

DIFERENCIACIÓN DE CARNES DE JABALÍ EUROPEO (*Sus scrofa scrofa*) Y CERDO DOMÉSTICO (*Sus scrofa domestica*) MEDIANTE EL ANÁLISIS POR PCR DE LA REGIÓN MITOCONDRIAL D-LOOP Y EL GEN NUCLEAR *MC1R*
DIFFERENTIATION OF EUROPEAN WILD BOAR (*Sus scrofa scrofa*) AND DOMESTIC SWINE (*Sus scrofa domestica*) MEATS BY PCR ANALYSIS TARGETING THE MITOCHONDRIAL D-LOOP AND THE NUCLEAR *MC1R* GENES

V. Fajardo Martín, I. González Alonso y R. Martín de Santos

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid

Resumen

En este trabajo se describe la diferenciación de carnes procedentes de jabalí europeo (*Sus scrofa scrofa*) y cerdo doméstico (*Sus scrofa domestica*) mediante el análisis por PCR de la región mitocondrial D-loop y del gen nuclear que codifica para el receptor 1 de la melanocortina (*MC1R*). La discriminación por PCR-RFLP de jabalí y cerdo en la región D-loop no fue posible. Sin embargo, la técnica de PCR-RFLP desarrollada en el gen *MC1R* determinó perfiles de bandas característicos que permitieron la diferenciación de jabalí y cerdo mediante el empleo de las endonucleasas *BspHI* y *BstUI*.

Palabras clave: jabalí europeo, cerdo doméstico, D-loop, *MC1R*, PCR-RFLP.

Summary

This work describes the differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic swine (*Sus scrofa domestica*) meats by PCR targeting sequences from the mitochondrial displacement loop (D-loop) region and the nuclear melanocortin receptor 1 (*MC1R*) gene. Detailed analysis of every D-loop sequence obtained indicated that PCR-RFLP differentiation between wild and domestic *Sus scrofa* meats was not possible. Nevertheless, the PCR-RFLP technique developed targeting the *MC1R* gene generated characteristic PCR-RFLP profiles that allowed discrimination among meats from wild and domestic swine specimens using *BspHI* and *BstUI* endonucleases.

Keywords: European wild boar, domestic swine, D-loop, *MC1R*, PCR-RFLP.

Introducción

La sustitución de carne de jabalí por carne de cerdo es una práctica fraudulenta habitual debido al diferente precio que alcanzan en el mercado. A pesar de que el jabalí y el cerdo pertenecen a la misma especie, tanto sus características productivas como los atributos de su carne son diferentes (Krkoska *et al.*, 2003). Por ello, es necesario que existan técnicas analíticas rápidas para su correcta identificación (Lenstra *et al.*, 2001).

En este trabajo de investigación se ha abordado la diferenciación de carnes procedentes de jabalí europeo (*Sus scrofa scrofa*) y cerdo doméstico (*Sus scrofa domestica*) mediante el análisis por PCR de dos marcadores genéticos: la región mitocondrial D-loop y el gen nuclear que codifica para el receptor 1 de la melanocortina (*MC1R*).

Material y métodos

Se diseñaron inicialmente los cebadores conservados *Mitdloop-FW* (5'-TACCATGCCGCGTGAAACCA-3') y *Mitdloop-REV* (5'-GGTCTTGTAACCCAGANAAGGAG-3') para la amplificación de un fragmento común de la región mitocondrial D-loop de ~270 pb. A continuación, se amplificaron, purificaron y secuenciaron los amplicones D-loop obtenidos a partir de varios ejemplares de jabalí y cerdo.

Asimismo, se diseñaron los cebadores *MC1R-FW* (5'-AGTGCCTGGAGGTGTCCATTCAC-3') y *MC1R-REV* (5'-CGTAGATGAGGGGGTCCAGGATAGA-3') para amplificar un fragmento de ADN nuclear de 795 pb, específico de la especie *Sus scrofa*. La especificidad de estos cebadores se confirmó tras el análisis por PCR de carne procedente de otras especies de caza y domésticas como ciervo (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*), corzo (*Capreolus capreolus*), rebeco (*Rupicapra rupicapra*), muflón (*Ovis ammon*), cabra montés (*Capra pyrenaica*), vaca (*Bos taurus*), oveja (*Ovis aries*) y cabra (*Capra hircus*). El estudio de los mapas de restricción de dicho fragmento permitió elegir las endonucleasas *BspHI* y *BstUI* para la diferenciación de jabalí y cerdo doméstico por PCR-RFLP. Se analizaron carnes procedentes de 45 individuos de cada subespecie porcina con los cebadores de *Sus scrofa* y, posteriormente, se procedió al análisis de los perfiles de restricción obtenidos tras la digestión de los amplicones con las dos enzimas seleccionadas.

Resultados y discusión

- **Análisis por PCR de la región mitocondrial D-loop**

Tras la amplificación y secuenciación del fragmento D-loop de 270 pb en varios individuos de jabalí y cerdo doméstico no se detectó ninguna posición nucleotídica polimórfica diagnóstica que permitiese la diferenciación directa de las dos subespecies de *Sus scrofa* mediante una técnica de PCR-RFLP.

- **Análisis por PCR-RFLP del gen nuclear MC1R**

Debido a la imposibilidad de diferenciar cerdo y jabalí con el marcador mitocondrial D-loop, se seleccionó el gen nuclear que codifica para el receptor 1 de la melanocortina (MC1R) (Kijas *et al.*, 1998; Fernández *et al.*, 2004).

La pareja de cebadores específicos de *Sus scrofa* (MC1R-FW/MC1R-REV) amplificó el fragmento esperado de 795 pb en jabalí y cerdo doméstico, sin producir señal de amplificación en las otras especies de caza mayor y domésticas analizadas. A continuación, el estudio de los mapas de restricción de varias secuencias del gen MC1R de *Sus scrofa*, permitió la selección de las endonucleasas *BspHI* y *BstUI* para llevar a cabo su diferenciación por PCR-RFLP. Los patrones de bandas de ADN esperados según los mapas de restricción obtenidos con las enzimas seleccionadas determinaron un único perfil para jabalí y dos diferentes para el cerdo doméstico (tipo A o B) (Tabla 1).

Tabla 1: Tamaño de los patrones de bandas esperados según de los mapas de restricción del gen MC1R con las enzimas *BspHI* y *BstUI*. (En negrita aparecen los fragmentos de ADN visibles en las imágenes electroforéticas).

	Jabalí	Cerdo doméstico tipo A	Cerdo doméstico tipo B
<i>BspHI</i>	795	539 256	795
<i>BstUI</i>	345 222 177 34 15 2	345 222 177 34 15 2	399 345 34 15 2

Los resultados obtenidos tras analizar las carnes procedentes de 45 jabalíes y cerdos con las enzimas *BspHI* y *BstUI* se muestran en la Figura 1. En la mayoría de las muestras de jabalíes analizadas (89%) se observó el perfil de restricción esperado (Jb),

mientras que en el 11% restante se obtuvo un perfil diferente (JbH); Con respecto al cerdo, el 73% de las muestras se adscribieron a los dos perfiles esperados (CdA o CdB), y el 27% restante originó un patrón distinto (CdH).

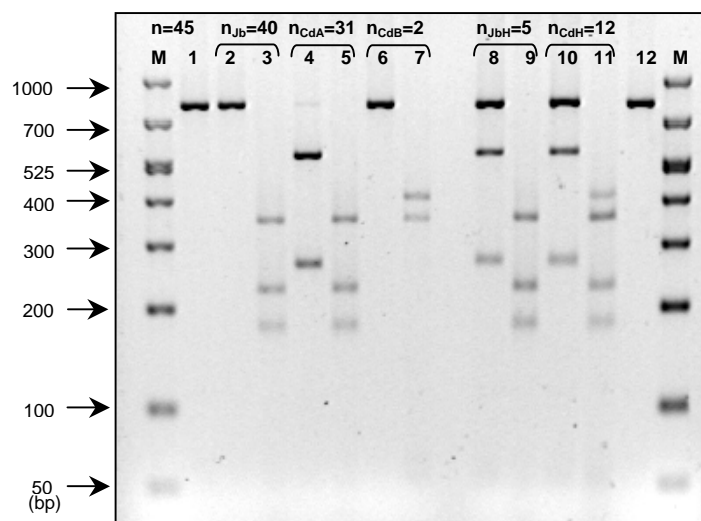


Figura 1. Análisis electroforético de los perfiles de restricción obtenidos tras la digestión de los productos de PCR del gen *MC1R* con las enzimas *BspHI* (2, 4, 6, 8 y 10) y *BstUI* (3, 5, 7, 9 y 11). Las muestras se adscribieron a: Jabalí puro (Jb, 2, 3), Cerdo doméstico tipo A (CdA, 4, 5), Cerdo doméstico tipo B (CdB, 6, 7), Jabalí híbrido (JbH, 8, 9), y Cerdo híbrido (CdH, 10, 11). Productos sin digerir (1, 12). M, Marcador de peso molecular de 50 a 1000 pb. n=número total de individuos analizados de cada subespecie porcina. n_{Jb} , n_{CdA} , n_{CdB} , n_{JbH} y n_{CdH} = número de individuos de cada tipo de perfil de restricción generado.

La secuenciación de varios individuos de cada perfil demostró que existían tres posiciones polimórficas diagnósticas (373, 494 y 730) que contenían dimorfismos alélicos y afectaban a las dianas de restricción de las enzimas *BspHI* o *BstUI*, dando lugar a perfiles de bandas característicos (Tabla 2). De acuerdo a estos resultados, las muestras de jabalí que originaron el perfil minoritario (JbH) podrían ser individuos híbridos resultantes del cruzamiento con cerdos. Asimismo, los ejemplares de cerdos que originaron el perfil menos frecuente (CdH), compartirían bandas de los tipos A y B como consecuencia del cruce de diferentes razas porcinas.

Conclusión

El análisis de la región mitocondrial D-loop no permitió la diferenciación por PCR-RFLP de carnes de jabalí europeo y cerdo doméstico. Sin embargo, mediante la

amplificación específica de un fragmento del gen nuclear *MC1R*, seguida de la digestión enzimática de los amplicones con las endonucleasas *BspHI* y *BstUI*, sí se consiguió la discriminación entre jabalí y cerdo.

Tabla 2. Posiciones polimórficas diagnósticas que afectan a las enzimas de restricción y perfiles de restricción generados en las secuencias de *MC1R* analizadas (En negrita aparecen los fragmentos de ADN visibles en las imágenes electroforéticas).

Especies	Posiciones polimórficas diagnósticas			Perfiles de restricción
	373	494	730	
Jabalí	G	C	G	<i>BspHI</i> : 795 <i>BstUI</i> : 345, 222, 177, 34, 15, 2
Cerdo doméstico A	A	C	G	<i>BspHI</i> : 539, 256 <i>BstUI</i> : 345, 222, 177, 34, 15, 2
Cerdo doméstico B	G	T	A	<i>BspHI</i> : 795 <i>BstUI</i> : 399, 345, 34, 17
Wild boar H	R	C	G	<i>BspHI</i> : 795, 539, 256 <i>BstUI</i> : 345, 222, 177, 34, 15, 2
Domestic swine H	R	Y	R	<i>BspHI</i> : 795, 539, 256 <i>BstUI</i> : 399, 345, 222, 177, 34, 17, 15, 2

R= G/A, Y= C/T

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 (proyectos nº. AGL 2004-00121 y nº. AGL 2007-60077). Violeta Fajardo disfruta de una beca del Ministerio de Educación y Ciencia.

Bibliografía

- Fernández, A, Fabuel, E, Alves, E, Rodríguez, C, Silió, L y Óvilo C.** 2004. DNA tests based on coat colour genes for authentication of meats products from Iberian pigs. *J. Sci. Food Agric.*, 84:1855-1860.
- Kijas, JHM, Wales, R, Törnsten, A, Chardon, P, Mollet, M y Andersson L.** 1998. Melanocortin receptor 1 (*MC1R*) mutations and coat color in pigs. *Genetics*, 150:1177–1185.

Krkoska, L, Nebola, M, Steinhauserová, I, Obroská, I y Ernst M. 2003. Using the PCR–RFLP method. *Fleischwirtschaft Int.* 2003, 2:39–42.

Lenstra, JA, Buntjer, JB y Janssen FW. 2001. On the origin of the meat-DNA techniques for species identification in meat products. *Vet. Sci. Tomorrow*, 2:1-15.