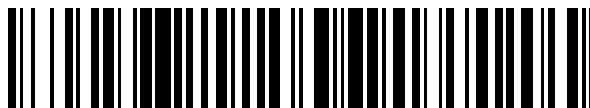


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 791**

21 Número de solicitud: 201231507

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

28.09.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.04.2014

Fecha de la concesión:

20.02.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

27.02.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT DE LLEIDA (100.0%)
Pl. de Víctor Siurana 1
25003 Lleida (Lleida) ES**

72 Inventor/es:

**ESTANY ILLA, Joan ;
PENA SUBIRÀ, Ramona Natacha y
TOR NAUDI, Marc**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **POLIMORFISMOS ASOCIADOS CON EL GRADO DE INSATURACIÓN DE LA GRASA INTRAMUSCULAR EN CERDOS**

57 Resumen:

Polimorfismos asociados con el grado de insaturación de la grasa intramuscular en cerdos.

La presente invención se refiere a polimorfismos en la región promotora del gen estearil-coenzima A desaturasa de origen porcino (SCD) que se relaciona con niveles elevados de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) en la grasa intramuscular del animal. La invención se relaciona también con reactivos adecuados para la detección de dicho polimorfismo así como con métodos para evaluar animales vivos de forma no invasiva y en los productos cárnicos derivados de los mismos la presencia de niveles elevados de MUFA. La invención se relaciona también con un método para seleccionar cerdos con un elevado grado de insaturación de ácidos grasos en la grasa intramuscular y/o subcutánea basado en la detección de dicho polimorfismo en la progenie resultante del cruce de cerdos podadores del polimorfismo.

ES 2 452 791 B1

DESCRIPCIÓN

POLIMORFISMOS ASOCIADOS CON EL GRADO DE INSATURACIÓN DE LA GRASA INTRAMUSCULAR EN CERDOS

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuadra dentro del campo de la genética y, más concretamente, en métodos genéticos para la identificación de cerdos que presenten grasas con alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados en base a la presencia de marcadores genéticos. La invención se relaciona también con métodos para criar cerdos que presenten grasas con alto contenido en ácidos grasos insaturados.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La grasa animal es un componente esencial de la carne para la percepción de su textura, sabor y jugosidad. Constituye además una fuente de ácidos grasos que no pueden ser sintetizados por el ser humano.

La proporción de grasa en la carne varía dependiendo del producto cárnico, de la especie animal así como del sistema de producción del animal. La fracción lipídica comprende entre el 12-20% del peso del cerdo listo para el mercado. Valores inferiores son generalmente consecuencia de la raza o de criterios comerciales.

Existe un creciente interés en determinar la composición de la grasa presente en la carne de consumo humano que proviene principalmente, de la necesidad actual que existe en la industria de encontrar procedimientos que permitan producir una carne más saludable. Ello está avalado por los resultados obtenidos por varios autores que relacionan la composición de la grasa intramuscular con la salud cardiovascular, la obesidad o el riesgo de sufrir enfermedades cancerígenas. Es por tanto necesario disponer de métodos fiables que permitan predecir la composición de la grasa presente en la carne para el consumo humano.

Las declaraciones nutricionales identifican los alimentos que son fuente de nutrientes beneficiosos para la salud que se deben de consumir con una frecuencia elevada así como alimentos fuentes de nutrientes que han de consumirse con una periodicidad menor por no ser saludables. En cuanto al contenido de grasas en los alimentos, el reglamento nutricional establecido en la Comunidad Europea establece que un alimento tiene un alto contenido en grasas monoinsaturadas, si al menos un 45% de los ácidos grasos presentes en el producto proceden de grasas monoinsaturadas y si dichas grasas aportan más del 20% del valor energético del producto. El consumo moderado de grasas monoinsaturadas está aconsejado por la Organización Mundial de la Salud debido a las propiedades beneficiosas que confieren como por ejemplo, ayudando a controlar los niveles de colesterol en sangre (CINDI dietary guide, EUR/00/5018028).

El contenido en grasa muscular y su composición son dos características, entre otras, que definen la calidad de la carne de cerdo, en especial aquella cuyo destino es el mercado de curados. De ahí el interés de las empresas de mejora porcina y de las fábricas de piensos en conocer cómo estas características evolucionan con la edad y el peso del animal para poderlos controlar o modificar, según el caso.

La variedad en la composición de ácidos grasos en el tejido adiposo y en músculo tienen efectos muy notables en la calidad de la carne. La composición en ácidos grasos determina la textura y la oleosidad del tejido adiposo así como la estabilidad oxidativa del músculo, lo cual a su vez afecta al sabor y al color del músculo.

Un contenido elevado en ácidos grasos poli-insaturados, PUFA (del inglés “*poly-unsaturated fatty acids*”) provoca efectos adversos en la calidad de la carne. Dichos efectos se reflejan tanto en el tiempo de conservación de la carne (debido a la oxidación de los lípidos y de la mioglobina) como en el sabor de la misma. Sin embargo, un contenido elevado en ácidos grasos monoinsaturados, MUFA (del inglés, “*mono-unsaturated fatty acids*”) es un distintivo de calidad debido a que estos ácidos grasos afectan favorablemente a las propiedades organolépticas (aspecto visual, textura, jugosidad y sabor) y nutritivas

de la carne. Además, en el caso de los cerdos se ha comprobado que también tiene efectos positivos en el proceso de curación del jamón.

La dieta, la edad del animal así como factores genéticos (por ejemplo raza, sexo o genotipo) afectan a la composición de ácidos grasos en los tejidos y por tanto a la calidad de la carne. Los programas de mejora genética porcina han dirigido tradicionalmente su atención a la mejora de los caracteres productivos, entre los que destacan los relacionados con la calidad del canal, y los reproductivos.

La producción de grasas monoinsaturadas en el cerdo se puede aumentar por ejemplo mediante la modificación de la dieta, alargando la edad de sacrificio del animal o practicando la castración. Sin embargo estas técnicas conllevan un aumento en la grasa intramuscular, tienen un coste elevado y el resultado conseguido en el animal no se trasmite a la descendencia.

El análisis físico-químico de la carne y sus derivados es un procedimiento obligado para garantizar la calidad de los productos. Entre los parámetros analizados, se determina el porcentaje de grasa presente en la muestra mediante el método establecido en la Norma ISO R-1443 (BOE 29/8/79) o variaciones del mismo. Este método, que permite determinar el porcentaje de grasa total (en peso seco), consiste en la extracción de la grasa de la muestra utilizando disolventes orgánicos que posteriormente se evaporan, pesando finalmente el residuo seco obtenido.

El análisis cuantitativo de la grasa en la carne también puede llevarse a cabo mediante espectrometría de infrarrojo cercano. Esta radiación es absorbida prácticamente por todas las moléculas y, por tanto, se pueden diferenciar los diversos componentes de la misma. Pese a que se trata de una técnica rápida y no destructiva de la muestra que requiere poca o ninguna preparación de la misma, es una metodología que no permite ser aplicada en un animal vivo (Bosch et al 2009, Meat Science 82 (4) 432-437). La determinación del contenido de MUFA en la grasa de animales vivos ha de hacerse mediante una biopsia, técnica que es considerada invasiva, que afecta al bienestar animal y que no es recomendada en un análisis rutinario.

Uemoto Y., *et al*, (Animal Gen., 2012, 43: 225-228) han descrito distintos haplotipos asociados a un mayor contenido en MUFA en la grasa muscular del cerdo.

Existe sin embargo una necesidad en el estado de la técnica de desarrollar un método que permita mejorar los métodos de determinación de los niveles de MUFA en animales vivos para su aplicabilidad a procesos de selección, cría y clasificación de animales destinados al mercado de calidad o destinados a producir derivados cárnicos.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han identificado la existencia de una posición polimórfica en la región promotora del gen estearil-coenzima A desaturasa porcino” (*SCD*, del inglés *Stearoyl Coenzyme A Desaturase*). En concreto, se trata de la posición 2281 en base a la numeración de la secuencia AY487830 en la base de datos NCBI con fecha de 15 de septiembre de 2004) (correspondiente a la posición -180 con respecto al codón de inicio de la traducción), que puede estar ocupada por una “G” o por una “A” (polimorfismo SNP3 (2281G/A). Adicionalmente, los autores de la presente invención han encontrado que, sorprendentemente, la presencia de una A en al menos un alelo de dicha posición polimórfica del gen *SCD* se correlaciona de forma estadísticamente significativa con niveles elevados de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) en la grasa intramuscular del animal (véase ejemplos 1-3 de la presente invención). Dicho cambio en el porcentaje de MUFA no va acompañado de cambios en peso de la canal ni del animal así como tampoco al porcentaje de magro de la canal ni de grasa intramuscular (GIM) (véase ejemplo 3 de la presente invención). Los autores de la presente invención han observado que dicho efecto también se produce en cerdos que presentan otros polimorfismos en el gen *SCD*, en concreto, el polimorfismo T/C en posición 2228 y el polimorfismo A/G en posición 15109 (usando en ambos casos a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la base de datos NCBI)

Estos hallazgos permiten el desarrollo de métodos no agresivos, rápidos y fiables que permitan evaluar tanto en animales vivos como en los productos cárnicos derivados de los mismos, si dichos animales son productores de niveles elevados de MUFA.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Polinucleótidos que comprenden la posición polimórfica en posición -180 del gen SCD

Así pues la presente invención se relaciona con la identificación de un SNP en el gen *SCD* porcino y un método que permite evaluar si los animales contienen niveles elevados de MUFA en base al genotipo de SNPs en el gen *SCD*.

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido aislado que comprende una región de al menos 10 nucleótidos consecutivos de una variante polimórfica del gen *SCD* de *Sus scrofa domestica*, caracterizada por la presencia de una A en posición 2281 en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la base de datos NCBI y en donde dicha región comprende el nucleótido en posición 2281, o un polinucleótido complementario a dicho polinucleótido.

Tal y como aquí se utiliza, la expresión “polinucleótido”, se refiere a un fragmento de ADN o ARN de origen genómico, que pueden ser monocatenarios o bicatenarios y pueden representar una hebra sentido o antisentido, ácido nucleico petídico (PNA) o cualquier material de tipo ADN o ARN natural. Como entenderán los expertos en la técnica, cuando el ácido nucleico es ARN, los desoxinucleótidos A, G, C y T son reemplazados por ribonucleótidos A, G, C y U respectivamente. En una realización, el polinucleótido comprende un fragmento de ADN que comprende al menos 10 nucleótidos, al menos 15 nucleótidos, al menos 20 nucleótidos, al menos 25 nucleótidos, al menos 30 nucleótidos, al menos 40 nucleótidos, al menos 50 nucleótidos, al menos 60 nucleótidos, al menos 70 nucleótidos, al menos 80 nucleótidos, al menos 90 nucleótidos, al menos 100 nucleótidos consecutivos de la variante polimórfica del gen *SCD* de *Sus scrofa domestica*.

El término “aislado” se refiere a material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan al material como se encuentra en su estado nativo. Típicamente, los ácidos nucleicos aislados de la invención son al menos aproximadamente el 50%, el 55%, 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80% o el 85% puros, habitualmente al menos aproximadamente el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% puros. Se puede indicar la pureza u homogeneidad por un número de medios bien conocidos en la técnica, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra de ácido nucleico, seguido por visualización tras la tinción. Para ciertos fines se necesitará alta resolución y se utilizará HPLC o un medio similar para la purificación. Para oligonucleótidos u otros productos sialilados, la pureza se puede determinar usando, por ejemplo, cromatografía en capa fina, HPLC o espectroscopia de masas.

Tal y como aquí se utiliza, la expresión “gen esteroil coA (SCD) de *Sus scrofa domestica*”, se refiere al gen que codifica la proteína esteroil coA desaturasa. La secuencia del gen *SCD* de *Sus scrofa* se encuentra depositada en la base de datos GenBank (versión del 15 de septiembre de 2004) bajo el número de acceso AY487830.1 (SEQ ID NO:1). La secuencia de la región codificante de dicho gen (correspondiente a las regiones 2461 a 2487, 3006 a 3288, 8073 a 8203, 9562 a 9767, 11236 a 11468 y 14423 a 14622 del gen *SCD* descrito en la secuencia AY487830.1) corresponde a la secuencia con número de acceso NM_213781.1 en la base de datos NCBI. La proteína codificada por dicho gen se define en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot, con el número de acceso O02858. Esta proteína participa en la ruta de insaturación de ácidos grasos de cadena larga catalizando la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados a partir de ácidos grasos saturados. El principal producto de reacción de SCD es el ácido oleico, el cual es obtenido mediante la insaturación del ácido esteárico.

Tal y como se usa en la presente invención, las expresiones “variante polimórfica” o “variante alélica” se usan de forma indistinta para referirse a una forma alternativa de un gen en donde un número variable de posiciones en dicho gen se encuentran ocupadas por un nucleótido alternativo al que aparece en dicho gen. Las variantes polimórficas se diferencian entre sí por la presencia de distintos nucleótidos en puntos denominados SNPs o “polimorfismo de un solo nucleótido”.

El término "polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)" se refiere a un sitio polimórfico ocupado por un solo nucleótido, que es el sitio de la variación entre las secuencias alélicas. El sitio suele ir precedido por y seguido por secuencias altamente conservadas del alelo (por ejemplo, las secuencias que varían en menos de 1/100 o 1/1000 miembros de una población). Un SNP surge normalmente debido a la sustitución de un nucleótido por otro en el sitio polimórfico. Los SNPs también pueden surgir de una delección de un nucleótido o una inserción de un nucleótido en relación a un alelo de referencia. Típicamente, el sitio polimórfico está ocupado por una base distinta de la base de referencia. Por ejemplo, cuando el alelo de referencia contiene la base de "T" (timidina) en el sitio polimórfico, el alelo alterado puede contener una "C" (citidina), "T" (guanina), o "A" (adenina) en el sitio polimórfico. Los SNPs pueden aparecer en la región codificante de los ácidos nucleicos, en cuyo caso pueden dar lugar a una proteína variante o incluso defectuosa. Estos SNP puede alterar la secuencia codificante del gen y por lo tanto especificar otro aminoácido (un SNP "missense") o puede introducir un codón de parada (un SNP "nonsense"). Cuando un SNP no altera la secuencia de aminoácidos de una proteína, el SNP se llama "silencioso". Los SNPs puede aparecer también en las regiones no codificadoras de la secuencia de nucleótidos, incluyendo en la región de los promotores, en intrones, en las regiones 5'-UTR y/o en regiones 3'-UTR. Cuando el cambio de nucleótido se corresponde con un cambio de aminoácido en la proteína, el polimorfismo puede ser nombrado de la siguiente manera "aa1-nn-aa2", donde "aa1" representa el aminoácido original, "nn" corresponde a la posición del aminoácido mutado, y "aa2" representa el aminoácido resultante de la mutación. Sin embargo, cuando el cambio de nucleótido no se corresponde con un cambio en el correspondiente aminoácido, el polimorfismo se nombra indicando la posición del nucleótido que contiene la mutación y el cambio de nucleótido se indica de la siguiente manera "mm nt1> nt2", en donde "mm" indica el número del nucleótido en el que se ha producido el cambio, "nt1" representa al nucleótido original y "nt2" el nucleótido cambiado. En general, los SNPs representan una de las formas más comunes de las variaciones genéticas y suelen aparecer cuando se altera en el genoma un único nucleótido (por ejemplo, a través de sustitución, adición o delección). Cada versión de la secuencia con respecto al sitio polimórfico se conoce como un alelo del sitio polimórfico. Los SNPs se producen a lo largo de todo el genoma, tanto en regiones extragénicas como en regiones codificantes o en sus secuencias reguladoras. Los SNPs tienden a ser evolutivamente estables de generación en generación, y, como tal, pueden ser usados para estudiar variaciones genéticas específicas en la población. Algunos SNPs pueden estar en regiones no codificantes, por ejemplo, en regiones reguladoras, donde sus posibles efectos funcionales pueden ser muy importantes ya que pueden dar lugar a un "splicing" diferencial o ventajoso o defectuoso o a alteraciones en los niveles de expresión de proteínas. Los SNPs, por tanto, pueden servir como indicadores efectivos de los niveles de expresión de proteínas o de la actividad de las mismas.

El término "alelo", tal como aquí se utiliza, se refiere a una, dos o más formas de un gen, locus o polimorfismo genético. A veces, los diferentes alelos pueden dar lugar a diferentes fenotipos; sin embargo, otras veces, los diferentes alelos tendrán el mismo resultado en la expresión de un gen. La mayoría de los organismos multicelulares tienen dos juegos de cromosomas, es decir, que son diploides. Estos cromosomas se denominan cromosomas homólogos. Los organismos diploides tienen una copia de cada gen (y un alelo) en cada cromosoma. Si ambos alelos son iguales, son homocigotos. Si los alelos son diferentes, son heterocigotos.

La variante polimórfica de la que deriva el polinucleótido de la invención es la variante en posición 2281 en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la base de datos NCBI, que corresponde a la posición -180 con respecto al codón de iniciación del gen *SCD* de *Sus scrofa*, siendo la adenina de dicho codón de iniciación el nucleótido en posición 1. La variante polimórfica contiene una G en dicha posición.

Sondas y kits adecuados para detectar polimorfismos asociados a un elevado contenido en ácidos grasos monoinsaturados

En otro aspecto, la invención se relaciona con una sonda capaz de detectar el nucleótido en posición 2281 del gen *SCD* de *S. scrofa domestica* en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la base de datos NCBI en el gen *SCD* de *Sus scrofa domestica* el gen o en una variante polimórfica en posición 2281 de dicha secuencia.

Las sondas de la invención son capaces de hibridar de forma específica con un ácido nucleico que contiene un determinado alelo en una posición polimórfica determinada sin mostrar hibridación detectable con el ácido nucleico que contiene otro alelo en dicha posición polimórfica. Así, la presente invención se refiere a sondas que son capaces de hibridar de forma específica con la variante polimórfica del gen *SCD* en la que la posición polimórfica en posición 2281 en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la base de datos NCBI se encuentra ocupada por una G sin mostrar hibridación detectable con la variante polimórfica del gen *SCD* en la que la posición polimórfica en posición 2281 en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la base de datos NCBI se encuentra ocupada por una A. Alternativamente, la invención se refiere a sondas que son capaces de hibridar de forma específica con la variante polimórfica del gen *SCD* en la que la posición polimórfica en posición 2281 en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la base de datos NCBI se encuentra ocupada por una A sin mostrar hibridación detectable con la variante polimórfica del gen *SCD* en la que la posición polimórfica en posición 2281 en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la base de datos NCBI se encuentra ocupada por una G.

El término “sonda”, tal y como aquí se utiliza, se refiere a un oligonucleótido de secuencia definida capaz de hibridar de forma específica con una secuencia complementaria de un ácido nucleico, por lo que puede utilizarse para detectar e identificar secuencias complementarias o sustancialmente complementarias en ácidos nucleicos. La longitud de la sonda de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo aunque, por razones prácticas, se prefieren sondas de longitud pequeña comprendida entre 15 bases y 30 bases, preferiblemente entre 16 bases y 22 bases. El empleo de sondas de mayor o menor longitud no afectaría a la sensibilidad o especificidad de la técnica, pero podría precisar de la realización de una serie de modificaciones de las condiciones sobre las que se realiza la misma al variar la temperatura de fusión de las mismas y su contenido en GC, lo cual afectaría a la temperatura y tiempo de hibridación fundamentalmente.

Asimismo, el término “hibridación”, tal y como aquí se utiliza, se refiere a la formación de una estructura de tipo dúplex por dos ácidos nucleicos debido al apareamiento de bases complementarias. La hibridación puede ocurrir entre cadenas de ácidos nucleicos totalmente complementarias o entre cadenas de ácidos nucleicos “sustancialmente complementarias” que contienen pequeñas regiones desapareadas. Las condiciones con las que hibridan cadenas de ácidos nucleicos totalmente complementarias se denominan “condiciones estrictas de hibridación” o “condiciones de hibridación específicas de secuencia”. No obstante, se pueden obtener cadenas dobles estables de ácidos nucleicos sustancialmente complementarias bajo condiciones de hibridación menos estrictas, en cuyo caso, el grado de desapareamiento tolerado puede ajustarse mediante ajuste apropiado de las condiciones de hibridación. El experto en la materia puede determinar empíricamente la estabilidad de un dúplex teniendo en cuenta diversas variables, tales como, la longitud y concentración de pares de bases de las sondas, fuerza iónica y la incidencia de los pares de bases desapareados, siguiendo las directrices del estado de la técnica (véase por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); y Wetmur, *Critical Reviews in Biochem. And Mol. Biol.* 26 (3/4):227-259 (1991)).

Así, las sondas específicas de alelo de acuerdo a la presente invención son capaces de hibridar específicamente con las variantes polimórficas del gen *SCD* caracterizadas por el nucleótido en posición 2281 de dicho gen en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la base de datos NCBI.

Por hibridación específica se entiende, en el contexto de la presente invención, la capacidad de un primer ácido nucleico de unirse, formar dúplex o hibridarse a un ácido segundo nucleico de forma que el segundo ácido nucleico puede ser identificado o distinguirse de otros componentes de una mezcla (por ejemplo, extractos celulares, ADN genómico, etc.). En forma preferidas de realización, la hibridación específica se lleva a cabo en condiciones altamente restrictivas o en condiciones restrictivas moderadas.

Condiciones típicas de hibridación altamente restrictivas incluyen la incubación en 6 X SSC (1 X SSC: NaCl 0,15 M, citrato de sodio 0,015 M) y formamida al 40% a 42 °C durante 14 horas, seguido de uno o varios ciclos de lavado usando 0,5 X SSC, SDS al 0,1% a 60°C. Alternativamente, condiciones altamente restrictivas incluyen aquellas que comprenden una

hibridación a una temperatura de aproximadamente 50°-55° C en 6 X SSC y un lavado final a una temperatura de 68° C en 1-3 X SSC. Las condiciones restrictivas moderadas comprenden la hibridación a una temperatura de aproximadamente 50° C hasta unos 65° C en NaCl 0,2 o 0,3 M, seguida de lavado a aproximadamente 50° C hasta unos 55° C en 0,2 X SSC, SDS 0,1% (dodecil sulfato sódico).

5 En una realización particular, la sonda es capaz de detectar el nucleótido G en la posición -180 del gen *SCD* de *S. scrofa domestica*. En una realización más particular, dicha sonda presenta la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 16.

En otra realización particular, la sonda es capaz de detectar el nucleótido A en la posición -180 del gen *SCD* de *S. scrofa domestica*. En otra realización más particular, dicha sonda presenta la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 17.

10 La sonda de la invención son complementarias o sustancialmente complementarias a secuencias diana específicas contenidas en el gen *SCD* de *S. Scrofa domestica*.

La sonda de la invención tendrá una alta homología con las secuencias diana específicas contenidas en el gen *SCD* de *S. Scrofa domestica*. “Alta homología” se refiere normalmente a una homología del 40% o superior, preferiblemente del 60% o superior, más preferiblemente del 80% o superior, incluso más preferiblemente del 95% o superior. La homología de la sonda puede determinarse siguiendo el algoritmo en “Wilbur y Lipman, 1983, Proc Natl. Acad. Sci. USA, 80: 723-30.

15 Opcionalmente, si se desea, puede llevarse a cabo el marcaje de la sonda de la invención con el fin de poder detectar posteriormente los fragmentos amplificados. El marcaje puede realizarse por métodos convencionales. Dicho marcaje puede ser directo, para lo cual pueden utilizarse fluoróforos, por ejemplo, Cy3, Cy5, fluoresceína, alexa, etc., enzimas, por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa, etc., isótopos radiactivos, por ejemplo, 33P, 125I, etc., o cualquier otro marcador conocido por el experto en la materia. Alternativamente, dicho marcaje puede ser indirecto mediante el empleo de métodos químicos, 20 enzimáticos, etc.; a modo ilustrativo, el producto de amplificación puede incorporar un miembro de un par de unión específica, por ejemplo, avidina o estreptavidina conjugada con un fluorocromo (locus), y la sonda se une al otro miembro del par de unión específica, por ejemplo, biotina (indicador), efectuándose la lectura mediante fluorimetría, etc.

Así, en una realización particular, el marcaje de la sonda se lleva a cabo mediante el marcaje, en uno de sus extremos, que, en otra realización todavía más particular, el compuesto empleado en el marcaje de la sonda se selecciona del grupo que consiste 25 en un radioisótopo, un material fluorescente, digoxigenina y biotina. Ejemplos de materiales fluorescentes que se pueden emplear en el marcaje de oligonucleótidos incluyen, sin limitar a, 5-carboxifluoresceína (5-FAM), 6-FAM, análogo tetraclorinado de t-FAM (TET), análogo hexaclorinado de 6-FAM (HEX), 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-4', 5'-dicloro-2', 7'-dimetoxifluoresceína (JOE), NED, Cy-3, Cy-5, Cy-5.5, fluorescein-6-isotiocinato (FITC), VIC y, tetrametilrodamina-5-isotiocinato (TRITC).

30 En una realización más particular, el marcaje de la sonda de la invención que es capaz de detectar el nucleótido A en la posición -180 del gen *SCD* de *S. scrofa domestica* se lleva a cabo con el compuesto fluorescente 5-carboxifluoresceína (5-FAM).

En otra realización más particular, el marcaje de la sonda de la invención que es capaz de detectar el nucleótido G en la posición -180 del gen *SCD* de *S. scrofa domestica* se lleva a cabo con el compuesto fluorescente VIC.

35 La presente invención también contempla kits, en adelante, “kit de la invención”, que comprende la sonda de la invención.

En una forma preferida de realización, el kit de la invención comprende una sonda capaz de detectar el nucleótido en posición 2281 del gen *SCD* de *S. scrofa domestica* en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la base de datos NCBI en el gen *SCD* de *Sus scrofa domestica* el gen o en una variante polimórfica en posición 2281 de dicha secuencia. En una forma preferida de realización, la sonda es adecuada para la detección de la variante del gen 40 *SCD* de *S. scrofa domestica* en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la que el nucleótido que ocupa la posición 2281 del gen *SCD* es una G. En una forma de realización más preferida, el kit de la invención comprende una sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO:16.

En otra forma preferida de realización, la sonda es adecuada para la detección de la variante del gen *SCD* de *S. scrofa domestica* en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la que el nucleótido que

ocupa la posición 2281 del gen *SCD* es una A. En una forma de realización más preferida, el kit de la invención comprende una sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO:17.

En una forma preferida de realización, la invención se relaciona con kits que comprenden adicionalmente sondas adecuadas para la detección de otros polimorfismos que están asociados con el contenido en ácidos grasos insaturados en la grasa intramuscular de cerdos. Así, en otra forma preferida de realización, el kit de la invención comprende adicionalmente una sonda para la detección del nucleótido en posición 2228 y/o una sonda para la detección del nucleótido en posición 15109 en el gen *SCD* en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la base de datos NCBI.

La posición 2228 en el gen *SCD* corresponde a la posición -233 con respecto al codón de iniciación del gen *SCD* de *Sus scrofa*, siendo la adenina de dicho codón de iniciación el nucleótido en posición 1. Dicha posición puede contener una T o una C.

La posición 15109 en el gen *SCD* se localiza en la región 3' no codificante del gen *SCD* y corresponde a la posición 1566 con respecto al codón de iniciación del gen *SCD* de *Sus scrofa*, siendo la adenina de dicho codón de iniciación el nucleótido en posición 1. Dicha posición puede contener una G o una A.

En una realización particular, las sondas que forman parte del kit de la invención están marcadas en uno de sus extremos con un compuesto fluorescente. En una realización preferida dicho compuesto fluorescente se selecciona del grupo que consiste en un radioisótopo, un material fluorescente, digoxigenina y biotina. Ejemplos de materiales fluorescentes que se pueden emplear en el marcaje de oligonucleótidos incluyen, sin limitar a, 5-carboxifluoresceína (5-FAM), 6-FAM, análogo tetraclorinado de t-FAM (TET), análogo hexaclorinado de 6-FAM (HEX), 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-4', 5'-dicloro-2', 7'-dimetoxifluoresceína (JOE), NED, Cy-3, Cy-5, Cy-5.5, fluorescein-6-isotiocinato (FITC), VIC y, tetrametilrodamina-5-isotiocinato (TRITC).

La invención se refiere adicionalmente a cebadores que permiten amplificar de forma específica la región del gen *SCD* de *Sus Scrofa* (número de acceso AY487830 en la base de datos NCBI) que comprende la posición polimórfica en posición 2281. Así, en otro aspecto, la invención se refiere a un kit para detectar el polimorfismo en posición 2281 del gen *SCD* de *S. scrofa domestica* en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la base de datos NCBI que comprende un primer y un segundo cebador complementarios a secuencias en el gen *SCD* en posición 5' y 3' con respecto a dicha posición.

En una forma preferida de realización, el primer cebador comprende la secuencia definida en SEQ ID NO:14 y/o en donde el segundo cebador comprende la secuencia definida en SEQ ID NO:15.

Adicionalmente, el kit de la invención puede comprender pares de cebadores adicionales que permiten amplificar de forma específica las regiones del gen *SCD* en donde se localizan otras posiciones polimórficas que se asocian con el contenido en ácidos grasos insaturados en la grasa intramuscular de cerdos. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende, adicionalmente, un segundo par de cebadores en donde el primer y segundo cebador de dicho segundo par de cebadores son complementarios a secuencias en el gen *SCD* en posición 5' y 3' con respecto a la posición 2228 de dicho gen y/o un tercer par de cebadores en donde el primer y segundo cebador de dicho tercer par de cebadores son complementarios a secuencias en el gen *SCD* en posición 5' y 3' con respecto a la posición 15109 en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la base de datos NCBI.

Materiales adecuados para su inclusión en un kit ejemplar de acuerdo con la presente invención, comprenden uno o más de los siguientes: pares de cebadores específicos para PCR (oligonucleótidos) que hibridan con dominios de la secuencia de ADN o cDNA que flanquean los polimorfismos genéticos de interés (SNPs de la invención); reactivos capaces de amplificar un dominio de una secuencia específica, ya sea en el ADN genómico o cDNA sin el requisito de la realización de PCR; reactivos necesarios para discriminar entre los distintos alelos en la secuencia de los dominios amplificados por PCR y PCR-no amplificación (por ejemplo, las endonucleasas de restricción, oligonucleótidos que hibridan preferentemente a un alelo del polimorfismo, incluidos los modificados para contener enzimas o grupos químicos fluorescentes que amplifican la señal de

los oligonucleótidos y que hacen la discriminación de los alelos más robusta); reactivos necesarios para separar físicamente los productos derivados de los diferentes alelos (por ejemplo agarosa o poliacrilamida y un tampón para ser utilizado en la electroforesis, columnas de HPLC, geles SSCP, geles formamida o un soporte de la matriz de MALDI-TOF).

5 En otra realización, la invención se refiere al uso del kit de la invención para determinar si un sujeto presenta al menos un SNP del gen *SCD* asociado con un grado de insaturación de ácidos grasos elevado. En una realización particular, el grado de insaturación se refiere a la relación de los ácidos grasos C18:1/ C18:0.

En otra realización, la invención se refiere al uso del kit de la invención en un sujeto, preferentemente en un cerdo. En una realización más particular, el kit de la invención se refiere a un cerdo de raza Duroc.

10 *Métodos de genotipado*

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de genotipado, en adelante, “primer método de la invención”, para detectar el nucleótido que ocupa la posición 2281 en el gen *SCD* de *S. scrofa domestica* en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la base de datos NCBI.

15 Métodos conocidos en el estado de la técnica para genotipar un polimorfismo y que se pueden ser usados en el contexto de la presente invención incluye, sin limitación, cualquiera de los métodos descritos por Rapley and Harbron, (Molecular Analysis and Genome Discovery. Chichester. John Wiley and Sons Ltd. 2004) tales como:

- Métodos basados en hibridación: Hibridación dinámica específica de alelo (DASH), micromatrices de ADN, balizas moleculares (molecular beacons),
- 20 - Métodos basados en enzimas tales como ADN ligasa, ADN polimerasa y nucleasa. Ejemplos de dichos métodos incluyen PCR específica de alelo, ensayo del invasor (endonucleasa Flap), extensión de base sencilla (SBE), TaqMan (5'-3'-endonucleasa), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), secuenciación directa y ensayo de ligación.
- 25 - Métodos post-amplificación basado en propiedades físicas del ADN tales como la temperatura de fusión de híbridos de ADN y conformación de cadena sencilla. Este tipo de métodos incluyen polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP), electroforesis en gel en gradiente de temperatura (TGGE), cromatografía de alta resolución en condiciones desnaturalizantes (DHPLC).

Como es obvio, el método de genotipado de acuerdo a la presente invención se puede llevar a cabo a partir de cualquier hebra de ácido nucleico o a partir de ambas hebras. En una realización particular, la detección de SNPs se realiza mediante la técnica de discriminación alélica. Esta metodología permite detectar variaciones en la secuencia de ADN, por ejemplo SNPs, mediante la lectura de la fluorescencia emitida por cada una de las sondas empleadas complementarias para cada uno de los SNPs puesto que están marcadas con fluorocromos diferentes. En una realización más particular el genotipado se realiza mediante el método de discriminación alélica mencionado anteriormente acoplado a un aparato de PCR a tiempo real.

35 En una forma preferida de realización, el método de genotipado de la presente invención comprende adicionalmente la detección de otros polimorfismos en el gen *SCD* que se asocian con el contenido en ácidos grasos insaturados en la grasa intramuscular de cerdos. Así, en una forma preferida de realización, el método de genotipado de acuerdo a la presente invención comprende adicionalmente detectar en el nucleótido que ocupa la posición 2228 de dicho gen y/o el nucleótido que ocupa la posición 15109 en el gen *SCD* de *S. scrofa domestica* en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la base de datos NCBI.

40 En una forma preferida de realización, el genotipado se lleva a cabo mediante hibridación con sondas específicas de alelo capaces de detectar el nucleótido en posición 2281 del gen *SCD* de *S. scrofa domestica* en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la base de datos NCBI en el gen *SCD* de *Sus scrofa domestica* el gen o en una variante polimórfica en posición 2281 de dicha secuencia. En una forma de realización más preferida, la sonda específica de alelo comprende la secuencia SEQ ID NO:16 y permite detectar variantes del gen *SCD* en donde el nucleótido

que ocupa la posición 2281 del gen *SCD* es una G. En otra forma preferida de realización, la sonda específica de alelo comprende la secuencia SEQ ID NO:17 y permite detectar variantes del gen *SCD* en donde el nucleótido que ocupa la posición 2281 del gen *SCD* es una A. Preferiblemente, las sondas se encuentran marcadas en uno de sus extremos con un compuesto fluorescente. En una forma de realización aún más preferida, el compuesto fluorescente es VIC o 5-carboxifluoresceína (5-FAM).

En otra forma preferida de realización, el método de genotipado de acuerdo a la presente invención comprende la amplificación de la región o las regiones del gen *SCD* de *S. scrofa domestica* que contiene la posición polimórfica o las posiciones polimórficas a caracterizar. En el caso del polimorfismo en posición 2281, en una forma preferida de realización, la amplificación de la región se lleva a cabo usando un par de cebadores en donde el primer cebador comprende la secuencia definida en SEQ ID NO:14 y/o en donde el segundo cebador comprende la secuencia definida en SEQ ID NO:15.

Métodos para predecir el grado de insaturación de ácidos grasos

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método, de aquí en adelante, “segundo método de la invención”, para predecir el grado de insaturación de ácidos grasos en un sujeto o de un derivado de dicho sujeto, que comprende detectar en una muestra de dicho sujeto el nucleótido de al menos una posición polimórfica en el gen *SCD* de *Sus scrofa domestica* en donde dicha posición polimórfica se selecciona del grupo formado por las posiciones 2281, 2228 y 15109 en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la base de datos NCBI y en donde la presencia del nucleótido A en la posición 2281, del nucleótido T en la posición 2228 y/o el nucleótido A en la posición 15109 en al menos un alelo del gen *SCD* es indicativa de un grado de insaturación de ácidos grasos elevado con respecto al valor de referencia.

El método de la invención comprende determinar la presencia o ausencia de los alelos asociados con una determinada condición, en este caso particular, un grado de insaturación de ácidos grasos elevado. Los alelos asociados con un grado elevado de insaturación se denominan alelos beneficiosos y se muestran en la Tabla 1.

NOMBRE DEL POLIMORFISMO	POSICIÓN EN EL GEN <i>SCD</i> DE <i>S. scrofa</i>	CAMBIODEL NUCLEÓTIDO	ALELO BENEFICIOSO
SNP2	-233/2228	T>C	T
SNP3	-180/2281	A>G	A
SNP5	+1566/15109	A>G	A

Tabla 1: Relación de alelos beneficiosos identificados. La columna “Posición en el gen *SCD* de *Sus scrofa* comprende la posición con respecto al codón de inicio de la transcripción seguido de la posición absoluta en la secuencia AY487830 en la base de datos NCBI.

El término “predecir”, como se usa aquí, se refiere a la determinación de la probabilidad de que la grasa del sujeto tenga un grado de insaturación determinado. Como entenderán los expertos en la materia, tal determinación normalmente no se pretende que sea correcta para todos (es decir, el 100 por cien) de los sujetos que se van a identificar. Sin embargo, el término requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos se pueda identificar (por ejemplo, una cohorte en un estudio de cohortes). El experto en la materia puede determinar fácilmente si una parte es estadísticamente significativa usando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación de los valores de p, prueba de la t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Los detalles se encuentran en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley and Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son al menos del 90 por ciento, al menos del 95 por ciento, al menos del 97 por ciento, al menos del 98 por ciento o al menos del 99 por ciento. Los valores de p son, preferiblemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Más preferiblemente, al menos de realización, el genotipado se lleva a cabo mediante hibridación con sondas específicas de alelo capaces de detectar el

60 por ciento, al menos el 70 por ciento, al menos el 80 por ciento o al menos el 90 por ciento de los sujetos de una población se pueden identificar apropiadamente por el método de la presente invención.

El término “asociado con”, tal y como aquí se utiliza, significa que, un sitio polimórfico particular está estructuralmente y/o funcionalmente asociado con un SNP específico, por ejemplo, dicho sitio polimórfico está en el locus correspondiente, o en su proximidad inmediata, y/o dicho sitio polimórfico interactúa con o afecta al gen correspondiente o a la expresión del producto del mismo.

La expresión “grado de insaturación de ácidos grasos”, tal y como aquí se utiliza, hace referencia a la proporción de uno o varios MUFAs presente en una muestra de un sujeto con respecto a la proporción del total de ácidos grasos presentes en dicha muestra de dicho sujeto. En una forma de realización aún más preferida, el grado de insaturación corresponde al porcentaje de ácido oleico con respecto al total de ácidos grasos en la muestra. En otra forma de realización, el grado de insaturación corresponde al porcentaje de ácido oleico con respecto al ácido esteárico (C18:0) en la muestra.

La expresión “ácidos grasos”, tal y como aquí se utiliza, se refiere a biomoléculas de naturaleza lipídica formadas por una larga cadena hidrocarbonada lineal, de diferente longitud o número de átomos de carbono que presentan un grupo alquilo en un extremo y un grupo ácido en el otro extremo. Los ácidos grasos se pueden clasificar en ácidos grasos saturados y ácidos grasos insaturados. Los primeros no poseen dobles enlaces en la cadena hidrocarbonada que los conforma y son flexibles y sólidos a temperatura ambiente mientras que, los segundos poseen dobles o triples enlaces, son rígidos a nivel de estos enlaces y presentan una temperatura líquida o viscosa a temperatura ambiente. En este último grupo, además podemos diferenciar entre ácidos grasos monoinsaturados o MUFA (del inglés “*monounsaturated fatty acid*”) y ácidos grasos polinsaturados o PUFA (del inglés “*polyunsaturated fatty acid*”). En la nomenclatura empleada para nombrar los ácidos grasos de la invención se hace referencia, en primer lugar el número total de carbonos de la molécula hidrocarbonada, seguido de dos puntos y un número que hace referencia al número de dobles enlaces que se encuentra en dicha cadena y finalmente, el término “n-número” hará referencia a la posición que ocupe el primer doble enlace con respecto al carbono del grupo metilo (CH₃).

El término “MUFA”, tal y como aquí se utiliza, se refiere a ácidos grasos de cadena carbonada par que contienen un único doble enlace en su estructura, es decir un solo doble enlace carbono-carbono (-CH=CH-). Ejemplos de MUFA son, el ácido palmitoleico (16:1 n-7), el ácido cis-vacénico (18:1 n-7), el ácido ecosanoico (20:1 n-9), el ácido erucico (22:1 n-9), el ácido nervónico (24:1 n-9) y el ácido oleico (18:1 n-9).

El término “PUFA”, tal y como aquí se utiliza, se refiere a ácidos grasos cuya cadena carbonada presenta más de un doble enlace. Ejemplos de PUFA son el ácido dexadecanotrienoico (16:3 n-3), el ácido alfa-linolénico (18:3 n-3), el ácido estearidónico (18:4 n-3), el ácido eicosatrienoico (18:4 n-3), el ácido ecosatetranoico (20:3 n-3), el ácido ecosapentanoico (20:5 n-3), el ácido docosapentanoico (22:6 n-3), el ácido tetracosapentanoico (24:5 n-3), el ácido tetracosahexanoico (24:6 n-3), el ácido linoleico (18:2 n-6), el ácido gamma-linolénico (18:3 n-6), el ácido eicosadienoico (22:2 n-6), el ácido araquidónico (22:4 n-6), el ácido docosadienoico (22:2 n-6), el ácido adrenico (22:4 n-6), el ácido docosapentanoico (22:5 n-6), el ácido tetracosatreanoico (22:4 n-6) y el ácido tetracosapentanoico (24:5 n-6).

El término “muestra”, como se usa aquí, se refiere a cualquier muestra que se puede obtener de un sujeto en la que exista material genético que permita determinar el nucleótido en las posiciones polimórficas indicadas anteriormente. Muestra biológicas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, una muestra de biopsia, una muestra de un derivado cárnico, un fluido biológico (por ejemplo, sangre, plasma, esperma, suero, orina, etc), una célula, un tejido (por ejemplo tejido adiposo, tejido muscular, tejido epitelial etc), etc., Las muestras pueden ser obtenidas por métodos convencionales, por ejemplo, un raspado, una biopsia, etc., usando métodos bien conocidos por los expertos en la materia. En una realización particular la muestra es una muestra de ácido nucléico, por ejemplo: una muestra que comprende un ácido nucléico, por ejemplo, el ADN, el ADN genómico (ADNg), ADN complementario (ADNc), el ARN, el ARN nuclear heterogéneo (ARNnh), ARNm, etc., del sujeto. En una realización, la muestra está aislada o extraída de una célula o tejido en particular. Las células pueden estar presentes en un fluido biológico, por ejemplo, sangre, saliva, esperma, etc, en un tejido

por ejemplo músculo o tejido adiposo, etc. En una realización particular, la muestra es un fluido biológico, como saliva, sangre, esperma o similares. En una forma preferida de realización, la muestra en la que se lleva a cabo la determinación de la presencia de los distintos polimorfismos es una muestra de músculo. En una forma preferida de realización, el músculo se selecciona de músculo de glúteo medio del jamón, músculo longuísimo dorsal y músculo semimembranoso. Los métodos para el aislamiento de muestras de células y tejidos son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, las aspiraciones, las secciones de tejidos, biopsias con aguja, etc.

El término “sujeto”, tal y como aquí se utiliza, hace referencia a cualquier animal clasificado como mamífero. Preferentemente, el sujeto es un cerdo. El término “cerdo”, tal y como aquí se utiliza, hace referencia a cualquier especie doméstica o silvestre perteneciente al género *Sus*, incluyendo *Sus barbatus*, *Sus bucculentus*, *Sus cebifrons*, *Sus celebensis*, *Sus domestica*, *Sus falconeri*, *Sus heurenii*, *Sus hysudricus*, *Sus philippensis*, *Sus salvanius*, *Sus scrofa*, *Sus strozzi*, *Sus timoriensis*, *Sus verrucosus*. En una forma preferida de realización, la determinación se lleva a cabo en el cerdo común o *S. scrofa domestica*. Sinónimos que pueden ser empleados para nombrar a un cerdo son, por ejemplo, puerco, cochino, cochi, cuche, chanco, marrano, con, chiro, guarrapo, cuto, tocino, rancho, gocho, gorrino, cochinitillo, verraco, cocha, gocha, etc. El término cerdo, tal y como aquí se utiliza engloba a cualquier raza, variedad o estirpe del cerdo. Ejemplos de subespecies de cerdos domésticos que pueden ser analizadas mediante el método de la presente invención son: cerdo albar (*Sus scrofa castilianus*), cerdo arocho (*Sus scrofa baeticus*), *Sus scrofa scrofa*, *Sus scrofa meridionalis*, *Sus scrofa majori*, *Sus scrofa attila*, *Sus scrofa ussuricus*, *Sus scrofa cristatus*, *Sus scrofa vittatus*, *Sus scrofa taivanus*. Según la presente invención el término “raza” hace referencia a un conjunto de individuos de la misma especie que ostentan unas mismas características, aptitudes o cualidades diferenciadas, y las transmiten de generación en generación. Ejemplos de razas de cerdos domésticos que pueden ser analizadas mediante el método de la presente invención son: *Hampshire*, *Pietrain*, *Landrace Belga*, *Meishan*, *Berkshire*, *Large White*, *Landrace o Duroc*. Dentro de una raza se puede definir una variedad que hace referencia a una agrupación de individuos de la misma raza que presentan una característica o una aptitud diferenciadas heredables, que normalmente suele ser la coloración de la capa. Una variedad puede contener distintas estirpes que se refieren a un conjunto de individuos de la misma raza y variedad, que se reproducen sin la intervención de aportaciones extrañas y con un número de ejemplares suficiente como para que la consanguinidad no sea elevada. En una realización preferida el sujeto es un cerdo de raza Duroc.

En una realización particular, el método de la invención permite determinar el grado de insaturación en el músculo del glúteo medio del jamón, músculo longuísimo dorsal y/o músculo semimembranoso.

En el caso particular de que se desee determinar el grado de insaturación en la grasa presente en un derivado cárnico de un sujeto, la muestra usada para la determinación de los polimorfismos es una muestra de dicho derivado cárnico.

La expresión “derivado cárnico”, según se usa en la presente invención, se refiere a un producto alimenticio preparado total o parcialmente con carnes o despojos de las especies autorizadas para tal fin, y sometidos a operaciones específicas para su conservación antes de su puesta al consumo. Dentro del ámbito que abarca la presente invención dentro de los derivados cárnicos se incluyen los productos cárnicos crudos y curados, que son aquellos sometidos a un proceso de maduración o desecación, bien picados y embutidos (chorizo, salchichón, chorizo blanco, chorizo Pamplona, salami, morcón, fuet, etc.) o enteros (jamón curado, paleta curada, panceta, beicon, cecina, lomo embuchado etc.). Los productos cárnicos tratados por calor, son los obtenidos por tratamiento térmico, bien picados y embutidos (salchichas tipo Frankfurt, mortadela chopped, sevillana, etc.) o enteros (jamón cocido, paleta cocida, magro de cerdo cocido, fiambres, etc.). Los productos cárnicos frescos son los preparados sin ser sometidos ni a tratamiento de desecación ni a tratamiento térmico. Pueden ser picados y embutidos (salchicha fresca, chorizo fresco, etc.), únicamente picados (carne picada, hamburguesas, tartas rellenas de carne, etc.) o enteros (lomo adobado). Este tipo de productos tienen un comportamiento similar al de la carne fresca en cuanto a la conservación. En una realización más particular, la muestra se obtiene de jamón y/o lomo.

La detección del polimorfismo o polimorfismos según el segundo método de la invención se puede llevar a cabo usando cualquiera de los métodos de genotipado descritos en el contexto del primer método de la invención. En una forma preferida

- nucleótido en posición 2281 del gen *SCD* de *S. scrofa domestica* en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la base de datos NCBI en el gen *SCD* de *Sus scrofa domestica* el gen o en una variante polimórfica en posición 2281 de dicha secuencia. En una forma de realización más preferida, la sonda específica de alelo comprende la secuencia SEQ ID NO:16 y permite detectar variantes del gen *SCD* en donde el nucleótido que ocupa la
- 5 posición 2281 del gen *SCD* es una G. En otra forma preferida de realización, la sonda específica de alelo comprende la secuencia SEQ ID NO:17 y permite detectar variantes del gen *SCD* en donde el nucleótido que ocupa la posición 2281 del gen *SCD* es una A. Preferiblemente, las sondas se encuentran marcadas en uno de sus extremos con un compuesto fluorescente. En una forma de realización aún más preferida, el compuesto fluorescente es VIC o 5-carboxifluoresceína (5-FAM).
- 10 En otra forma preferida de realización, el método de genotipado de acuerdo a la presente invención comprende la amplificación de la región o las regiones del gen *SCD* de *S. scrofa domestica* que contiene la posición polimórfica o las posiciones polimórficas a caracterizar. En el caso del polimorfismo en posición 2281, en una forma preferida de realización, la amplificación de la región se lleva a cabo usando un par de cebadores en donde el primer cebador comprende la secuencia definida en SEQ ID NO:14 y/o en donde el segundo cebador comprende la secuencia definida en SEQ ID NO:15.
- 15 De acuerdo con el segundo método de la invención, la presencia del nucleótido A en la posición 2281, del nucleótido T en la posición 2228 y/o el nucleótido A en la posición 15109 en al menos un alelo del gen *SCD* se asocia con un grado de insaturación elevado en la grasa intramuscular de un animal. El grado de insaturación se relaciona con el número de alelos favorables. Así, en el caso del polimorfismo en posición 2281, animales homocigotos para el alelo A muestran un mayor grado de insaturación en la grasa que animales heterocigotos AG, y éstos mayor que los animales homocigotos GG.
- 20 La expresión “grado de insaturación elevado”, tal y como aquí se utiliza hace referencia a que los valores del grado de insaturación se encuentran elevados con respecto a valores de referencia para dicho grado de insaturación. De acuerdo con la presente invención, se considera que el grado de insaturación es elevado con respecto a un valor de referencia cuando los niveles en la muestra del sujeto están aumentados al menos un 0,8%, al menos un 0,85%, al menos un 0,9%, al menos un 0,95%, al menos un 1%, al menos un 1,5%, al menos un 2%, al menos un 3%, al menos un 4%, al menos un 4%, al menos
- 25 un 5%, al menos un 6%, al menos un 7%, al menos un 8%, al menos un 9%, al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 100% o más con respecto a un valor de referencia para dicho parámetro
- Valores de referencia para el grado de insaturación que se pueden usar en el contexto de la presente invención incluyen, por ejemplo, el grado de insaturación en animales que presentan uno o más marcadores asociados con un bajo grado de
- 30 insaturación. Así, en una forma preferida de realización, se toma como valor de referencia el grado de insaturación de la grasa intramuscular o de la grasa subcutánea obtenida de un cerdo en el que es homocigoto para el nucleótido G en posición 2281 del gen *SCD*, el grado de insaturación de la grasa intramuscular obtenida de un cerdo en el que es homocigoto para el nucleótido C en la posición 2228 y/o el grado de insaturación de la grasa intramuscular obtenida de un cerdo en el que es homocigoto para el nucleótido G en la posición 15109. Alternativamente, se puede tomar como valor de
- 35 referencia el grado de insaturación de la grasa intramuscular o subcutánea obtenida de un cerdo en el que es homocigoto para varias de las posiciones polimórficas que se correlacionan con un bajo índice de insaturación.
- Además, los inventores también han observado que cuando el sujeto presenta en uno o varios de los SNPs de acuerdo con la presente invención, el nucleótido indicativo de un grado de insaturación de ácidos grasos elevado (alelo beneficioso) en los dos alelos (es decir, el sujeto es homocigótico para el SNP asociado con un grado de insaturación de ácidos grasos elevado),
- 40 se ve incrementado el grado de insaturación de ácidos grasos con respecto a un sujeto que presente dicho alelo beneficioso en solamente uno de los alelos del gen. Así pues, en otra realización particular, el método de la invención implica detectar al menos un SNP el nucleótido en al menos una posición polimórfica en el gen *SCD* de *Sus scrofa domestica* en donde dicha posición polimórfica se selecciona del grupo formado por las posiciones 2281, 2228 y 15109 en base a la numeración de la

secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la base de datos NCBI y en donde la presencia en los dos alelos del gen SCD del nucleótido A en la posición 2281, del nucleótido T en la posición 2228 y/o el nucleótido A en la posición 15109 en al menos un alelo del gen SCD es indicativa de un grado de insaturación de ácidos grasos elevado con respecto al valor de referencia.

5

Métodos de selección de cerdos con elevado contenido en ácidos grasos monoinsaturados en la grasa muscular y subcutánea.

La identificación de polimorfismos que se asocian de forma significativa con un elevado grado de insaturación en la grasa intramuscular y subcutánea permite el desarrollo de métodos para seleccionar cerdos que presentan dicha característica mediante cruce de cerdos con dichos polimorfismos y selección de aquellos cerdos de la progenie que hayan heredado el polimorfismo beneficioso. Así, en otro aspecto, la invención se refiere a un método para seleccionar cerdos con un elevado grado de insaturación de ácidos grasos en la grasa intramuscular y/o subcutánea que comprende:

10

- (i) cruzar un cerdo que presenta una A en posición 2281 del gen SCD, una C en la posición 2228 y/o una A en la posición 15109 en al menos un alelo del gen SCD en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la base de datos NCBI, seleccionado en la etapa (i) con un cerdo del sexo opuesto; y

15

- (ii) seleccionar aquellos individuos de la progenie que presenten al menos uno de los polimorfismos indicados en la etapa (i).

En una primera etapa, el método de selección y crianza de cerdos con elevado contenido en ácidos grasos monoinsaturados comprende cruzar un cerdo que presenta una A en posición 2281 del gen SCD, una C en la posición 2228 y/o una A en la posición 15109 en al menos un alelo del gen SCD en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la base de datos NCBI, seleccionado en la etapa (i) con un cerdo del sexo opuesto.

20

El término "cruce" se refiere aquí tanto a procedimientos basados en el apareamiento espontáneo como a procedimientos de inseminación artificial usando métodos conocidos en la técnica.

25

En una forma preferible de realización, tanto el cerdo del sexo opuesto usado en la etapa (i) presenta una A en posición 2281 del gen SCD, una T en la posición 2228 y/o una A en la posición 15109 en al menos un alelo del gen SCD en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la base de datos NCBI. El experto en la materia entenderá que cuando los dos progenitores presentan polimorfismos favorables a un alto grado de insaturación de la grasa muscular o subcutánea, la etapa (i) puede llevarse a cabo cruzando cerdos que presenten el mismo polimorfismo, de forma que se pueda obtener progenie homocigota para dicho polimorfismo favorable. Alternativamente, la etapa (i) puede llevarse a cabo cruzando cerdos que presenten distintos polimorfismos favorables a un alto grado de insaturación de la grasa muscular o subcutánea, de forma que la progenie incorpore los distintos polimorfismos. Alternativamente, la etapa (i) puede llevarse a cabo cruzando cerdos que presenten los mismos polimorfismos, de forma que se pueda obtener progenie homocigota para todos los polimorfismos en un solo ciclo de cruce y selección.

30

35

En una segunda etapa, el método de selección y crianza de cerdos con elevado contenido en ácidos grasos monoinsaturados de acuerdo a la invención comprende seleccionar aquellos individuos de la progenie que presenten al menos uno de los polimorfismos indicados en la etapa (i). La selección se lleva a cabo preferiblemente mediante el genotipado de los miembros de la progenie, usando preferiblemente alguno de los métodos descritos anteriormente en el contexto de métodos de genotipado. La selección puede ser también de una naturaleza "virtual", tal que el genotipo de un animal se graba en una base de datos portátil o un ordenador. Aquí, los animales podrían ser seleccionados en base a su genotipo conocido sin la necesidad de separación física. Esto permitiría una para seleccionar a los animales de fenotipo deseado, donde la separación física no es necesaria.

40

En una forma preferida de realización, el genotipado se lleva a cabo mediante hibridación con sondas específicas de alelo capaces de detectar el nucleótido en posición 2281 del gen *SCD* de *S. scrofa domestica* en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en la base de datos NCBI en el gen *SCD* de *Sus scrofa domestica* el gen o en una variante polimórfica en posición 2281 de dicha secuencia. En una forma de realización más preferida, la sonda específica de alelo comprende la secuencia SEQ ID NO:16 y permite detectar variantes del gen *SCD* en donde el nucleótido que ocupa la posición 2281 del gen *SCD* es una G. En otra forma preferida de realización, la sonda específica de alelo comprende la secuencia SEQ ID NO:17 y permite detectar variantes del gen *SCD* en donde el nucleótido que ocupa la posición 2281 del gen *SCD* es una A. Preferiblemente, las sondas se encuentran marcadas en uno de sus extremos con un compuesto fluorescente. En una forma de realización aún más preferida, el compuesto fluorescente es VIC o 5-carboxifluoresceína (5-FAM).

La selección de la etapa (ii) permite identificar cerdos que comprenden una A en posición 2281 del gen *SCD*, una T en la posición 2228 y/o una A en la posición 15109 en al menos un alelo del gen *SCD* en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830. En una forma preferida de realización, cuando ambos progenitores presentan los alelos favorables asociados a un alto grado de insaturación de la grasa muscular o subcutánea, la segregación de los alelos de acuerdo a las leyes de genética Mendeliana permite que algunos miembros de la progenie presenten el polimorfismo favorable en ambos alelos. Así, en otra forma preferida de realización, la etapa (ii) comprende la selección de aquellos cerdos que comprenden una A en posición 2281 del gen *SCD*, una T en la posición 2228 y/o una A en la posición 15109 en ambos alelos del gen *SCD* en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830.

En una forma preferida de realización, el método de selección de cerdos de acuerdo a la invención comprende retrocruzar un cerdo seleccionado en la etapa (ii) con un cerdo del sexo opuesto. Preferiblemente, el cerdo con el que se retrocruzan los individuos seleccionados en la etapa (ii) son cerdos que comprenden uno o más de los distintos polimorfismos marcadores de alto grado de insaturación de la grasa muscular o subcutánea y, en particular, una A en posición 2281 del gen *SCD*, una T en la posición 2228 y/o una A en la posición 15109 en base a la numeración de la secuencia definida por el número de acceso AY487830 en al menos uno de los alelos del gen *SCD*. En una forma preferida de realización, los cerdos que se usan para retrocruzar con los cerdos seleccionados en la etapa (i) pertenecen a la misma camada.

La invención se describe por medio de los siguientes ejemplos que deben ser considerados como meramente ilustrativos y no limitantes del alcance de la invención. Los siguientes métodos son comunes a todos los ejemplos

EJEMPLOS

MÉTODOS

1. Estudio poblacional

Para el estudio de la variabilidad genética del gen *SCD* porcino, se secuenció unas 780 pares de bases de la región promotora y la totalidad de la región 3' no codificante (3'UTR) en 12 cerdos de la raza Duroc del banco de muestras de la Universidad de Lleida. De todos los cerdos Duroc analizados (335 sujetos) se disponía de muestra de ADN y del registro del contenido en 11 ácidos grasos en al menos un músculo. Los 12 cerdos que se eligieron como muestra poblacional de este estudio fueron escogidos de manera que 6 de ellos tenían los valores de ácido oleico, en músculo semimembranosos y glúteo medio, más elevados de entre todos los registrados (73.7 y 101.7 mg/g de materia seca) y, los 6 restantes contenían los valores más bajos de los registrados para dicho ácido (49.3 y 12.2 mg/g de materia seca).

Para secuenciar el gen *SDC* se amplificaron mediante PCR seis fragmentos de ADN de entre 780 y 1000 pares de bases a partir de los cebadores detallados en la Tabla 2.

SONDA	SECUENCIA 5'-3'	SEQ ID NO:	TAMAÑO DEL AMPLICÓN (pares de bases, pb)
Promoter-F	ACTTCCCTAGTGCCCATCCT	2	890
Promoter-R	GATCACTTTCCCAGGGATGA	3	
3UTR_F1	AAGTATCCAAGGGCTGCCATC	4	866
3UTR_R1	CAATTCCGGAAAGAACCTCA	5	
3UTR_F2	TGGGGAAGAAGTCTTTCTTGT	6	990
3UTR_R2	GGTTCAGTGACCCTGAGCAT	7	
3UTR_F3	TTTCCTGCCGGTTCTATCTC	8	945
3UTR_R3	GAGTAGGTGCTTGGGTCTGG	9	
3UTR_F4	ATGGAGGATAAAGGGGTTGG	10	648
3UTR_R4	ACTTGCCCAGGGTCACATAG	11	
3UTR_F5	GTCAAGGTTACACGGGTGGT	12	742
3UTR_R5	CAGGACATAGGGTGGCAGAT	13	

Tabla 2: Sondas (cebadores) utilizadas para la amplificación mediante PCR de seis fragmentos del gen *SCD* porcino.

2. Genotipado de la mutación SNP3 en el promotor del gen *SCD* porcino

Se procedió a detectar el polimorfismo de la invención SNP3 en 635 cerdos castrados de raza Duroc del banco de muestras de la Universidad del Lleida de los que se disponía de datos de contenido y composición de la GIM. Los cerdos genotipados se criaron en 7 lotes distintos. El genotipado se realizó mediante un protocolo de discriminación alélica en un aparato de PCR a tiempo real. Los cebadores y las sondas empleadas se indican en la Tabla 3 junto con las concentraciones finales utilizadas.

SONDA	SECUENCIA 5'-3'	SEQ ID NO:	CONCENTRACIÓN FINAL
Cebador directo	TGCCAGCTCTAGCCTTTAAATACC	14	900 nM
Cebador reverso	CACGTTGGGTTCGGTGTGTCT	15	900 nM
Sonda para el alelo G	VIC-ACCCGCGCACAGCA-NFQ	16	200 nM
Sonda para el alelo A	FAM-AGACCCACGCACAGCA-NFQ	17	200 nM

Tabla 3: Sondas utilizadas en el genotipado de SNP3 del promotor del gen *SCD* porcino.

La reacción de PCR incluía los cuatro cebadores, a las concentraciones indicadas en la Tabla 3, 1x Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas) y 10 ng de ADN genómico. El genotipo de asignaba según la acumulación de fluorescencia verde (correspondiente al fluorocromo VIC de la sonda que hibrida con el alelo G) y/o azul (FAM, alelo A) durante los ciclos de PCR. Todo cerdo genotipado fue clasificado como de genotipo GG, AG o AA.

3. Determinación del contenido y la composición de la grasa

Todas las muestras de músculo o grasa fueron identificadas, liofilizadas y pulverizadas. A partir de una alícuota de cada una de ellas, se determinó en duplicado el contenido en los ácidos grasos C14:0, C16:0, C16:1n-7, C18:0, C18:1 n-9, C18:2 n-6, C18: 3 n-3, C20:0, C20:2n-6, C20:4n-6 y C20:1n-9 mediante cromatografía de gases cuantitativa según se ha descrito en Bosch et al. (Meat Science, 2009, 82: 432-437). Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se obtuvieron por transesterificación directa a partir de una solución al 20% de trifloruro de boro en metanol y se determinaron por

cromatografía de gases mediante una columna capilar SP2330 (30mx 0.25 mm, Supelco, Bellefonte, PA) y un detector de ionización en llama con helio como gas portador a 1 mL/min. El contenido de cada ácido graso se cuantificó normalizando el área después de añadir a cada muestra 1,2,3-tripentadecanoilglicerol como patrón interno. El porcentaje de GIM en un músculo se calculó a partir del cociente entre la suma del contenido de todos los ácidos grasos determinados, expresados estos en su equivalente triglicérido, respecto al contenido de materia seca de la muestra. El porcentaje de cada ácido graso respecto del total de ácidos grasos se calculó como el cociente entre el contenido de ese ácido graso en particular relativo al total de ácidos grasos. El porcentaje de MUFA se calculó como el cociente entre la suma de los MUFA (C16:1 n-7, C18: 1n-9 y C20:1 n-9) respecto al contenido total de ácidos grasos. El porcentaje de ácidos grasos saturados se calculó como el cociente entre la suma de los ácidos grasos saturados (C14:0, C16:0, C18:0 y C20:0) respecto al contenido total de ácidos grasos.

Se calculó de forma específica el grado de insaturación ID como el cociente entre el contenido de C18:1 respecto al de C18:0.

EJEMPLO 1: Asociación entre el genotipo del SNP3 del gen SCD y el ID de la carne y la grasa subcutánea del cerdo.

Se contrastaron en 7 lotes diferentes, las medias de los tres genotipos posibles del SNP3 (GG, GA, AA) para el contenido de GIM e ID en el músculo glúteo medio del jamón mediante un modelo lineal que incluyó el genotipo como único factor. En la Tabla 4 se representan las medias de GIM e ID por genotipo, así como el valor p asociado al correspondiente análisis de varianza.

				GIM				ID (C18:1/C18:0)			
				Genotipo				Genotipo			
Lote	Año	N	f(A)	AA	AG	GG	p	AA	AG	GG	p
1	2006	109	0,44	14,50	14,64	14,97	0,91	5,93	5,90	5,37	<0,01
2	2007	100	0,46	15,89	15,76	16,70	0,74	4,92	4,54	4,29	<0,01
3	2008	66	0,44	16,52	15,15	16,31	0,40	5,96	5,12	4,54	<0,01
4	2008	72	0,38	13,58	11,61	12,26	0,21	4,35	3,77	3,50	<0,01
5	2010	85	0,39	14,76	15,27	13,84	0,54	4,35	4,34	3,92	<0,05
6	2010	96	0,49	13,63	14,41	15,51	0,41	4,34	4,04	3,71	<0,01
7	2011	86	0,48	18,78	17,66	16,91	0,41	3,98	3,82	3,73	<0,05
Total		614	0,44	15,27	14,92	15,18	0,72	4,80	4,51	4,15	<0,01

Tabla 4: Efecto del genotipo de SNP3 sobre el contenido de GIM e ID en el músculo glúteo medio.

Se observa de forma consistente en todos los lotes que el alelo A no afecta el contenido de GIM pero mejora el ID. El efecto del alelo A en el conjunto de todos los lotes (Total) se estimó mediante un modelo lineal que incluyó el lote además del genotipo.

Análisis similares realizados sobre la asociación entre el genotipo de SNP3 y GIM e ID en los músculos longuísimo dorsal y semimembranosos confirmaron el mismo efecto, es decir, el alelo A de dicho SNP no aumenta el contenido en GIM pero mejora el ID.

Análisis similares realizados sobre la asociación entre el genotipo de SNP3 y el espesor de la grasa dorsal confirmaron el mismo efecto, es decir, el alelo A de dicho SNP no aumenta el espesor de la grasa dorsal pero mejora el ID.

EJEMPLO 2: El SNP3 tiene un modo de acción génica aditivo.

Se comprobó dentro de cada lote el modo de acción génica de SNP3 sobre ID mediante un modelo con una covariable aditiva (a) y una de dominante (d), en el que la variable a toma los valores 1, 0, y -1 y la variable d los valores 0, 1 y 0, según sea el genotipo AA, AG y GG, respectivamente. En la Tabla 5 se presentan los valores de a y d para ID, así como el valor p asociado a cada una de ellas.

ID				
Lote	a	p-valor	d	p-valor
1	0,28	<0,01	0,25	0,06
2	0,31	<0,01	-0,07	0,52
3	0,71	<0,01	-0,13	0,56
4	0,43	<0,01	-0,15	0,07
5	0,22	<0,05	0,21	0,16
6	0,32	<0,01	0,02	0,81
7	0,13	<0,01	-0,04	0,56
total	0,32	<0,01	0,03	0,50

Tabla 5: Efecto aditivo (a) y dominante (d) del genotipo SNP3 del gen SCD porcino sobre el ID en el músculo glúteo medio.

Se observa de forma consistente en todos los lotes que el modo de acción de SNP es estrictamente aditivo de forma que ID aumenta entre 0,13 y 0,71, según el lote, por cada alelo A presente en el genotipo. El efecto medio del alelo A en el conjunto de todos los lotes (total) se estimó mediante el mismo modelo pero añadiendo el efecto lote. En media cada alelo A aumenta 0,32 puntos ID.

EJEMPLO 3: Asociación entre el genotipo del SNP3 del gen SCD porcino y el porcentaje de MUFA y C18:1 en la grasa del cerdo y con otras características comerciales.

Se contrastó el efecto del genotipo SNP3 sobre, el porcentaje de MUFA y C18:1 en músculo y grasa subcutánea, por ser los dos caracteres relacionados con ID que más afectan comercialmente la calidad de la carne y la grasa del cerdo. El contraste se realizó mediante un modelo lineal que incluyó el genotipo y el lote con la covariable GIM. En la Tabla 6 se presentan las medias de los caracteres anteriores según el genotipo de SNP3 y sus efectos aditivo y dominante, así como los correspondientes valores p asociados.

Item	n	Genotipo			p	Valor aditivo y dominante			
		AA	AG	GG		a	p	d	p
Edad (días)	617	209,1	209,0	209,2	0,90	-0,01	0,98	-0,17	-0,65
Peso canal (Kg)	614	93,42	94,31	93,60	0,55	-0,09	0,86	0,080	0,27
Espesor de grasa (mm)	582	22,24	22,49	22,49	0,80	-0,12	0,56	0,13	0,67
Magro (%)	582	44,39	43,87	43,95	0,59	0,22	0,44	-0,30	0,44
Peso del jamón (Kg)	611	12,02	12,19	12,09	0,35	-0,03	0,60	0,13	0,16
Jamón (m. gluteus medius)									
GIM(%)	615	15,29	14,95	15,20	0,73	0,04	0,87	-0,29	0,43
MUFA (%)	615	15,42	50,45	49,48	<0,01	0,97	<0,01	0,01	0,97
C18:1 (%)	615	46,61	46,02	45,28	<0,01	0,66	<0,01	0,08	0,61
Lomo (m. longissimus dorsi)									
GIM (%)	236	11,30	11,39	11,11	0,85	0,10	0,76	0,18	0,69
MUFA (%)	236	52,58	51,30	51,50	<0,01	1,078	<0,01	-0,26	0,25
C18:1 (%)	236	56,61	46,58	46,12	<0,01	0,77	<0,01	-0,30	0,16
Grasa subcutánea									
MUFA (%)	103	51,44	50,26	49,68	0,11	0,88	0,04	-0,30	0,59
C18:1 (%)	103	47,81	46,69	46,26	0,13	0,78	0,05	-0,34	0,52

Tabla 6: Efecto del genotipo de SNP3 y efectos aditivo (a) y dominante (d) del genotipo de SNP3 del gen SCD porcino sobre los caracteres productivos y el contenido de MUFA y C18:1 en carne y grasa subcutánea.

Se constata que en media, cada alelo A aumenta un 1% (0.75%) el porcentaje de MUFA (C18:1) en jamón, lomo y grasa subcutánea, de tal forma que substituir un cerdo o producto cárnico de genotipo GG por uno de genotipo AA mejora el porcentaje de MUFA y C18:1 en un 2% y un 1,5%, respectivamente.

5 En la Tabla 6 también se observa que el alelo A del SNP3 no afecta al peso de la canal ni del jamón (valores de elevada importancia comercial), así como tampoco al porcentaje de magro de la canal ni al contenido de GIM.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polinucleótido aislado que comprende una región de al menos 10 nucleótidos consecutivos de una variante polimórfica del gen *SCD* de *Sus scrofa domestica*, caracterizada por la presencia de una A en posición 2281 en base a la numeración de la secuencia SEQ ID NO: 1 y en donde dicha región comprende el nucleótido en posición 2281, o un polinucleótido complementario a dicho polinucleótido.
- 10 2. Una sonda capaz de detectar el nucleótido en posición 2281 del gen *SCD* de *S. scrofa domestica* en base a la numeración de la secuencia SEQ ID NO: 1 en el gen *SCD* de *Sus scrofa domestica* o de una variante polimórfica en posición 2281 de dicha secuencia, en donde la sonda comprende la secuencia SEQ ID NO: 16 o la secuencia SEQ ID NO: 17
- 15 3. Una sonda según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde dicha sonda está marcada en uno de sus extremos con un compuesto fluorescente.
4. Una sonda según la reivindicación 5, en donde dicho compuesto fluorescente es VIC o 5-carboxifluoresceína (5-FAM).
5. Un kit que comprende una sonda según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.
- 20 6. Un kit para detectar el polimorfismo en posición 2281 del gen *SCD* de *S. scrofa domestica* en base a la numeración de la secuencia SEQ ID NO: 1 que comprende un primer y un segundo cebador complementarios a secuencias en el gen *SCD* en posición 5' y 3' con respecto a dicha posición, en donde el primer cebador comprende la secuencia definida en SEQ ID NO: 14 y/o en donde el segundo cebador comprende la secuencia definida en SEQ ID NO: 15.
- 25 7. Un método para genotipar un sujeto que comprende detectar en una muestra de dicho sujeto el nucleótido que ocupa la posición 2281 en el gen *SCD* de *S. scrofa domestica* en base a la numeración de la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 30 8. Método según la reivindicación 7, en donde la detección del nucleótido en la posición o posiciones polimórficas se realiza mediante secuenciación, mini-secuenciación, hibridación, análisis de los fragmentos de restricción, PCR, PCR cuantitativa, PCR-alelo específica o una combinación de dichos métodos.
- 35 9. Método según la reivindicación 8, en donde la detección del nucleótido en la posición o posiciones polimórficas de dicho SNP comprende la hibridación con al menos una sonda específica para dicho SNP.
10. Método según la reivindicación 9, en donde al menos una de dichas sondas específicas es una sonda según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.
- 40 11. Método para predecir el grado de insaturación de ácidos grasos en un sujeto o un derivado del mismo, que comprende detectar en una muestra de dicho sujeto o de dicho derivado cárnico el nucleótido en la posición polimórfica 2281 en el gen *SCD* de *Sus scrofa domestica* en base a la numeración de la secuencia SEQ ID NO: 1 y en donde la presencia del nucleótido A en dicha posición 2281, en al menos un alelo del gen *SCD* es indicativa de un grado de insaturación de ácidos grasos elevado con respecto al valor de referencia.
12. Método según la reivindicación 11, en donde la presencia del nucleótido A en la posición 2281, en los dos alelos del gen *SDC* está asociada a un grado de insaturación de ácidos grasos elevado con respecto al valor de referencia.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12 en donde la detección del nucleótido en la posición o posiciones polimórficas se realiza mediante secuenciación, mini-secuenciación, hibridación, análisis de los fragmentos de restricción, PCR, PCR cuantitativa, PCR-alelo específica o una combinación de dichos métodos.
- 5 14. Método según la reivindicación 13, en donde la detección de nucleótido en la posición o posiciones polimórficas dichos SNPs comprende la hibridación con al menos una sonda específica para dichos SNPs.
- 10 15. Método según la reivindicación 14, en donde al menos una de dichas sondas específicas es una sonda según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15, en donde la muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre, pelo, epidermis, saliva, esperma, grasa subcutánea, músculo y de derivados cárnicos de dicho sujeto.
- 15 17. Método según la reivindicación 16, en donde el músculo se selecciona de músculo de glúteo medio del jamón, músculo longuísimo dorsal y músculo semimembranoso.
18. Método según la reivindicación 17, en donde el derivado cárnico es jamón o lomo.
- 20 19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18, en donde se determina el grado de insaturación de ácidos grasos en la grasa intramuscular.
20. Método según la reivindicación 19, en donde la grasa intramuscular se determina en un musculo seleccionado del grupo formado por músculo de glúteo medio del jamón, músculo longuísimo dorsal y músculo semimembranoso.
- 25 21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 20, en donde el sujeto es un mamífero.
22. Método según la reivindicación 21, en donde el mamífero es un cerdo.
- 30 23. Método según la reivindicación 22, en donde el cerdo es de la raza Duroc.
24. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6 para determinar si un sujeto presenta al menos un SNP asociado con un grado de insaturación de ácidos grasos elevado.
- 35 25. Uso del kit según la reivindicación 24, en donde el sujeto es un mamífero.
26. Uso del kit según la reivindicación 25, en donde el mamífero es un cerdo.
27. Uso del kit según la reivindicación 26 en donde el cerdo es de la raza Duroc.
- 40 28. Método para seleccionar cerdos con un elevado grado de insaturación de ácidos grasos en la grasa intramuscular y/o subcutánea que comprende:

- 5
- (i) cruzar un cerdo caracterizado por presentar una A en posición 2281 del gen *SCD* en al menos un alelo del gen *SCD* en base a la numeración de la secuencia SEQ ID NO: 1 con un cerdo del sexo opuesto; y
 - (ii) seleccionar aquellos individuos de la progenie que presenten al menos uno de los polimorfismos indicados en la etapa (i).
29. Método según la reivindicación 28, en donde el cerdo del sexo opuesto usado en la etapa (i) presenta una A en posición 2281 del gen *SCD*, en al menos un alelo del gen *SCD* en base a la numeración de la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 10 30. Método según las reivindicaciones 28 ó 29 que comprende, además una etapa adicional que comprende retrocruzar el cerdo seleccionado en la etapa (ii) con otro cerdo del sexo opuesto.
- 15 31. Método según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 31 en donde la selección de cerdos en la etapa (i) y/o (iii) y/o en donde la selección del cerdo del sexo opuesto se lleva a cabo mediante el método de acuerdo a las reivindicaciones 7 a 10.

ES 2 452 791 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSITAT DE LLEIDA

<120> POLIMORFISMOS ASOCIADOS CON EL GRADO DE INSATURACIÓN DE LA GRASA INTRAMUSCULAR EN CERDOS

<130> P8396ES00

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20985

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 1

tctagaccct ttgaatttcc acttaaatTT tagaatctgc ttgtctatTT cctcaaagaa 60

atctgttTga tttctatagt gattaaatta atctatagat caacactgag tctgtccatt 120

tatgaacaca gaataataaca aattctTTTT ttctctctat ttaagagttt taaagttttt 180

ctcagcattg ttttgatact ttcagtgtag ctatcctata aacattttaga tttattcttt 240

gtgacatttt tgatgttctt ttaatttttg ttttttttagg gccgcacctg tggcacatga 300

agttcctggg ccaggggtcg aatcagagcc aaagctacca gcctatacca ccaccatagc 360

aacgccaggt ctggaccgca tctgtgatgt acgccggagc tcgtgacaat gccagatcct 420

taaccactg agcaaggcca gcatgtaacc cacaacctcg tggacactag tcgagttctt 480

aaccgctga gccacaagga gaactccatt tttgatgcta ttttaaacag tatattttta 540

atttcattct gcaattgttt tttaatagaa tataggacag aataattttt ttatactggT 600

ttctatcttg accttttctaa attcacttac caattttgac acttttttgT tggtagattc 660

tatacatTTT tcatacacac agttaggtct tctgcaaata ataacagttt ctttcttctt 720

ttcctatctt tatatctttc atttctTTTT tctgtccat catgcaacct aggatttcta 780

gcacaatgtt gactagaaat ggtagacgat tatatgcttg cctgttctct taaggggaaa 840

tttttttttt ttttttttgT tctttttaag cctgcacca tggctaggaa ctgtagctgc 900

tggcctatgc cacagccaca gcaaacactg atccgaactg tatctgtgac ctacaccaca 960

gctcatggct atgccagatc cttaaccac tgagcgaggc cagggatcga accctcgacc 1020

tcacggttcc tagtcggatt cgtctccgct gcgcacaac gggaactccc acgactaatg 1080

attaagtaaa atgattcttg tggactgact tgcctaataa ttctatagct gatagctatt 1140

tttgtccac ttacaagtcc ttttgctgc ttctggatga aggcacacgc tgcgcttct 1200

cccttttctc atgaaagcca ttccaaaatt acaactcgac aatctgaaga atttccaaaa 1260

ES 2 452 791 B1

catcccgcac acgttcgggg tggggggggg gcggtgggcac aaggacggga tcgctcactg 1320
gtgcctggcg gcgaacgtcc cctgctgggc ttgcctagta gctgaacgcc gtgcgcgcgt 1380
gcagggtccac acatctatct atgcatctac gtgtgtgtac acggctgccg gcctggagac 1440
cggcgagttc agcagtacgc atctatcgcc ccgcccagcag tgggcggcgc agagccattg 1500
ttccgcgcgc ggccgaccct cagcccctgc ggcacgcgcg ttcgtcacgg agggaggtgg 1560
ggcttcgccg ggccccggc ccccaacccg gggtttgaag gcacgtctcc ccctcccacg 1620
cgtctccgcg agctagaagg cgggagtggg gttgtgcgta gcggtcgccc gcgcggcttc 1680
acccacactt tccccgaaa cttccctagt gccatcctt tcgcgaagtg cccagggcc 1740
agtcctgggc tagcaccac ctcccacccc cctactgagt cctcttctc ttccagggaa 1800
gacgtctctg agcgctccg aggaggcagg acgcccggca gaagcccagc ggccggtgga 1860
agagaagctg aggaggagaa agggagggga gggggagtga ggagctcgcg gcagagggaa 1920
cagcagattg cgccgagcca atggcaacgg caggacgagg tggcaccaa ttcccttcgg 1980
ccaatgacgc gccagagtct acagaagccc attagcattt cccaggggc aggggcagag 2040
gcaggggctg cggagaccga gccgcggagt gtctgcagca tccagttttt gcgtctccg 2100
ccccagcaa gccccggctc tctgtctcct cccctctccc gccatgcgg ttctcccacg 2160
gtgagccaac tctgcgcact ttgcccctt ttggcagcga ataaaagggg tcagaggaaa 2220
tacaggatac ggtcgcccac tgccagctct agcctttaa taccagcct ggggagacc 2280
acgcacagca ggtcgggtgc agacaccgac ccaacgtgca gcaaaggggt ccgagcgag 2340
catcgctgat ctccgcgcaa gagccggctc cagcactagt ctacgctcag tgcggtctgc 2400
cacgaactcc tccctgaagt ctcatccctg ggaaagtgat cccaacgtcc gagagcccag 2460
atgccggccc acttgctgca agaggaggtg agtttccaag taatggcccc cagaccgcgg 2520
gctcgccagt gctggttggg cttctaggtg actcgggtga gaagagagtt gagatcgccg 2580
aggacagcca cttttttcga gttgtatagt cttcagttt ttgggaatgt ggattgtaat 2640
ttgggaactt agttctccaa cttttgttt ctaaagctt aaagaaaaat ctggtggtac 2700
ctgtaccctg atgtgtgtag gcatgcgggc tttcctttgt gtgtttgaag ggggtcgagt 2760
gttttaccac tctatttccc cttcccctga ggtttcacc tctccccaa tttctccgca 2820
cagttcctgg ggacttgct ctcttccatc taggatagac cttgccctca ggtaacctgg 2880
gtattggggc caggtctgtg cctatacccc gcccttcccc cagctagacc agggagtga 2940
gtggccccca gtgtctccac gtgtcctccc ctctctccca gctctgact tccactctct 3000
ttcagatctc tagctcctac acaaccacca ctaccatcac agcaccttc tccaggttcc 3060

ES 2 452 791 B1

tgcagaatgg agggggcaag ttggagaaga ctccccaata cgtggaagaa gacatccgcc 3120
 ctgaaatgaa agatgacatc tatgacccaa cctaccagga taaggagggc ccaaggccca 3180
 agcttgaata tgttttgaga aacatcatcc tcatgagtct gctacacttg ggagccctgt 3240
 atgggatcat attgatcccc acctgcaaga tatacacctt gctctggggg aagaggtccc 3300
 cttgtcctcc tgtctcagta tcccagggtc tctccactct tttaatacag tagcaactta 3360
 cacagagtag aaacaccagc ccctccaggc cgagggtttt ccaaccattt ctcttaggtg 3420
 ttgtggtggg ctgggaaggg agtctagggg gtttgggatg caggagtgtc gattctgggg 3480
 cctttaattt gggggggggg ttggagaggg agccctggga ccatgggcca caggctttga 3540
 agtgagtaga tctgtgccag ggagtcagct tttctgtttc aagtcatttt cttgactgct 3600
 tgtcccagcc ctgccagcct agaaagaatc aaggccctta cctggatgca tgggaacatg 3660
 gggctagact agtgtgactt tagagggcac atgctgggta tagtcacggg gtagcaagag 3720
 aaactactca ggaagagggt taagcagaag aggggggaag agagctgtgg tcatccatga 3780
 aattattttg ccctgatcct tagccttatt aggtcctta attacacaga cagaggaagg 3840
 cggtcctgc ataactcatg ttacatggat gtcttgctct gtgactccac gtgggtctcc 3900
 agggaactgc acatgccact caagaaaatg ttctaataaa ataaggtaa agaaacgttt 3960
 cctgccccat tccccacca tctgtctcca gccctctcc cctgatgcca ggagtgcctc 4020
 cttgctgggg acagccaagc cagaaaagag actccggagc agccccggcc ctgaggctgc 4080
 tgcagtgagg gagacagtcc cccgtgctc cctgacctgc ccttagctca gctctttcag 4140
 gaatccatgg cttgggctga tagtgagacc ctgccccctc acacacatgc gctctgcagg 4200
 cattgccact cctgcctcga gtctgacttg ggaagaggag agcagggaac tctaaagatc 4260
 caggagctcc atgctgtctac cctctgtgat ggggtgtggg ttcagaactc cctgttcaga 4320
 aagccacggt atggtttctg gagcagtgtc ggatgttggg tccttgctgg cagctatgct 4380
 cttggagggt ggttctacag aaggactggt gggccaagtt tcagcaaagt cctccaggac 4440
 ctctttgatc taaagagggt ggatctggtc tgcggagcct tgtcttgga gatcctcttg 4500
 gtgccacaga cagagaaatg catctgggta gattccctct ctcaattttc ccagacacaa 4560
 actggggaca acaggacttt ttttaagctt agaaaggtag tgctcctctt ttggcctccc 4620
 tgaagcatgt ggagttgccg gaccggggat cagacctaa cctcagctgc agaatgccg 4680
 gatccttaac ccaccctacc aggccgggat tccacctgag tcccagcatt cccaagggtc 4740
 cgctgatccc gttgtgtctac agcggacatt ccaagaaagg tgctcctgga gttcctcgag 4800
 tgtcattgct ggggccagcc aggtgcagag gaaatcaatt catcctcaga ccaggaaggg 4860

ES 2 452 791 B1

ctcttataat tgtaagggga gggggacttc tgctccccag cccctctgag aaccagcag 4920
 agcttgagtt gcagtgtgag gaatcaagag ccagggacat ggatgcccc a ggaatctgt 4980
 gggctcccc cctgaccct tctccccat agaggagtct tcacaagttt agtcacttcc 5040
 aagtccccct ccagcctcag gactccctgt cggcctcgtt aagttccgag tttggccagg 5100
 cagctgctgc tggctcttct cccttggctg ctactgcagg ggacaggatg ctgtcccca 5160
 ccaaggctgt gcctgccgcc tttttggtgc cctgcctgta gatgtgtgct ctgcccttgg 5220
 acagaaacct gtcacacaga ctggatggtg acttttttac ttgtccctgg atcctgtggt 5280
 ggtggatggc ttagctgatg gaatgaccat tttggtatgg ccatatccga gctcctctgg 5340
 tggagttggg gggaggggtca gagttcccga accttaagag ttcaggaact tggcttcac 5400
 ttttcttgtc ttgtccctaa ggacagtgc gaattagcaa atggttgtga ttccagcatt 5460
 tgtcaggact gagcaatttt gagtgtctca gaagagccct gagggctgaa gcgatacctg 5520
 gcagcacctg ggggctctga ggcgaaacgt ctccaggctc ttccttaggg ctaaaactat 5580
 gaagttttgc ttaaccataa atctagactt tagtagagaa tgaatatcca actgacaggc 5640
 ttaggggtgc tggtagaaaa aggcaccaga gacttgggtg tttccccagg ttctctgtta 5700
 ggatcatatg tgcttccatt tttgtgcttt gcttttttag ggccacactt gcggcatatg 5760
 taagtccca ggctaggggt caaatgggag ctgcagttgc tggcctacac cacagccaca 5820
 gcaactccca cgtacaccac agttcatggc aatgctagat ctttaacca ctgagtgagg 5880
 ccaggcatca caccatgtc ctcatggata ctagttaggt tcgtaattca ctgagccaca 5940
 gtcagaactg cctgcgtgtg ctttctgagt cagcttgcca gggcttctcg ttgcatgtaa 6000
 ccacccagtg agcttccctgg gttctgagct acctcttctg tgctcaaaga ctttcttgg 6060
 cctttggtga ttggcgggct gcggctcaac tgttatttat ccagggtcag atgcaggcag 6120
 atgtgcctc tgggaggata ttaccacaag gcgggggagg ccagaaaatc acctggaccc 6180
 ctaatgcagc cccgaggacc gtgggtggca cttccctgag acagactctg gctccctggc 6240
 tctcctccct gtccctgtagg aggaataggc tagggtagag gaaggtgggt gggacagggg 6300
 gcttgtttag gaaactggtg tctgtggctg agaacacaag acaatgtgtt acaatgtgtg 6360
 gtgtctccaa ctgcaactaa gttcagtggc cactgaggat ccattgtttc tagctgcttc 6420
 cctaggaatg aaacattgtc aacagtcact gctctcccaa ggctcagcc tctgcctcct 6480
 agagctgctg aacagaggaa ggtgggtgtg ccagcaacc cgcctcccag ttagagactc 6540
 caacctgcac ccctagaacc tgcaggcccc caggaagatg aggtagacag cgctggggtg 6600
 cccccacca cagctttgag cctgccctac cgttgcctag aattaaccct gacgggggta 6660

ES 2 452 791 B1

tgagctgact gaggaaggtg gcaaaggaga gatgcaggag cgctgagagt atcttgggag 6720
 gggggggcat ggtaaaccat ctcgagccag ggctcaggag caccaagtag ttgttgacag 6780
 aacacctcat ttcaaaccat ggctccattt tttttttttt tttccttttg ctttttaggg 6840
 ccacaccttc ggcatatgga ggttcccagg ctaggggtct aatcagagct gtagccaccc 6900
 acctacacca cagccatagg aactcaggat ccgagccgca tctgagacct attccatagc 6960
 tctactgcaac gccagatcct taactcactg agtgatccca gggatcgaac atgcaacctc 7020
 atggttacta gttggattag tttttgctgc gccacaacag gaactcctat ggctcccttt 7080
 cttactagcc atgtggcctt agataaacac ttaatctttc tgagtgtcta tttctttggc 7140
 ttaaacccca tgcaaggtag ccagtgaatc aaagaataca gaaatctgga gttcccctta 7200
 tgtctcagcc gtaacgaacc tgactagtag ccataaggac tcgggttgat ccctggaccc 7260
 gctcagtgag ttaaatatcc agcattcctg taagctgtgg tgtgggttg agacacagct 7320
 ggggtctggc gtggctgtgg cgtacgttgg cggctgtggc tccaattcca cccctagcct 7380
 gggagcttcc atatgctggg gatgtggctc tagaaacaaa cacaacaaa caaacaaaaa 7440
 tccttggcaa agcttaagac tgtgcagata tgacttaggt gcaaggcgag ttttcccat 7500
 tctgtgacca cgcagtctgc caaaagactg aaatggtttt gtaccagatg gtaaataagct 7560
 ctagttctga gccccccccc cgccccccgc tgcccccat gtcccctaga acccagagtc 7620
 cctcaaactg gtcagtggc aggccatcct gtcttacata ttttaatact gcccttgttt 7680
 atgggtcttc agctctgcaa gactactctg tggctcctaa aactgtggag aagcttagtg 7740
 aaggtcagag gagatgggac ctgggataat gtccttcctg acagagaatg acaagtggct 7800
 ggagggtag agccctcttc tctgtccgc cttcctgaac tttctgggac ctgtaagctt 7860
 attccagctg tgaggctaag aggataggag gcgatggtaa tttttttcca agtggtaaaa 7920
 ttgaagggga ctaagagatc taggtgtccg tggagttcag ggaaaagcag atcctcacct 7980
 gcagcctgaa ggacacctag acgtgacct gaggagaaca tcacgtgtaa gacttgcccc 8040
 gattactgac tccctgtcct gtcttccggc agcgtttgcc tactatctgc tgagtgtctg 8100
 ggggtgtcacg gcaggagctc accgctgtg gagtcaccga acttacaag ctcgactgcc 8160
 cctgcgggtc ttctgatca ttgccaacac gatggcattc caggtaagaa gccagctgtg 8220
 ctcagctctt tatcaaacgc aggcgatggg tgcttggaag ggagcagcac ctggacagct 8280
 acttacttt cctctctgct tccagtcacc tcaagttcag gttcagtcct tgggtccata 8340
 acacctgcag tacttttgag tgactggaaa agggaaatag gggataaaga ggaaatagcc 8400
 tctgtgtata ggatcggttt cgagcctccg ttgtcacaca gtctggctgt tgtggctcct 8460

ES 2 452 791 B1

tcattagtgc acgaggcagg aactgaccct gatttcctag gcagccgttg gacaatacat 8520
 tcactatttt aggtgaacat ctgaggactc caccaaaagg gattaaagtt aatgtttcac 8580
 agattcatga accctattgt tttcagggtga gaagatcaaa cacttttata gtgttaacta 8640
 tacctcctgg ccctattctg agcacttgac aaggattaca ccattaagcc ctcccaacag 8700
 tcttaggagg ttggtactgt tgtgatcccc atttcacgga gggggaagct gtgtcactga 8760
 ggggtgtagg agaccatcat tatggctcctg tgttgagctg ccaagctgtc taagtcaa 8820
 attgaggtct gctgaagccg gaagctcata gcagggaatt ggagaaagg aactccgagt 8880
 tattgaacag cagcactggg caaaggctag catgttgtgt ggggcttagc ttggatcaag 8940
 gggcaaaaag aaggaaacca aatcggttcc tttcttcgtg gcagtgtctc acacagctgc 9000
 ataactgtct tctgccatag cacttaacgc cttgaaggcc cctgatgtgg tccctgttgg 9060
 ggcaaaagaa ggaagagata ttggcaccct ctctaagcga tagaaagtgt ccagaggag 9120
 ccagagagacc atttggaat gcggtcaa 9180
 catgattatg tgtctggcct tgttgagttg 9180
 tgggagctga atcttgccaa gggattaggc agcctgtgaa gacctttgc tccagttctt 9240
 gctggaagaa ttgcaat tttt acctcctagt gaaactcttc aagctctata caatccatct 9300
 ccattctgcc caccatataa cccgcaagaa gcagccagcc ctattcatgt ggtcctgaga 9360
 cttgaagggtg cttttccact taagcatcag tggccagtta gagaggaggc aactccctga 9420
 ctctcctttt ggagccctga ctcccaggta tttcgcgagc ttgggctgag cgcctcgggc 9480
 tcttgaagac acctagccat tggcattccc ctgagagggt gtctctctc aggcctccat 9540
 tcctcttctc tgtccctcca gaatgacgtt tatgaatggg cccgagatca ccgtgcccac 9600
 cacaagtttt cagaaacaga tgctgatccc cacaattccc gacgtggctt tttcttctct 9660
 cacgtggggt ggctgcttgt gcgcaaacac ccagccgtca aagagaaggg tggtttgctt 9720
 aacatgtctg acctaaaagc cgagaagctg gtgatgttcc agaggagggt agtgctgtgg 9780
 tgggtggagct gggcgctgg tgtttgggga caccctctcc cctccctgtt tttcttctta 9840
 ggacttgctc acataagctg ggaaactgac agggctctgcc taccctaaat cataattcaa 9900
 aacccttctt ttatgggcca cagccataga ctgttggtga ttcttctct ctgagctaaa 9960
 aaaaaaacca gttaagggtca acaatgtgtg ttgacctgtt acagtcattg atacaaagct 10020
 acatgttgcc atagtcctta cttcaagaa gttcatagcc tgttggggat gggagcacta 10080
 agccagggtg ccaaatacct atgacatggc aaaatatttt tctgtcccca ggaaaggcac 10140
 agaggggagg gagactgtgg agtggggaac attagagaag ggttttagga gaaggtagct 10200
 taggaatcca ctgggtggata gagat tttt caagtgttgg cggaggggga ggcagtgcaa 10260

ES 2 452 791 B1

acagaaagaa tgagctaaag catgaagcat gttccagcaa tagagtcctt ctgcttaaag 10320
 tacagggtgt ggtaggaaat aaagactaga gagaccgaga cctttcttgt ggggccttaa 10380
 gagcagacag ggtttaattc aactccagca ataggaaacc atggaagggt ttttgagccg 10440
 gaatgtggtc agagggtgtgc tctggagagg tcaccctgca gataggtgaa agaaaccatt 10500
 gggctgaaga ggtgagctgc agggccccag gtgaggaggt actgggcatc tgtgctgggg 10560
 aagtgggtggc acggagagga ggcgaaatgt ggggacacac gtgatccaag agtagcagac 10620
 ttgactgctg aagagggtgca ggaaatcagc tccctcgga tgtcagtagc ctgttttact 10680
 ttgggagaat gaagaatggg ccagggcctc cagagggaca gcctgcaggc atccgggaca 10740
 ctcggtgtgc ccctgagggg aaaagaagag aaaggatcag aaggcttgct ggctagcaag 10800
 agaggaaggc aagataccaa acacagattc tgcaaagagc actgacacca agagaggagc 10860
 aggcagaatg gaaagacctg ggcaggagaa ctcagttcag taatctgtaa tttgggccgc 10920
 ccctgttgtg gtacgattag gctgtggtca aagagagcaa tggatggaga gtcgggagac 10980
 aaggcattcc agcccttgct ccaactggttc ctggtggtat gaccctagaa aagtcattta 11040
 gcccctcctt accttacctc atcaaaaaag tatgataata aactgcctt ctcaaaagac 11100
 taccaccccc atccctcttg ctctgtttcc tgccaccttg tgctcacagc gtagagggta 11160
 ggggacagct cagccccatg aaaggacaaa gtcagagtcc cctccatgaa tgggggtgtgt 11220
 gatctctccc tgtaggtact acaaaccggt tatcctgttg atgtgcttca tcctgccac 11280
 gatcgtgccc tggatttgct ggggtgaagc ttttcccaa agcctgttcg tcgccacctt 11340
 tcttcgttac gccatcgtgc tcaatgccac ctggctggta aacagtgtg cccacctata 11400
 cggatatcgc ccttatgaca agactattag cccccgggag aatatcctgg tttcattggg 11460
 agctgtgggt aagttagcag tccatagcaa gaccccatct agtgggctgc tggttaagag 11520
 tattagacta ggagccagaa aaaccagatt aacctgctt atgaccctc tctgtttctc 11580
 tgctataaaa ctaagggtgca atagtagata ccccttgaga gttgggcagc aagtcttata 11640
 taaagagaat tgggctaaaa aataacaatg tctctgagtc caggttcaa aaagatcccc 11700
 aggtgctctg gatgaggaac cgctttggct tgtcctttt ccagtcatt ctgagctggc 11760
 acatggtctg gctaggggca gggactgcat gaatagaaca gtagggctct ctgggtggcc 11820
 agtaagccta gtgttttata tttagacatg ctatacaaaa tgcagaacaa atccttaaca 11880
 tttcaacaag cttctctttt atcaccttg tatattcaga gaggctgaac tcaaagtgt 11940
 tttcatgcct tattgttttg tgatgccaac atgaaggacc tcaaagcaac tgttggtggc 12000
 ccttttatca ccgccgaccg ctctcatctc ttgtccttta ttcttctctt gtcctttatt 12060

ES 2 452 791 B1

```

cttctctaac ccgtgctggg aacacccgct ccccttaaca tggcttggag aactcctgat 12120
aaagcagtta atttgatcac aagtctctgc tctactgatct aatgctgact attcaagaat 12180
atcttttctaa aaaaaaaaaa agttatatct ttctctcatt ccagttgcaa tagccagaat 12240
ctaagacaac agtggttctac catctgtctc ccttttattt tttcccctgc cactcttttc 12300
aactaaacat agatcttgac taacgcctgg aagcagtttt ccttaagcag cgctgtgac 12360
ctcttccacg ccagtgatca gtgccactgg ttgtctggca tatctaggca acctccctgc 12420
tccccacatg tgtgtacact gcggcctagc ttttgctttg ttctctttaa aacctttctt 12480
tatgtgctca accctgagca tctttttttt tacaatctgt actaaagaca tttcatttgt 12540
atcttttttt tttttttttt tagtgccgca cctgtgccat atggaagtgc ccaggctagg 12600
ggccaatcc gagctacagc tgctggcctc caccacagcc acggcaatgc cagatccaag 12660
caacctacac cacagctcat ggcaatgctg gatccttaac cactgagca aggccaggga 12720
ttgaaccac aacctcatgg ttcctagttg gatttgttt tgctgagcca caaggggaac 12780
tcctgtatct ctttttaact ttcattgtatc tttcccctcc tttcagggaac cctctaccat 12840
tgtgcatgta tctactctga accatgtttg aaatctaaca ggctattttc atagatttat 12900
gaatgttgcg gaagtttctg gaatgagact ggtcctggat ttagaatgag cttccccaac 12960
cccagtctct ttctaaccat ccgttcaaag tagctgcca catcttcctt tgtctcaatt 13020
atcattcatc cctccatcct ggctgctctc ccccttatta cctcaccctt tgttctccca 13080
tagctggctt ccctgtcatt ctaatctttt tcttcttgaa ttacctcccc cacagtcaca 13140
tgctcatctc tccgctaaag ctgacctcct gccttgagcc tctcctggac tgtgtcttgc 13200
tgccccagtt gcagagtctt gtccttctcc tctttttttc tcccttgga actagtgtgt 13260
gtctgattaa agtttttaaat ctgataagta tatctgataa gcctggctag tgcttatcaa 13320
gatcctagct gcagaatttt atggaaattc gtacttttag ccttgggggtt atcctaccct 13380
cctactcagt tcacactaga taagctgatt atccacttg tagagagtca gacagaggac 13440
ctacctcgaa tgatgccctg gatggtgtca tttcctttgc agaatttcct tccttgcttg 13500
ttattaatgt cattactact ctactaaggc tctttcatct tcaaagggt caacatgctc 13560
ttttattagc tattcttgcc cagctctgcc tgggcgtcat aaggggtcag cattgtcata 13620
gttgaatgct gttcggaaaa aagatccgc caagggttgg agacctctgg ctctggagtt 13680
tgcacagctc aactcatgac agacattatt ctgaatccag agtttctctg attttcttct 13740
atggagcaaa gtgaactctt ctgagaagca tagaggtttt ttattctaatt tctaagcctt 13800
ttgattctgt ttccctcaga gagcttctgt cttatcagct tgacccccac accaggattc 13860

```

ES 2 452 791 B1

aagctcaaag aattagaagc cagagcagtc ccctctgaac cagtggaaac tgaggaaatg 13920
tgggcccttg gtctgggcct ctttctgact tttgactgtt ggtgcctgat tccgtggtac 13980
cttctgccct tagagatggg atggtacagt ggggaaagg atacccctt gctcaccttt 14040
ttcagaaaca cggcagcagt tctttgttct agactcttct ctctcacc taacacatgc 14100
tactcatac agagctttaa ggtctcagac caataactag tgaagctctg gaatttccca 14160
atctaaaatt tatccctgt gatagcagtt tctctccggt catcttatcc cctcagagga 14220
actgtcagtc ctcttccac agaggctccc agagagccat ggcgaccagg gtgtccccag 14280
ttgtttctta aggtgcctct gaggggatct atttagttga aaagactgga ttcattcatt 14340
caaccacagc aagttatctg ctaggtttga gctgtgccac cccagtgta gttcatgac 14400
ttttctctgc tttttattcc aggtgagggc ttccacaact accaccacac ctttcctat 14460
gactattctg ccagcgagta ccgctggcac atcaacttaa ccacgttctt catcgactgc 14520
atggctgccc tgggtctggc ttatgaccgg aagaaagtat ccaaggctgc catcttggcc 14580
aggattaaaa gaactggaga tgagagctac aagagtggct gagtttggg tcccttgggt 14640
tccttttctg aaagccagct gggcagaggt ttaatgttct gtttattaac tactgaataa 14700
tgctaccagg atgctaaaga tgatgatgtt aaccggttcc agtacagtat tcttttaaaa 14760
tttcttttaa gattgaaagc ctacaattct gcctttatga tgctaagctc atattcttgt 14820
ttcttctctc tcttctagtc ccattgtcct tctcttggct ttgttctgt caccttctc 14880
tctcttcccc ctactgtgc ccaggcaag gagctggtca gtcgttgggt ggtttccagc 14940
ttccaaagcc tagaccttc agtagtcaa aactggtgag cggcttttg cccagatagc 15000
tctttctttg agttgtcctg agctttaagg tgggtggctc aaggagaga ggtgataaaa 15060
tcttctggga aagccctgt tcattatttt cagcccagac ttttgc taa tgacaaaaat 15120
aactctat tggcacaag cttcgaaagc aggttaacttg tcaggggagg gagttagcat 15180
gctgtgtgtg gtgggggtga taaagaagg ggaggtgagg tgggaaacca ggcaggaggc 15240
tcctgctgtg atgggacact cggtgactg cccagtgagg gctttgcgc ctggcacaca 15300
gcatgcttcc tttctctcct gactctgggg aatggccgtg gaacttggca atgctagaac 15360
tcaaaagcac atcccagtg cccaatgtac gttaggctga ggataaagaa gcagcattta 15420
gtttgtggca gcagtggct ctgctgggga agaagtctt cttgtctct taataacagg 15480
aagatttctt attccataga gtgagaaatc ttgaggttct ttccggaatt gctgaatcgg 15540
caactcatgg aattgtcctc actcttttca tcttccgct ctgccatctt tgggatacag 15600
ctccctcat agtaacaata aggtggctgc cgcattttga gacatcgga ctgaggtgtg 15660

ES 2 452 791 B1

ttggtggtac cgtggtgagc ttaactatct tccccaaaag aaaggatttt agcaggtgga 15720
 ggtgggtccc acataaagat agttaaacct cgg tactttg cttggaatac caacataatt 15780
 ctcttggaact atttccctct gaaagagaag gaggcttgag aagaggaaga atgggggtgg 15840
 atggtctcct ttcctctctc tgctgaacag gagatggagg ggttgagggg caggggtctag 15900
 aggcagctcc tgagacataa cattgcaaac gaagggctct gggggattca gaaggttact 15960
 gagtaagtta ctggacgtcc tcctatggga agctgggtcac acaggcaagt tagatattgg 16020
 ggttcatttc attcattcca gttgctgctt ggaataagga actagaaggc tgctccccac 16080
 agtgtgaaag cttttcactc ctgccttcta gcctcaagcg tactaccctg actatggatt 16140
 cctgctctgc cctgtctatc cgttttttcc tgccggttct atctcctccc tgaggttttt 16200
 cctttctctc tggagggcag gcctcctttg ggagtatgca aaggcagtga tggctgctgc 16260
 tctacaggca gcttcctctc ccacagtcag aatgctcagg gtcactgaac cactgtttct 16320
 cttcacaaaag gtgagctagc tgccacctcc acgtggcctc cagagtctcc acctgcaccc 16380
 ttgtgctccc ctgccactcc aatgattcaa gacaaggcgg gcaaaccctc ctagaacat 16440
 cccgggcacg ggcacccctt ctcataaggc acagccaagc caaatgctca cgttgtgcca 16500
 gtgagtcagc cacagagcaa aagagggttt gtggttagtc tcctctatct gggtcagaac 16560
 cagagagcag gctggatgcc ccctgcttgc tcggtaagcc tgcccagcct gagtcaatgc 16620
 tcacggctga cagtgcaatg cttgcagaaa caggagggag cctggtcttc actgggaagc 16680
 acaagaggcc aagacaagtt ccaaagtgcc tcaactgaaa gggaaccctg tcccctggag 16740
 ctagggtgta ccacaaagct ttggctgagt cttgggctga acagcgtctc tgttcagcaa 16800
 actaaccagc attccctaca gcacagccca aggcagacaa gagaatagaa gagggctgga 16860
 aaacaaaaaa taagaacctt ggcccaactcc tgtccctgta acctcagtcg tcaacacaga 16920
 agcctggctt tactctaaag attggaaata tacaatacca gatgctctgt ccactgttga 16980
 gccccaggag tggaagggca gagagcattt cttcctgtat taactgagta aatggaggat 17040
 aaaggggttg ggctggacta gaggcacctt tgtcttttga gccattcttc tcagtagaaa 17100
 aaaaagctga tggaagatca ctgtagttca cattcccaga cccaagcacc tactctttgg 17160
 aaatgactgt tgggttagtt ttaattccac aggtcgtcag atgctgctt tatagctgat 17220
 gatcaaaacc aacttttatc tttctattct aattgttttc aatggatctg atccatacca 17280
 taaccctaca caaggctgga tggggttctt aggcgaaggg cccagtgta tgtgtggatg 17340
 tgtaggggtg gagggcgggg agtaaggaat acttttttca aggttctaaa gctgaattca 17400
 aatgacgcat taatgaccca gaaactcaga tctgatagaa tctgaatttc taacaggcct 17460

ES 2 452 791 B1

tgctttgtag gtgtactgac aacttatctg ggggccttac atctttttta atcgggtgtta 17520
 cgtccgagcc tgctctgctc cctcactccc tctgcactcc ctctgtggcg ttcccttgcc 17580
 cctgagagcc tgcagaagtg gctggtagaa gtggggggct ggctggagaa ttatcagtat 17640
 gcaggattcc tttctgggct ttgttttgga aactttcctt agggctgttt ttattaagtg 17700
 cccacatttg acggaagggtg gaaggaattt gaatgtattt gatttataat gttattatta 17760
 ttattttttt agattaaaag atggtttagt catttaaaac ggaaaccttt tctcctggtt 17820
 agctagtatc ctgagtgtat tctctgtaag tgtagctcaa atgggtcagc gtgaagaaaa 17880
 gttaaagaaa gcacgatgtc aaggttacac ggggtggttaa ggccagggcc tctcctacca 17940
 ctgtgccact gacttgctat gtgaccctgg gcaagtcatt taactataat gtgcctcagt 18000
 tttccttctg ttaaaatggg ataataatac tgacctacct caaagggcag ttttgaggcg 18060
 tgactaatgc tttttataaa gcattttggg atccttcagc agaggaattc tcttaagtcc 18120
 tgagtatttt tataataaca gtatccacca tgaactgtgt ccaccatgaa ccctgtgtcc 18180
 tggatgctgt cattaatcct tatggttctc tctgagaaat tgaataaacc caatagataa 18240
 gtggtggata actagtcaga cagaatctga gaatgcataa actcattgcc atggaaacat 18300
 acacaggata ccttttcctt gattgggtgg gattttttcc cctttttatg tgggatagta 18360
 gttatttggtg gcctaagaat aattttggaa taatttctat taatatcaac tctgaagcta 18420
 gttgtactga tctgagattg tgtttgttca taataaaagg gaagtgaatc tgattgcctt 18480
 gtgtctgaga ggttttttgc ctgtgagtca gtctcttggg acttaatctg ccaccctatg 18540
 tcctgttcct gtacctttaa gagagtaaaa aaagtagaag ctacaatggt tgattcacac 18600
 tctagtaacc cgccctgccc tccctgccct tcttaggggt aactttaggt taaactcagc 18660
 cttggcagca ggaagccagg agtctgctgc cattagatca gacatgttaa cccagctgg 18720
 ctctttggcc ctgggggaaat gccaggctct tttcggtaac atggggccaa atgatactga 18780
 gagaggaaag gagcagcagg tgacacttcc ctggaaaggg gttctgtacc tggcaacca 18840
 ggctgggcca tcctgcttca ttcctctgaa atgtagcccc ttctgggaat aaagtggctt 18900
 cctgaaaatg ctgattaaca acagcaggaa gaaaggaaaa gcaatcctag agaagccttg 18960
 taaattcctg gaatagagag ggcttcatga tcatcaacta gaaaggcttt ggcttttact 19020
 gcttttagcta agaactcttt tttttttttt tttttttttt gtctttttgc tatttctttg 19080
 ggctgctcct gcagcatatg gaggttccca ggctaggggt ccacagcaac gcgggatccg 19140
 agccgcgtct gcaacctaca ccacagctca cagcaacacc agatccttaa cccactgagc 19200
 aggggcaggg accgaacccc caacctcatg attcctagtc ggattcgttg accactgctc 19260

ES 2 452 791 B1

cacgacggga actcagctaa gaatcttgat gtgcaaacga gaagggcttt ttttgaagag 19320
 gcttcatttt ccaacaggag ccacctaagc ttctgagcat tcccagacc ccccccttac 19380
 actttctagt gtaacgtcgc cctcaccttg gacaagcacg actctcagtg attcatccca 19440
 aatcaagtct atattcagtg aggccttgcc aggccttaat aacgtaaatt gatgggtggca 19500
 ctttcttaat atctggcttt ctaccccttt ccctctattg tgtttaaaat gttcggggttg 19560
 gaccattttt ccatthttata taatggcatg gttccgcca agtctctgtt tttggaggca 19620
 aagacatcag ccacatgaga aagggcagct gtgataaact atagtgagtc taggatgata 19680
 ctcatgaaac caaattcctt ggaacaatct atatcagata gagggattgg gaccatgcgt 19740
 caacagaaat ctcacaccct cttttttttt cttttctttt ttggtcgcac atgcagcaca 19800
 ttgaagttcc tatgtgacct atgccacagc tagggcaatg ttggatcctt aaccactgt 19860
 gccacagcag gaactcgcta tgacaacatt tgggtgcagga aacccaaatt gtgagtccac 19920
 cagactcaat aacatttact ataaacagcc attgtagtga gtgcttgaca gtgcattatc 19980
 acagcatttc caaagcaggt gccatcatta ccctaatttt attgatgaaa ttccctagaa 20040
 gagaaagaac acaaggcgag ggagtatgca aggatgctgt gattcagctc agaactttgc 20100
 ttattttactg ctctccaaat ggggtgtaaag tagataagca acttgataag tctggatgca 20160
 taagtcccat atatgtaagt agatgcctgg cgatattcag ttatgctcag aggtaaaact 20220
 tggtagcaat ggtacagagc ttagtttatg caaagtcaaa tcgcagatgt gtcctctgtt 20280
 ccagaggaac ccaactcact ccacctcccg acatgtttta acattcaacc acacctgagt 20340
 tttaaagctc tcagaccata gaaaccattt cttggggccg tcccacggca tatggagggt 20400
 cccaggctag gggtcgaatc ggagctgtag ccaccagcct acgccacagc cacagcaatg 20460
 tgggatccga gcctcatctg caacctacac cacagctcac ggcaatgctg gaccttaac 20520
 ccactgagca aggccaggga tcgaacccgc aaactcatgg ttcctagtca gatttggtta 20580
 ccactgagcc atgatgggaa ctctcctct atcgttttgc aaaccatact ccatccacc 20640
 tgctcttggtg ttttgagatc ttttaaggga tctcttctt tagaaatgtc tcctgcccct 20700
 aatggatcag tgcttaataa aagtattgaa agacctcgtt tctagtthta aattctgtct 20760
 ctgtgacaaa ctgtgtgaaa tgtcacaggg agtggaatt gcattctgtg acctgtagtt 20820
 aacttactaa actgcaggca aaaagccgat tcctgcatgc tgactttggg gcaaatacca 20880
 caagctctaa ttgcaggttc caagaagttg agattctata ctgggattgc ccctcccccg 20940
 cccggggcct gccacgctg ctgcaacca ggcacagag agctc 20985

ES 2 452 791 B1

<210> 2 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Promoter-F <400> 2 acttccctag tgcccatcct	20
<210> 3 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Promoter-R <400> 3 gatcactttc ccagggatga	20
<210> 4 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 3UTR_F1 <400> 4 aagtatccaa gggctgccat c	21
<210> 5 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 3UTR_R1 <400> 5 caattccgga aagaacctca	20
<210> 6 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 3UTR_F2 <400> 6 tggggaagaa gtctttcttg t	21

ES 2 452 791 B1

<210> 7 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 3UTR_R2 <400> 7 ggttcagtga ccctgagcat	20
<210> 8 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 3UTR_F3 <400> 8 tttcctgccg gttctatctc	20
<210> 9 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 3UTR_R3 <400> 9 gagtaggtgc ttgggtctgg	20
<210> 10 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 3UTR_F4 <400> 10 atggaggata aaggggttgg	20
<210> 11 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 3UTR_R4 <400> 11 acttgcccag ggtcacatag	20

ES 2 452 791 B1

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 3UTR_F5

 <400> 12
 gtcaaggtta cacgggtggt 20

 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 3UTR_R5

 <400> 13
 caggacatag ggtggcagat 20

 <210> 14
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> cebador directo para el genotipado de SNP3

 <400> 14
 tgccagctct agcctttaaa tacc 24

 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Cebador reverso para el genotipado de SNP3

 <400> 15
 cacgttgggt cgtgtgtct 20

 <210> 16
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> sonda para el alelo G

 <400> 16
 acccgcgcac agca 14

<210> 17
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sonda para el alelo A

<400> 17
agacccacgc acagca

16



- ②① N.º solicitud: 201231507
②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.09.2012
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

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

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	EP 1598430 A1 (NEW IND RES ORGANIZATION) 23/11/2005, reivindicaciones.	1-39
X	OH DONG-YEP et al. Identification of the SNP (Single Nucleotide Polymorphism) of the Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) Associated with Unsaturated Fatty Acid in Hanwoo (Korean Cattle).Asian-Australasian Journal of Animal Sciences JUN 2011. Vol. 24 No: 6 Pags: 757-765. ISSN 1011-2367.	1-39
X	ZIN CHAO. "SNPs in the Stearoyl-CoA desaturase and their associations with the CLA and MUFA content of milk fat from Canadian Holstein and Jersey cows". Septiembre 2007. Recuperado de internet: "http://cgil.uoguelph.ca/dcbgc/Agenda0709/agenda0709.htm.	1-39
A	REN J et al. Isolation and molecular characterization of the porcine stearyl-CoA desaturase gene.GENE. 29/09/2004. Vol. 340. No: 1 Pags: 19 - 30. ISSN 0378-1119	1-39
A	EP 1845159 A1 (NEW IND RES ORGANIZATION) 17/10/2007, todo el documento.	1-39

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
05.06.2013

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/4

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

C12Q, C12N

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, NPL.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 05.06.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-39	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-39	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	EP 1598430 A1 (NEW IND RES ORGANIZATION)	23.11.2005
D02	OH DONG-YEP et al. Identification of the SNP (Single Nucleotide Polymorphism) of the Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) Associated with Unsaturated Fatty Acid in Hanwoo (Korean Cattle).Asian-Australasian Journal of Animal Sciences JUN 2011. Vol. 24 No: 6 Pags: 757-765. ISSN 1011-2367.	Jun 2011
D03	ZIN CHAO. "SNPs in the Stearoyl-CoA desaturase and their associations with the CLA and MUFA content of milk fat from Canadian Holstein and Jersey cows". Septiembre 2007. Recuperado de internet: " http://cgil.uoguelph.ca/dcbgc/Agenda0709/agenda0709.htm ".	Sep 2007
D04	REN J et al. Isolation and molecular characterization of the porcine stearyl-CoA desaturase gene.GENE.29/09/2004. Vol. 340. No: 1 Pags: 19 - 30. ISSN 0378-1119	29.09.2004
D05	EP 1845159 A1 (NEW IND RES ORGANIZATION)	17.10.2007

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 describe la relación existente entre varios SNPs del gen estearoil- CoA-desaturasa y el grado de ácidos grasos insaturados presentes en la carne o la grasa de un animal.

El objeto de las reivindicaciones comprende: polinucleótidos de 10 nt consecutivos que comprendan los SNPs de las posiciones 2281, 2228, 15109, de la secuencia definida por el número de acceso AY487830. Sondas y Kit para la detección de tales SNPs. Un método de genotipado de individuos que presenten tales SNPs. Un método de predicción del grado de insaturación de ácidos grasos presente en un sujeto basado en la identificación de uno, o varios de los SNPs. Un método para seleccionar cerdos con un elevado grado de insaturación de ácidos grasos en la grasa intramuscular o subcutánea basado en la identificación de alguno de los SNPs anteriores.

D01 divulga un método para evaluar el contenido de ácidos grasos insaturados en grasa de vaca (o grasa de la leche), en base al genotipo de 8 SNPs en el gen estearoil-CoA desaturasa (reivindicaciones).

D02 investiga los efectos de los factores genéticos, como el estearoil-CoA desaturasa (SCD), sobre las características de la canal de carne, incluida la composición de ácidos grasos. Se identificaron 3 SNPs (tabla 2) y se relacionó la presencia de los mismos con el contenido de ácidos grasos insaturados presentes en la carne analizada.

D03 describe una estrategia de genotipado de animales en el locus SCD, a partir de la identificación de SNPs, para seleccionar aquellos individuos que produzcan leche con un mayor contenido en ácido linoleico y ácidos grasos monoinsaturados en la grasa de la leche.

D04 divulga el aislamiento y caracterización molecular de la estearoil-CoA desaturasa porcina.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulga los SNPs divulgados por la presente invención, por lo que las reivindicaciones 1-39, parecen cumplir con el requisito de novedad, tal y como se menciona en el art. 6 de la Ley 11/1986. La diferencia entre D01-D03 sería la posición de los SNPs encontrados en la secuencia del gen SCD con número de acceso AY487830,. Por tanto el problema que plantea la presente invención sería la provisión de SNPs en el gen SCD, alternativos a los ya existentes, para utilizarlos en la selección de carne, o grasa animal con un elevado contenido de ácidos grasos insaturados. Sin embargo, el hallazgo de los SNPs de las posiciones 2281, 2228, 15109 de la secuencia AY487830, no suponen ningún efecto técnico adicional a lo ya conocido, por lo que se consideran una alternativa obvia a los SNPs descritos en el estado de la técnica representado por los documentos D01-D03. Así pues, las reivindicaciones 1-39 parece que carecen de actividad inventiva tal y como se menciona en el art.8 de la ley 11/1986.