

## **AUTENTIFICACIÓN DE CARNES PROCEDENTES DE AVES DE CAZA Y DE LA AVICULTURA ALTERNATIVA POR PCR-RFLP.**

María Rojas Diéguez y Teresa García Lacarra.

Tutoras: Isabel González Alonso y Rosario Martín de Santos.

Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. UCM.

### **INTRODUCCIÓN**

En España, el consumo de carne procedente de aves de caza ha aumentado de forma notable en los últimos años. Por otra parte, cada vez son más numerosas las explotaciones dedicadas a la producción intensiva de codorniz, faisán, perdiz y pintada en lo que se conoce como avicultura alternativa (MAPA, 2004). El aumento en el consumo de carne de aves procedentes tanto de la actividad cinegética como de la avicultura alternativa, unido al incremento del comercio internacional de estos productos, justifica la necesidad de prestar una mayor atención a la adecuada autentificación de la carne procedente de estas especies, sobre todo en productos picados, deshuesados, escabechados, etc., donde desaparecen las características morfológicas que facilitan su identificación. La autentificación es necesaria para evitar prácticas fraudulentas derivadas de la sustitución de las especies más valoradas por aquellas de menor valor comercial y organoléptico (Partis *et al.*, 2000). Asimismo, la identificación de especies es importante para verificar el cumplimiento de las prohibiciones y vedas que establece la ley de caza. La caza furtiva, junto con el comercio de especies protegidas, ha contribuido a poner en peligro la supervivencia de un elevado número de especies de aves (Teletchea *et al.*, 2005).

En la actualidad, las técnicas genéticas constituyen una de las alternativas más específicas para llevar a cabo la diferenciación de especies animales (Lenstra *et al.*, 2001). Las técnicas genéticas aplicadas a la identificación de especies se basan, en su mayoría, en la amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y en la posterior utilización de técnicas complementarias como la secuenciación (PCR-secuenciación) o el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) (Sáez *et al.*, 2004; Fajardo *et al.*, 2006).

En consecuencia, el objetivo de este trabajo ha consistido en el desarrollo de marcadores génicos y en la utilización de una técnica de PCR-RFLP para la identificación de codorniz, faisán, perdiz, pintada, urogallo, becada, paloma torcaz y zorzal, y su diferenciación de otras aves de consumo como el pollo, pavo, pato de berbería y oca.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. Selección y extracción del ADN de las muestras cárnicas**

Se utilizaron muestras de tejido muscular procedente de las siguientes especies: codorniz (*Coturnix coturnix*), faisán (*Phasianus colchicus*), perdiz (*Alectoris rufa*), pintada (*Numida meleagris*), urogallo (*Tetrao urogallo*), paloma torcaz (*Columba palumbus*), becada (*Scolopax rusticola*), zorzal común (*Turdus philomelas*), pollo (*Gallus gallus*), pavo (*Meleagris gallopavo*), pato de berbería (*Carina moschata*) y oca (*Anser anser*). Las muestras procedían de la empresa cárnica Antonio de Miguel y de comercios minoristas ubicados en la Comunidad Autónoma de Madrid. Todos los ejemplares fueron identificados morfológicamente antes del procesado de las muestras.

El ADN de las muestras se extrajo utilizando el kit comercial *Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-up* de Promega, de acuerdo al método descrito por Rodríguez *et al.*, (2003).

### **2. Selección de marcadores génicos y diseño de cebadores**

El marcador génico empleado en este trabajo ha sido el gen mitocondrial 12S ARN ribosómico. A partir de las secuencias de este gen disponibles en la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) se diseñó la pareja de cebadores 12SEQDIR (5'-GGT AAA TCT CGT GCC AGC CA-3') y 12SEQINV (5'-TCC AGT ATG CTT ACC TTG TTA CGA C-3') que delimitan un fragmento conservado de aproximadamente 720 pb en todas las especies analizadas.

La comparación de las secuencias y el diseño de los cebadores se realizó empleando el programa EMMA del paquete informático EMBOSS software package, versión 2.9.0.

### **3. Amplificación por PCR de los marcadores génicos seleccionados**

Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en un volumen total de 25  $\mu$ L, con 5 pm de cada cebador y 100 ng de ADN. La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en un termociclador (Techne Ltd. Cambrigde, Reino Unido), programado para realizar una desnaturalización inicial del ADN a 93°C durante 2 min, seguida de 40 ciclos que comprendían las siguientes etapas: 30 s a 93°C para desnaturalizar, 30 s a 65°C para permitir la unión de los cebadores y 45 s a 72°C para extender la cadena de ADN. La última extensión se prolongó durante 5 min. Los fragmentos resultantes se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa D1 al 2%.

### **4. Purificación y secuenciación de los productos de PCR amplificados con los cebadores 12SEQDIR-12SEQINV**

La purificación de los productos de PCR amplificados con los cebadores 12SEQDIR-12SEQINV a partir de las especies animales seleccionadas en este estudio, se realizó utilizando el kit de extracción *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. La secuenciación de los productos de PCR purificados se efectuó en las instalaciones de los laboratorios de la empresa Sistemas Genómicos S.L. (Parque Tecnológico de Valencia, España) y en la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid.

### **5. Técnica del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR**

Mediante la utilización del programa REMAP del paquete informático EMBOSS se determinaron los mapas de restricción de las secuencias obtenidas. Tras la comparación detallada de los mismos, se seleccionaron las endonucleasas AluI y BfaI para la diferenciación de las distintas especies objeto de estudio mediante PCR-RFLP. Los productos de PCR amplificados con los cebadores 12SEQDIR-12SEQINV se incubaron a 37°C durante 16 horas en un volumen

total de 20  $\mu$ L, que contenía 100 ng de ADN amplificado, de 10 a 12,5 unidades de enzima y 10  $\mu$ L de tampón de digestión 10X recomendado por el fabricante.

Las enzimas de restricción originaron distintos cortes en el fragmento de 720 pb en función del número de dianas de restricción presentes en la secuencia. De este modo se obtuvieron fragmentos de menor tamaño que se visualizaron posteriormente mediante análisis electroforético en un gel de agarosa MS8 al 3,5%. El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó por comparación con un marcador de tamaño molecular de 50-1000 pb (Biomarker Low).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La metodología convencional utilizada para la identificación de especies animales ha estado principalmente basada en el análisis de proteínas. Actualmente, el análisis del ADN y, concretamente, las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), constituyen una atractiva estrategia para la identificación de especies ya que son rápidas, pueden diferenciar especies estrechamente relacionadas filogenéticamente y permiten el análisis de muestras sometidas a tratamientos térmicos intensos (Wolf *et al.*, 1999; Sáez *et al.*, 2004).

La práctica totalidad de los estudios realizados en la identificación genética de especies en carnes y productos cárnicos se ha centrado en especies como la vaca, oveja, cabra, cerdo, pollo, oca y pato siendo prácticamente inexistentes los estudios realizados para la diferenciación de carnes y productos cárnicos procedentes de aves de caza y de la avicultura alternativa (Rodríguez *et al.*, 2003; Lahiff *et al.*, 2001; Girish *et al.*, 2005). En este trabajo de investigación se ha empleado una técnica de PCR-RFLP para la identificación de carne procedente de codorniz, faisán, perdiz, pintada, urogallo, becada, paloma torcaz y zorzal, y su diferenciación de otras especies como el pollo, pavo, pato de berbería y oca.

La identificación de especies animales mediante técnicas genéticas exige una cuidadosa selección de los marcadores genéticos a utilizar. En este trabajo, el marcador elegido ha sido el gen que codifica para la subunidad 12S del ARNr. Los genes mitocondriales, y en concreto la región 12S, cumplen muchas de las cualidades exigidas para el desarrollo de las técnicas de identificación de especies (Wolf *et al.*, 1999).

El estudio informático de las secuencias de la región 12S ARNr disponibles para varias especies animales en la base de datos NCBI, permitió el diseño de la pareja de cebadores conservados 12SEQDIR-12SEQINV. Estos cebadores amplificaron un fragmento de ADN de aproximadamente 720 pb en todas las especies seleccionadas en este estudio (*Figura 1*).

Tras la secuenciación de los fragmentos amplificados de la región 12S ARNr en varios individuos de cada especie, se elaboraron los mapas de restricción de las secuencias obtenidas, seleccionándose las enzimas AluI y BfaI para llevar a cabo la diferenciación de las especies de interés. Los perfiles de restricción obtenidos por PCR-RFLP coincidieron con los esperados según los mapas de restricción. La *Tabla 1* muestra el tamaño de los fragmentos obtenidos a partir de los productos de PCR amplificados con los cebadores 12SEQDIR-12SEQINV, tras ser sometidos a digestión con las enzimas AluI y BfaI. La utilización de la enzima AluI permitió la diferenciación de codorniz, faisán, perdiz, pintada, pollo, pavo, pato de berbería y oca, al obtenerse patrones de restricción especie-específicos (*Figura 2A*). Esta diferenciación también fue posible mediante la utilización de la enzima BfaI (*Figura 2B*).

Cuando se compararon los perfiles de restricción de las especies mencionadas anteriormente con los perfiles de otras aves de caza como el urogallo, becada, paloma torcaz y zorzal, resultó necesaria la utilización conjunta de las enzimas AluI y BfaI. El empleo de la enzima AluI permitió la diferenciación de codorniz, perdiz, pintada, becada, paloma torcaz, pollo, pavo y pato de berbería del resto de especies (*Figura 3A*). La identificación de faisán, urogallo, zorzal y oca, se efectuó con la enzima BfaI (*Figura 3B*).

En este trabajo se analizaron quince individuos de cada especie y los resultados obtenidos no mostraron polimorfismo intraespecífico para las enzimas seleccionadas.

## CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación demuestran que la técnica de PCR-RFLP desarrollada permite llevar a cabo la identificación específica de carnes procedentes de aves como la codorniz, faisán, perdiz, pintada, urogallo, becada, paloma torcaz, zorzal, pollo, pavo, pato de berbería y oca.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Dirección General de Universidades de la Comunidad de Madrid (Programa de Vigilancia Sanitaria S-0505/AGR/000265) y por el Ministerio de Educación y Ciencia de España (Proyecto AGL 2004-00121). María Rojas disfruta de una beca del Ministerio de Educación y Ciencia.

## BIBLIOGRAFÍA

Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Hernández, P.E., García, T. y Martín R. PCR-RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*) and goat (*Capra hircus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54: 1144-1150.

Girish, P.S., Anjaneyulu, A.S.R., Viswas, K.N., Shivakumar, B.M., Anand, M., Patel, M. y Sharma, B. Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Science*, 2005, 70: 107-112.

Lahiff, S., Glennon, M., O'Brien, L., Lyng, J., Smith, T., Maher, M. y Shilton, N. Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal (MBM). *Molecular and Cellular Probes*, 2001, 15: 27-35.

Lenstra, J. A., Buntjer J. B. y Janssen, F. W. On the origin of the meat-DNA techniques for species identification in meat products. *Veterinary Sciences Tomorrow*, 2001, 2: 1-15.

MAPA. Estudio de caracterización de la avicultura de carne alternativa en España. 2005.

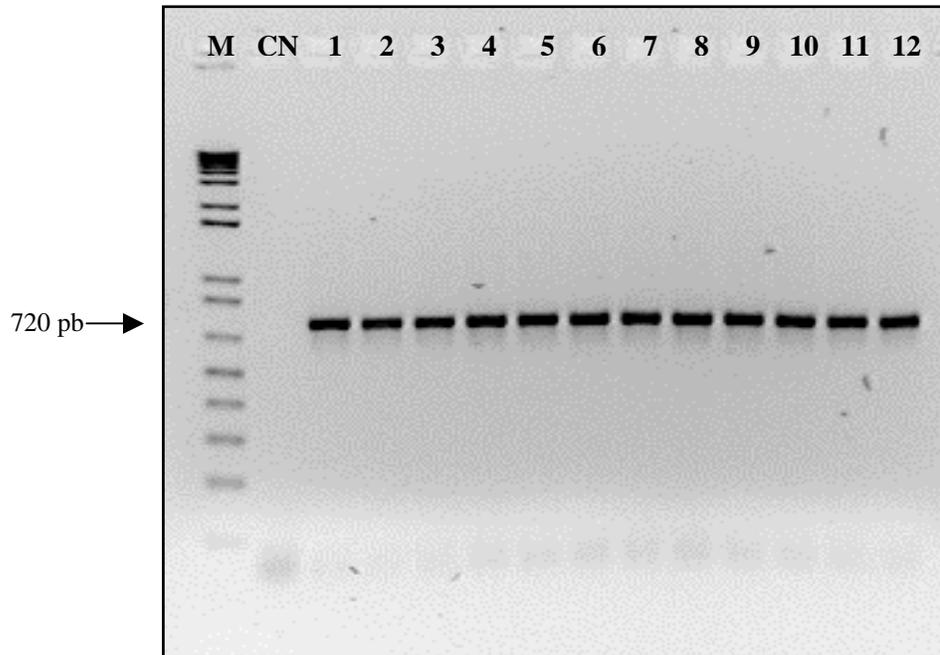
Partis, L., Croan, D., Guo, Z., Clark, R., Coldham, T. y Murby, J. Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Science*, 2000, 54: 369-376.

Rodríguez, M.A., García, T., González, I., Asensio, L., Mayoral, B., Lopez-Calleja, I., Hernández, P.E. y Martín, R. Identification of goose, mule duck, chicken, turkey, and swine in foie gras by species-specific polymerase chain reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51: 1524-1529.

Sáez, R., Sanz, Y. y Toldrá, F. PCR-fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. *Meat Science*, 2004, 66: 659-665.

Teletchea, F., Maudet, C. y Hanni, C. Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends in Biotechnology*, 2005, 23: 359-366.

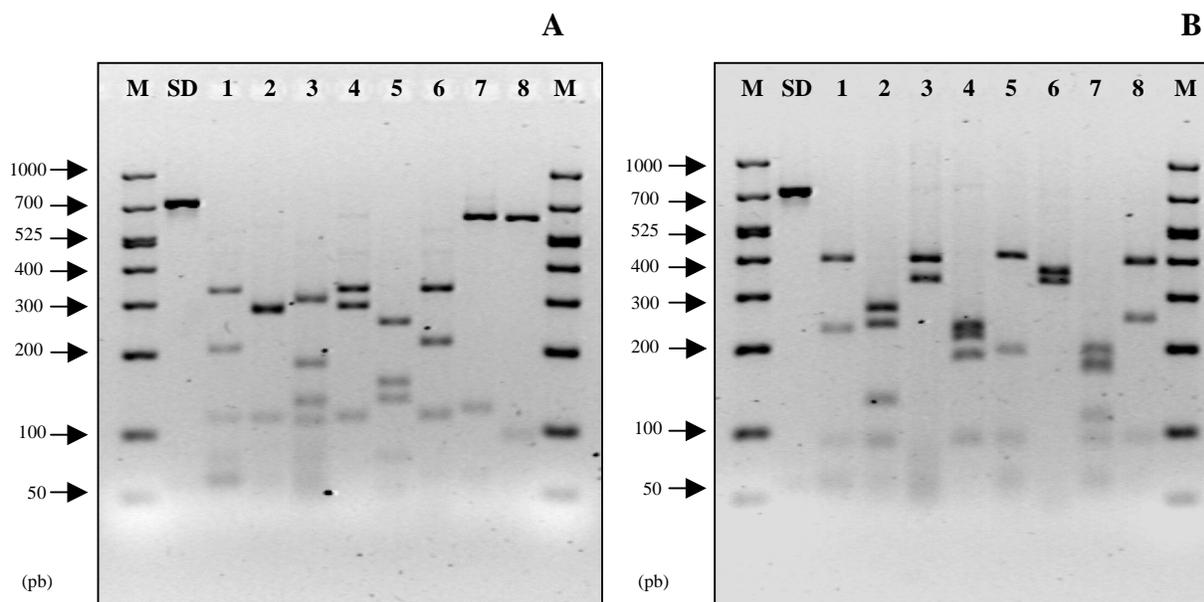
Wolf, C., Rentsch, J. y Hübner, P. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47: 1350-1355.



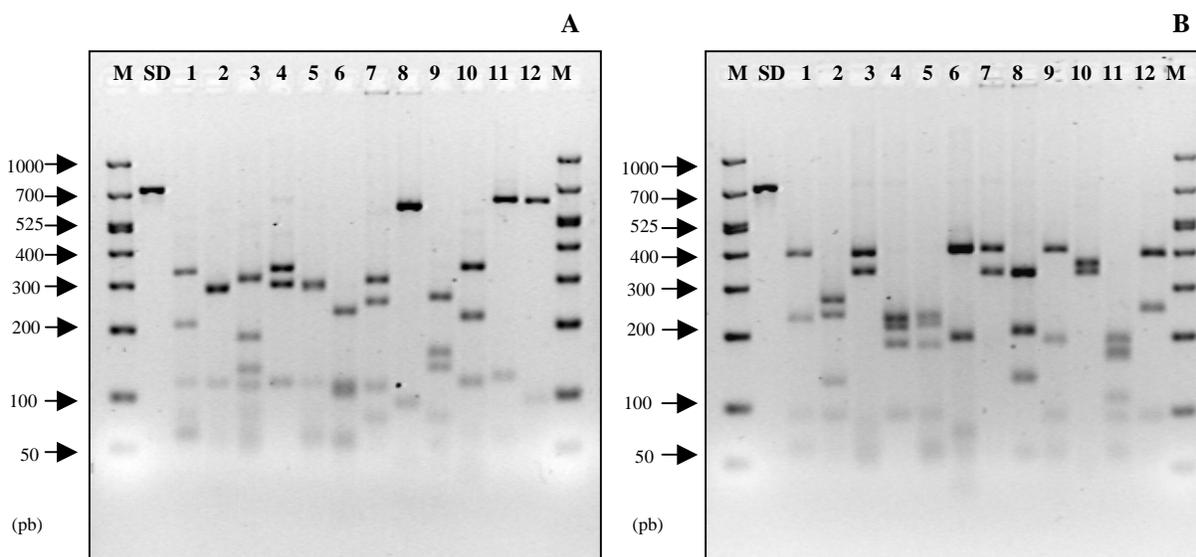
**Figura 1.** Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 12S ARNr amplificados a partir de muestras de tejido muscular con los cebadores 12SEQDIR-12SEQINV. Muestras: codorniz (1), faisán (2), perdiz (3), pintada (4), urogallo (5), becada (6), paloma torcaz (7), zorzal (8), pollo (9), pavo (10), pato de berbería (11) y oca (12). CN: Control negativo. M: Marcador de peso molecular *1 kb plus DNA ladder*.

**Tabla 1.** Tamaño de los fragmentos obtenidos a partir de los productos de PCR amplificados con los cebadores 12SEQDIR-12SEQINV, tras ser sometidos a digestión con las enzimas AluI y BfaI.

ENZIMA	CODORNIZ	FAISÁN	PERDIZ	PINTADA	UROGALLO	BECADA	PALOMA TORCAZ	ZORZAL	POLLO	PAVO	PATO DE BERBERÍA	OCA
<i>AluI</i>	<b>325</b>	<b>283</b>	<b>302</b>	<b>326</b>	<b>286</b>	<b>224</b>	<b>292</b>	<b>572</b>	<b>251</b>	<b>327</b>	<b>609</b>	<b>604</b>
	<b>203</b>	<b>276</b>	<b>178</b>	<b>282</b>	<b>276</b>	<b>112</b>	<b>238</b>	<b>90</b>	<b>153</b>	<b>209</b>	<b>120</b>	<b>94</b>
	<b>113</b>	<b>113</b>	<b>129</b>	<b>113</b>	<b>113</b>	<b>104</b>	<b>107</b>	40	<b>132</b>	<b>113</b>		26
	<b>75</b>	27	<b>108</b>		41	<b>99</b>	<b>73</b>	22	<b>77</b>	40		
		18	5			55	10		51	33		
						54	5		40			
						40			22			
						17						
<i>BfaI</i>	<b>389</b>	<b>267</b>	<b>390</b>	<b>228</b>	<b>231</b>	<b>399</b>	<b>395</b>	<b>331</b>	<b>397</b>	<b>351</b>	<b>191</b>	<b>387</b>
	<b>227</b>	<b>235</b>	<b>332</b>	<b>212</b>	<b>215</b>	<b>194</b>	<b>330</b>	<b>206</b>	<b>191</b>	<b>328</b>	<b>173</b>	<b>246</b>
	<b>88</b>	<b>127</b>		<b>181</b>	<b>182</b>	<b>72</b>		<b>132</b>	<b>90</b>	43	<b>164</b>	<b>91</b>
	12	<b>88</b>		<b>88</b>	<b>88</b>	36		55	36		<b>112</b>	
				12		31			12		<b>89</b>	



**Figura 2.** Análisis electroforético de los fragmentos de restricción obtenidos a partir de los productos de PCR amplificados con los cebadores 12SEQDIR-12SEQINV tras ser sometidos a digestión con la enzima AluI (A) y BfaI (B). Muestras: codorniz (1), faisán (2), perdiz (3), pintada (4), pollo (5), pavo (6), pato de berbería (7) y oca (8). SD: Producto de PCR sin digerir. M: Marcador de peso molecular de 50-1000 pb *Biomarker Low*.



**Figura 3.** Análisis electroforético de los fragmentos de restricción obtenidos a partir de los productos de PCR amplificados con los cebadores 12SEQDIR-12SEQINV tras ser sometidos a digestión con la enzima AluI (A) y BfaI (B). Muestras: codorniz (1), faisán (2), perdiz (3), pintada (4), urogallo (5), becada (6), paloma torcaz (7), zorzal (8), pollo (9), pavo (10), pato de berbería (11) y oca (12). SD: Producto de PCR sin digerir. M: Marcador de peso molecular de 50-1000 pb *Biomarker Low*.