

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 922 987**

21 Número de solicitud: 202031140

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6895 (2008.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

13.11.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.09.2022

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

29.10.2024

Fecha de concesión:

19.11.2024

45 Fecha de publicación de la concesión:

26.11.2024

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (85.7%)
Edificio Emprendia
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES y
PANADERÍA DA CUNHA S.L. (14.3%)**

72 Inventor/es:

**LOMBARDERO FERNÁNDEZ, Matilde;
ROMERO RODRÍGUEZ, María Ángeles;
FERNÁNDEZ CANTO, María Nerea;
VÁZQUEZ ORDERIZ, María Lourdes;
RAMOS CABRER, Ana María;
PEREIRA LORENZO, Santiago y
ALMEIDA GARCÍA, Fernando**

74 Agente/Representante:

CAMIÑA TATO, Montserrat

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico

54 Título: **Procedimiento para la detección, cuantificación y/o identificación de ADN de las variedades de trigo gallego "Callobre" y "Caaveiro"**

57 Resumen:

La IGP Pan Gallego prescribe la utilización de, al menos, un 25% de trigo gallego en su elaboración. Actualmente, están registradas dos variedades de trigo gallego: "Caaveiro" y "Callobre". Los marcadores microsatélite (SSR) permiten la identificación y cuantificación de trigo gallego en muestras biológicas, siendo una herramienta factible en la trazabilidad del uso del trigo gallego en la producción de Pan Gallego amparado en la IGP.

ES 2 922 987 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la detección, cuantificación y/o identificación de ADN de las variedades de trigo gallego 'Callobre' y 'Caaveiro'

5 SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a procedimiento y kit para la detección, cuantificación y/o identificación de ADN de las variedades de trigo gallego 'Caaveiro' y 'Callobre' en diferentes tipos de muestra.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

El "Pan Galego" o "Pan Gallego" es un pan con corteza crujiente, dureza variable según el formato, miga esponjosa y abundante e irregular panal, que se elabora a mano con agua, 15 harina, masa madre, levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y sal (Xunta de Galicia, 2018). Este pan se caracteriza por la mezcla de harinas procedentes de las variedades de trigo autóctono cultivado en Galicia y de harina de fuerza de trigo con otros orígenes. Ambos pertenecen a la especie de trigo blando *Triticum aestivum* ssp. vulgare.

20 En 2018 la Xunta de Galicia aprobó el Pliego de Condiciones de la Indicación Geográfica Protegida (IGP) "Pan Galego" / "Pan Gallego" donde se recoge la descripción de las características que habrá de cumplir el producto amparado por dicha IGP. Entre estas características se incluye que se exigirá un mínimo de un 25% de harina de trigo autóctono cultivado en Galicia para asegurar la conservación de sus cualidades intrínsecas (Xunta de 25 Galicia, 2018)

Los trigos autóctonos de Galicia (comúnmente denominados "trigo del país" o "trigo gallego") son un grupo de diversas variedades locales. De ellos, solo se han seleccionado y registrado dos variedades, 'Callobre' y 'Caaveiro' (Xunta de Galicia, 2018), en el Registro de Variedades 30 Comerciales de la Oficina Española de Variedades Vegetales (OEVV) del MAGRAMA el 24/08/2006 y el 14/04/2015, respectivamente (Urquijo, 2018). Son estas dos variedades las que se reconocen en la IGP. Por ello, se deben de implementar procedimientos que permitan garantizar que se trata de trigo de estas dos variedades o de productos derivados de las mismas, así como los procedimientos que permitan cuantificar el porcentaje en el que 35 aparecen las harinas en los productos elaborados.

En las últimas décadas, el análisis de ADN ha adquirido una gran importancia para satisfacer las expectativas de los consumidores sobre la calidad y autenticidad de los alimentos (Pasqualone et al., 2010). El estudio de marcadores moleculares, que se basa en la variabilidad genética dentro de las especies, ha permitido verificar el ADN de manera inequívoca y precisa en cada etapa de la cadena alimentaria, sin verse afectado por el proceso de fabricación o el medio ambiente (Giancaspro et al., 2016).

Con respecto a los productos relacionados con el cereal de trigo, dentro de los análisis del ADN, existen dos tipos de estudios: aquellos donde se secuencian diferentes microsátélites para identificar diferentes cultivares de esta especie y otros en los que se cuantifica el porcentaje de cada cultivar utilizado.

Son varios los trabajos que se han realizado utilizando marcadores moleculares en este campo. En primer lugar, tenemos el trabajo de Pasqualone et al. (2010) en el que realizaron un estudio utilizando microsátélites sobre pan de Altamura (producto tradicional de Altamura, que se encuentra en el sur de Italia y está protegido por una DOP de este país). Este tipo de pan debe contener al menos un 80% de sémola derivada de trigo duro (*Triticum turgidum* L. var. Durum) cultivado en una zona cercana a la ciudad de Altamura. Las variedades que se pueden utilizar son: 'Appulo', 'Arcangelo', 'Dulio' y 'Simeto'. Para ello, se extrajo ADN de diversas combinaciones de harinas en distintas cantidades, de manera que se puede distinguir el aporte de cada cultivar individual a este tipo de pan. En los marcadores evaluados, cuatro microsátélites fueron suficientes para una buena discriminación. Además, utilizando microsátélites y la técnica de PCR en tiempo real, la detección de trigo blando en panes Altamura también fue factible (Pasqualone et al., 2007).

También se utilizaron marcadores moleculares para garantizar al consumidor la autenticidad del "Pane Nero di Castelvetro", que es un pan tradicional siciliano reconocido como un producto artesanal de alta calidad. Este tipo de pan se obtiene a partir de harina de trigo duro, de la que al menos un 20% debe pertenecer al cultivar 'Timilia', que le confiere características propias junto con el horno de leña. Para ello, utilizaron la técnica de desnaturalización por cromatografía líquida de alta resolución (DHPLC), que permite observar un aumento paulatino de la altura del pico, lo que posibilita la detección de 'Timilia' (Giancaspro et al., 2016).

La adulteración más común para la fabricación de pasta industrial es el uso de trigo blando (*Triticum aestivum*). Oficialmente en Italia, Francia y España solo se puede utilizar trigo duro (Pasqualone et al., 1999; Alary et al., 2002; Terzi et al., 2004) con un alto contenido de proteína

de buena calidad y gluten (Pasqualone et al., 1999). Solo se permite un nivel por debajo del 3% de trigo blando (debido a la contaminación accidental durante la cosecha, el almacenamiento o el transporte del grano) (Alary et al., 2002; Terzi et al., 2004). Por lo tanto, para prevenir el fraude, es necesario implementar sistemas de control de calidad de rutina que identifiquen los cultivares de trigo duro (Pasqualone et al., 1999).

Alary et al... (2002), mediante la técnica de PCR en tiempo real, afirmaron que se puede cuantificar la adulteración y distinguir las variedades de trigo blando y trigo duro (dado que es necesario verificarla en una amplia variedad de trigo comercial para contrastar). Posteriormente, Terzi et al. (2004) plantearon la posibilidad de detectar pastas elaboradas a partir de una única variedad y caracterizaron ocho variedades.

Por lo tanto, podemos decir que el uso de marcadores moleculares contribuye significativamente a proteger las marcas de calidad y al consumidor (Terzi et al., 2004).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la detección, cuantificación y/o identificación de ADN específico de las variedades 'Caaveiro' y 'Callobre' a partir de distintos tipos de muestras como material vegetal fresco, muestras de harina monovarietal, muestras de mezcla de harinas, muestras de granos de trigo, muestras de pan, muestras de masa madre o muestras de masa de pan antes de su cocción. La invención se basa en la amplificación, detección y cuantificación de ADN usando o bien PCR y un secuenciador o bien PCR en tiempo real. El procedimiento propuesto comprende la amplificación de cinco microsatélites localizados en 5 zonas no codificantes del genoma. En dicha amplificación se incluyen fluorocromos que permiten la detección de los productos de la amplificación o bien por la lectura de la fluorescencia durante el uso de PCR a tiempo real o bien de forma posterior a una PCR mediante un secuenciador que permite identificar los microsatélites en base al pico de fluorescencia específico. La alta especificidad de los cebadores permite identificar las variedades concretas.

La técnica propuesta es sensible y específica presentando ventajas como:

- La identificación de ADN de las variedades 'Callobre' y 'Caaveiro', en una sola reacción, a partir de muestras de material vegetal fresco, muestras de harina

monovarietal, muestras de mezcla de harinas, muestras de granos de trigo, muestras de pan, muestras de masa madre y/o muestras de masa de pan antes de la cocción.

- La detección de los productos de PCR de forma rápida, fácil y objetiva, permitiendo una fácil y rápida identificación, detección y cuantificación.
- 5 • No requiere utilizar electroforesis en geles de agarosa, luz ultravioleta, ni el uso de agentes tóxicos para la detección de los productos obtenidos.
- Es susceptible de ser automatizado.

Constituye un primer objeto de la presente invención un procedimiento para la detección, 10 cuantificación y/o identificación, de forma simultánea, de ADN de las variedades '*Callobre*' y/o '*Caaveiro*' en una muestra biológica que comprende las siguientes etapas:

- a. Extraer el ADN contenido en dicha muestra biológica;
- b. Amplificación de los fragmentos de interés mediante la técnica de PCR ("Polymerase Chain Reaction") utilizando los cebadores específicos para 15 las secuencias SEQ ID NO 11 (SSR3), SEQ ID NO 12 (SSR7), SEQ ID NO 13 (SSR10), SEQ ID NO 14 (SSR11), SEQ ID NO 15 (SSR12); y
- c. Detectar las secuencias nucleotídicas amplificadas.

Una realización de esta invención es el procedimiento de la invención donde la muestra 20 biológica se extrae de material vegetal fresco, harina monovarietal, mezcla de harinas, granos de trigo, pan, masa madre y/o masa de pan antes de la cocción.

Otra realización de esta invención es el procedimiento de la invención donde la extracción de ADN incluye una etapa de purificación.

25 Otra realización de esta invención es el procedimiento de la invención, donde se realiza la detección, cuantificación y/o identificación de ADN únicamente de la variedad '*Callobre*' en una muestra biológica.

30 Otra realización de esta invención es el procedimiento de la invención, donde se realiza la detección, cuantificación y/o identificación de ADN únicamente de la variedad '*Caaveiro*' en una muestra biológica.

Otra realización de esta invención es el procedimiento de la invención, donde se realiza la 35 detección, cuantificación y/o identificación de ADN de las variedades '*Caaveiro*' y/o '*Callobre*' en una muestra biológica utilizando cebadores específicos para la secuencia SEQ ID NO 11

(SSR3) solos o en cualquiera de las combinaciones posibles con los cebadores específicos para las secuencias SEQ ID NO 12 (SSR7), SEQ ID NO 13 (SSR10), SEQ ID NO 14 (SSR11) y SEQ ID NO 15 (SSR12).

5 Otra realización de esta invención es el procedimiento de la invención, donde se realiza la detección, cuantificación y/o identificación de ADN de las variedades '*Caaveiro*' y/o '*Callobre*' en una muestra biológica utilizando cebadores específicos para la secuencia SEQ ID NO 12 (SSR7) solos o en cualquiera de las combinaciones posibles con los cebadores específicos para las secuencias SEQ ID NO 11 (SSR3), SEQ ID NO 13 (SSR10), SEQ ID NO 14 (SSR11)
10 y SEQ ID NO 15 (SSR12).

Otra realización de esta invención es el procedimiento de la invención, donde se realiza la detección, cuantificación y/o identificación de ADN de las variedades '*Caaveiro*' y/o '*Callobre*' en una muestra biológica utilizando cebadores específicos para la secuencia SEQ ID NO 13
15 (SSR10) solos o en cualquiera de las combinaciones posibles con los cebadores específicos para las secuencias SEQ ID NO 11 (SSR3), SEQ ID NO 12 (SSR7), SEQ ID NO 14 (SSR11) y SEQ ID NO 15 (SSR12).

Otra realización de esta invención es el procedimiento de la invención, donde se realiza la
20 detección, cuantificación y/o identificación de ADN de las variedades '*Caaveiro*' y/o '*Callobre*' en una muestra biológica utilizando cebadores específicos para la secuencia SEQ ID NO 14 (SSR11) solos o en cualquiera de las combinaciones posibles con los cebadores específicos para las secuencias SEQ ID NO 11 (SSR3), SEQ ID NO 12 (SSR7), SEQ ID NO 13 (SSR10) y SEQ ID NO 15 (SSR12).

25 Otra realización de esta invención es el procedimiento de la invención, donde se realiza la detección, cuantificación y/o identificación de ADN de las variedades '*Caaveiro*' y/o '*Callobre*' en una muestra biológica utilizando cebadores específicos para la secuencia SEQ ID NO 15 (SSR12) solos o en cualquiera de las combinaciones posibles con los cebadores específicos para las secuencias SEQ ID NO 11 (SSR3), SEQ ID NO 12 (SSR7), SEQ ID NO 13 (SSR10)
30 y SEQ ID NO 14 (SSR11).

En la presente solicitud, cualquiera de las combinaciones posibles significa todas las combinaciones de cebadores que se pueden realizar para identificar simultáneamente 2
35 secuencias, 3 secuencias, 4 secuencias o las 5 secuencias incluidas en el procedimiento.

Otra realización de esta invención es el procedimiento donde los cebadores específicos de SEQ ID NO 11 (SSR3) son las secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2.

5 Otra realización de esta invención es el procedimiento donde los cebadores específicos de SEQ ID NO 12 (SSR7) son las secuencias SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4.

Otra realización de esta invención es el procedimiento donde los cebadores específicos de SEQ ID NO 13 (SSR10) son las secuencias SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6.

10 Otra realización de esta invención es el procedimiento donde los cebadores específicos de SEQ ID NO 14 (SSR11) son las secuencias SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8.

Otra realización de esta invención es el procedimiento donde los cebadores específicos de SEQ ID NO 15 (SSR12) son las secuencias SEQ ID NO 9 y SEQ ID NO 10.

15 Otra realización de esta invención es el procedimiento de la invención, donde se utilizan cebadores que tienen una identidad del 75% respecto a los cebadores identificados por las secuencias SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4 y SEQ ID NO 5. Una realización preferente es un procedimiento de la invención donde dicha identidad es del 85%.
20 Una realización más preferente es un procedimiento de la invención donde dicha identidad es del 95% y una realización aún más preferente es un procedimiento de la invención donde dicha identidad es del 99%.

En la presente solicitud, el porcentaje de identidad en una secuencia determinada se calcula
25 teniendo en cuenta que un 99% de identidad significa que un 99% de residuos de la secuencia completa de los cebadores identificados para cada una las secuencias SEQ ID NO 11 (SSR3), SEQ ID NO 12 (SSR7), SEQ ID NO 13 (SSR10), SEQ ID NO 14 (SSR11), SEQ ID NO 15 (SSR12) son idénticos a los residuos de la secuencia determinada.

30 Otra realización de esta invención es el procedimiento en el que la amplificación de los segmentos de interés de las secuencias nucleotídicas se realiza utilizando la técnica de PCR multiplex.

Otra realización de esta invención es el procedimiento en el que la amplificación de los
35 segmentos de interés y su detección se realiza utilizando la técnica de PCR a tiempo real.

Otra realización de la invención es un kit para detectar, cuantificar y/o identificar el ADN de las variedades '*Callobre*' y/o '*Caaveiro*' en un ensayo de PCR con detección de las secuencias nucleotídicas amplificadas, durante o después de la amplificación, que comprende:

- 5 a. Los cebadores SEQ ID Nos 1 a 10,
- b. Un control positivo,
- c. Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs),
- d. Tampón de reacción y Taq polimerasa,
- e. Manual de instrucciones que detalla el procedimiento a seguir.

10 El control positivo está presente en el kit para permitir determinar el correcto funcionamiento de los componentes del kit.

Una realización preferente es el kit de la invención donde los fluorocromos utilizados están entre LIZ, PET, 6-FAM, ROX, VIC, NED, JOE, HEX, Cy3C.

15

Una realización aún más preferente es el kit de la invención donde los fluorocromos utilizados son 6-FAM, VIC, NED y PET.

Una realización preferente es el kit de la invención donde el control positivo es ADN de variedad '*Callobre*' y/o '*Caaveiro*'.

20

Otra realización preferente es un kit de la invención donde los desoxinucleótidos trifosfato son dATP, dCTP, dGTP y dTTP.

25 Otra realización preferente es un kit de la invención donde los desoxinucleótidos trifosfato están a una concentración final 0,32 μ M.

Otra realización preferente es un kit de la invención donde dicho tampón de reacción es 10 mM de TrisHCl pH 9,0, 3,2 mM de MgCl₂, 1 Ud de Taq polimerasa por 20 μ L de reacción.

30 Otra realización de la invención se refiere al uso del kit para la detección, cuantificación y/o identificación de ADN de las variedades de trigo gallego '*Caaveiro*' y/o '*Callobre*' en una muestra biológica.

35 Otra realización de la invención se refiere al uso del kit para la determinación del porcentaje de harina de las variedades de trigo '*Caaveiro*' y/o '*Callobre*' presente en mezclas de harina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. a) Identificación de ADN de trigo ‘*Caaveiro*’ en una muestra biológica. b) Identificación de ADN de trigo ‘*Callobre*’ en una muestra biológica.

5

Figura 2. Microsatélites con alto poder de discriminación en mezclas de harinas, ya que no presenta alelos coincidentes en las harinas monovarietales. Los alelos en negrita subrayado pertenecen a harina de la variedad ‘*Caaveiro*’, el resto de alelos pertenecen a harina de Castilla. a) Harina 100% variedad Castilla; b) Harina 100% variedad ‘*Caaveiro*’; c) Mezcla de harinas 50% variedad Castilla y 50% variedad ‘*Caaveiro*’.

10

Figura 3. Microsatélites con alto poder de detección de los porcentajes de harina incluidos en una muestra. En gris la lectura de los picos generados por una muestra de harina de Castilla. En negro la lectura de los picos generados por una mezcla de harinas de Castilla y de la variedad “*Caaveiro*”.

15

MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN

20

La presente invención se ilustra adecuadamente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1. Aislamiento de ADN

25

Para la extracción del ADN, que se usó en el estudio de marcadores SSRs, se utilizó tanto material fresco (planta viva siempre que fue posible), con el fin de tener las referencias genéticas de los principales trigos y variedades, así como como granos, harinas y pan. En cuanto a los granos, se utilizaron variedades de trigo ‘*Caaveiro*’ y ‘*Callobre*’. Se emplearon también harinas procedentes de Castilla (conformadas por una mezcla de distintos cultivares de trigo) y harina de trigo del “país” (‘*Caaveiro*’).

30

La extracción de ADN se llevó a cabo siguiendo el método del CTAB (Doyle y Doyle, 1987) modificando el protocolo. Se pesaron en torno a 50-75 mg de material vegetal y se machacó con ayuda de un pistilo (en el caso de la harina no fue necesario). A esta muestra se añadieron 1 mL de buffer de extracción y 100 µL de bisulfito de sodio al 10%. Se mezcló la muestra con ayuda de un vórtex a máxima velocidad. La mezcla obtenida se incubó en un baño de agua durante 30 minutos a 65° C agitándose los tubos cada 5-10 minutos. A continuación, se

35

añadieron 700 µL de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1. Se volvieron a agitar los tubos durante 10- 15 segundos hasta obtener una mezcla homogénea.

5 Posteriormente se centrifugó durante 15 minutos a 11.000g (20° C). Se cogieron aproximadamente 800 µL de fase acuosa obtenida tras la centrifugación y se añadió el mismo volumen de isopropanol que de fase acuosa y se invirtieron los tubos hasta ver aparecer las hebras de ADN. A continuación, se centrifugó durante 3 minutos a 11.000g a 20°C. Se desechó la parte líquida y se añadió 1 mL de solución de etanol 70%.

10 Posteriormente se agitó, se dejó reposar durante 30 minutos y se centrifugó durante 3 minutos a 11.000g a 20°C. Se descartó la parte fluida y se dejaron los tubos invertidos durante 5-10 minutos para que se evaporase el etanol. Por último, se solubilizó el pellet de ADN añadiendo 75 µl de agua MilliQ dejándolo en el baño de agua durante 1 minuto a 65° C. Las muestras se guardaron en congelación hasta el momento de la cuantificación.

15

Ejemplo 2. Estimación da cantidad y calidad de ADN

20

Una vez extraídas las muestras mediante el procedimiento anterior, se procedió a su cuantificación, con el fin de determinar la cantidad y calidad del ADN. Para ello, las muestras se diluyeron a una concentración de 10ng/ul y se empleó un espectrofotómetro Nanodrop.

Tras la cuantificación se congelaron hasta el momento de su uso.

25

Ejemplo 3. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR multiplex a partir de muestras

30 Para la amplificación de las muestras fueron seleccionados un total de 5 microsatélites (Tabla 1) que presentaron elevado polimorfismo en trabajos previos de trigo en España (Ruíz et al., 2012), y sus secuencias y condiciones de amplificación se obtuvieron de la base de datos GrainGenes

(<https://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/GG3/browse.cgi?class=marker>).

35

El cebador “Forward” se marcó con un fluorocromo fluorescente que emite señales de distinta coloración, como son 6- FAM (señal azul), VIC (verde), NED (amarilla), o PET (roja) para su posterior lectura mediante el láser del secuenciador. La selección del fluorocromo dependió

del rango de tamaño en el que se encuentran los alelos en cada uno de los locus que se amplificara.

Tabla 1. Información de los microsatélites seleccionados

Marcador SSRs	Caracterizado por	Cebador Forward	Cebador Reverse	Motivo de repetición	Temperatura de Anneling
SSR3	SEQ ID NO 11	ATCGCATGATGCACGTA GAG	ACATGCATGCCTACCTAATGG	(GA)37	55°
SSR7	SEQ ID NO 12	AAGATGGACGTATGCAT CACA	GCCATATTTGATGACGCATA	(CA)21	60°
SSR10	SEQ ID NO 13	CCAACCGTGCTATTAGT CATC	CAATGCAGGCCCTCCTAAC	(GT)14	60°
SSR11	SEQ ID NO 14	AGCCAGCAAGTCACCAA AAC	AGTGCTGGAAAGAGTAGTGAA GC	(GA)36	60°
SSR12	SEQ ID NO 15	TCGCCTTTTACAGTCGG C	ATGGGTAGCTGAGAGCCAAA	(CT)14(GT)18	60°

5

Con estos cebadores se procedió a la amplificación de las muestras en un termociclador (PTC-100 de M. J. Research, INC o GeneAmp PCR System 2700). Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 20 µL que contenía 12 mM de PCR buffer pH 8,3; 2,0 mM MgCl₂; 0,31 mM de cada nucleótido (dNTPs); 1 µM del primer Forward; 1 µM del primer Reverse; 1 unidad de la polimerasa Taq ADN; 50 ng de ADN, completando con agua destilada hasta los 20 µL. Una vez hecha la mezcla, se introdujo en el termociclador para proceder a su amplificación mediante la técnica de PCR, siguiendo el programa de amplificación que se describe a continuación, toda vez que la temperatura de “annealing” (temperatura a la que el microsatélite muestra su óptima amplificación) seleccionada fue la óptima para los SSRs de cada una de las PCR múltiplex. La amplificación se realizó en las siguientes condiciones: un paso inicial de incubación a 94°C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos consistentes en una desnaturalización a 94°C durante 35 segundos, un paso de “annealing” durante 1 minuto y 30 segundos y un paso de extensión a 72°C durante 1 minuto y 30 segundos, tras los 30 ciclos se realizó un paso final a 72° C durante 5 minutos.

20

Ejemplo 4. Detección de las secuencias nucleotídicas

Tras la amplificación, se prepararon las muestras con una mezcla de formamida para cargarlas en el secuenciador automático ABI3730, también se incluyó un patrón interno GS500LIZ_3730 con tamaños de 50.0, 75.0, 100.0, 139.0, 150.0, 160.0, 200.0, 300.0, 350.0, 400.0, 450.0, 490.0 y 500.0 bp. Los resultados se interpretaron con ayuda del programa Peak Scanner v.1.0 (AB, 2009) a partir de los picos detectados (Tabla 2).

25

Tabla 2. Productos amplificados para cada microsatélite

	SSR3- SEQ ID No 11	SSR7 SEQ ID No 12	SSR10 SEQ ID No 13	SSR11 SEQ ID No 14	SSR12 SEQ ID No 15
<i>'Callobre'</i>	241,243	109, 124, 138, 142,155	291	190, 195, 217	96, 155
<i>'Caaveiro'</i>	250, 252	109, 127, 134, 147	289	190, 195, 229	96, 159

Ejemplo 5. Discriminación de harinas y determinación de porcentajes

Se hicieron mezclas de diferentes proporciones de harinas (de 5% en 5% hasta el 100%) con el fin de ver si era posible identificar las mismas y, al mismo tiempo, ver si había variaciones de los resultados obtenidos en función del porcentaje de harina de cada tipo presente en la mezcla. Concretamente, para este estudio se empleó harina de la variedad *'Caaveiro'* y harina de Castilla y también se hicieron mezclas con diferentes proporciones de ambas harinas. El aislamiento, estimación y amplificación del ADN y la detección de las secuencias amplificadas se realizó utilizando los protocolos descritos en los ejemplos anteriores. Como resultado se vio que los microsatélites SEQ ID No 11 (SSR3), SEQ ID No 12 (SSR7), SEQ ID No 13 (SSR10), SEQ ID No 14 (SSR11) y SEQ ID No 15 (SSR12) permitieron la diferenciación entre estos dos tipos de harina. En el caso de los microsatélites SEQ ID No 11 (SSR3), SEQ ID No 13 (SSR10) Y SEQ ID No 12 (SSR7) la capacidad de discriminación es mayor ya que, a excepción del producto de amplificación 109, el resto no se repiten en esas harinas. Además, cuando se combinan ambas harinas aparecen los productos de amplificación de ambas variedades de forma proporcional a la cantidad de cada tipo.

Una vez analizados los porcentajes de las muestras fue posible cuantificar la proporción de harina *'Caaveiro'* en la mezcla.

25

30

35

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para detección, cuantificación y/o identificación simultánea de ADN de las variedades de trigo gallego ‘*Caaveiro*’ y ‘*Callobre*’ en una muestra biológica que comprende:
- 5
- a. Extraer el ADN contenido en dicha muestra biológica;
 - b. Amplificación de los fragmentos de interés mediante la técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) utilizando cebadores específicos para las secuencias SEQ ID NO 11(SSR3), SEQ ID NO 12 (SSR7), SEQ ID NO 13 (SSR10), SEQ ID NO 14 (SSR11), SEQ ID NO 15 (SSR12); y
 - c. Detectar las secuencias nucleotídicas amplificadas mediante un secuenciador.
- 10
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, para detección, cuantificación y/o identificación de ADN de la variedad de trigo gallego ‘*Caaveiro*’ en una muestra biológica que comprende:
- 15
- a. Extraer el ADN contenido en dicha muestra biológica;
 - b. Amplificación de los fragmentos de interés mediante la técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) utilizando cebadores específicos para las secuencias SEQ ID NO 11 (SSR3), SEQ ID NO 12 (SSR7), SEQ ID NO 13 (SSR10), SEQ ID NO 14 (SSR11), SEQ ID NO 15 (SSR12); y
 - c. Detectar las secuencias nucleotídicas amplificadas mediante un secuenciador.
- 20
- 25
3. Procedimiento, según la reivindicación 1, para detección, cuantificación y/o identificación de ADN de la variedad de trigo gallego ‘*Callobre*’ en una muestra biológica que comprende:
- 30
- a. Extraer el ADN contenido en dicha muestra biológica;
 - b. Amplificación de los fragmentos de interés mediante la técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) utilizando cebadores específicos para las secuencias SEQ ID NO 11 (SSR3), SEQ ID NO 12 (SSR7), SEQ ID NO 13 (SSR10), SEQ ID NO 14 (SSR11), SEQ ID NO 15 (SSR12); y
 - c. Detectar las secuencias nucleotídicas amplificadas mediante un secuenciador.
- 35

4. Procedimiento según reivindicaciones de 1 a 3 en el que para la amplificación se utilizan cebadores específicos para SEQ ID NO 11 (SSR3) solos o en cualquiera de las combinaciones posibles con los cebadores específicos para las secuencias SEQ ID NO 12 (SSR7), SEQ ID NO 13 (SSR10), SEQ ID NO 14 (SSR11), SEQ ID NO 15 (SSR12).
5
5. Procedimiento según reivindicaciones de 1 a 3 en el que para la amplificación se utilizan cebadores específicos para SEQ ID NO 12 (SSR7) solos o en cualquiera de las combinaciones posibles con los cebadores específicos para las secuencias SEQ ID NO 11 (SSR3), SEQ ID NO 13 (SSR10), SEQ ID NO 14 (SSR11), SEQ ID NO 15 (SSR12).
10
6. Procedimiento según reivindicaciones de 1 a 3 en el que para la amplificación se utilizan cebadores específicos para SEQ ID NO 13 (SSR10) solos o en cualquiera de las combinaciones posibles con los cebadores específicos para las secuencias SEQ ID NO 11 (SSR3), SEQ ID NO 12 (SSR7), SEQ ID NO 14 (SSR11), SEQ ID NO 15 (SSR12).
15
7. Procedimiento según reivindicaciones de 1 a 3 en el que para la amplificación se utilizan cebadores específicos para SEQ ID NO 14 (SSR11) solos o en cualquiera de las combinaciones posibles con los cebadores específicos para las secuencias SEQ ID NO 11 (SSR3), SEQ ID NO 12 (SSR7), SEQ ID NO 13 (SSR10), SEQ ID NO 15 (SSR12).
20
8. Procedimiento según reivindicaciones de 1 a 3 en el que para la amplificación se utilizan cebadores específicos para SEQ ID NO 15 (SSR12) solos o en cualquiera de las combinaciones posibles con los cebadores específicos para las secuencias SEQ ID NO 11 (SSR3), SEQ ID NO 12 (SSR7), SEQ ID NO 13 (SSR10), SEQ ID NO 14 (SSR11).
25
30
9. Procedimiento según reivindicaciones 1 a 8 donde los cebadores específicos de SEQ ID NO 11 (SSR3) son las secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2.
10. Procedimiento según reivindicaciones 1 a 8 donde los cebadores específicos de SEQ ID NO 12 (SSR7) son las secuencias SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4.
35

11. Procedimiento según reivindicaciones 1 a 8 donde los cebadores específicos de SEQ ID NO 13 (SSR10) son las secuencias SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6.
- 5
12. Procedimiento según reivindicaciones 1 a 8 donde los cebadores específicos de SEQ ID NO 14 (SSR11) son las secuencias SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8.
13. Procedimiento según reivindicaciones 1 a 8 donde los cebadores específicos de SEQ ID NO 15 (SSR12) son las secuencias SEQ ID NO 9 y SEQ ID NO 10.
- 10
14. Procedimiento según reivindicaciones 1 a 13 donde la extracción de ADN incluye una etapa de purificación.
- 15
15. Procedimiento según la reivindicación 1 a 13 en el que la muestra biológica es (i) muestra de material vegetal fresco, (ii) muestra de harina monovarietal, (iii) muestra de mezcla de harinas, (iv) muestra obtenida a partir de granos de trigo, (v) muestra de pan, (vi) muestra de masa madre, (vii) muestra de masa de pan para cocción.
- 20
16. Procedimiento según la reivindicación 1 a 13 en el que la amplificación de los segmentos de interés de las secuencias nucleotídicas se realiza utilizando la técnica de PCR multiplex.
- 25
17. Procedimiento según la reivindicación 1 a 13 en el que la amplificación de los segmentos de interés de las secuencias nucleotídicas se realiza utilizando la técnica de PCR multiplex y la detección mediante secuenciador.
- 30
18. Procedimiento según la reivindicación 1 a 13 en el que la amplificación de los segmentos de interés y la detección de las secuencias nucleotídicas amplificadas se realiza utilizando la técnica de PCR a tiempo real.
19. Kit para la detección, cuantificación y/o identificación de las variedades de trigo gallego 'Caaveiro' y/o 'Callobre' que comprende:
- 35
- a. Los cebadores SEQ ID Nos 1 a 10,
 - b. Sondas,

- c. Control positivo,
- d. Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs),
- e. Tampón de reacción y Taq polimerasa,
- f. Manual de instrucciones que detalla el procedimiento a seguir.

5

20. Kit según la reivindicación 19 en el que los cebadores y/o las sondas están marcados con un fluorocromo.

10

21. Kit según la reivindicación 20 donde el fluorocromo se selecciona de la lista que consiste en LIZ, PET, 6-FAM, ROX, VIC, NED, JOE, HEX, Cy3C.

22. Kit según reivindicación 20 donde los fluorocromos son 6-FAM, VIC, PET y NED.

15

23. Kit según la reivindicación 19 donde los desoxinucleotidos trifosfato son dATP, dCTP, dGTP y dTTP.

24. Kit según las reivindicaciones 19 donde el tampón de reacción es TRIS-HCl pH 9.

20

25. Uso del kit, según reivindicaciones de la 19 a 24, para detección, cuantificación y/o identificación simultánea de ADN procedente de las variedades de trigo gallego '*Caaveiro*' y '*Callobre*' en una muestra biológica.

25

26. Uso del kit, según las reivindicaciones de la 19 a 24, para detección, cuantificación y/o identificación de ADN procedente de la variedad '*Caaveiro*' en una muestra biológica.

27. Uso del kit, según la reivindicación 19 a 24, para detección, cuantificación y/o identificación de ADN de la variedad '*Callobre*' en una muestra biológica.

30

28. Uso del kit, según reivindicaciones de la 19 a 24, para la determinación del porcentaje de harina '*Caaveiro*' y '*Callobre*' presente en mezcla de harinas.

29. Uso del kit, según reivindicaciones 19 a 24, para la determinación del porcentaje de harina '*Callobre*' presente en una mezcla de harinas.

35

30. Uso del kit, según reivindicaciones 19 a 24, para la determinación del porcentaje de harina '*Caaveiro*' presente en una mezcla de harinas.

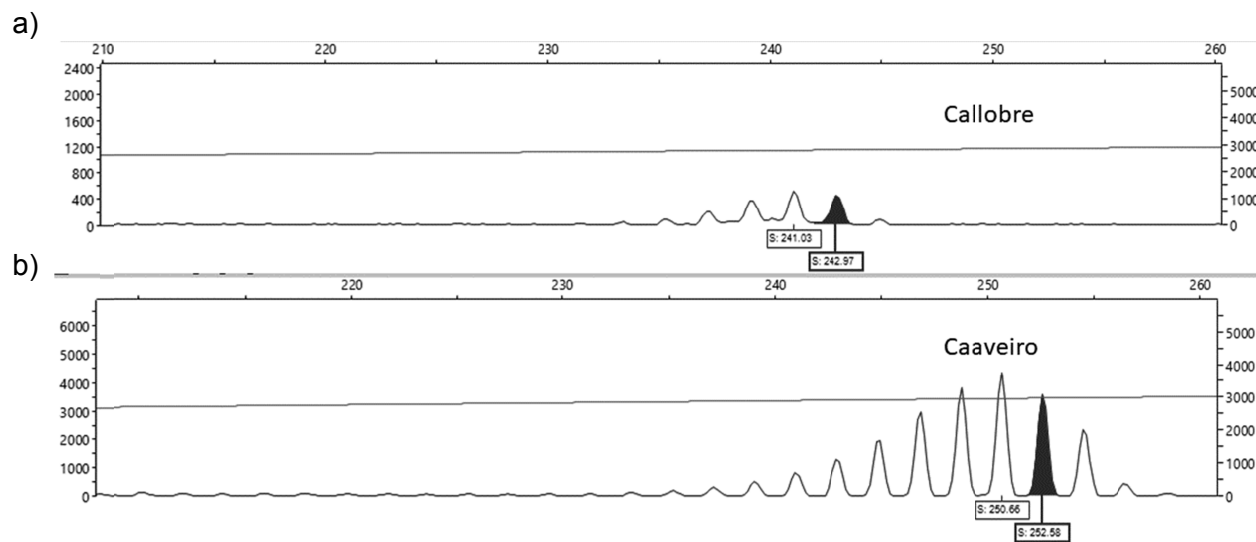


FIG.1

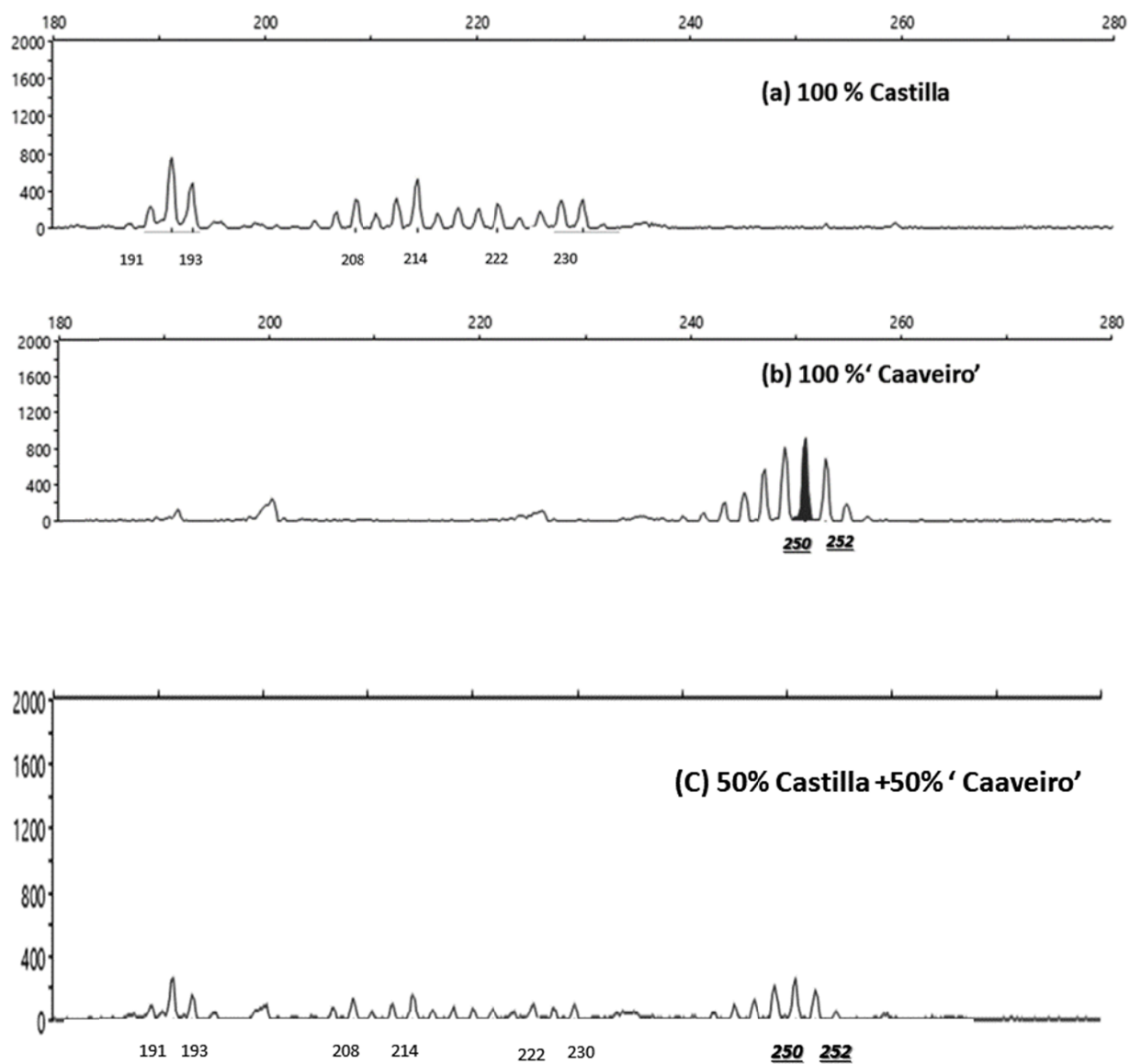


FIG.2

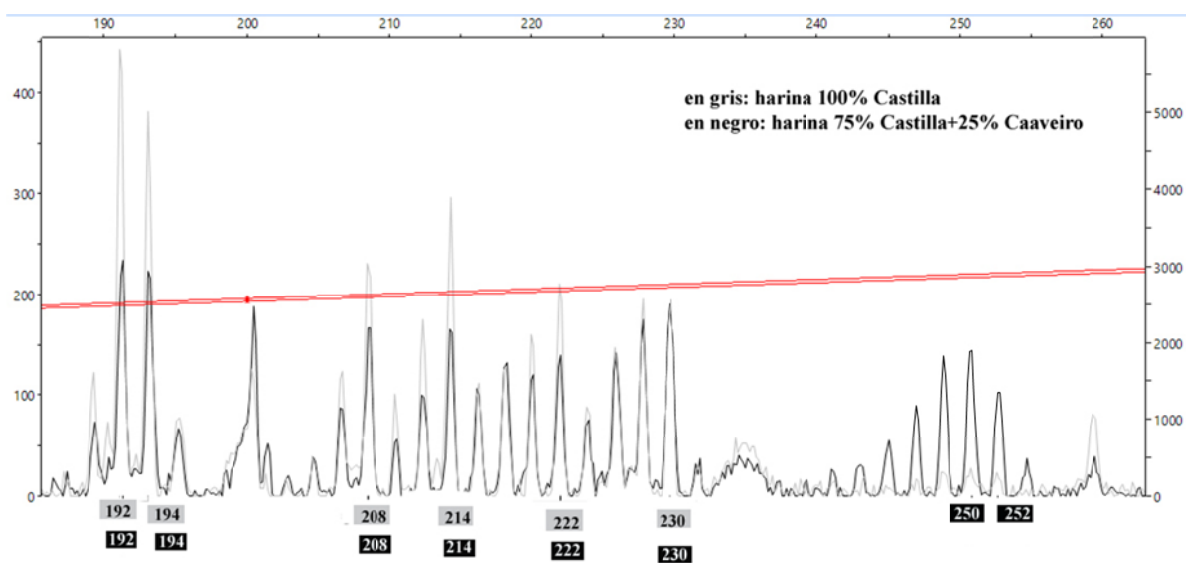


FIG.3