

# Simple procedimiento para la autenticación de la Pinchagua, *Opisthonema* spp., en conservas de Ecuador

Javier Quinteiro<sup>1</sup>, Dailos Hernández-Reyes<sup>2</sup>, Nieves González-Henríquez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Santiago de Compostela. Laboratorio SISMOL. Departamento de Bioquímica e Bioloxía Molecular. Campus Vida. CIBUS. 15782-Santiago de Compostela (A Coruña).

<sup>2</sup>Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Laboratorio BioMol. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias del Mar.

Correo-e: nieves.gonzalez@ulpgc.es

## RESUMEN

Se ha desarrollado un simple procedimiento para la autenticación de la Pinchagua, *Opisthonema* spp., en conservas de Ecuador, que incluye: i) la amplificación por PCR específica de un fragmento (210 pb) 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 muestras positivas que permite discriminar entre las especies de *Opisthonema* (*O. bulleri*, *O. meridastre* y *O. libertate*), tras la obtención de patrones específicos de PCR-RFLP.

**PALABRAS CLAVE:** PCR-RFLP, trazabilidad, *Opisthonema*, pinchagua, Ecuador.

## 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

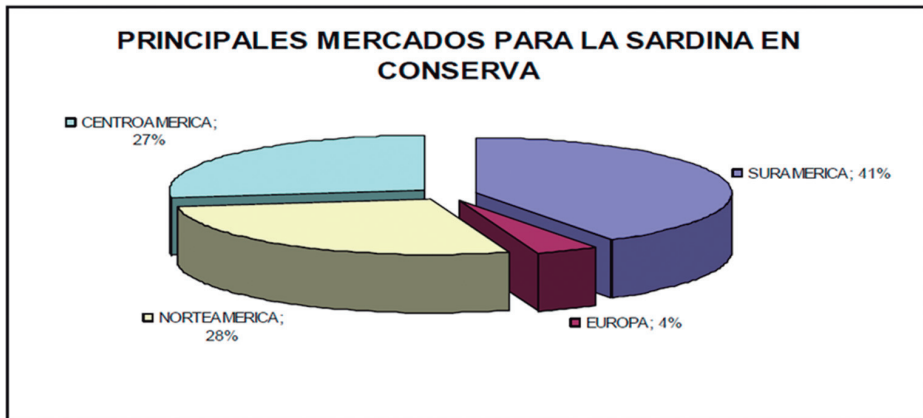
ecuatorianas se han citado cuatro especies, tres para el área costera continental: *Opisthonema bulleri*, *O. libertate* y *O. medirastre*; y *O. berlangai* para las islas Galápagos. Estas especies son difíciles de distinguir a través de sus características morfológicas, por lo que, se las cita a nivel de género: *Opisthonema* spp. (González, 2010).

Representan unas de las principales especies capturadas por la flota pesquera sardinera (Tabla I), 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 para las exportaciones de las conservas enlatadas, que generan una cantidad importante de divisas para el país. (González, 2010). La exportación de pescado y demás productos pesqueros es el tercer epígrafe en importancia en las exportaciones ecuatorianas, tras el petróleo y el banano.

Estas especies son utilizadas en un 90% para la fabricación de conservas enlatadas, que se realiza principalmente en la zona costera de la Provincia de Manabí, ocupando a más de 8.000 personas en la época de las capturas. Las especies de *Opisthonema* spp (pinchagua o sardina ecuatoriana) llegan a fábrica evisceradas y sin cabeza, conllevando dificultades para su identificación (Tabla I). El 68% de la producción se exporta a países de Sudamérica y Centroamérica (Colombia y Cuba), el 28% a EEUU y solo el 4% a Europa (Fig. 1).

**Tabla I.-** Datos Ecuador subflota pesquera peces: pelágicos pequeños. Fuente INP.

NOMBRE CIENTÍFICO	FAMILIA	NOMBRE COMÚN
<b>ESPECIES PRINCIPALES</b>		
<i>Sardinops sagax</i>	CLUPEIDAE	Sardina del Sur
<i>Scomber japonicus</i>	SCOMBRIDAE	Macarela
<i>Opisthonema</i> spp.	CLUPEIDAE	Pinchagua
<i>Cetengraulis mysticetus</i>	ENGRAULIDAE	Chuhueco
<i>Etrumeus teres</i>	CLUPEIDAE	Sardina Redonda
<b>ESPECIES SECUNDARIAS</b>		
<i>Trachurus murphyi</i>	CARANGIDAE	Jurel
<i>Auxis</i> spp.	SCOMBRIDAE	Botellita
<i>Engraulis ringens</i>	ENGRAULIDAE	Anchoveta
<i>Anchoa</i> spp.	ENGRAULIDAE	Rollizo
<b>OTRAS ESPECIES</b>		
<i>Decapterus macrosoma</i>	CARANGIDAE	Picudillo
<i>Peprillus medius</i>	STROMATEIDAE	Gallinaza



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

## MATERIALES Y MÉTODOS

El análisis se realizó sobre muestras de productos enlatados de Sardinas (“Pinchaguas”, “Sardina crinuda”, ...), elaborados en Ecuador (Fig. 2).

Se dispuso de material biológico de las especies de *Opisthonema* (*O. bulleri*, *O. meridastre* y *O. libertate*), caracterizado genéticamente y depositados en el Banco Genético de BioMol de la ULPGC, siendo utilizados como control de referencia.

La metodología de aislamiento fue llevada a cabo utilizando procedimientos descritos previamente (Quinteiro, 2011; Quinteiro *et al.*, 2016). 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 del fabricante.

Las PCR fueron elaboradas usando el kit GoTaq (Promega) en un volumen de reacción final de 15  $\mu$ L, con una concentración de 2,5 mM  $MgCl_2$ ; 0,8  $\mu$ M de dNTPs y 0,5  $\mu$ M de los cebadores específicamente diseñados para este trabajo: OPIS-COX1-1F (5'-CCWCCTGCAATYTCACAATACCA-3') y OPIS-COX-2R (5'-TTCTGGGTGGCCAAAGAATCAG-3') y 10-50 ng de ADN. Para la amplificación se utilizó el termociclador Simply Amp (Applied Biosystems), siendo usadas condiciones

Simple procedimiento para la autenticación de la ...

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 y 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.



**Figura 2.-** Muestras analizadas de productos enlatados de Sardinas (“Pinchaguas”, “Sardina 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. (Fig. 3 y 4). Tal es el caso de la muestra de conserva n°1, dónde se observa una muy débil amplificación, indicando la ausencia de *Opisthonema* spp. como ingrediente, pero siendo detectadas trazas. En esta muestra el etiquetado indica la posible presencia de un variado grupo de especies, incluyendo *Scomber japonicus*, *Auxis thazard*, *Sardinops sagax*, *Etrumeus teres* y *Opisthonema libertate*. El resultado permite descartar la presencia de esta última especie como ingrediente principal en esta lata, pero las trazas indicarían el uso rutinario de esa especie en las instalaciones y en la fabricación de otros lotes.

La obtención de un fragmento de 210 pb indica la presencia de ADN de *Opisthonema*

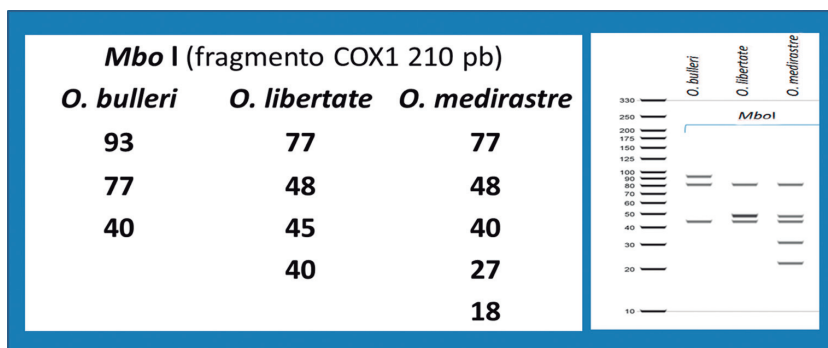
spp. en las muestras 2 y 3. Este fragmento amplificado ha sido seleccionado debido a que contiene sitios de reconocimiento específicos de especies para la enzima de restricción *Mbo* I, y además posee un tamaño amplificable a partir de ADN degradado, tal y como el extraído a partir de muestras de productos procesados, como transformados y conservas (Quinteiro *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 3). Para las especies que se comercializan en Ecuador (*O. libertate*, *O. bulleri* y *O. meridastre*), hay fragmentos comunes de 77 pb y 40 pb. Sin embargo, *O. bulleri* presenta un fragmento exclusivo de 93 pb, mientras que *O. medirastre*, muestra dos fragmentos específicos de 27 y 18 pb (Fig. 4).

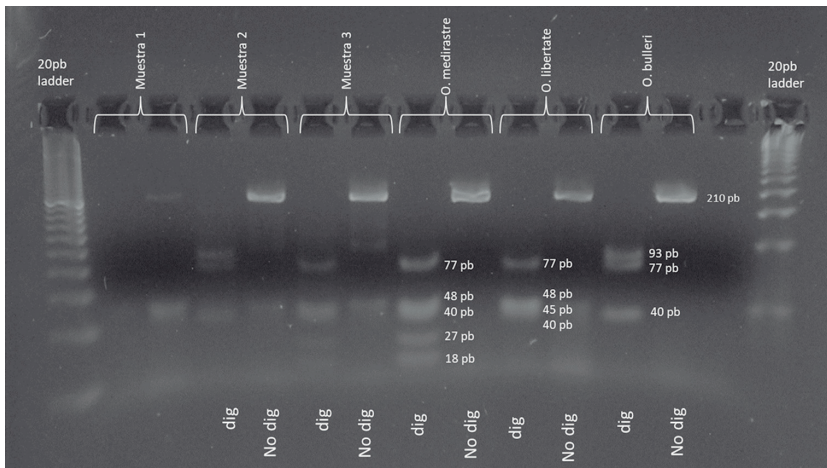
Debe tenerse en cuenta la ausencia de datos para *O. berlangai*, una especie endémica de Galápagos, que podría originar tanto patrones distintos como comunes con las especies incluidas en el presente análisis.

Las muestras 2 y 3 presentan los patrones de *O. bulleri* y *O. medirastre* respectivamente, indicando la utilización de estas especies para la elaboración de las conservas analizadas. Así la muestra 2 presenta la doble banda específica, correspondiente a los fragmentos de 93 y 77 pb, característica de *O. bulleri*. La muestra 3 presenta las bandas de menor tamaño (27 y 18 pb) correspondientes a *O. medirastre*.

Aunque no se ha detectado en este análisis, el protocolo de PCR-RFLP permitiría la detección y una identificación sencilla en el caso de la presencia de mezcla de especies, originándose una mezcla de patrones específicos.



**Figura 3.-** Patrones de PCR-RFLP esperados para la digestión del fragmento Opis-COX-1F/2R con la enzima *Mbo* I.



**Figura 4.-** Patrones de PCR-RFLP observados tras la digestión del fragmento Opis-COX-1F/2R con la enzima *Mbo* I.

## CONCLUSIONES

Un simple procedimiento para la autenticación de la Pinchagua, *Opisthonema* spp., en las conservas de Ecuador, implica la amplificación por PCR específica de un fragmento (210pb).

La ausencia de amplificación de este fragmento indica la ausencia de *Opisthonema* en las conservas.

La digestión con la enzima *Mbo* I en las muestra positivas permitió discriminar entre las especies de *Opisthonema* (*O. bulleri*, *O. meridastre* y *O. libertate*), utilizadas como ingredientes en la elaboración de las conservas.

## BIBLIOGRAFÍA

- González N. y Solís E. 2010. Características biológico-pesqueras y proceso de elaboración de enlatados de la pinchagua (*Opisthonema* spp.) en Ecuador. *Boletín Científico y Técnico* 20 (7): 19-46.
- Quinteiro J. 2011. *Filogenia molecular, estructura poblacional y trazabilidad genética de escómbridos (Pisces: Scombridae)*. Universidad de Santiago de Compostela. Tesis Doctoral.
- Quinteiro J., Manent P., Assunção P., Medina C., Sarmiento R. 2016. *Guía de procedimientos y protocolos genéticos de especies marinas*. Editores: Nieves González-Henríquez, Manuel Rey-Méndez. ISBN 978-84-608-6634-3. Depósito legal C 364-2016
- Quinteiro J., Sotelo C. G., Rehbein H., Pryde S. E., Medina I., Perez-Martin R. I., Rey-Mendez M., y Mackie I. M. 1998. Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (4):1662-1669.