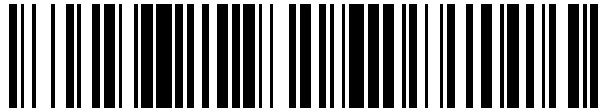


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 366 289**

21 Número de solicitud: 201000362

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22

Fecha de presentación: **18.03.2010**

43

Fecha de publicación de la solicitud: **19.10.2011**

Fecha de la concesión: **08.05.2012**

45

Fecha de anuncio de la concesión: **21.05.2012**

45

Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**21.05.2012**

62

Número de la solicitud inicial: **P 200801656**

73

Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE VIGO  
CAMPUS UNIVERSITARIO LAGOAS  
MARCOSENDE  
36310 VIGO, Pontevedra, ES**

72

Inventor/es:

**Sotelo Fernández, Graciela;  
Moran Martínez, Paloma y  
Posada Gonzalez, David**

74

Agente/Representante:

**No consta**

54

Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE LAS ESPECIAS EUROPEAS DEL GENERO MAJA (CENTOLLAS).**

57

Resumen:

Procedimiento para la identificación genética de las especies europeas del género Maja (centollas).

Se ha desarrollado un protocolo para la identificación genética de la centolla europea del Atlántico (*Maja brachydactyla*) frente a las demás especies del género que se encuentran en el Mediterráneo (*M. squinado*, *M. crispata* y *M. goltziana*). Estas especies constituyen un recurso comercial de gran valor; su identificación es fundamental para posibilitar su trazabilidad y correcto etiquetado y para orientar su gestión y conservación.

El protocolo consiste en amplificar una región de 671 pb del gen 16S del ADN mitocondrial, cuya secuencia nucleotídica es característica de cada una de las 4 especies. En particular, se han identificado 3 enzimas de restricción que digieren el fragmento de 671 pb de forma que la combinación de los patrones de bandas que generan es distintiva y característica de cada una de las especies.

ES 2 366 289 B2

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimientos para la identificación genética de las especies europeas del género *Maja* (centollas).

## 5 Sector de la técnica

La centolla es un recurso pesquero muy importante en Europa y, como tal, una exigencia básica de mercado es la autenticación de su origen y su correcto etiquetado. Además, se está explotando de forma intensiva y, de hecho, en el Mediterráneo, la especie más comercializada ya se considera amenazada. Por eso también es fundamental la  
10 identificación de estas especies para desarrollar programas de recuperación y repoblación, de modo que se asegure la incorporación correcta de cada especie en su área de distribución geográfica.

## Estado de la técnica

15 La centolla es uno de los crustáceos de mayor importancia económica en las costas europeas. Pertenece al género *Maja* y en esta región se han definido cuatro especies: *M. brachydactyla*, *M. squinado*, *M. crispata* y *M. goltziana* (Neumann 1998), si bien el interés comercial se centra en las dos primeras. *M. brachydactyla* se distribuye en el Atlántico (desde el sur del Mar del Norte hasta Senegal) mientras que *M. squinado* es endémica del Mediterráneo. *M. crispata* y *M. goltziana* fueron descritas inicialmente tanto en el Atlántico (desde el oeste de Portugal hasta el Golfo de Guinea) como en el Mediterráneo, aunque los registros recientes corresponden al Mediterráneo (Carmona-Suárez  
20 2003, Fürböck y Patzner 2005; Soppelsa *et al.* 2005, Lelli *et al.* 2007).

La diferenciación de estas especies es muy complicada, especialmente en el caso de *M. brachydactyla* y *M. squinado*; se basa en una serie de caracteres morfológicos como la forma de los primeros gonópodos, la forma de las espinas del caparazón (y su disposición) y varias medidas morfométricas (Neumann 1998). Sin embargo, estas diferencias no son definitivas, son apreciables sólo por expertos y tienen el inconveniente añadido de que cambian a lo largo de la vida del individuo (no se observan en estado larvario y varían entre juveniles y adultos). Por este motivo, las centollas pescadas en el Atlántico (*M. brachydactyla*, según Neumann) son todavía etiquetadas en los mercados como *M. squinado*.  
30

Desde el punto de vista comercial, las capturas de centolla superaron las 5000 toneladas en el año 2005 (según los últimos datos disponibles de la FAO); y, siendo un producto muy apreciado en el mercado, alcanza además precios elevados. Se pesca casi exclusivamente en el litoral Atlántico, mientras que en el Mediterráneo es cada vez más difícil de encontrar. De hecho, en algunas zonas del Mediterráneo, *M. squinado* se considera una especie amenazada.  
35 Por estos motivos, se está desarrollando el cultivo en cautividad, tanto para abastecer a los mercados y paliar la sobreexplotación de las poblaciones naturales como para repoblar y recuperar las áreas más afectadas.

Para resolver los problemas de identificación, hemos llevado a cabo un estudio genético con marcadores de ADN mitocondrial: un fragmento de 710 pb del gen COI y un fragmento de 560 pb del gen 16S (Sotelo *et al.* 2008),  
40 confirmando el estatus de especie de cada una de las formas propuestas.

En este estudio concluimos además que el fragmento de 16S es un marcador idóneo para la identificación de estas centollas, por ser invariable dentro de especie y variable entre especies. Conociendo la secuencia nucleotídica de estos fragmentos, es posible asignar una muestra de centolla europea de forma inequívoca a una de las cuatro especies. La  
45 ventaja de la identificación genética es su validez en cualquier etapa del desarrollo del individuo, desde larva a adulto, y su aplicación sobre una pequeña cantidad de tejido del individuo analizado, por lo que no es necesario disponer del individuo completo.

Aunque la secuenciación del fragmento del 16S es un buen método de identificación, hemos diseñado un protocolo de asignación molecular más rápido y sencillo, pero igualmente eficaz. El principal objetivo es la identificación de *M. brachydactyla* frente a *M. squinado*, ya que estas dos especies de centolla son las más parecidas morfológicamente y de mayor interés comercial. Sin embargo, para evitar cualquier posible confusión con las demás especies del Mediterráneo, éstas también se han incluido a la hora de desarrollar la técnica.  
50

## 55 Bibliografía

- Carmona-Suárez CA (2003)** Reproductive biology and relative growth in the spider crab *Maja crispata* (Crustacea: Brachyura: Majidae). *Scientia Marina* 67: 75-80.
- 60 **Fürböck S, Patzner RA (2005)** Daily movement patterns of *Maja crispata* Risso 1827 (Brachyura: Majidae) *Acta Adriatica* 46: 41-45.
- Lelli S, Carpentieri P, Colloca F, Ardizzone GD (2007)** The spiny spider crab *Maja goltziana* (Crustacea: Majidae) in south Lebanese waters. JMBA2 - *Biodiversity Records* (Published on-line).
- 65 **Neumann V (1998)** A review of the *Maja squinado* (Crustacea: Decapoda: Brachyura) species-complex with a key to the eastern Atlantic and Mediterranean species of the genus. *Journal of Natural History* 32: 1667-1684.

Soppelsa N, Zenetos A, Papathanassiou E (2005) *Maja goltziana* d'Oliveira, 1888 (Decapoda, Brachyura, Majidae) in the southern Tyrrhenian Sea. *Crustaceana* 78: 121-124.

5 Sotelo G, Moran P, Posada D (2008) Genetic identification of the northeastern Atlantic spiny spider crab as *Maja brachydactyla* Balss, 1922. *Journal of Crustacean Biology* 28: 76-81.

### Explicación de la invención

10 El objetivo de la invención es la identificación genética inequívoca de las 4 especies de centolla que se han descrito en las costas europeas. La invención se basa en la amplificación de un fragmento de 671 pb del gen 16S del ADN mitocondrial, para el que ya había cebadores disponibles con anterioridad, y en el estudio de las diferencias en la secuencia entre las 4 especies de centolla. Teniendo en cuenta estas diferencias, se han identificado 3 enzimas de restricción que digieren el fragmento de 671 pb (cada enzima por separado, en una reacción independiente) de modo que el patrón combinado de bandas que generan es característico de cada una de las especies.

### 15 Descripción detallada de la invención (forma de realización)

20 El procedimiento para la identificación genética de las 4 especies europeas del género *Maja* (centollas), *M. brachydactyla*, *M. squinado*, *M. crispata* y *M. goltziana*, consta de las siguientes etapas:

1. Extracción de ADN.
2. Amplificación por PCR de un fragmento de 671 pb del gen mitocondrial 16S.
- 25 3. Digestión del fragmento amplificado de 671 pb con 3 endonucleasas de restricción, en reacciones independientes.
4. Electroforesis de los fragmentos que resultan de cada digestión y análisis de los patrones combinados de las 3 enzimas, característicos de cada especie.

#### 30 1.- Extracción de ADN

35 Para extraer ADN se parte de una muestra de tejido de 0.5 cm<sup>3</sup>, de músculo preferentemente. Se han descrito muchos protocolos de extracción, pero uno de los más sencillos y rápidos es el que utiliza la resina quelante Chelex [Estoup *et al.* (1996) *Mol Mar Biol Biotech* 5: 295-298], Consiste en homogeneizar el tejido en 400 µL de una solución de Chelex 100 (Bio Rad) al 10%. La solución debe mantenerse caliente y en agitación antes de tratar la muestra. Para potenciar la eliminación de proteínas, se añaden 30 µL de proteasa 20 mg/mL (*Pronase*, Roche) al homogeneizado. Éste se incuba primero a 60°C durante 1 hora (en un baño de agua, con agitación) y después a 99°C durante 15 minutos (en una estufa). Para que precipiten los restos de tejido, junto con la resina, y el ADN quede en el sobrenadante, se aplica una centrifugación final de 1 minuto.

45 Si la cantidad de muestra es limitante (si se trata de una larva, por ejemplo), el kit *NucleoSpin Tissue* (Macherey-Nagel) es más adecuado porque permite recuperar más ADN y de mejor calidad. En este caso, se siguen las instrucciones del fabricante.

Para comprobar la efectividad de la extracción, una alícuota de 4 µL se somete a electroforesis en un gel de agarosa (*Agarose D-1 low EEO-QDT*, *Pronadisa*) al 1% en tampón TBE 1×. El gel lleva incorporado bromuro de etidio, de modo que el ADN se hace visible bajo luz ultravioleta (Figura 1).

#### 50 2.- Amplificación de un fragmento de 671 pb del gen 16S

Para amplificar por PCR este fragmento se utilizan los cebadores 16L29 y 16HLeu (SEQ ID NO 1 y 2, respectivamente), que ya habían sido descritos para otros crustáceos decápodos (en el laboratorio de Christoph Schubart). Hay que indicar que el extremo 3' del fragmento corresponde al inicio del gen tRNA<sup>Leu</sup>. La reacción contiene: 1 µL de extracción (ADN), 2 µL de tampón 10× (160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% Tween 20), 1 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.5 µL de cada uno de los cebadores 20 µM, 1 µL de dNTP Mix 10 mM (Applied Biosystems), 0.2 µL de ADN polimerasa (*BIOTAQ 5 U/µL*, Boline) y agua bidestilada estéril hasta completar un volumen de 20 µL. El programa de amplificación consiste en una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C, templado a 55°C y extensión a 72°C, cada paso durante 20 segundos, y una extensión final a 72°C durante 7 minutos. El resultado se comprueba migrando 4 µL del producto de PCR en un gel de agarosa (*Agarose D-1 low EEO-QDT*, *Pronadisa*) al 2%, durante 30 minutos a 100 V. En el mismo gel se co-migran también 3 µL de un marcador de peso molecular (*HyperLadder IV*, Boline) para estimar el tamaño del fragmento amplificado. Este marcador resulta en un patrón de 10 bandas, con un rango de 100 a 1000 pb (cada banda es un múltiplo exacto de 100 pb). En toda muestra de centolla europea debe visualizarse la banda de 671 pb (Figura 2).

### 3.- Digestión del fragmento amplificado de 671 pb con 3 endonucleasas de restricción

Para identificar las 4 especies de centolla, atendiendo a las diferencias en la secuencia del fragmento de 671 pb (Figura 3), se han seleccionado 3 enzimas de restricción que generan patrones combinados de bandas característicos en cada especie; son *BsgI*, *Hpy188I* y *PsiI* (New England Biolabs). Cada digestión se lleva a cabo como una reacción independiente. Se digieren en cada caso alrededor de 150 ng del producto de PCR con 10U de enzima en un volumen final de 20  $\mu$ L (2  $\mu$ L del tampón 10 $\times$  específico de la enzima y agua bidestilada estéril hasta completar el volumen); durante un tiempo mínimo de 1 hora a 37°C.

### 4.- Electroforesis de los fragmentos que resultan de cada digestión y análisis de los patrones combinados

Una alícuota de 10  $\mu$ L de cada digestión se migra en un gel de agarosa (*Agarose D-1 low EEO-QDT*, Pronadisa) al 2% en tampón TBE 1 $\times$ , durante 60 minutos a 100 V. Se co-migran en cada caso 3  $\mu$ L de marcador de peso molecular (*HyperLadder IV*, Biorline). Al igual que en los pasos de comprobación de PCR, el gel contiene bromuro de etidio, por lo que el resultado de la electroforesis se observa bajo luz ultravioleta. Los perfiles de restricción que genera cada enzima son los siguientes:

i.- La enzima *BsgI* tiene como diana de corte la secuencia  $GTGCAG(N)_{14}\uparrow NN\downarrow$

Esta diana sólo se encuentra en *M. brachydactyla*, en la posición 516. La digestión da lugar a 2 fragmentos de 516 y 155 pb (perfil A). En las otras 3 especies el fragmento de 671 pb permanece completo (perfil B) (Figura 4). Esta enzima ya permite diferenciar *M. brachydactyla* del resto de especies (Figura 5).

ii.- La enzima *Hpy188I* tiene como diana de corte la secuencia  $TCN\downarrow GA$

Esta diana aparece dos veces en *M. squinado*, en las posiciones 87 y 554. La digestión resulta en 3 fragmentos de 87, 467 y 117 pb (perfil A). En las otras 3 especies la diana sólo se encuentra una vez, en la posición 554, de modo que se obtienen 2 fragmentos de 554 y 117 pb (perfil B) (Figura 6). Esta enzima permite diferenciar *M. squinado* del resto de especies (Figura 5).

iii.- La enzima *PsiI* tiene como diana de corte la secuencia  $TTA\downarrow TAA$

Esta diana aparece dos veces en *M. brachydactyla*, en las posiciones 171 y 245, por lo que se forman 3 fragmentos de 171, 74 y 426 pb (perfil A). En *M. squinado* y *M. crispata* sólo se encuentra una vez, en la posición 245, y se obtienen 2 fragmentos de 245 y 426 pb (perfil B). En *M. goltziana* aparece tres veces, en las posiciones 171, 245 y 640, por lo que resultan 4 fragmentos de 171, 74, 395 y 31 pb (perfil C) (Figura 7). Esta tercera enzima permite diferenciar *M. crispata* y *M. goltziana*, las 2 especies que no se pueden separar con las enzimas anteriores (Figura 5).

Los patrones combinados se resumen en la siguiente tabla:

Enzima ► Especie ▼	<i>BsgI</i>		<i>Hpy188I</i>		<i>PsiI</i>		Patrón combinado
	Bandas	Perfil	Bandas	Perfil	Bandas	Perfil	
<i>M. brachydactyla</i>	516, 155	A	554, 117	B	426, 171, 74	A	<b>ABA</b>
<i>M. squinado</i>	671	B	467, 117, 87	A	426, 245	B	<b>BAB</b>
<i>M. crispata</i>	671	B	554, 117	B	426, 245	B	<b>BBB</b>
<i>M. goltziana</i>	671	B	554, 117	B	395, 171, 74, 31	C	<b>BBC</b>

Por lo tanto, la digestión secuencial del fragmento de 671 pb del ADN mitocondrial con las enzimas *BsgI*, *Hpy188I* y *PsiI* permite identificar de forma inequívoca las 4 especies de centolla del género *Maja* que se han descrito en Europa.

Se trata de un método sencillo y rápido. Los equipos que se requieren son básicos en cualquier laboratorio de análisis molecular y es posible analizar simultáneamente un número elevado de muestras y obtener los resultados en horas. La gran ventaja de la identificación genética frente a la morfológica (la única disponible hasta el momento) es su aplicación a cualquier individuo independientemente de la fase vital en que se encuentre, porque no se ve afectada por cambios ontogénicos, y su aplicación a muestras pequeñas de tejido, sin necesidad de tener individuos completos e intactos.

La aportación más relevante de este procedimiento es la diferenciación de la centolla del Atlántico, *M. brachydactyla*, frente a las centollas del Mediterráneo. Actualmente, esta especie es la más importante para el comercio y se está evaluando su cultivo en cautividad, por lo que es fundamental asegurar su autenticidad en todo momento. La centolla del Mediterráneo *M. squinado* está amenazada en varias regiones de su distribución natural y por eso se están desarrollando planes de recuperación y repoblación, en los que es indispensable identificar los individuos de partida. Además, el conocimiento básico de cualquier especie, tanto *M. brachydactyla* como *M. squinado*, *M. crispata* o *M.*

*goltziana*, incluye la descripción de su área de distribución y su abundancia, dónde la aplicación de esta invención puede ser muy útil.

### Descripción de las figuras

5

Figura 1. Fotografía de un gel de agarosa al 1% en el que se ha comprobado una extracción de ADN a partir de muestras de músculo de centolla. La primera calle de la izquierda corresponde al marcador de peso molecular *HyperLadder IV*, y las siguientes (de izquierda a derecha) a *Maja brachydactyla* (br), *M. squinado* (sq), *M. crispata* (cr) y *M. goltziana* (go). Se observa una banda de varios Kpb, resultado de la rotura mecánica del ADN durante el proceso de extracción, pero no se detectan fragmentos pequeños (de cientos de bases) que indicarían que el ADN estaba dañado de antemano. Además, la intensidad de la banda indica que la cantidad de ADN es suficiente para poder realizar el análisis molecular.

10

Figura 2. Fotografía de un gel de agarosa al 2% en el que se ha comprobado la amplificación por PCR del fragmento de 671 pb del gen 16S, a partir de muestras de centolla procedentes de la costa europea. La primera calle de la izquierda corresponde al marcador de peso molecular *HyperLadder IV*, y las siguientes (de izquierda a derecha) a *M. brachydactyla* (br), *M. squinado* (sq), *M. crispata* (cr) y *M. goltziana* (go). En las cuatro calles se observa la banda de 671 pb.

15

Figura 3. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del fragmento de 671 pb del gen 16S de las cuatro especies de centolla, *M. brachydactyla*, *M. squinado*, *M. crispata* y *M. goltziana* (SEQ ID NO 3 - 6). En el margen izquierdo se indica la especie a la que pertenece cada línea de la secuencia, que aparece separada en bloques consecutivos de 60 pb, tal como se indica en el margen derecho. Las columnas con un asterisco en la base se corresponden con las posiciones de la secuencia que no varían entre las especies; mientras que la ausencia de asterisco marca las posiciones variables. Las posiciones indicadas en minúscula, las 20 primeras y las 20 últimas, corresponden a los cebadores 16L29 y 16HLeu (SEQ ID NO 1 y 2).

20

25

Figura 4. Localización de la secuencia de reconocimiento de la enzima *BsgI*, GTCAG(N)<sub>16</sub>, sobre el alineamiento del fragmento de 671 pb de las cuatro especies de centolla. Se indica en negrita y sombreada. Se observa que sólo aparece en la secuencia de *M. brachydactyla*, donde da lugar a dos fragmentos de 516 y 155 pb.

30

Figura 5. Fotografía de un gel de agarosa al 2% en el que se han comprobado las digestiones del fragmento de 671 pb con las enzimas *BsgI*, *Hpy188I* y *PsiI*. Cada bloque de 5 calles corresponde a una digestión, en el orden citado. En cada grupo, la primera calle de la izquierda corresponde al marcador de peso molecular *HyperLadder IV*, y las siguientes (de izquierda a derecha) a *M. brachydactyla* (br), *M. squinado* (sq), *M. crispata* (cr) y *M. goltziana* (go).

35

Con la enzima *BsgI*: en la calle que corresponde a *M. brachydactyla* se observan las dos bandas de 516 y 155 pb. En las calles restantes aparece la banda de 671, el fragmento completo sin digerir.

40

Con la enzima *Hpy188I*. en la calle que corresponde a *M. squinado* se observan las tres bandas de 467, 117 y 87 pb (la última es muy tenue, está indicada con una flecha). En las calles restantes aparecen las dos bandas de 554 y 117 pb.

45

Con la enzima *PsiI*: en la calle que corresponde a *M. brachydactyla* se observan las tres bandas de 426, 171 y 74 pb (la última es muy tenue, está indicada con una flecha). En las calles de *M. squinado* y *M. crispata* aparecen las dos bandas de 426 y 245 pb. En la calle de *M. goltziana* se diferencian las 4 bandas de 395, 171, 74 (ésta es muy tenue, está indicada con una flecha) y 31 pb.

50

Figura 6. Localización de la secuencia de reconocimiento de la enzima *Hpy188I*, TCNGA, sobre el alineamiento del fragmento de 671 pb de las cuatro especies de centolla. Se indica en negrita y sombreada. Se observa que aparece dos veces en la secuencia de *M. squinado*, donde da lugar a tres fragmentos de 87, 467 y 117 pb, y una vez en las demás especies, donde genera dos fragmentos de 554 y 117 pb.

55

Figura 7. Localización de la secuencia de reconocimiento de la enzima *PsiI*, TATTAA, sobre el alineamiento del fragmento de 671 pb de las cuatro especies de centolla. Se indica en negrita y sombreada. Se observa que aparece dos veces en la secuencia de *M. brachydactyla*, donde da lugar a tres fragmentos de 171, 74 y 426 pb; una vez en las secuencias de *M. squinado* y *M. crispata*, donde genera dos fragmentos de 245 y 426 pb; y tres veces en la secuencia de *M. goltziana*, donde origina cuatro fragmentos de 171, 74, 395 y 31 pb.

60

#### Texto libre de la lista de secuencias

SEQ ID NO 1 corresponde al cebador directo diseñado en el laboratorio de Christoph Schubart para amplificar un fragmento del gen 16S en varios crustáceos decápodos.

65

SEQ ID NO 2 corresponde al cebador reverso diseñado en el laboratorio de Christoph Schubart para amplificar un fragmento del gen 16S en varios crustáceos decápodos; localizado en el extremo 5' del gen tRNALeu.

## REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la identificación genética de las especies de centolla descritas en Europa: en el Atlántico, *Maja brachydactyla*, y en el Mediterráneo, *M. squinado*, *M. crispata* y *M. goltziana*, **caracterizado** por consistir en:

a. Obtener una muestra para evaluar.

b. Extraer el ADN de la muestra.

10 c. Amplificar por PCR un fragmento de 671 pb del ADN mitocondrial con los cebadores 16L29 y 16HLeu (SEQ ID NO 1 y 2, respectivamente) y comprobar la correcta amplificación.

15 d. Digerir el fragmento amplificado de 671 pb con enzimas que reconozcan como secuencias diana: GTGCAG(N)<sub>14</sub>↑NN↓, TCN↓GA y TTA↓TAA.

e. Analizar los productos de digestión y compararlos con los patrones combinados de restricción característicos de cada una de las 4 especies, de modo que:

20 - con la enzima que reconoce la secuencia GTGCAG(N)<sub>14</sub>↑NN↓, 2 fragmentos de 516 y 155 pb son indicativos de *M. brachydactyla* (perfil A), y el fragmento sin cortar de 671 pb es indicativo de *M. squinado*, *M. crispata* o *M. goltziana* (perfil B).

25 - con la enzima que reconoce la secuencia TCN↓GA, 3 fragmentos de 467, 117 y 87 pb son indicativos de *M. squinado* (perfil A), y 2 fragmentos de 554 y 117 pb son indicativos de *M. brachydactyla*, *M. crispata* o *M. goltziana* (perfil B).

30 - con la enzima que reconoce la secuencia TTA↓TAA, 3 fragmentos de 426, 171 y 74 pb son indicativos de *M. brachydactyla* (perfil A), 2 fragmentos de 426 y 245 pb son indicativos de *M. squinado* o *M. crispata* (perfil B), y 4 fragmentos de 395, 171, 74 y 31 pb son indicativos de *M. goltziana* (perfil C).

Y, por tanto:

- el patrón combinado ABA corresponde a *M. brachydactyla*

35 - el patrón combinado BAB corresponde a *M. squinado*

- el patrón combinado BBB corresponde a *M. crispata*

40 - el patrón combinado BBC corresponde a *M. goltziana*.

2. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que la muestra a evaluar procede de una centolla en cualquier etapa de desarrollo capturada en las costas europeas, del Atlántico o del Mediterráneo.

45 3. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que la enzima que reconoce como diana de corte la secuencia GTGCAG(N)<sub>14</sub>↑NN↓ es *BsgI*, la enzima que reconoce como diana de corte la secuencia TCN↓GA es *Hpy188I* y la enzima que reconoce como diana de corte la secuencia TTA↓TAA es *PsiI*.

50 4. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que el análisis de los productos de la digestión enzimática se realiza mediante electroforesis en geles de agarosa y posterior visualización bajo luz ultravioleta por tinción con bromuro de etidio.

55

60

65

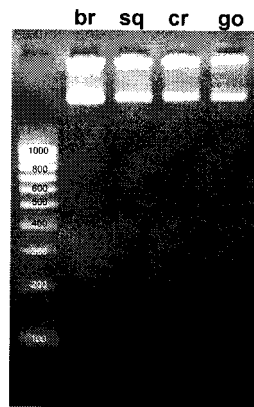


Figura 1

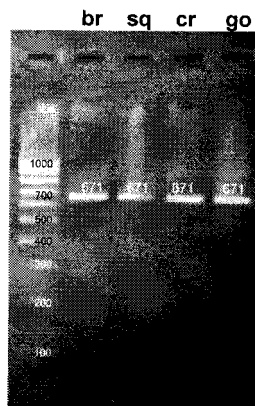


Figura 2

*M. brachydactyla* ygcctgtttatcaaaaacatGTCTATATGAATATTTATATAGTCTAACCTGCTCATTGAC 60  
*M. squinado* ygcctgtttatcaaaaacatGTCTATATGAATATTTATATAGTCTAACCTGCTCATTGAC  
*M. crispata* ygcctgtttatcaaaaacatGTCTATATGAATATTTATATAGTCTAACCTGCTCATTGAC  
*M. goltziana* ygcctgtttatcaaaaacatGTCTATATGAATATTTATATAGTCTAACCTGCTCATTGAC  
 \*\*\*\*\*

*M. brachydactyla* TAAAAAGTTTAAAAGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCTT 120  
*M. squinado* TAAAAAGTTTAAAAGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCTT  
*M. crispata* TAAAAAGTTTAAAAGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCTT  
*M. goltziana* TATTAAGTTTAAAAGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCTT  
 \* \*\*\*\*\*

*M. brachydactyla* TAATTGAGAACCTGTATGAAAGGTTGAACAAGAGAAAGACTGTATCTATTATAAATCTTA 180  
*M. squinado* TAATTGGGAACCTGTATGAAAGGTTGAACAAGAGAAAGACTGTATCTATTATAAATCTTA  
*M. crispata* TAATTGGGAACCTGTATGAAAGGTTGAACAAGAGAAAGACTGTATCTATTATAAATCTTA  
*M. goltziana* TAATTGGGAACCTGTATGAAAGGTTGAACAAGAGAAAGACTGTATCTATTATAAATCTTA  
 \*\*\*\*\*

*M. brachydactyla* AATTTAACTTTTAAAGTAAAAGGCTTAAATAAATTTAGAGGGACGATAAGACCCATAAAG 240  
*M. squinado* AATTTAACTTTTAAAGTAAAAGGCTTAAATAAATTTAGAGGGACGATAAGACCCATAAAG  
*M. crispata* AATTTAACTTTTAAAGTAAAAGGCTTAAATAAATTTAGAGGGACGATAAGACCCATAAAG  
*M. goltziana* AATTTAACTTTTAAAGTAAAAGGCTTAAATAAATTTAGAGGGACGATAAGACCCATAAAG  
 \*\*\*\*\*

*M. brachydactyla* CTTTATAAGTAAGTAGAAATTTATGAATTAAAATTGAAAACCTATATTTCTATTGCTT 300  
*M. squinado* CTTTATAAGTAAGTAGAAATTTATGAATTAAAATTGAAAACCTATATTTCTATTGCTT  
*M. crispata* CTTTATAAGTAAGTAGAAATTTATGAATTAAAATTGAAAACCTATATTTCTATTGCTT  
*M. goltziana* CTTTATAAGTAAGTAGAAATTTATGAATTAAAATTGAAAACCTATATTTCTATTGCTT  
 \*\*\*\*\*

*M. brachydactyla* ATTGTGTTGGGGCGACATAAATATAAATTATTTAACTGTTTGAGAATAAGACATAAATTT 360  
*M. squinado* ATTGTGTTGGGGCGACATAAATATAAATTATTTAACTGTTTGAGAATAAGACATAAATTT  
*M. crispata* ATTGTGTTGGGGCGACATAAATATAAATTATTTAACTGTTTGAGAATAAGACATAAATTT  
*M. goltziana* ATTATGTTGGGGCGACATAAATATAAATTATTTAACTGTTTGAAGAATAAACATGAATTT  
 \*\*\* \*\*\*\*\*

*M. brachydactyla* ATGAATTAAAATTAATTGATCCTTTTTAAAGATTTAAGTTTAACTTTAGGGATAAC 420  
*M. squinado* ATGAATTAAAATTAATTGATCCTTTTTAAAGATTTAAGTTTAACTTTAGGGATAAC  
*M. crispata* ATGAATTAAAATTAATTGATCCTTTTTAAAGATTTAAGTTTAACTTTAGGGATAAC  
*M. goltziana* TTGAATTAAAATTAATTGATCCTTTTTAAAGATTTAAGTTTAACTTTAGGGATAAC  
 \*\*\*\*\*

*M. brachydactyla* AGCGTTATTTCTTTTGAGAGTTCTTATCGAGAAAGAAGTTTGCACCTCGATGTTGAATT 480  
*M. squinado* AGCGTTATTTCTTTTGAGAGTTCTTATCGAGAAAGAAGTTTGCACCTCGATGTTGAATT  
*M. crispata* AGCGTTATTTCTTTTGAGAGTTCTTATCGAGAAAGAAGTTTGCACCTCGATGTTGAATT  
*M. goltziana* AGCGTTATTTCTTTTGAGAGTTCTTATCGAGAAAGAAGTTTGCACCTCGATGTTGAATT  
 \*\*\*\*\*

*M. brachydactyla* AAACATCTTGATGGTGCAGCAGCTAAGAGAGAAAGTCTGTTCCACTTTTAAATGTTTAC 540  
*M. squinado* AAACATCTTGATGGTGCAGCAGCTAAGAGAGAAAGTCTGTTCCACTTTTAAATGTTTAC  
*M. crispata* AAACATCTTGATGGTGCAGCAGCTAAGAGAGAAAGTCTGTTCCACTTTTAAATGTTTAC  
*M. goltziana* AAACATCTTGATGGTGCAGCAGCTAAGAGAGAAAGTCTGTTCCACTTTTAAATGTTTAC  
 \*\*\*\*\*

*M. brachydactyla* ATGATTTGAGTTCAGACCGCGGTGAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAATATAAAAAAT 600  
*M. squinado* ATGATTTGAGTTCAGACCGCGGTGAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAATATAAAAAAT  
*M. crispata* ATGATTTGAGTTCAGACCGCGGTGAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAATATAAAAAAC  
*M. goltziana* ATGATTTGAGTTCAGACCGCGGTGAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAAAATAAAAAT  
 \*\*\*\*\*

*M. brachydactyla* TGCTTTAGTACGAAAGGATTGAGCAGTTAAAATATTTTGTGATTTACCAGctattttgg 660  
*M. squinado* TGCTTTAGTACGAAAGGATTGAGTAGTTAAAATATTTTGTGATTTAC-AGctattttgg  
*M. crispata* TGCTTTAGTACGAAAGGATTGAGTAGTTAAAATATTTTATGAATTAC-AGctattttgg  
*M. goltziana* TGCTTTAGTACGAAAGGATTAAGTAGTTAAA-TATTTTATAAATTAC-AGctattttgg  
 \*\*\*\*\*

*M. brachydactyla* cagataaatatg 671  
*M. squinado* cagataaatatg  
*M. crispata* cagataaatatg  
*M. goltziana* cagataaatatg  
 \*\*\*\*\*

Figura 3



ES 2 366 289 B2

*M. brachydactyla* ygcctgttatcaaaaacatGTCTATATGAATATTTATATAGTCTAACCTGCTCATTGAC 60  
*M. squinado* ygcctgttatcaaaaacatGTCTATATGAATATTTATATAGTCTAACCTGCTCATTGAC  
*M. crispata* ygcctgttatcaaaaacatGTCTATATGAATATTTATATAGTCTAACCTGCTCATTGAC  
*M. goltziana* ygcctgttatcaaaaacatGTCTATATGAATATTTATATAGTCTAGCCTGCTCATTGAC  
\*\*\*\*\*

*M. brachydactyla* TAAAAAGTTTAAAAGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCTT 120  
*M. squinado* TAAAAAGTTTAAAAGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCTT  
*M. crispata* TAAAAAGTTTAAAAGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCTT  
*M. goltziana* TATTAAGTTTAAAAGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCTT  
\*\* \*\*\*\*\*

*M. brachydactyla* TAATTGGAACCTGTATGAAAGGTTGAACAAGAGAAAGACTGTATCTATTATAAATCTTA 180  
*M. squinado* TAATTGGAACCTGTATGAAAGGTTGAACAAGAGAAAGACTGTATCTATTGTAATCTTA  
*M. crispata* TAATTGGAACCTGTATGAAAGGTTGAACAAGAGAAAGACTGTATCTATTGTAATCTTA  
*M. goltziana* TAATTGGAACCTGTATGAAAGGTTGAACAAGAGAAAGACTGTATCTATTATAAATCTTA  
\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

*M. brachydactyla* AATTTAACTTTTAAAGTAAAAGGCTTAAATAATTTAGAGGGACGATAAGACCCATAAAG 240  
*M. squinado* AATTTAACTTTTAAAGTAAAAGGCTTAAATAACTTAGAGGGACGATAAGACCCATAAAG  
*M. crispata* AATTTAACTTTTAAAGTAAAAGGCTTAAATAACTTAGAGGGACGATAAGACCCATAAAG  
*M. goltziana* AATTTAACTTTTAAAGTAAAAGGCTTAAATAATTTAGAGGGACGATAAGACCCATAAAG  
\*\*\*\*\*

*M. brachydactyla* CTTTATAAGTAAGTAGAAATTTATTGAATTAATAAATGAAAACCTATATTTCTATTGTCTT 300  
*M. squinado* CTTTATAAGTAAGTAGAAATTTATT-AATTAATAACTGAAAACCTATATTTCTATTATCTT  
*M. crispata* CTTTATAAGTAAGTAGAAATTTATT-AATTAATAACTGAAAACCTATATTTCTATTATCTT  
*M. goltziana* CTTTATAAGTAAGTAGAAATTTATTAAATAAATAAATGAAAATATATTTCTATTGTCTT  
\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \* \* \* \* \*\*\*\*\*

*M. brachydactyla* ATTGTGTTGGGGCGACATAAAATATAAATTAATTTAACTGTTTGAGAATAAGACATAAATTT 360  
*M. squinado* ATTGTGTTGGGGCGACATAAAATATAAATTAATTTAACTGTTTGAGAATAAGACATAAATTT  
*M. crispata* ATTGTGTTGGGGCGACATAAAATATAAATTAATTTAACTGTTTGAGAATAAGACATAAATTT  
*M. goltziana* ATTATGTTGGGGCGACATAAAATATAAATTAATTTAACTGTTTAAAGATAAATGAAATTT  
\*\*\* \*\*\*\*\*

*M. brachydactyla* ATGAATTAATAAATTAATTTGATCCTTTTTAAAGATTTAAGTTTAAAGTTACTTTAGGGATAAC 420  
*M. squinado* ATGAATTAATAAATTAATTTGATCCTTTTTAAAGATTTCAAGTTTAAAGTTACTTTAGGGATAAC  
*M. crispata* ATGAATTAATAAATTAATTTGATCCTTTTTAAAGATTTCAAGTTTAAAGTTACTTTAGGGATAAC  
*M. goltziana* TTGAATTAATAAATTAATTTGATCCTTTTTAAAGATTTAAGTTTAAAGTTACTTTAGGGATAAC  
\*\*\*\*\*

*M. brachydactyla* AGCGTTATTTCTTTTGAGAGTTCTTATCGAGAAAGAAGTTTGCACCTCGATGTTGAATT 480  
*M. squinado* AGCGTTATTTCTTTTGAGAGTTCTTATCGAGAAAGAAGTTTGCACCTCGATGTTGAATT  
*M. crispata* AGCGTTATTTCTTTTGAGAGTTCTTATCGAGAAAGAAGTTTGCACCTCGATGTTGAATT  
*M. goltziana* AGCGTTATTTCTTTTGAGAGTTCTTATCGAGAAAGAAGTTTGCACCTCGATGTTGAATT  
\*\*\*\*\*

*M. brachydactyla* AAACCTATCTTGATGGTGCAGCAGCTAAGAGAGAAAGTCTGTTTCGACTTTTAAATGTTTAC 540  
*M. squinado* AAACCTATCTTGATGGTGTAGCAGCTAAGAGAGAAAGTCTGTTTCGACTTTTAAATGTTTAC  
*M. crispata* AAACCTATCTTGATGGTGTAGCAGCTAAGAGAGAAAGTCTGTTTCGACTTTTAAATGTTTAC  
*M. goltziana* AAACCTATCTTGATGGTGTAGCAGCTGAGAGAGAAAGTCTGTTTCGACTTTTAAATGTTTAC  
\*\*\*\*\*

*M. brachydactyla* ATGATTTGAGTTCAGACCGGCGTGAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAATATAAAAAAT 600  
*M. squinado* ATGATTTGAGTTCAGACCGGCGTAAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAATATAAAAAAT  
*M. crispata* ATGATTTGAGTTCAGACCGGCGTGAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAATATAAAAAAC  
*M. goltziana* ATGATTTGAGTTCAGACCGGCGTGAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAAAATAAAAAT  
\*\*\*\*\*

*M. brachydactyla* TGCTTTAGTACGAAAGGATTGAGCAGTTAAATATTTTTGTGATTACCAGctatthttgg 660  
*M. squinado* TGCTTTAGTACGAAAGGATTGAGTAGTTAAATATTTTTGTGATTAC-AGctatthttgg  
*M. crispata* TGCTTTAGTACGAAAGGATTGAGTAGTTAAATATTTTTATGAATTAC-AGctatthttgg  
*M. goltziana* TGCTTTAGTACGAAAGGATTAAAGTAGTTAAATATTTTTATGAATTAC-AGctatthttgg  
\*\*\*\*\*

*M. brachydactyla* cagataatatg 671  
*M. squinado* cagataatatg  
*M. crispata* cagataatatg  
*M. goltziana* cagataatatg  
\*\*\*\*\*

Figura 4

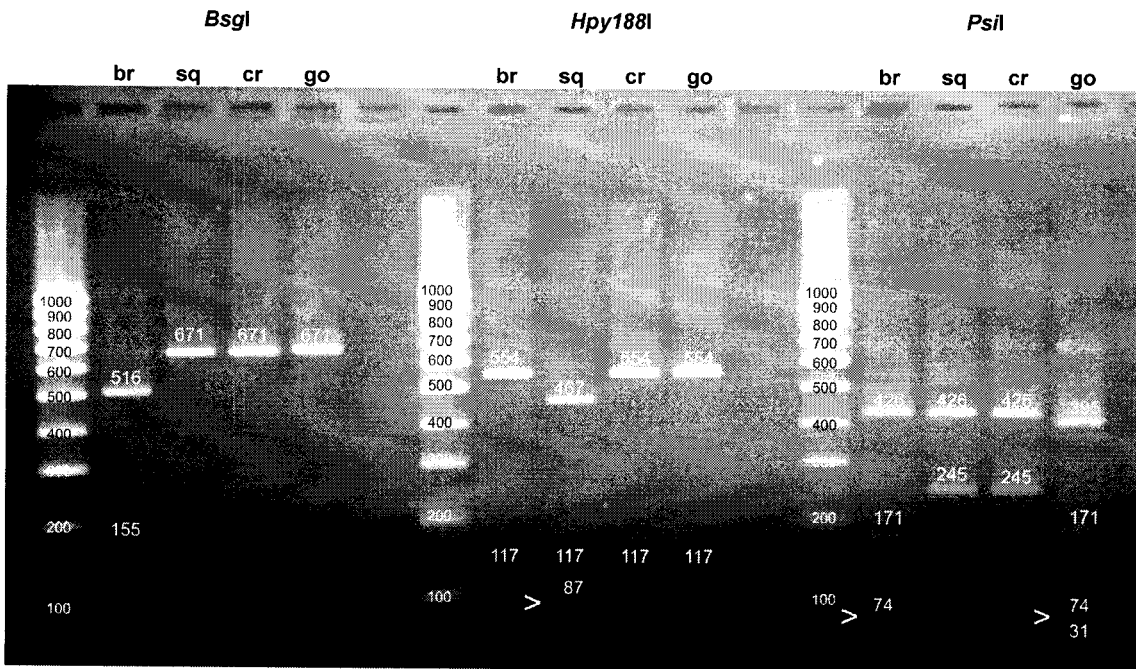


Figura 5

ES 2 366 289 B2

<i>M. brachydactyla</i>	ygccctgtttatcaaaaacatGTCTATATGAATATTTATATAGTCTAACCTGCTCATTGAC	60
<i>M. squinado</i>	ygccctgtttatcaaaaacatGTCTATATGAATATTTATATAGTCTAACCTGCTCATTGAC	
<i>M. crispata</i>	ygccctgtttatcaaaaacatGTCTATATGAATATTTATATAGTCTAACCTGCTCATTGAC	
<i>M. goltziana</i>	ygccctgtttatcaaaaacatGTCTATATGAATATTTATATAGTCTAGCCTGCTCATTGAC *****	
<i>M. brachydactyla</i>	TAAAAAGTTTAAAAAGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCTT	120
<i>M. squinado</i>	TAAAAAGTTTAAAAAGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCTT	
<i>M. crispata</i>	TAAAAAGTTTAAAAAGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCTT	
<i>M. goltziana</i>	TATTAAGTTTAAAAAGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCTT ** *****	
<i>M. brachydactyla</i>	TAATTGAGAACTTGTATGAAAGGTTGAACAAGAGAAAGACTGTATCTATTATAAATCTTA	180
<i>M. squinado</i>	TAATTGGGAACCTTGTATGAAAGGTTGAACAAGAGAAAGACTGTATCTATTGTAATCTTA	
<i>M. crispata</i>	TAATTGGGAACCTTGTATGAAAGGTTGAACAAGAGAAAGACTGTATCTATTGTAATCTTA	
<i>M. goltziana</i>	TAATTGGGAACCTTGTATGAAAGGTTGAACAAGAGAAAGACTGTGTCTATTATAAATCTTA *****	
<i>M. brachydactyla</i>	AATTTAACTTTTAAAGTGAAAAGGCTTAAATAAATTTAGAGGGACGATAAGACCTATAAAG	240
<i>M. squinado</i>	AATTTAACTTTTAAAGTGAAAAGGCTTAAATAAATTTAGAGGGACGATAAGACCTATAAAG	
<i>M. crispata</i>	AATTTAACTTTTAAAGTGAAAAGGCTTAAATAAATTTAGAGGGACGATAAGACCTATAAAG	
<i>M. goltziana</i>	AATTTAACTTTTAAAGTGAAAAGGCTTAAATAAATTTAGAGGGACGATAAGACCTATAAAG *****	
<i>M. brachydactyla</i>	CTTTATAAGTAAGTAGAAATTTATTGAATTAATAAATTTGAAAACCTATATTTCTATTGTCTT	300
<i>M. squinado</i>	CTTTATAAGTAAGTAGAAATTTATT-AATTAATAACTGAAACCTATATTTCTATTATCTT	
<i>M. crispata</i>	CTTTATAAGTAAGTAGAAATTTATT-AATTAATAACTGAAAACCTATATTTCTATTATCTT	
<i>M. goltziana</i>	CTTTATAAGTAAGTGGAATTTATTAAATAAATAAATTTGAAAATTTATATTTCTATTGTCTT *****	
<i>M. brachydactyla</i>	ATTGTGTTGGGGCGACATAAATAAATTTAATTAAGTGTGAGAATAAGACATAAATTT	360
<i>M. squinado</i>	ATTGTGTTGGGGCGACATAAATAAATTTAATTAAGTGTGAGAATAAGACATAAATTT	
<i>M. crispata</i>	ATTGTGTTGGGGCGACATAAATAAATTTAATTAAGTGTGAGAATAAGACATAAATTT	
<i>M. goltziana</i>	ATTATGTTGGGGCGACATAAATAAATTTAATTAAGTGTGAGAATAAATTAAGTGTGAGAATAAATTT *** *****	
<i>M. brachydactyla</i>	ATGAATTAATAAATTAATTTGATCCTTTTTAAAGATTTAAGTTTAAAGTTACTTTAGGGATAAC	420
<i>M. squinado</i>	ATGAATTTGAAATTAATTTGATCCTTTTTAAAGATTTCAAGTTTAAAGTTACTTTAGGGATAAC	
<i>M. crispata</i>	ATGAATTTGAAATTAATTTGATCCTTTTTAAAGATTTCAAGTTTAAAGTTACTTTAGGGATAAC	
<i>M. goltziana</i>	TTGAATTAATAAATTAATTTGATCCTTTTTAAAGATTTAAGTTTAAAGTTACTTTAGGGATAAC *****	
<i>M. brachydactyla</i>	AGCGTTATTTCTTTTGAGAGTTCTTATCGAGAAAGAAGTTTGGCGACCTCGATGTTGAATT	480
<i>M. squinado</i>	AGCGTTATTTCTTTTGAGAGTTCTTATCGAGAAAGAAGTTTGGCGACCTCGATGTTGAATT	
<i>M. crispata</i>	AGCGTTATTTCTTTTGAGAGTTCTTATCGAGAAAGAAGTTTGGCGACCTCGATGTTGAATT	
<i>M. goltziana</i>	AGCGTTATTTCTTTTGAGAGTTCTTATCGAGAAAGAAGTTTGGCGACCTCGATGTTGAATT *****	
<i>M. brachydactyla</i>	AAACTATCTTGATGGTGCAGCAGCTAAGAGAGAAAGTCTGTTTCGACTTTTAAATGTTTAC	540
<i>M. squinado</i>	AAACTATCTTGATGGTGTAGCAGCTAAGAGAGAAAGTCTGTTTCGACTTTTAAATGTTTAC	
<i>M. crispata</i>	AAACTATCTTGATGGTGTAGCAGCTAAGAGAGAAAGTCTGTTTCGACTTTTAAATGTTTAC	
<i>M. goltziana</i>	AAACTATCTTGATGGTGTAGCAGCTGAGAGAGAAAGTCTGTTTCGACTTTTAAATGTTTAC *****	
<i>M. brachydactyla</i>	ATGATTTGAGTTTCAGACCGGCGGTGAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAATATAAAAAAT	600
<i>M. squinado</i>	ATGATTTGAGTTTCAGACCGGCGGTGAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAATATAAAAAAT	
<i>M. crispata</i>	ATGATTTGAGTTTCAGACCGGCGGTGAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAATATAAAAAAC	
<i>M. goltziana</i>	ATGATTTGAGTTTCAGACCGGCGGTGAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAAAAATAAAAAT *****	
<i>M. brachydactyla</i>	TGCTTTAGTACGAAAGGATTGAGCAGTTAAAAATATTTTGTGATTACCAGctattttgg	660
<i>M. squinado</i>	TGCTTTAGTACGAAAGGATTGAGTAGTTAAAAATATTTTGTGATTACCAGctattttgg	
<i>M. crispata</i>	TGCTTTAGTACGAAAGGATTGAGTAGTTAAAAATATTTTGTGATTACCAGctattttgg	
<i>M. goltziana</i>	TGCTTTAGTACGAAAGGATTGAGTAGTTAAAAATATTTTGTGATTACCAGctattttgg *****	
<i>M. brachydactyla</i>	cagataaatg	671
<i>M. squinado</i>	cagataaatg	
<i>M. crispata</i>	cagataaatg	
<i>M. goltziana</i>	cagataaatg *****	

Figura 6

ES 2 366 289 B2

<i>M. brachydactyla</i>	ygccctgtttatcaaaaacatGTCTATATGAATATTTATATAGTCTAACCTGCTCATTGAC	60
<i>M. squinado</i>	ygccctgtttatcaaaaacatGTCTATATGAATATTTATATAGTCTAACCTGCTCATTGAC	
<i>M. crispata</i>	ygccctgtttatcaaaaacatGTCTATATGAATATTTATATAGTCTAACCTGCTCATTGAC	
<i>M. goltziana</i>	ygccctgtttatcaaaaacatGTCTATATGAATATTTATATAGTCTAACCTGCTCATTGAC *****	
<i>M. brachydactyla</i>	TAAAAAGTTTAAAAGCCGCGGTATTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCCT	120
<i>M. squinado</i>	TAAAAAGTTTAAAAGCCGCGGTATTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCCT	
<i>M. crispata</i>	TAAAAAGTTTAAAAGCCGCGGTATTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCCT	
<i>M. goltziana</i>	TATTAAGTTTAAAAGCCGCGGTATTTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTCCT ** *****	
<i>M. brachydactyla</i>	TAATTGAGAAGTTGTATGAAAGGTTGAACAAGAGAAAGACTGTATCTA <b>TTATAA</b> ATCTTA	180
<i>M. squinado</i>	TAATTGGAAGTTGTATGAAAGGTTGAACAAGAGAAAGACTGTATCTA <b>TTATAA</b> ATCTTA	
<i>M. crispata</i>	TAATTGGAAGTTGTATGAAAGGTTGAACAAGAGAAAGACTGTATCTA <b>TTATAA</b> ATCTTA	
<i>M. goltziana</i>	TAATTGGAAGTTGTATGAAAGGTTGAACAAGAGAAAGACTGTATCTA <b>TTATAA</b> ATCTTA *****	
<i>M. brachydactyla</i>	AATTTAACTTTTAAAGTAAAAGGCTTAAATAAATTTAGAGGGACGATAAGACCCTATAAAG	240
<i>M. squinado</i>	AATTTAACTTTTAAAGTAAAAGGCTTAAATAAATTTAGAGGGACGATAAGACCCTATAAAG	
<i>M. crispata</i>	AATTTAACTTTTAAAGTAAAAGGCTTAAATAAATTTAGAGGGACGATAAGACCCTATAAAG	
<i>M. goltziana</i>	AATTTAACTTTTAAAGTAAAAGGCTTAAATAAATTTAGAGGGACGATAAGACCCTATAAAG *****	
<i>M. brachydactyla</i>	CT <b>TTATAA</b> AGTAAGTAGAAATTTATTGAATAAAAATGAAAACATATTTCTATTGTCTT	300
<i>M. squinado</i>	CT <b>TTATAA</b> AGTAAGTAGAAATTTATTGAATAAAAATGAAAACATATTTCTATTGTCTT	
<i>M. crispata</i>	CT <b>TTATAA</b> AGTAAGTAGAAATTTATTGAATAAAAATGAAAACATATTTCTATTGTCTT	
<i>M. goltziana</i>	CT <b>TTATAA</b> AGTAAGTAGAAATTTATTGAATAAAAATGAAAACATATTTCTATTGTCTT ***** ** * * * * *	
<i>M. brachydactyla</i>	ATTGTGTTGGGGCGACATAAAATATAAATTTAACTGTTTGAGAATAAGACATAAATTT	360
<i>M. squinado</i>	ATTGTGTTGGGGCGACATAAAATATAAATTTAACTGTTTGAGAATAAGACATAAATTT	
<i>M. crispata</i>	ATTGTGTTGGGGCGACATAAAATATAAATTTAACTGTTTGAGAATAAGACATAAATTT	
<i>M. goltziana</i>	ATTATGTTGGGGCGACATAAAATATAAATTTAACTGTTTGAGAATAAAGACATAAATTT *** *****	
<i>M. brachydactyla</i>	ATGAATTAATAAATTAATGATCCTTTTAAAGATTTAAGTTAAGTTACTTTAGGGATAAC	420
<i>M. squinado</i>	ATGAATTAATAAATTAATGATCCTTTTAAAGATTTAAGTTAAGTTACTTTAGGGATAAC	
<i>M. crispata</i>	ATGAATTAATAAATTAATGATCCTTTTAAAGATTTAAGTTAAGTTACTTTAGGGATAAC	
<i>M. goltziana</i>	TTGAATTAATAAATTAATGATCCTTTTAAAGATTTAAGTTAAGTTACTTTAGGGATAAC *****	
<i>M. brachydactyla</i>	AGCGTTATTCTTTTGAGAGTTCTTATCGAGAAAGAAGTTGCGACCTCGATGTTGAATT	480
<i>M. squinado</i>	AGCGTTATTCTTTTGAGAGTTCTTATCGAGAAAGAAGTTGCGACCTCGATGTTGAATT	
<i>M. crispata</i>	AGCGTTATTCTTTTGAGAGTTCTTATCGAGAAAGAAGTTGCGACCTCGATGTTGAATT	
<i>M. goltziana</i>	AGCGTTATTCTTTTGAGAGTTCTTATCGAGAAAGAAGTTGCGACCTCGATGTTGAATT *****	
<i>M. brachydactyla</i>	AAACTATCTTGATGGTGCAGCAGCTAAGAGAGAAAGTCTGTTGCGACTTTTAAATGTTTAC	540
<i>M. squinado</i>	AAACTATCTTGATGGTGTAGCAGCTAAGAGAGAAAGTCTGTTGCGACTTTTAAATGTTTAC	
<i>M. crispata</i>	AAACTATCTTGATGGTGTAGCAGCTAAGAGAGAAAGTCTGTTGCGACTTTTAAATGTTTAC	
<i>M. goltziana</i>	AAACTATCTTGATGGTGTAGCAGCTAAGAGAGAAAGTCTGTTGCGACTTTTAAATGTTTAC *****	
<i>M. brachydactyla</i>	ATGATTTGAGTTCAGACCGCGGTGAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAATATAAAAAAT	600
<i>M. squinado</i>	ATGATTTGAGTTCAGACCGCGGTGAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAATATAAAAAAT	
<i>M. crispata</i>	ATGATTTGAGTTCAGACCGCGGTGAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAATATAAAAAAT	
<i>M. goltziana</i>	ATGATTTGAGTTCAGACCGCGGTGAGCCAGGTCGGTTTCTATCTTCTAAATATAAAAAAT ***** * * * * *	
<i>M. brachydactyla</i>	TGCTTTAGTACGAAAGGATTGAGCAGTTAAAATATTTTTGTGATTTACCAGctat	660
<i>M. squinado</i>	TGCTTTAGTACGAAAGGATTGAGTAGTTAAAATATTTTTGTAAGTTAC-AGctat	
<i>M. crispata</i>	TGCTTTAGTACGAAAGGATTGAGTAGTTAAAATATTTTTATGAATTAC-AGctat	
<i>M. goltziana</i>	TGCTTTAGTACGAAAGGATTGAGTAGTTAAAATATTTTT <b>TTATAA</b> ATTAC-AGctat ***** * * * * *	
<i>M. brachydactyla</i>	cagataaatg	671
<i>M. squinado</i>	cagataaatg	
<i>M. crispata</i>	cagataaatg	
<i>M. goltziana</i>	cagataaatg *****	

Figura 7

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Vigo

5 <120> Identificación genética de las especies europeas del género *Maja* (centollas)

<130>

10 <160> 8

<210> 1

<211> 20

15 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

20 <223> Forward primer designed at Christoph Schubart's lab to amplify a fragment of the 16S gene in several decapod crustaceans

<400> 1

25

ygctgttta tcaaaaacat

20

<210> 2

30 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

35 <220>

<223> Reverse primer designed at Christoph Schubart's lab to amplify a fragment of the 16S gene in several decapod crustaceans; located in the 5' extreme of the tRNA<sup>Leu</sup> gene

40 <400> 2

catattatct gccaaaatag

20

45 <210> 3

<211> 671

<212> DNA

<213> *Maja brachydactyla*

50

<400> 3

55	ygctgttta	tcaaaaacat	gtctatatga	atatttata	agtctaact	gctcattgac	60
	taaaagttt	aaaagccgcg	gtattttgac	cgtgcaaagg	tagcataatc	attagttctt	120
	taattgagaa	cttgtatgaa	aggttgaaca	agagaaagac	tgtatctatt	ataaatctta	180
	aatttaactt	ttaagtgaaa	aggcttaaat	aatttagagg	gacgataaga	ccctataaag	240
	cttataagt	aagtagaaat	ttattgaatt	aaaaattgaa	aactataatt	ctattgtctt	300
	attgtggttg	ggcgacataa	atataaatta	tttaactggt	tgagaataag	acataaattt	360
	atgaattaaa	attaattgat	cctttttaaa	gatttaagtt	taagttactt	tagggataac	420
60	agcgttattt	cttttgagag	ttcttatcga	gaaagaagtt	tgcgacctcg	atggtgaatt	480
	aaactatctt	gatggtgcag	cagctaagag	agaaagtctg	ttcgactttt	aaatgtttac	540
	atgatattgag	ttcagaccgg	cgtgagccag	gtcggtttct	atcttctaaa	tataaaaaat	600
	tgctttagta	cgaaaggatt	gagcagttaa	aatatttttg	tgatttacca	gctatttttg	660
65	cagataatat	g					671

<210> 4

<211> 671

<212> DNA

<213> *Maja squinado*

5 <400> 4

	ygccctgttta	tcaaaaacat	gtctatatga	atattttatat	agtctaacct	gctcattgac	60
	taaaaagttt	aaaagccgcg	gtatttctgac	cgtgcaaagg	tagcataatc	attagttcct	120
	taattgggaa	cttgtatgaa	aggttgaaca	agaaaaagac	tgtatctatt	gtaaatctta	180
10	aatttaactt	ttaagtgaaa	aggcttaaat	aacttagagg	gacgataaga	ccctataaag	240
	ctttataagt	aagtagaaat	ttatt-aatt	aataactgaa	acctatattt	ctattatcct	300
	attgtgttgg	ggcgacataa	atataaatta	ttaactggt	tgagaataag	acataaattt	360
	atgaattgaa	attaattgat	cctttttaa	gattcaagtt	taagttactt	tagggataac	420
	agcgttattt	cttttgagag	ttcttatcga	gaaagaagtt	tgcgacctcg	atggtgaatt	480
15	aaactatcct	gatggtgtag	cagctaagag	agaaagtctg	ttcgactttt	aaatgtttac	540
	atgatttgag	ttcagaccgg	cgtaagccag	gtcggtttct	atcttctaaa	tataaaaaat	600
	tgctttagta	cgaaggatt	gagtagttaa	aatatttttg	taagttac-a	gctattttgg	660
	cagataatat	g					671

20 <210> 5

<211> 671

<212> DNA

25 <213> *Maja crispata*

<400> 5

	ygccctgttta	tcaaaaacat	gtctatatga	atattttatat	agtctaacct	gctcattgac	60
	taaaaagttt	aaaagccgcg	gtattttgac	cgtgcaaagg	tagcataatc	attagttcct	120
	taattgggaa	cttgtatgaa	aggttgaaca	agagaaagac	tgtatctatt	gtaaatctta	180
30	aatttaactt	ttaagtgaaa	aggcttaaat	aacttagagg	gacgataaga	ccctataaag	240
	ctttataagt	aagtagaaat	ttatt-aatt	aataactgaa	acctatattt	ctattatcct	300
	attgtgttgg	ggcgacataa	atataaatta	ttaactggt	tgagaataag	acataaattt	360
	atgaattgaa	attaattgat	cctttttaa	gattcaagtt	taagttactt	tagggataac	420
35	agcgttattt	cttttgagag	ttcttatcga	gaaagaagtt	tgcgacctcg	atggtgaatt	480
	aaactatcct	gatggtgtag	cagctaagag	agaaagtctg	ttcgactttt	aaatgtttac	540
	atgatttgag	ttcagaccgg	cgtagaccag	gtcggtttct	atcttctaaa	tataaaaaac	600
	tgctttagta	cgaaggatt	gagtagttaa	aatattttta	tgaattac-a	gctattttgg	660
40	cagataatat	g					671

<210> 6

<211> 671

45 <212> DNA

<213> *Maja goltziana*

<400> 6

	ygccctgttta	tcaaaaacat	gtctatatga	atattttatat	agtctagcct	gctcattgac	60
	tattaagttt	aaaagccgcg	gtattttgac	cgtgcaaagg	tagcataatc	attagttcct	120
	taattgggaa	cttgtatgaa	aggttgaaca	agagaaagac	tgtgtctatt	ataaatctta	180
	aatttaactt	ttaagtgaaa	aggcttaaat	aatttagagg	gacgataaga	ccctataaag	240
55	ctttataagt	aagtggaaat	ttattaaaat	aaaaattgaa	aattatattt	ctattgtcct	300
	attatgttgg	ggcgacataa	atataaatta	ttaactggt	taagaataaa	acatgaattt	360
	ttgaattaaa	attaattgat	cctttttaa	gatttaagtt	taagttactt	tagggataac	420
	agcgttattt	cttttgagag	ttcttatcga	gaaagaagtt	tgcgacctcg	atggtgaatt	480
	aaactatcct	gatggtgtag	cagctgagag	agaaagtctg	ttcgactttt	aaatgtttac	540
60	atgatttgag	ttcagaccgg	cgcgagccag	gtcggtttct	atcttctaaa	aattaaaaat	600
	tgctttagta	cgaaggatt	aagtagttaa	a-tattttta	taaattac-a	gctattttgg	660
	cagataatat	g					671

65



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201000362

②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 18.03.2010

③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SOTELO, G. et al., 'Genetic identification of the riortheastern Atlantic spiny spider crab as Maje brachydactyla Balss', 1922., JOURNAL OF CRUSTACEAN BIOLOGY, 2008 Feb, Vol. 28, No. 1, páginas 76-81, ISSN: 0278-0372, todo el documento, en particular, Materiales y Métodos: 'DNA sequencing'; Resultados: 'Genetic differentiation for 16S'.	1-4
A	SOTELO, G. et al., 'Identification and characterization of microsatellite loci in the spiny spider crab Maja brachydactyla', CONSERVATION GENETICS, 2007, Vol. 8, No. 1, páginas 245-247, ISSN: 1566-0621, todo el documento.	1-4
A	SCHUBART, C. D. et al., 'Molecular phylogeny of the crab genus Brachynotus (Brachyura: Varunidae) based on 16S rRNA gene', HYDROBIOLOGIA, 2001, Vol. 449, páginas 41-46, ISSN 0018-8158, todo el documento.	1-4
A	WO 2007011367 A2 (MONTAGNIER, LUC et al.) 25.01.2007, todo el documento.	1-4

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  
28.06.2011

Examinador  
J. Vizán Arroyo

Página  
1/4

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE, EBI



Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.06.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-4	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-4	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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	SOTELO, G. et al., <i>J. Crustac. Biol.</i> , (Feb 2008), 28(1): 76-81.	2008
D02	SOTELO, G. et al., <i>Conserva. Geneti.</i> , (2007), 8(1): 245-247.	2007
D03	SCHUBART, C. D. et al., <i>Hydrobiologia</i> , (2001), 449: 41-46.	2001
D04	WO 2007011367 A2 (MONTAGNIER, LUC et al.)	25.01.2007

En D1 se describe un procedimiento de diferenciación genética de las especies *Maja brachydactyla*, *Maja squinado* y *Maja crispata*.

En D2 se identifican y caracterizan diferentes loci microsatélites en *Maja brachydactyla*.

En D3 y D4 se describen procedimientos de identificación de microorganismos basado en una reacción PCR anidada.

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración****1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes).**

1.1. La presente invención satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-4, es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

**2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).****2.1. Reivindicación independiente 1.**

2.1.1. El documento D1 constituye el estado de la técnica más próximo. En él se describe un procedimiento para diferenciar entre sí las especies *Maja brachydactyla*, *Maja squinado* y *Maja crispata*, basado en el análisis de un fragmento de 518pb del correspondiente gen mitocondrial 16S. La comparación de las respectivas secuencias reveló la presencia de un nucleótido Guanina (G) extra en la posición 246 en el fragmento obtenido de *M. brachydactyla* frente a los obtenidos de *M. squinado* y *M. crispata* (cf. D1: Resultados: 'Genetic Differentiation for 16S'; Discusión).

2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación independiente 1 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de un nuevo procedimiento de identificación de las especies *Maja brachydactyla*, *Maja squinado*, *Maja crispata* y *Maja goltziana*.

2.1.3. La solución propuesta es el procedimiento de la reivindicación 1 que comprende la amplificación de un fragmento de 671 pb del correspondiente gen 16S y su digestión con enzimas de restricción que reconozcan las secuencias diana: GTGCAG(N)<sub>14</sub>†NN↓, TCN↓GA y TTA↓TAA. La identificación de cada una de las diferentes especies se basa en el patrón de fragmentos de restricción obtenido tras la digestión.

En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D1-D4, no se ha divulgado ningún procedimiento de identificación de las especies indicadas que comparta las mismas características técnicas del procedimiento de la invención. Además, dicho procedimiento no se deduce de una manera obvia mediante la combinación de métodos descritos previamente. Por consiguiente, el objeto de protección de la reivindicación independiente 1 y el de las dependientes 2-4 se considera inventivo.

2.2. La presente invención satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-4, implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patente.