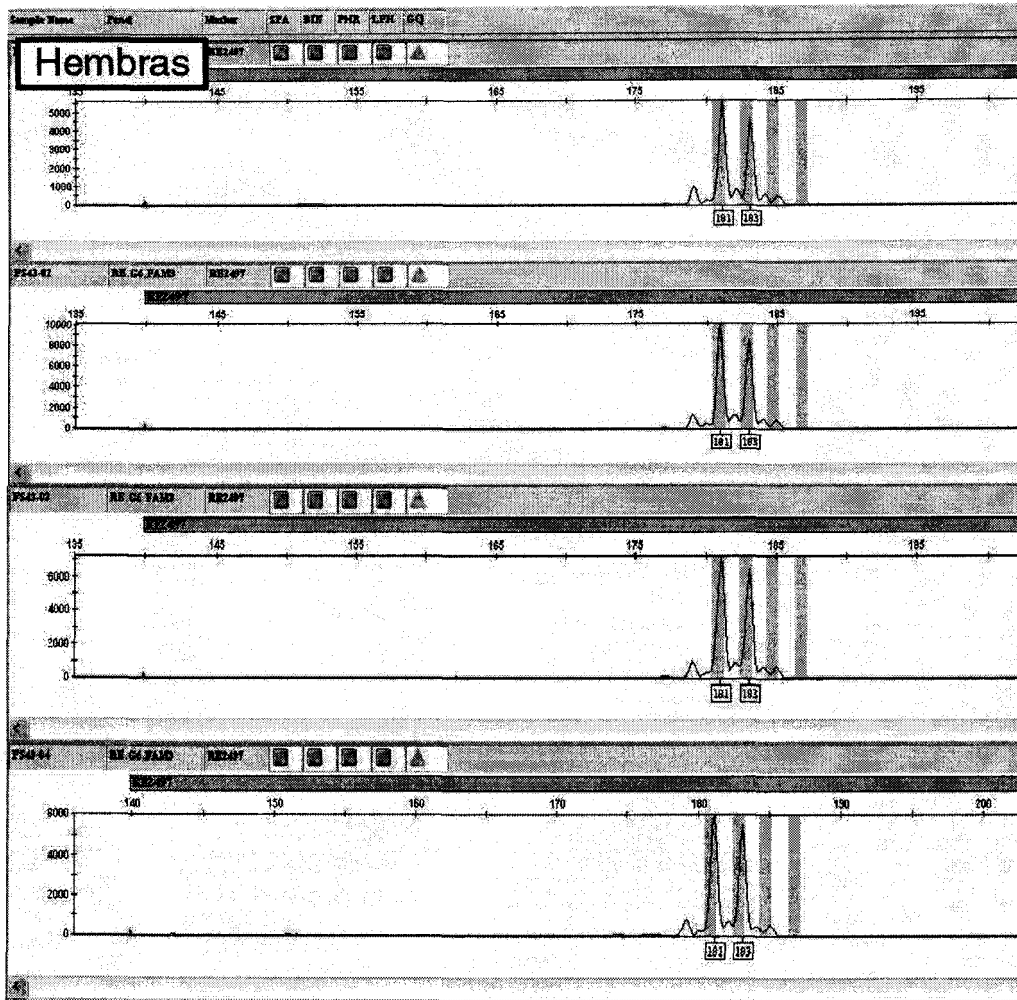


Fig. 1.

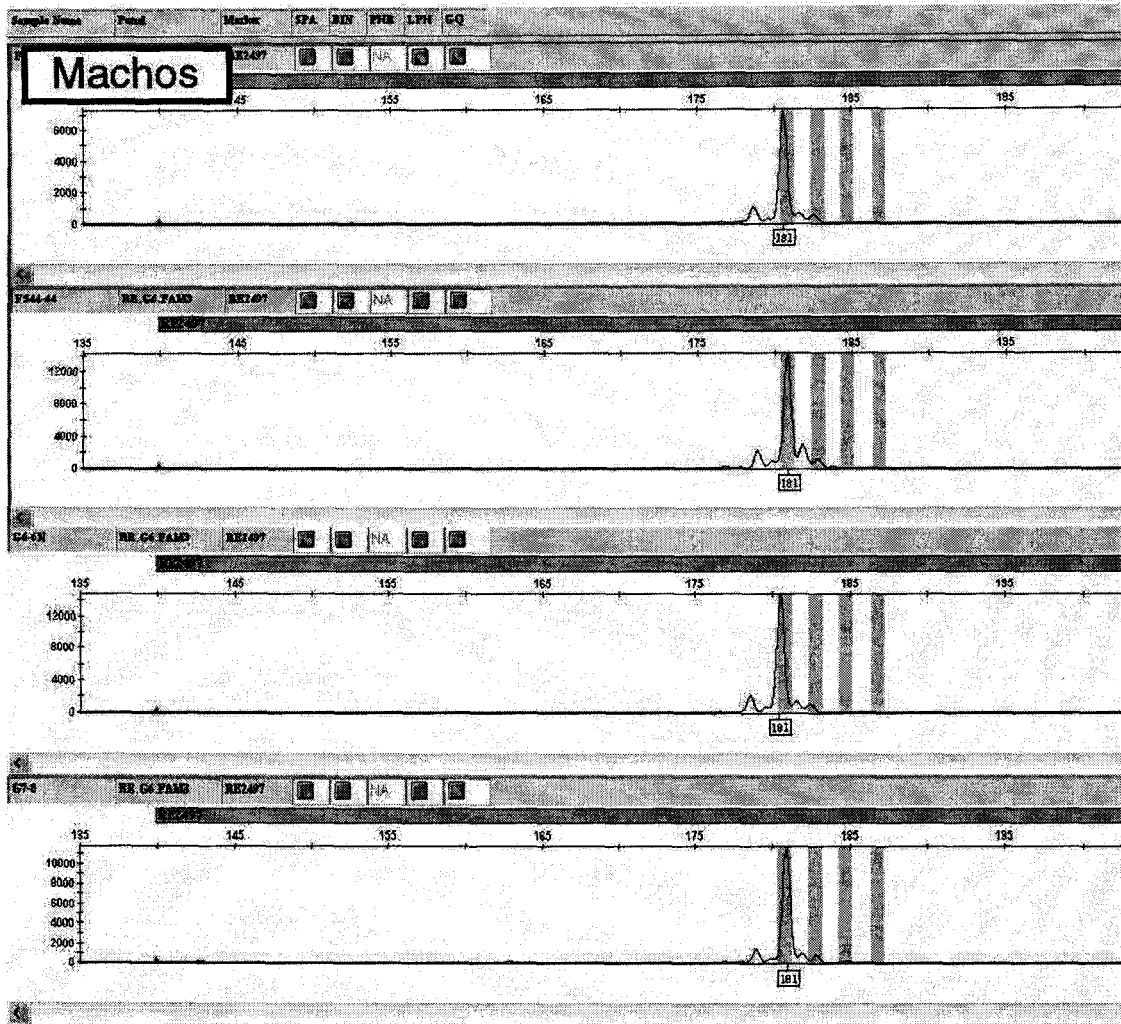


Fig. 2.

ES 2 354 343 B2

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidade de Santiago de Compostela
Universidad Politécnica de Madrid
5 Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)

<120> Método de identificación precoz del sexo en especies del género *Scophthalmus*

10 <130> 1596.19

<160> 3

15 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 20
20 <212> DNA
<213> *Scophthalmus maximus*

<400> 1
25 gctgaaagat cggaggcata 20

<210> 2
30 <211> 20
<212> DNA
<213> *Scophthalmus maximus*

35 <400> 2
cccaagtggg tgcattatga 20

40 <210> 3
<211> 462
<212> DNA
<213> *Scophthalmus maximus*

45 <400> 3
gcttgagagt agatcggaaa catgtcgtcg ccccggctcc gcacaccgtc tgtcttgaga
60
50 tcctctcgct cgttcgtttt ttctccgtgt tactcggacg ctttcgcccc tcgcagctga
120
gcgcgtctcc tctctgctgc acgtaaaccg gcacctgctg gcaggtgcga ggccgacgct
180
55 gaaagatcgg aggcatatct ttttcgaaat caggtgtgtc tgttcttaat gtttgtgggg
240
cgaatgagtc cagttatcct ttacatttat atatatatat atatataaa aaatatatat
300
60 atctgtttgga agagtttgac attagctgct ttgttttttt tcaatatgca accacttggg
360
tcgtagaaga aatgtgttat tatggagtgt ctggaaaaag aaagaacaa tagaagagtt
420
65 gttttctttg cactgaaacg attttttggg tttgttttgg tt
462



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930098

②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.04.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A01K61/00** (01.01.2006)
C12Q1/68 (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X A	BOUZA, C., <i>et al.</i> Characterization of EST-derived microsatellites for gene mapping and evolutionary genomics in turbot. <i>Animal genetics</i> . Dic-2008. Vol. 39, nº 6, páginas 666-670. ISSN 1365-2052 (Electrónico). Ver todo el documento, especialmente Tabla 1.	9,11 1-8,10,12,13
X A	PARDO, B.G., <i>et al.</i> Expressed sequence tags (ESTs) from immune tissues of turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>) challenged with pathogens. <i>BMC veterinary research</i> . 25.09.2008. Vol. 4, página 37. ISSN 1746-6148 (Electrónico) & Base de datos EMBL, Hinxton,UK; 06.11.2008; [en línea] PARDO, B.G., <i>et al.</i> Número de acceso FE946656. Ver todo el documento.	9,11 1-8,10,12,13
A	GU, Y., <i>et al.</i> Isolation and characterization of microsatellite markers for turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>) by screening SSR-enriched library. <i>Conservation Genetics</i> . 10.03.2009. Vol. 10, nº 6, páginas 2001-2003. ISSN 1566-0621. Ver todo el documento.	1-13
A	BOUZA, C., <i>et al.</i> A microsatellite genetic map of the turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>). <i>Genetics</i> . Dic-2007. Vol. 177, 4, páginas 2457-2467. ISSN 0016-6731. Ver todo el documento.	1-13
A	SHIRAK, A., <i>et al.</i> <i>Amh</i> and <i>Dmrta2</i> genes map to tilapia (<i>Oreochromis spp.</i>) linkage group 23 within quantitative trait locus regions for sex determination. <i>Genetics</i> . Nov-2006. Vol. 174, nº 3, páginas 1573-1581. ISSN 0016-6731. Ver todo el documento.	1-13
A	CHISTIAKOV, D.A., <i>et al.</i> Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. <i>Aquaculture</i> . 31.05.2006. Vol. 255, nº 1-4, páginas 1-29. ISSN 0044-8486. Ver todo el documento, especialmente resumen y apartados 6 y 7.	1-13

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
23.02.2011

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/5

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

A01K, C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, EBI (Euro Patents, Japan Patents, US Patents, EMBL All, STSs, ESTs, Vertebrates, naGeneSeq), REGISTRY.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.02.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-8, 10, 12, 13	SI
	Reivindicaciones 9, 11	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-8, 10, 12, 13	SI
	Reivindicaciones 9, 11	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	BOUZA, C., <i>et al.</i> Animal genetics. Dic-2008. Vol. 39, nº 6, páginas 666-670. ISSN 1365-2052 (Electrónico).	Dic-2008
D02	PARDO, B.G., <i>et al.</i> BMC veterinary research. 25.09.2008. Vol. 4, página 37. ISSN 1746-6148 (Electrónico) & Base de datos EMBL, Hinxton, UK; 06.11.2008; [en línea] PARDO, B.G., <i>et al.</i> Número de acceso FE946656.	25.09.2008
D03	GU, Y., <i>et al.</i> Conservation Genetics. 10.03.2009. Vol. 10, nº 6, páginas 2001-2003. ISSN 1566-0621.	10.03.2009
D04	BOUZA, C., <i>et al.</i> Genetics. Dic-2007. Vol. 177, 4, páginas 2457-2467. ISSN 0016-6731.	Dic-2007
D05	SHIRAK, A., <i>et al.</i> Genetics. Nov-2006. Vol. 174, nº 3, páginas 1573-1581. ISSN 0016-6731.	Nov-2006
D06	CHISTIAKOV, D.A., <i>et al.</i> Aquaculture. 31.05.2006. Vol. 255, nº 1-4, páginas 1-29. ISSN 0044-8486.	31.05.2006

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

La presente solicitud de patente describe y reivindica un método para la identificación precoz del sexo en especies del género *Scophthalmus*, que consiste en la amplificación por PCR de la secuencia del marcador microsatélite M-SmaSD para realizar el genotipado del individuo. Posteriormente se realiza la selección de los individuos de sexo femenino mediante la detección de la presencia de un QTL (*quantitative trait loci*) relacionado con el sexo y asociado al mencionado marcador microsatélite. La solicitud reivindica también la secuencia de nucleótidos del marcador microsatélite y las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del mismo.

No se ha encontrado en el estado de la técnica el método de detección precoz del sexo en *Scophthalmus* que se reivindica en la solicitud, por lo que las reivindicaciones 1-8, 10, 12 y 13 se consideran nuevas según el artículo 6 de la Ley de Patentes.

Sin embargo, existen documentos en el estado de la técnica que divulgan las secuencias del microsatélite utilizado como marcador en el método de la solicitud, así como las secuencias de los oligonucleótidos empleados para la amplificación del microsatélite. Así, en la tabla 1 del documento D01 se incluye el número de acceso de la base de datos GenBank del microsatélite SmaUSC-E30, que es la secuencia del marcador empleado en el método reivindicado (aunque se le llama M-SmaSD en la solicitud de patente). En la misma tabla encontramos las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de este microsatélite, que también coinciden con las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la solicitud. Por tanto, el documento D01 afecta la novedad de las reivindicaciones 9 y 11 de la presente solicitud de patente.

Por otro lado, la secuencia del microsatélite M-Sma-SD aparece divulgada en la base de datos EMBL con el número de acceso FE946656, esta vez con el nombre SMA-USC-EC-580, como se muestra en el documento D02. Por consiguiente, a la luz de lo divulgado en este documento D02, la reivindicación 11 de la solicitud no cumple el requisito de novedad. Además, dado que el diseño de oligonucleótidos para amplificar por PCR una secuencia conocida es una técnica rutinaria y sobradamente conocida, la información divulgada en el documento D02 afecta también la actividad inventiva de la reivindicación 9 de la solicitud, según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

Dado que ni el documento D01 ni el D02 describen el uso del microsatélite y los oligonucleótidos mencionados para la determinación precoz del sexo en *Scophthalmus*, ninguno de estos dos documentos afectaría la novedad ni la actividad inventiva de las demás reivindicaciones de la solicitud (1-8, 10, 12 y 13).

En el resto de los documentos citados en el presente informe tampoco se divulga el método reivindicado. Se trata de documentos que únicamente contienen información general del estado de la técnica relativa al método de la invención, pero no afectan la novedad ni la actividad inventiva de la misma.

El documento D03 describe el aislamiento de 10 secuencias de microsatélites en dos cepas de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) a partir de una genoteca enriquecida en SSRs (*simple sequence repeats*), y para ello emplean técnicas similares a la de la solicitud de patente. Aunque se sugiere que estos nuevos microsatélites son útiles como marcadores para mapeo genómico, determinación de parentescos, o genética poblacional, no se menciona su utilidad para determinación del sexo en estas especies, por lo que el documento D03 no afecta la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud.

El documento D04 divulga la creación de un mapa genético de microsatélites en *Scophthalmus maximus*, y su utilidad para identificación de QTLs relacionados con rasgos de interés en la producción de estos peces. Al final del documento se sugiere el uso de este mapa de ligamiento para estudios genéticos, incluyendo determinación de sexo, pero, dado que únicamente se comenta con carácter general, y no se divulga el método reivindicado, se considera que tampoco el documento D04 afecta la novedad ni la actividad inventiva de la presente solicitud.

En el documento D05, los autores localizan dos genes implicados en determinación sexual en tilapia (*Oreochromis spp.*), y lo hacen empleando microsatélites y QTL. Tampoco este documento afecta la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud, pues, aunque las técnicas son similares en ambos casos, se trata de organismos y secuencias génicas distintas.

Finalmente, se cita el documento D06, que es una revisión de la función y aplicaciones de los microsatélites, con especial énfasis en su uso en estudios de genética de peces y aplicaciones prácticas en acuicultura. Se trata de un documento con información general, que no afecta la novedad ni la actividad inventiva de la presente solicitud de patente.