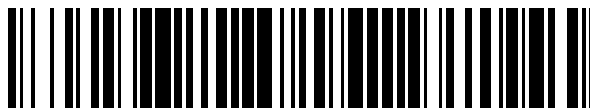


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 227**

21 Número de solicitud: 201031165

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

27.07.2010

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.10.2012

Fecha de la concesión:

12.02.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

22.02.2013

73 Titular/es:

**CONSEJO REGULADOR DEL MEJILLÓN DE
GALICIA**

AVDA. DA MARIÑA 25

36600 VILAGARCÍA DE AROUSA (Pontevedra) ES

72 Inventor/es:

FERNÁNDEZ TAJES, Juan;

LEE LE FANG, Ren Shiang;

LONGA PORTABALES, María Ángeles y

MÉNDEZ FELPETO, Josefina

74 Agente/Representante:

MOLERO MORALED A, Felipe

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE MEJILLÓN DEL GÉNERO MYTILUS.**

57 Resumen:

Procedimiento para la identificación de espacios de mejillón del género *Mytilu*. El procedimiento de la invención permite diferenciar los mejillones del género *Mytilus* por el patrón electroforético observado en un gel de poliacrilamida tras la amplificación por PCR de un fragmento de la región que codifica la proteína polifenólica del pie empleando ADN extraído de ejemplares vivos, conservados en etanol, congelados, envasados en conserva o procesados y la amplificación por PCR se lleva a cabo con el mismo trío de cebadores en las seis especies, generando distintos patrones de bandas específicos para cada una de las especies.

El trío de cebadores degenerados a utilizar con el procedimiento de la presente invención son aquellos que se identifican con las siguientes secuencias: Myti-A 5'-CATCWTACAAASCTATTAAgACAAC; Myti-B 5'-TgCTggATAACTTggCTTTg, Myti-C 5'-ggTTTATATgTTgggggATAAgTAg, siendo S equivalente a C o a G y W equivalente a T o a A.

ES 2 388 227 B2

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE MEJILLÓN DEL GÉNERO *MYTILUS*

Campo y antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la identificación de especies de mejillón del género *Mytilus*, siendo de aplicación en la industria alimentaria para la detección y autenticación de especies de mejillón.

Más en particular, la presente invención se refiere a un procedimiento sencillo para identificar especies de mejillón del género *Mytilus*, más
10 específicamente de las especies *M. californianus*, *M. coruscus*, *M. chilensis*, *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*, así como para la identificación de las combinaciones híbridas de cada una de estas especies, basándose el procedimiento en el análisis de la secuencia de gen que codifica la proteína polifenólica del pie del mejillón. Para lo cual, se emplea ADN extraído de
15 ejemplares vivos, conservados en etanol, congelados, envasados en conserva o procesados y se lleva a cabo una amplificación por PCR con el mismo trío de cebadores en las seis especies, generando distintos patrones de bandas específicos para cada una de las especies.

Tradicionalmente, la identificación de especies en productos de la pesca y
20 de la acuicultura se ha fundamentado en el análisis de las características morfológicas de tales productos, características que a menudo muestran gran plasticidad debido a que están sujetas a influencias ambientales.

En el caso de los moluscos bivalvos y en concreto de los mejillones, la información morfológica proviene en buena parte de las conchas, por lo que, en
25 productos manufacturados o procesados, la identificación se ve muy dificultada o incluso impedida por la pérdida de las mismas, lo que posibilita la aparición de fraudes respecto a la sustitución de unas especies por otras de menor valor.

La explotación de mejillones en países extracomunitarios se ha visto incrementada enormemente en los últimos años y con ella se han multiplicado

las importaciones de mejillón de las especies del género *Mytilus* distintas de *Mytilus galloprovincialis* (especie producida en España), pero de elevada similitud morfológica: *M. californianus*, *M. edulis*, *M. trossulus*, *M. chilensis* y *M. coruscus*. Todo ello ha generado la necesidad de desarrollar técnicas y procedimientos que permitan la identificación unívoca de las especies comercializadas para garantizar el cumplimiento de las normativas de comercialización vigente y evitar fraudes al consumidor.

Ante esta necesidad, en los últimos años, en los productos de la pesca y de la acuicultura, se han empezado a aplicar métodos que se fundamentan en el estudio del ADN, ya que, a diferencia de lo que ocurre con otras biomoléculas como las proteínas, el ADN es una molécula más resistente a la degradación cuando se aplican tratamientos fisicoquímicos durante el procesado (calor, presión, etc.); se encuentra presente en todos los tejidos de los organismos y no muestra una expresión diferencial según el estadio de desarrollo del organismo (Martínez, I. y col., 2005. FAO, Fisheries Technical Paper. Nº 455: 73p).

Los métodos para la identificación de especies basados en ADN generalmente hacen uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mediante el diseño de cebadores apropiados se pueden amplificar directamente tramos de ADN que muestran variantes de longitud o bien se pueden amplificar series diferentes de fragmentos. En otros casos, el producto amplificado puede analizarse por diversos métodos para detectar polimorfismos. Entre éstos se incluye la secuenciación, la digestión con enzimas de restricción o el análisis SSCP (polimorfismo conformacional de cadena sencilla). No obstante, a la hora de aplicar cualquier técnica molecular debe tenerse en cuenta que el ADN extraído de productos manufacturados a menudo no excede el tamaño de unos pocos cientos de pares de bases.

En el caso de los mejillones, y en concreto de los pertenecientes al género *Mytilus*, el primer estudio diseñado para la búsqueda de marcadores moleculares para la identificación de las especies *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* fue desarrollado por Inoue y col. (1995), que estudiaron la variabilidad de la proteína polifenólica del pie y diseñaron cebadores que

producen fragmentos de ADN especie-específicos. En los años posteriores se realizaron diversos estudios en productos frescos que incluyeron más especies del género (Freire y col., 2007. En: Genética y genómica en acuicultura, 115-154).

5 No obstante y a pesar de la gran importancia comercial que tiene el mejillón, existen pocos trabajos en los que se haya estudiado la identificación de todas estas especies en productos procesados o manufacturados. En 2006, Santaclara y col. aplicaron los cebadores diseñados por Inoue y col. (1995) - Me15 y Me16- en la diferenciación de *M. chilensis*, *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*. En una primera etapa, los autores diferencian *M. edulis* y *M. trossulus* mediante un análisis de polimorfismo de longitud de un fragmento del gen que codifica la proteína polifenólica del pie y, en un paso posterior, diferencian *M. galloprovincialis* y *M. chilensis* mediante un análisis PCR-RFLP empleando la enzima de restricción Acil.

15 La Patente ES 2 255 343, "Anticuerpos monoclonales de ratón y su aplicación en la identificación específica de larvas en D del mejillón *Mytilus galloprovincialis*", describe la obtención de dos hibridomas (HYB-M36.5 e HYB-M22.8) productores de los anticuerpos monoclonales de ratón M36.5 y M22.8 a partir de ratones Balb/C inmunizados con larvas de mejillón de dos días de vida (en D) de la especie *Mytilus galloprovincialis*.

Sería por tanto deseable disponer de una técnica rápida, sencilla y fiable que permita identificar las distintas especies que se agrupan dentro del género *Mytilus*, tanto en producto fresco como en procesado y/o manufacturado.

25

Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es poner a disposición un procedimiento sencillo para identificar especies de mejillón del género *Mytilus*, más específicamente de las especies *M. californianus*, *M. coruscus*, *M. chilensis*, *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*, así como para la identificación de

las combinaciones híbridas de cada una de estas especies, basándose el procedimiento en el análisis de la secuencia de gen que codifica la proteína polifenólica del pie del mejillón.

Para ello, se emplea ADN extraído de ejemplares vivos, conservados en etanol, congelados, envasados en conserva o procesados y se lleva a cabo una amplificación por PCR con el mismo trío de cebadores en las seis especies, generando distintos patrones de bandas específicos para cada una de las especies.

Una de las novedades más desatacadas del procedimiento de la invención frente a los anteriormente descritos radica en el empleo simultáneo de tres cebadores nuevos para la amplificación con PCR de una región codificante del gen de la proteína polifenólica del pie.

Descripción de la invención

El objeto de la presente invención es poner a disposición un procedimiento sencillo para identificar especies de mejillón del género *Mytilus*, en concreto *M. californianus*, *M. coruscus*, *M. chilensis*, *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*, así como para la identificación de las combinaciones híbridas de cada una de estas especies, donde el procedimiento se basa en el análisis de la secuencia de gen que codifica la proteína polifenólica del pie del mejillón mediante la utilización simultánea de tres nuevos cebadores nuevos para la amplificación con PCR de una región codificante del gen de la proteína polifenólica del pie.

Para ello, se emplea ADN extraído de ejemplares vivos, conservados en etanol, congelados, envasados en conserva o procesados y la amplificación por PCR se lleva a cabo con el mismo trío de cebadores en las seis especies, generando distintos patrones de bandas específicos para cada una de las especies.

El procedimiento de la invención permite diferenciar los mejillones del género *Mytilus* por el patrón electroforético observado en un gel de poliacrilamida tras la amplificación por PCR de un fragmento de la región que codifica la proteína polifenólica del pie. Para ello, se emplea ADN extraído de
 5 ejemplares vivos, conservados en etanol, congelados, envasados en conserva o procesados y la amplificación por PCR se lleva a cabo con el mismo trío de cebadores en las seis especies, generando distintos patrones de bandas específicos para cada una de las especies.

El trío de cebadores degenerados a utilizar con el procedimiento de la
 10 presente invención son aquellos que se identifican con las siguientes secuencias:

Cebador 1: Myti-A 5'-CATCWTACAAASCTATTAAGACAAC (SEQ ID NO 1);
 Cebador 2: Myti-B 5'-TgCTggATAACTTggCTTTg (SEQ ID NO 2);
 15 Cebador 3: Myti-C 5'-ggTTTATATgTTgggggATAAGTA (SEQ ID NO3);
 siendo **S** equivalente a C o a G y **W** equivalente a T o a A.

Cuando el cebador Myti-A está marcado en 5' con fluorescencia, la visualización de los fragmentos se realiza mediante el empleo de un equipo de secuenciación de ADN.

20

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Aplicación del protocolo PCR a seis especies de mejillón con los cebadores Myti-A, Myti-B y Myti-C y electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (columna 1 y 2- *Mytilus californianus*; 3 y 4-
 25 *M. coruscus*, 5 y 6- *M. edulis*, 7 y 8- *M. trossulus*, 9 y 10- *M. chilensis*, 11 y 12- *M. galloprovincialis*, M- marcadores de peso molecular gradual de 100 pares de bases (pb) desde 100 pb hasta 2.000 pb).

Figura 2: Patrón de bandas analizadas mediante secuenciador obtenidas mediante el empleo del trío de cebadores Myti-A, Myti-B y Myti-C uno de ellos marcado con fluorescencia (Cy5).

5 Ejemplo de realización de la invención

El procedimiento sencillo para identificar las especies de mejillón del género *Mytilus*, *M. californianus*, *M. coruscus*, *M. chilensis*, *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*, así como para la identificación de las combinaciones híbridas de cada una de estas especies, se basa en el análisis de la secuencia de gen que codifica la proteína polifenólica del pie del mejillón empleando ADN extraído de ejemplares vivos, conservados en etanol, congelados, envasados en conserva o procesados, llevándose a cabo una amplificación por PCR, con el mismo trío de cebadores simultáneamente en las seis especies, de una región codificante del gen de la proteína polifenólica del pie, generando distintos patrones de bandas específicos para cada una de las especies.

1) Extracción de ADN

Para la extracción del ADN de ejemplares vivos, conservados en etanol, congelados, envasados en conserva o procesados de las especies de mejillón *Mytilus californianus*, *M. coruscus*, *M. chilensis*, *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* se sigue el método descrito en Fernández-Tajes y col. (2007, Aquaculture Research, Vol. 38: 1205-1212.) con ciertas modificaciones.

Se pesan entre 30 y 50 mg de tejido de muestra procedente de ejemplares vivos, conservados en etanol, congelados, envasados en conserva o procesados en un tubo Eppendorf estéril de 1,5 ml. Se añaden al tubo 450 µl de Tampón de lisis (1M Tris-Base, 0,2M EDTA, 2,5% N-Lauryl-sarcosine) y 5 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) y se incuba a 60°C durante una noche. Transcurrido este tiempo se añaden 4 µl de RNAsa (2mg/ml) y se incuba durante 1 h a 37°C. A continuación se añade un volumen de 150 µl de acetato de amonio (3M pH 6,0) y se mezcla por vortex, centrifugando a 13.000 r.p.m. durante 10 minutos.

El sobrenadante se transfiere entonces a otro tubo Eppendorf estéril, al que se añaden 400 µl de una solución fenol-cloroformo-álcool isoamílico (25:24:1). Tras lavado durante 5 minutos en noria, se vuelve a centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 5 minutos y se transfiere el sobrenadante a otro tubo Eppendorf estéril. A este sobrenadante se añade un volumen de isopropanol frío que se corresponde con el 80% de su volumen y se procede a mezclar por inmersión del tubo, centrifugando a 13.000 r.p.m. durante 10 minutos. Entonces se elimina el sobrenadante y se añaden 400 µl de etanol 70° frío. Tras lavado durante una hora en noria, se centrifuga a 13.000 r.p.m. durante 5 minutos y se elimina el sobrenadante. Por último, se seca el ADN así obtenido y se resuspende en 100 µl de agua estéril.

- 1) Amplificación mediante PCR del fragmento de ADN que codifica para la proteína polifenólica del pie en los mejillones

Para la amplificación PCR del fragmento de ADN que codifica para la proteína polifenólica del pie se emplea un único trío de cebadores a una concentración 0,2 µM:

- | | | |
|------------|--------|---|
| Cebador 1: | Myti-A | 5'-CATCWTACAAASCTATTAAgACAAC (SEQ ID NO 1) |
| Cebador 2: | Myti-B | 5'-TgCTggATAACTTggCTTTg (SEQ ID NO 2), |
| Cebador 3: | Myti-C | 5'-ggTTTATATgTTgggggATAAgTAg (SEQ ID NO 3), |

siendo **S** equivalente a C o a G y **W** equivalente a T o a A.

La amplificación por PCR se realiza en un volumen final de 25 µl, conteniendo 25 ng de ADN, 2,5 µl de *buffer*10X (con el magnesio incluido), dNTP 200 µM, 0,2 µM de cada cebador, 1U de la enzima *Taq* polimerasa. El protocolo de la PCR se ejecutará de acuerdo con el siguiente procedimiento: desnaturalización inicial de 4 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos, con un paso final de elongación de 72°C durante 10 minutos.

Los resultados de estos pasos de procedimiento 1) y 2) se muestran en la figura 1.

3) Electroforesis en gel de poliacrilamida para la separación de los
5 fragmentos amplificados

A continuación se lleva a cabo la electroforesis de los productos de la PCR sobre un gel de poliacrilamida al 10%. Los fragmentos amplificados se visualizan tras tinción con bromuro de etidio bajo iluminación con luz ultravioleta.

Una variante de este método, en la que se evita el empleo de bromuro de
10 etidio, consiste en emplear para la PCR uno de los cebadores marcados con fluorescencia de tal forma que la visualización de los fragmentos amplificados y sometidos a electroforesis se realiza mediante un secuenciador de ADN. En el presente procedimiento, cuando el cebador Myti-A está marcado en 5' con fluorescencia, la visualización de los fragmentos se realiza mediante el empleo
15 de un equipo de secuenciación de ADN.

Como resultado de la aplicación del procedimiento de la presente invención se obtiene el patrón de bandas mostrado en la figura 2, analizadas mediante secuenciador, obtenidas mediante el empleo del trío de cebadores Myti-A, Myti-B y Myti-C, uno de ellos marcado con fluorescencia (Cy5).

20 Las distintas especies de mejillón se distinguen por el distinto patrón de bandas amplificadas, a modo de código de barras específico para cada especie. Las diferencias de tamaño de los fragmentos amplificados son apreciables en un gel de poliacrilamida al 10%. El procedimiento desarrollado no depende del ciclo vital de los organismos y es válido para productos frescos, procesados y
25 manufacturados.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la identificación de especies de mejillón del género *Mytilus* que comprende etapas de extracción de ADN, amplificación de la región que codifica para la proteína polifenólica del pie mediante PCR, análisis de los productos amplificados y visualización de los productos digeridos caracterizado porque en la etapa de amplificación de la de la región que codifica para la proteína polifenólica del pie mediante PCR se utiliza el siguiente trío de cebadores degenerados identificados con las secuencias: Cebador 1 Myti-A de SEQ ID NO 1, Cebador 2 Myti-B DE SEQ ID NO 2 y Cebador 3 Myti-C se SEQ ID NO 3.
2. Procedimiento para la identificación de especies de mejillón del género *Mytilus* según la reivindicación 1 caracterizado porque para la PCR se emplea el cebador Myti-A marcado en 5' con fluorescencia de tal forma que la visualización de los fragmentos amplificados y sometidos a electroforesis se realiza mediante un secuenciador de ADN.
3. Procedimiento para la identificación de especies de mejillón del género *Mytilus* según la reivindicación 1, caracterizado porque las especies de mejillón identificadas son *Mytilus californianus*, *Mytilus coruscus*, *Mytilus chilensis*, *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis* y *Mytilus trossulus*, así como combinaciones híbridas de cada una de estas especies.

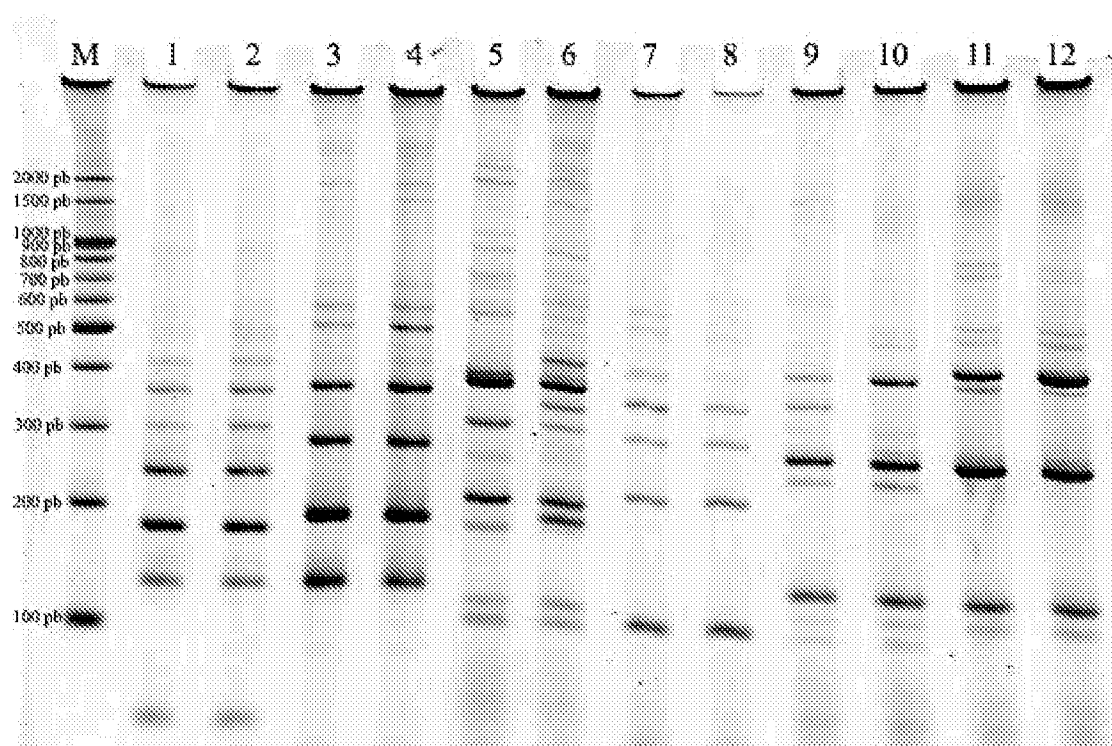


Figura 1

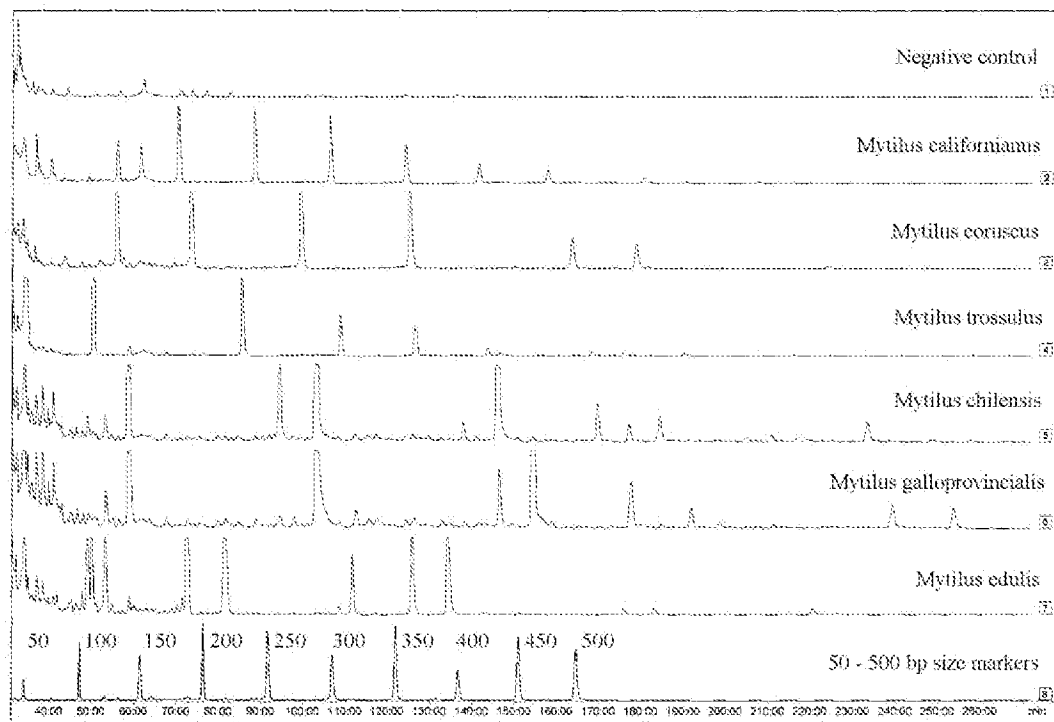


Figura 2

Listado de Secuencias

<110> xxxxxx, xxxxx

<120> IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE MEJILLÓN DEL GÉNERO MYTILUS

<160> 3

<170> BISSAP 1.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Mytilus

<220>

<221> source

<222> 1..25

<223> /mol_type="DNA"
/organism="Mytilus"

<400> 1

catcwtacaa asctattaag acaac

25

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Mytilus

<220>

<221> source

<222> 1..20

<223> /mol_type="DNA"
/organism="Mytilus"

<400> 2

tgctggataa cttggctttg

20

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Mytilus

<220>

<221> source

<222> 1..25

<223> /mol_type="DNA"
/organism="Mytilus"

<400> 3

ggtttatatg ttgggggata agtag

25



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031165

②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.07.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SANTACLARA F.J. et al. "Development of a method for the genetic identification of mussel species belonging to <i>Mytilus</i> , <i>Perna</i> , <i>Aulacomya</i> and other genera" Journal of Agricultural and Food Chemistry (10 julio 2006) Vol. 54, páginas 8461-8470; DOI 10.1021/jf061400u; todo el documento.	1-3
A	KIJEWSKI T. et al. "Genetic composition of cultured and wild mussels <i>Mytilus</i> from the Netherlands and transfers from Ireland and Great Britain" Aquaculture (18 febrero 2009) Vol. 287, páginas 292-296; ISSN 0044-8486; DOI 10.1016/j.aquaculture.2008.10.048; todo el documento.	1-3
A	REGO I. et al. "PCR technique for identification of mussel species" Journal of Agricultural and Food Chemistry (marzo 2002) Vol. 50, N.º. 7, páginas 1780-1784; DOI 10.1021/jf0110957; todo el documento.	1-3

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
27.09.2012

Examinador
M. A. García Coca

Página
1/4

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.09.2012

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-3
Reivindicaciones

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones 1-3
Reivindicaciones

SI
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	SANTACLARA F. J. et al. "Development of a method for the genetic identification of mussel species belonging to <i>Mytilus</i> , <i>Perna</i> , <i>Aulacomya</i> and other genera" Journal of Agricultural and Food Chemistry (10 julio 2006) Vol. 54, páginas 8461-8470; DOI 10.1021/jf061400u.	10.07.2006
D02	KIJEWSKI T. et al. "Genetic composition of cultured and wild mussels <i>Mytilus</i> from the Netherlands and transfers from Ireland and Great Britain" Aquaculture (18 febrero 2009) Vol. 287, páginas 292-296; ISSN 0044-8486; DOI 10.1016/j.aquaculture.2008.10.048.	18.02.2009
D03	REGO I. et al. "PCR technique for identification of mussel species" Journal of Agricultural and Food Chemistry (marzo 2002) Vol. 50, N°. 7, páginas 1780-1784; DOI 10.1021/jf0110957.	Marzo 2002

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

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-3, es un procedimiento para la identificación de especies de mejillón del género *Mytilus*, basado en la amplificación de la región que codifica para la proteína polifenólica del pie mediante PCR y utilizando los cebadores Myti-A (marcado en 5' con fluorescencia), Myti-B y Myti-C.

Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D01 divulga el uso de los cebadores Me15 y Me16 para la ampliación de la región variable (no-repetitiva) del gen que codifica para la proteína polifenólica del pie, para la identificación de las especies *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. chilensis*, *M. trossulus* y sus híbridos.

El documento D02 divulga la utilización de distintos marcadores nucleares para la identificación de especies del género *Mytilus*, en concreto para la identificación de *M. galloprovincialis*, *M. edulis*, *M. trossulus* y sus híbridos. Para la identificación de estas especies utilizan los cebadores Me15, Me16, EFbis y M7.

El documento D03 divulga la utilización de análisis RAPD (amplificación aleatoria de DNA polimórfico), basados en la amplificación de DNA utilizando primers "al azar", para la identificación genética de *M. galloprovincialis*.

Aunque en los documentos citados, que en cierta medida son un resumen de los métodos (concretamente de PCR) y cebadores que se están utilizando para la identificación de distintas especies del género *Mytilus*, se divulgan distintos cebadores y primers, en ellos no se divulgan los cebadores de la invención. Además, con los cebadores divulgados en estos documentos tampoco es posible la identificación de todas las especies que se reivindican en la solicitud.

Por lo tanto, ninguno de los documentos citados del estado de la técnica anterior a la solicitud, tomados solos o en combinación, revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-3. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-3. Así, la invención contenida en las reivindicaciones 1-14 es con referencia a los documentos D01-D03 nueva y se considera que implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).