

Trazabilidad genética en conservas elaboradas a partir de túnidos y caballa en Cabo Verde

Javier Quinteiro¹, Nilson Brás², Isilda Fortes², Manuel Rey-Méndez¹, Corrine Almeida², Pablo Manent³, Nieves González-Henríquez³

¹Departamento de Bioquímica e Biología Molecular. Universidade de Santiago de Compostela.

²Departamento de Engenharias e Ciências do Mar. Universidad de Cabo Verde.

³Departamento de Biología. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC).

E-mail: nieves.gonzalez@ulpgc.es.

Resumen

En Cabo Verde, la pesca representa un importante factor socio-económico, con una fundamental industria implicada en la elaboración de productos en conserva a partir de un juego limitado de especies. Se incluyen la caballa macarela (scad caballa), *Decapterus macarellus* (Cuvier, 1833), como especie pesquera destacada en Cabo Verde, y diversas especies de túnidos de los géneros *Thunnus*, *Auxis* y *Kastuwonus*. La trascendencia de estos productos para Cabo Verde y la normativa de etiquetado exigible por mercados, tales como el europeo, demanda una profundización en metodologías aplicables al control de la calidad de dichos productos, en concreto en la autenticación de la materia prima utilizada en su elaboración. Para ello, las metodologías de identificación por PCR aplicadas a productos en conserva en basaron i) en el análisis comparativo de secuencias de ADN homólogas, ii) la obtención de patrones de especies específicas de PCR-RFLP y, iii) PCR específica en *D. macarellus*. Los resultados de identificación de la materia prima utilizada en la elaboración de las conservas mostraron la presencia de, además de *D. macarellus*, *Scomber scomber* y *Scomber colias*, en productos conteniendo etiquetados como caballa macarela. En cuanto a las conservas de túnidos solo se detectó la presencia de *Kastuwonus pelamis* en productos que indicaban la presencia compartida con especies del género *Thunnus*. Las conservas indicando la presencia de especies de *Auxis*, incluyeron tanto *A. thazard* como *A. rochei*. En consecuencia, las metodologías evaluadas pueden ser implementadas en un sistema de trazabilidad para el control de la calidad en productos manufacturados en el caso del archipiélago de Cabo Verde.

Palabras clave

Trazabilidad genética, conservas de pescado, túnidos, caballa.



Introducción

La caballa macarela (scad caballa), *Decapterus macarellus* (Cuvier, 1833), es una especie pesquera importante para Cabo Verde, que representa más del 40% de las capturas de pesca total en 1997 y 1998 (≈ 3700 t). Sin embargo, esta proporción ha disminuido hasta un 20% en los últimos años, siendo de 2104 toneladas en 2004. Las especies pelágicas de la familia Scombridae como *Katsuwonus pelamis* (Linnaeus, 1758), *Thunus albacares* (Bonnaterre, 1788) y *Auxis thazard* (Lacepède, 1800) o *A. rochei* (Risso, 1810) dominan actualmente las capturas en Cabo Verde.

En Cabo Verde la pesca representa un importante factor socio-económico, empleando en 2004 aproximadamente entre el 2,1% y 5,2% de la población. Por otro lado, el consumo per cápita en la última década ha seguido una tendencia positiva, llegando a un valor de 26,5 kg per cápita.

Los productos pesqueros poseen también una creciente importancia en la contribución al equilibrio de la balanza de pagos, llegando a representar el 79,5% de las exportaciones (representando las conservas el 39%), en el año 2010. En 2011 alcanzó el 81,13% (44,5% representado por las conserva) y el 83,1% y 83.13%, (43,3% y 38,9%, para las conservas) en los años 2012 y 2013, respectivamente (Instituto Nacional de Estadística, 2011; Instituto Nacional de Estadística, 2013).

La trascendencia de estos productos para Cabo Verde y la normativa de etiquetado exigible por mercados, tales como el Europeo, demanda una profundización en metodologías aplicables al control de la calidad de dichos productos. A partir de los datos obtenidos sobre individuos de referencia, y morfológica y genéticamente caracterizados, se diseñaron cebadores específicos para el análisis de la caballa macarela, una especie con escasa información genética. En el caso del análisis de túnidos, la amplia disponibilidad de información genética y cebadores (p.ej. Quinteiro 2011; Quinteiro *et al.* 1998) ha permitido aplicar directamente cebadores y protocolos previamente descritos al presente análisis de productos en conserva caboverdianos.

Las metodologías de identificación aplicadas a productos en conserva en basaron i) en el análisis comparativo de secuencias homólogas, ii) la obtención de patrones de especies específicas de PCR-RFLP y, iii) PCR específica en *D. macarellus*.

Materiales y métodos

El análisis se realizó inicialmente sobre material biológico de referencia morfológicamente caracterizado de *Decapterus macarellus*, caballa negra (Cuvier 1833) (N=20) y de las especies locales de túnidos, obtenidos en diversos mercados de las diferentes islas del archipiélago de Cabo Verde. Luego se



obtuvieron muestras de productos enlatados elaborados en Cabo Verde y comercializados localmente. La metodología de aislamiento fue llevada a cabo utilizando procedimientos descritos previamente. El ADN de tejidos fueron purificados con E.Z.N.A.®DNA Tissue Kit (Omega Bio-Tek, Inc.) y los de las conservas con 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 MgCl₂ que varió de 1,5 mM a 3,5 mM, 0,8 µM de dNTPs e 0,5 µM de cada primer y 2 µl de la solución de ADN. Para la amplificación se utilizó el termociclador 2720 (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 50°C durante 40 segundos e extensión a 72°C durante 70 segundos, con una extensión final a 72°C durante 5 min.

En *D. macarellus*, se llevó a cabo la amplificación un fragmento estándar para barcoding localizado en el gen COX1, y de dos fragmentos del Citocromo b (CB12 y CB34), con nuevos cebadores diseñados en base a secuencias obtenidas para esta especie. Además, el diseño de cebadores específicos (DMAC-CR-1F/2R) en la región control del ADN mitocondrial permitió la amplificación específica de especie de dicho fragmento. De forma similar, en el caso de las especies de túnidos los fragmentos amplificados se localizaron en el citocromo b y región control (Quinteiro 2011; Quinteiro et al. 1998). Los fragmentos fueron sometidos al análisis comparativo de secuencias homólogas para la identificación de especie. También, con este fin se llevaron a cabo análisis de PCR-RFLP.

Resultados y discusión

Identificación de *Decapterus macarellus* en productos en conserva por análisis comparativo de secuencias

Diversas secuencias obtenidas de conservas se agruparon (Figura 1) en un clado específico junto con secuencias idénticas de referencia de *D. macarellus*. En este caso no se detectaron secuencias de conservas que perteneciesen a otras especies, en especial a especies del género *Scomber*. Con el uso de un pequeño fragmento del gen citocromo b se resuelven claramente los clados divergentes de *Decapterus* e *Scomber*. En contraste, otras muestras obtenidas de conservas y con la secuenciación de un fragmento de la región control, muestran una posición que indica su pertenencia a dos especies de *Scomber* presentes en el Atlántico (Figura 2): *Scomber colias* y *Scomber scombrus*.

En consecuencia los análisis comparativos de las secuencias indican la presencia de, al menos, tres especies en las conservas que declaran como ingrediente a *D. macarellus*, y elaboradas en Cabo Verde. La primera especie es la correspondiente a dicha caballa macarela. A mayores se detectan la caballa del



Atlántico, *Scomber scombrus* y el estornino, *Scomber colias* (clasificada previamente como *S. japonicus*).

Identificación de *Decapterus macarellus* mediante PCR-RFLP

La digestión de los fragmentos amplificados (CB12 y CB34) de tejido de la muestra la referencia la especie *D. macarellus*, produce los patrones esperados (Tabla 1, Figura 3). En el caso de la muestras problema analizadas los patrones de PCR-RFLP coinciden con los patrones observados para las muestras de referencia de la caballa macarela (Figura 3). En consecuencia, se concluye que la materia prima detectada y utilizada en la elaboración de las conservas analizadas corresponde a *D. macarellus*.

Este método constituye una alternativa al basado en el análisis comparativo de secuencias, evitando el requerimiento de secuenciación de fragmentos de PCR y permitiendo una robusta identificación de muestras problema.

Tabla 1. Patrones de PCR-RFLP esperados para los fragmentos CB12 y CB34 en el citocromo b de *D. macarellus*.

Fragmento	Enzimas	Sequências reconocidas	Cortes esperados
CB12	Mbo I	5'-GATC- 3'	71/127
	Hph I	5'-GGTGA(N)8- 3'	57/141
CB34	Mbo I	5'-GATC- 3'	157/24
	Aci I	5' -CCGC- 3'	115/66

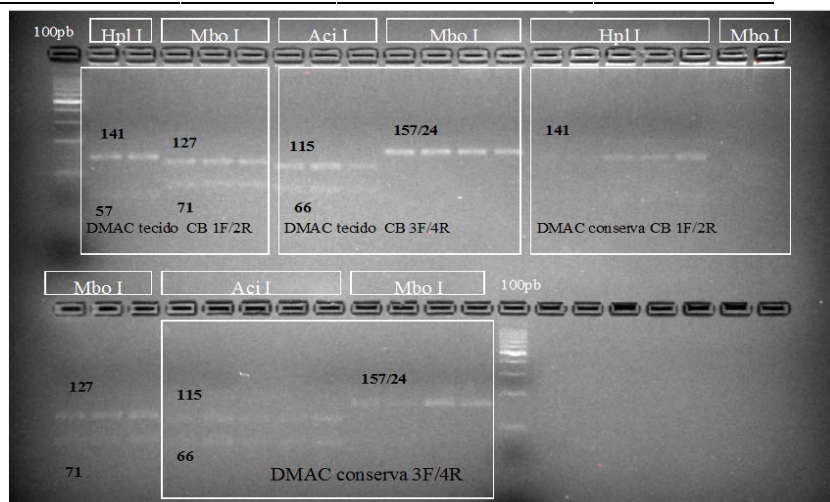


Figura 3. Patrones de RFLP obtenidos tras la digestión de los fragmentos CB12 y CB34 do Citocromo b con las enzimas de restricción *Mbo I*, *Hph I* y *Aci I*. Se incluyen los ADN de referencia de la especie *Decapterus macarellus* e ADN problema extraído de muestras de conservas comerciales.



Detección de *D. macarellus* en conservas por PCR específica

La PCR-específica constituye un método eficaz para el cribado (*screening*) de muestras interrogándolas por la presencia de ADN, en este caso, perteneciente a la caballa macarela, *D. macarellus*. Permite con una única PCR y con la verificación de la presencia de amplificación, detectar ese ADN.

Así a partir de la evaluación in-silico de los cebadores, en las muestras de referencia se evaluó la eficiencia y especificidad de los cebadores DMAC CR 1F y DMAC CR 2R. Se detectó la presencia de *Decapterus macarellus* (Figura 4) en congruencia con los resultados obtenidos por las otras metodologías previamente consideradas.

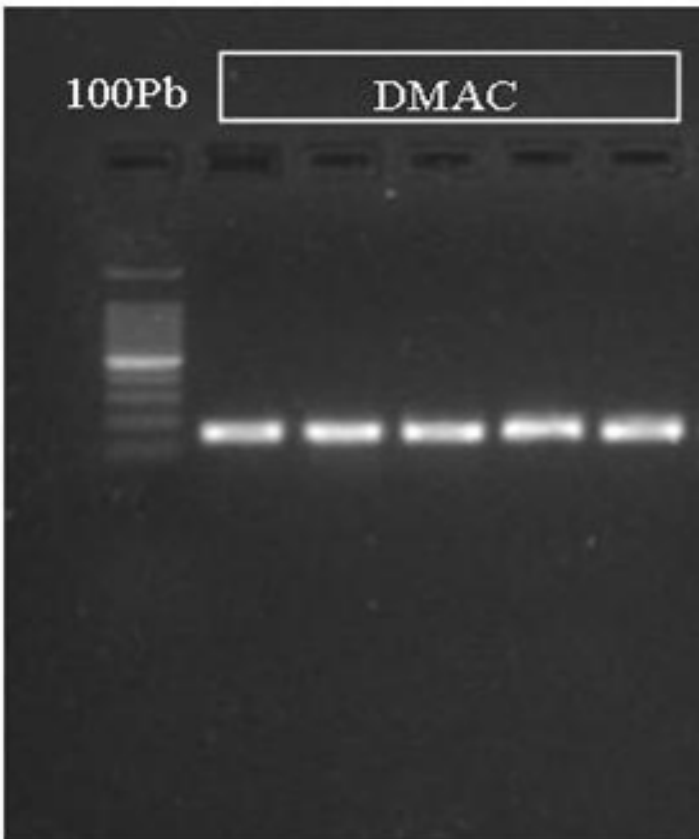


Figura 4. PCR específica en muestras de tejidos preservados, utilizando el juego de cebadores específico (Dmac-CR-1F/2R) para la región control de *Decapterus macarellus*.



Identificación de especies de túnidos en productos en conserva por análisis comparativo de secuencias

El análisis identificativo de muestras de túnidos en conservas se llevó a cabo mediante el análisis comparativo de secuencias del fragmento B126 del citocromo b, incorporando secuencias de muestras locales de referencia e información homóloga del Genbank.

La mayoría de los individuos identificados como *Katsuwonus pelamis*, se agrupan en el mismo cluster, con una escasa distancia intra-específica, incluyendo conservas de los productores analizadas y etiquetadas como “*Katsuwonus pelamis/Thunnus* spp. No se ha detectado materia prima perteneciente a las valiosas especies del género *Thunnus* en dichas muestras (Figura 5).

En relación con el género *Auxis*, se observa que individuos identificados como *Auxis rochei*, se agrupan en el mismo clado, incluyendo las conservas etiquetadas como “*Auxis* spp” y producidas por la compañía A. En cuanto a las conservas producidas por la compañía B, y etiquetados como “*A. thazard*”, estas se agrupan con los individuos y secuencias de referencia identificados como *A. thazard* (Figura 5).

Identificación de especies de túnidos mediante PCR-RFLP

Los productos de PCR del fragmento B126, tanto de especies de referencias como de productos en conserva, fueron digeridos utilizando las enzimas de restricción *MboI* y *MnII* para generar los patrones específicos de las especies implicadas (Tabla 2).

Los resultados son congruentes con los observados tras el análisis de secuencias. Así, el patrón de digestión observado para la especie de referencia *K. pelamis*, es el mismo observado para las conservas etiquetadas por las compañías analizadas como “*K. pelamis/Thunnus* spp”, determinándose únicamente como elaboradas a partir de *K. pelamis* en exclusiva. También en las muestras de *Auxis* spp. se detectan las especies *A. thazard* y *A. rochei* (Figura 6).

Tabla 2. Tamaño de los fragmentos esperados tras la digestión de los productos de PCR del fragmento B126 con las enzimas de restricción *MboI* e *MnII*.

	<i>MboI</i> , Sau3AI ^GATC	<i>MnII</i> CCTC
Fragment B126 L15424/H15573		
<i>T. albacares</i>	47/129	21/25/35/43/52
<i>K. pelamis</i>	176	60/49/43/24
<i>A.thazard</i>	146/30	103/52/21
<i>A.rochei</i>	146/30	78/73/25



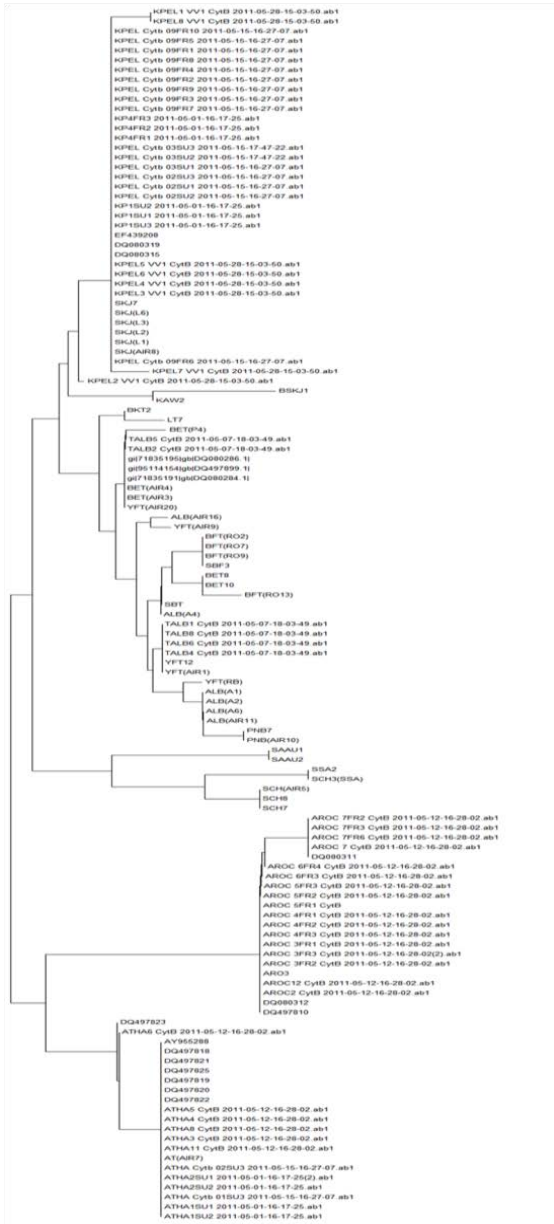


Figura 5. Árbol de neighbor-joining (MEGA) usando el modelo Tamura-Nei, construido en base a las secuencias del fragmento B126 del gen citocromo b. Los códigos de las secuencias de mayor interés son ATHA, para *Auxis thazard*, AROC para *A. rochei*, KPEL o SKJ para *Katsuwonus pelamis*, TALB o YFT para *Thunnus albacares* y BET para *T. obesus*. Las muestras de conservas comerciales incorporan SU o FR en su código.



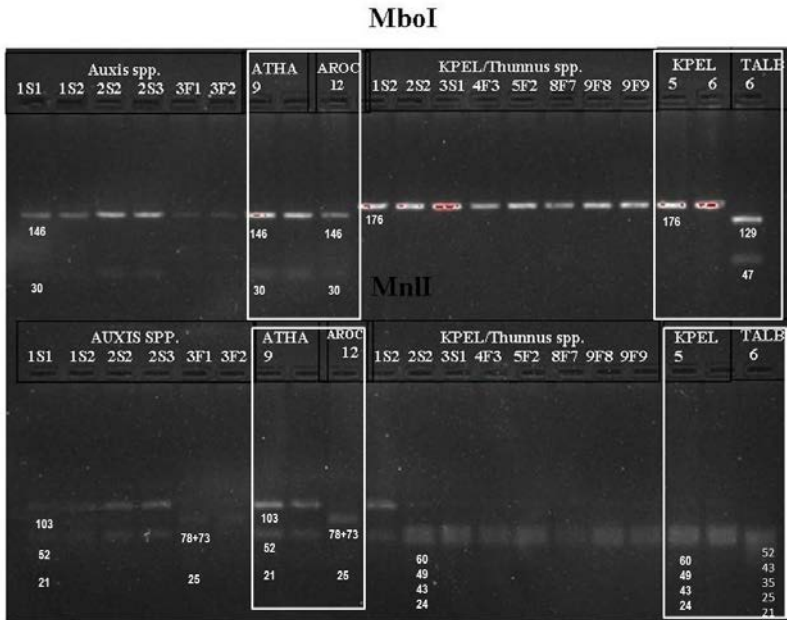


Figura 6. Fotografía del gel de agarosa Metaphore 3,5%, mostrando la digestión del fragmento B126 con las enzimas de restricción *MboI* e *MnII*, para las especies de referencia (en recuadro blanco) *T. albacares*, *K. pelamis*, *A. rochei*, *A. thazard* y para las conservas de túnidos.

Referencias

Quinteiro J (2011) *Filogenia molecular, estructura poblacional y trazabilidad genética de escómbridos (Pisces: Scombridae)*, Universidad de Santiago de Compostela.

Quinteiro J, Sotelo CG, Rehbein H, et al. (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, 1662-1669.

