

REIVINDICACIONES

1. Un kit de sexado temprano no invasivo mediante PCR en tiempo real para determinar el sexo de paiche (*Arapaima gigas*) en cualquier edad, caracterizado porque el kit comprende uno de los pares de cebadores MSR_107 directo (TGGAAATCAGGGTGAACTGT) y MSR_107 reverso (GTCGTCCCTAAGCTGGTTATTATC) o MSR_129 directo (GATAATAACCAGCTTAGGGACGAC) y MSR_129 reverso (CGCTGTAATACACCTATAACCATCC).
2. El kit de sexado temprano no invasivo mediante PCR en tiempo real para determinar el sexo de paiche (*Arapaima gigas*) en cualquier edad de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende además hisopos estériles, solución amortiguadora de lisis, solución acuosa de NaOH, controles endógenos TBPL1 directo (CTCTGGCTTG TAGATGACATTGG) y TBPL1 reverso (TTTGTTGCGTGTCTCTGTGG) y SYBR-Green I Master Mix 2x.
3. Un método no invasivo de determinación temprana del sexo mediante PCR en tiempo real para paiche (*Arapaima gigas*), el cual comprende las siguientes etapas:
 - a) Proporcionar una muestra de mucus de branquias de *Arapaima gigas* o un segmento de la aleta caudal;
 - b) Extraer ADN genómico e incubar en bloque térmico;
 - c) Preparar y realizar qPCR agregando el ADN genómico extraído en la etapa b) a una solución A y agregar una premezcla de uno de los pares de cebadores MSR107 o MSR 129 y cebadores del HKG y hacer la reacción; y
 - d) Analizar las curvas de disociación.

4. El método no invasivo de determinación temprana del sexo mediante PCR en tiempo real para paiche (*Arapaima gigas*) de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque en la etapa b) la extracción del ADN genómico se realiza mediante la adición a la muestra en solución amortiguadora de lisis de 180µl de NaOH 50 mM, y 0.2 mM EDTA y se incuba en bloque térmico por 5 minutos a 95°C, al que luego se le agrega 180µl de Tris-HCl 300 mM pH 8.0.

5. El método no invasivo de determinación temprana del sexo mediante PCR en tiempo real para paiche (*Arapaima gigas*) de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque en la etapa c) la preparación y realización de PCR en tiempo real (qPCR) se realiza mediante la adición del ADN genómico extraído en la etapa b) a una solución A que comprende enzima *Taq*-polimerasa, fluoróforo intercalante SYBR Green, dNTPs, solución amortiguadora y Mg²⁺ e inmediatamente se agregan una premezcla de los pares de cebadores MSR_107 directo (TGGAATCAGGGTGAACTGT) y MSR_107 reverso (GTCGTCCCTAAGCTGGTTATTATC) y MSR_129 directo (GATAATAACCAGCTTAGGGACGAC) y MSR_129 reverso (CGCTGTAATACACCTATACCATCC) y de los cebadores del gen presente en machos y hembras *TATA-Box Binding Protein Like 1* (HKG) TBPL1 directo (CTCTGGCTTG TAGATGACATTGG) y TBPL1 reverso (TTTGTTGCGTGTCTCTGTGG).

6. El método no invasivo de determinación temprana del sexo mediante PCR en tiempo real para paiche (*Arapaima gigas*) de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque en la etapa c) en donde los tubos de reacción son puestos en un equipo termociclador y la reacción se realiza con 5 minutos a 95°C y seguidamente, se realizan 35 ciclos de amplificación, en donde cada ciclo consiste en 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 62°C, posteriormente se realiza la curva de disociación incrementando la temperatura de reacción de 60°C a 95° con pasos crecientes de 2.2°C/s.

7. El método no invasivo de determinación temprana del sexo mediante PCR en tiempo real para paiche (*Arapaima gigas*) de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque el producto de amplificación para el par de cebadores MSR_107 tiene una temperatura de disociación de 76.6°C y el producto de amplificación para el par de cebadores MSR_129 es de 77.5°C.
8. El método no invasivo de determinación temprana del sexo mediante PCR en tiempo real para paiche (*Arapaima gigas*) de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque el producto de amplificación amplificar del gen TATA-Box Binding Protein like 1 (HKG): TBPL1 directo (CTCTGGCTTG TAGATGACATTGG) y TBPL1 reverso (TTTGTGCGTGTCTCTGTGG), tiene una temperatura de disociación (Tm) de 84.7°C.
9. El método no invasivo de determinación temprana del sexo mediante PCR en tiempo real para paiche (*Arapaima gigas*) de acuerdo con la reivindicación 5 caracterizado porque los productos de amplificación se diferencian además mediante electroforesis en gel de agarosa, del de poliacrilamida o una mezcla de agarosa y poliacrilamida.
10. Uso de un kit de sexado temprana no invasivo mediante PCR en tiempo real para paiche (*Arapaima gigas*) mediante la identificación de machos de *A. gigas* mediante la detección de la MSR usando uno de los pares de cebadores MSR_107 directo (TGGAATCAGGGTGAACTGT) y MSR_107 reverso (GTCGTCCCTAAGCTGGTTATTATC) o MSR_129 directo (GATAATAACCAGCTTAGGGACGAC) y MSR_129 reverso (CGCTGTAATACACCTATACCATCC).