



Javier Quintero¹, Dailos Hernández-Reyes², Nieves González-Henríquez²
¹ Universidad de Santiago de Compostela. Laboratorio SISMOL. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Campus Vida. CIBUS.
² Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Laboratorio BioMol. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias del Mar.
 E-mail autor: nievesevira@gmail.com

Resumen

Un simple procedimiento para la autenticación la Pinchagua, *Opisthonema* spp., en conservas de Ecuador incluye: i) la amplificación por PCR específica de un fragmento (210pb) indicando en las muestras negativas la ausencia de *Opisthonema* en la elaboración de las conservas; ii) la digestión con la enzima *Mbo* I en las muestra positivas permite discriminar entre las especies de *Opisthonema* (*O. bulleri*, *O. meridastre* y *O. libertate*).

INTRODUCCIÓN

Los distintos tipos de Pinchagua (*Opisthonema* spp.), constituyen un grupo de especies de gran importancia comercial dentro de los pequeños pelágicos tropicales; en aguas ecuatorianas se han citado cuatro especies, tres para el área costera continental: *Opisthonema bulleri*, *O. libertate* y *O. meridastre*, y *O. berlangai* para las islas Galápagos. Estas especies son difíciles de distinguir a través de sus características morfológicas, por lo que, se las denomina a nivel de género (*Opisthonema* spp.) (González N, 2010).

Son unas de las principales especies capturadas por la flota pesquera sardinera (Tabla 1), por lo que es motivo de análisis del Instituto Nacional de Pesca (INP). Esta especie forma parte de la dieta alimentaria de la población y se la emplea como materia prima para la elaboración de conservas. Su captura, y procesamiento (embarcaciones, pescadores, evisceradores, etc) genera ingresos para las comunidades pesqueras (pescadores y sus familias) que dependen de este recurso; así como también las exportaciones de las conservas enlatadas genera un rubro importante de divisas para el país. (González N, 2010).

Estos peces son utilizados en un 90% para la fabricación de conservas en lata, que se realiza principalmente en la zona costera de la Provincia de Manabí, ocupando a más de 8000 personas en la época de las capturas, ya que las especies de *Opisthonema* spp (pinchagua o sardina ecuatoriana) llegan a la fábrica evisceradas y sin cabeza. El 68 % de la producción se va a los países de Sudamérica y Centroamérica (Colombia y Cuba), el 28% a EEUU y solo el 4% a Europa (Figura 1). La exportación de pescado y demás productos pesqueros es el tercer rubro en importancia en las exportaciones ecuatorianas, tras el petróleo y el banano.

MATERIAL Y MÉTODOS

El análisis se realizó sobre muestras de productos enlatados de Sardinias (Pinchagua, Sardinias crinuda...), elaborados en Ecuador (Figura 2).

Material biológico de referencia de las especies de *Opisthonema* (*O. bulleri*, *O. meridastre* y *O. libertate*) caracterizado genéticamente y depositados en el Banco Genético BioMol de la ULPGC sirvieron de control.

La metodología de aislamiento fue llevada a cabo utilizando procedimientos descritos previamente (Quintero, 2010). Para la extracción del ADN de los tejidos de las conservas se utilizó Speedtools Food DNA extraction kit (BIOTOOLS B&M Labs, S.A.), siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Las PCR fueron elaboradas usando el kit GoTaq (Promega) en un volumen de reacción final de 15 µl, con una concentración de 2,5 mM MgCl₂, 0,8 µM de dNTPs y 0,5 µM de cada primer: OPIS-COX1-1F (5'-CCWCCGTCGAATYCACAATLCCA-3') y OPIS-COX-2R (5'-TTCGGGTGGCCAAAGATGAC-3') y 2 µl de la solución de ADN. Para la amplificación se utilizó el termociclador Simply Amp (Applied Biosystems) siendo usadas condiciones estándar: una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C en 40 segundos, fusión a 60°C durante 40 segundos e extensión a 72°C durante 40 segundos, con una extensión final a 72°C durante 5 min.

Los productos de PCR generados fueron sometidos a digestión enzimática con *Mbo* I, siendo analizados los perfiles de PCR-RFLP.

Mbo I (fragmento COX1 210 pb)			
<i>O. bulleri</i>	<i>O. libertate</i>	<i>O. meridastre</i>	
93	77	77	
77	48	48	
40	45	40	
	40	27	
		18	

Figura 2. Perfiles de PCR esperados para la digestión del fragmento Opis-COX-1F/2R con la enzima *Mbo* I.

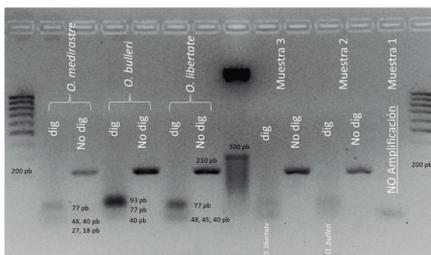


Figura 2. Perfiles de PCR esperados para la digestión del fragmento Opis-COX-1F/2R con la enzima *Mbo* I.

CONCLUSIONES

Un simple procedimiento para la autenticación la Pinchagua, *Opisthonema* spp., en conservas de Ecuador implica la amplificación por PCR específica de un fragmento (210pb). La ausencia de amplificación indicando la ausencia de *Opisthonema* en la elaboración de las conservas. La digestión con la enzima *Mbo* I en las muestra positivas permite discriminar entre las especies de *Opisthonema* (*O. bulleri*, *O. meridastre* y *O. libertate*).

NOMBRE CIENTÍFICO	FAMILIA	NOMBRE COMÚN
ESPECIES PRINCIPALES		
<i>Sardinops sagax</i>	CLUPEIDAE	Sardina del Sur
<i>Scomber japonicus</i>	SCOMBRIDAE	Macarela
<i>Opisthonema spp.</i>	CLUPEIDAE	Pinchagua
<i>Colexerualus mysticetus</i>	ENGRAULIDAE	Chahuaco
<i>Etrumeus teres</i>	CLUPEIDAE	Sardina Redonda
ESPECIES SECUNDARIAS		
<i>Trachurus murphyi</i>	CARANGIDAE	Jurel
<i>Axote spp.</i>	SCOMBRIDAE	Botelita
<i>Engraulis ringens</i>	ENGRAULIDAE	Anchoveta
<i>Anchoa spp.</i>	ENGRAULIDAE	Rolizo
OTRAS ESPECIES		
<i>Decapterus macrostoma</i>	CARANGIDAE	Picadillo
<i>Peprilus medius</i>	STROMATEIDAE	Gallinaza

Tabla 1. Ecuador subflota pesquera peces: pelágicos pequeños.



Figura 1. Datos 2009 sobre las cantidades exportadas de tipo sardina. Fuente Ecuador Pesquero.



Figura 2. Muestras analizadas de productos enlatados de Sardinias (Pinchagua, Sardinias crinuda...), elaborados en Ecuador

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cebadores OPIS-COX1-1Fy OPIS COX1-2R han sido diseñados de forma específica para la amplificación selectiva de *Opisthonema* spp. En consecuencia, la falta de amplificación a partir del ADN aislado de una muestra problema indica la ausencia de materia prima proveniente de *Opisthonema* spp. Tal es el caso de la muestra de conserva n°1, donde no se observa amplificación, indicando la ausencia de *Opisthonema* spp. en su elaboración

La obtención de un fragmento de 210 pb indica la presencia de ADN de *Opisthonema* spp. en las muestras 2 y 3. Este fragmento amplificado ha sido seleccionado debido a que contiene sitios de reconocimiento específicos para la enzima de restricción *Mbo* I, y además posee un tamaño amplificable a partir de ADN degradado, tal y como el extraído a partir de muestras de productos procesados, como transformados y conservas (Quintero et al. 1998), posibilitando así el análisis e identificación de tales productos comerciales. La digestión *in silico* del amplicón generado con los primers OPIS-COX1-1F y OPIS-COX1-2R con la enzima de restricción *Mbo* I (* GATC) origina patrones de restricción específicos de cada una de las 3 especies consideradas del Pacífico (Figura 2). Para las especies que se comercializan en Ecuador (*O. libertate*, *O. bulleri*) y *O. meridastre*), hay fragmentos comunes de 77 y 40 pb. Sin embargo, *O. bulleri* presenta un fragmento exclusivo de 93pb, mientras que *O. meridastre*, muestra dos fragmentos específicos de 27 y 18 pb (Fig. 2). Debe tenerse en cuenta la ausencia de datos para *O. berlangai*, una especie endémica de Galápagos, que podría originar tanto patrones distintos como comunes con las especies incluídas en el presente análisis. Las muestras 2 y 3 presentan lños patrones de *O. bulleri* y *O. meridastre*, respectivamente, indicando la utilización de estas especies para la elaboración de tales conservas.

Referencias

Bonilla R, & Sánchez 2003. Características biológicas y proceso de elaboración de unidades de la pinchagua (*Opisthonema* spp.) en Ecuador. *Investigación y Ciencia*. 20(2): 1-6.
 Quintero J, C. G. Sierra R, Berlanga J, E. Pizarro, A. Medina, A. Franco, Martín M, Rey, Villalba, 2011. Muestras de *Opisthonema* obtenidas por procesamiento PCR de sardineras y análisis de sus patrones de restricción con la enzima *Mbo* I. *Investigación y Ciencia*. 20(2): 1-6.
 Quintero J, R. Berlanga, & R. Acevedo. 2012. Guía de identificación y posiblidad genética de especies marítimas. BIODIVERS, programa NAC. 2007-2013. Departamento de Biología.