

IDENTIFICACIÓN POR REAL TIME PCR DE ESPECIES ANIMALES DE ORIGEN PESQUERO COMERCIALIZADAS EN ARGENTINA

REAL TIME PCR IDENTIFICATION OF ANIMAL SPECIES OF FISHERIES ORIGIN TRADED IN ARGENTINA

Natalia Leonor Vázquez. Senasa (Argentina)

Lic. Ciencias Biológicas. Jefa departamento Evaluación y Desarrollo – Coordinación de calidad e Inocuidad de alimentos de origen animal – DLA – DGLYCT - SENASA
nvazquez@senasa.gob.ar /

Matías Gabriel Agnese. Senasa (Argentina)

Lic. Ciencias Biológicas. Analista Departamento Evaluación y Desarrollo – Coordinación de calidad e Inocuidad de alimentos de origen animal – DLA – DGLYCT - SENASA
magnese@senasa.gob.ar /

Gonzalo Rodríguez Girault. Senasa (Argentina)

Lic. Ciencias Químicas. Analista Departamento Evaluación y Desarrollo – Coordinación de calidad e Inocuidad de alimentos de origen animal – DLA – DGLYCT - SENASA
grodrigu@senasa.gob.ar /

Enrique Fabián Flores. Senasa (Argentina)

Lic. Ciencia y Tecnología de los alimentos. Jefe Departamento Gestión Técnica, calidad y proyectos – Coordinación de calidad e Inocuidad de alimentos de origen animal – DLA – DGLYCT – SENASA
eflores@senasa.gob.ar /

Marcelo Oscar Bello. Senasa (Argentina)

Dr. Ciencias Químicas. Coordinador – Coordinación de calidad e Inocuidad de alimentos de origen animal – DLA – DGLYCT - SENASA
mabello@senasa.gob.ar /

Resumen

La amplia diversidad de especies utilizadas para la elaboración de productos de la pesca hace necesario el desarrollo de una metodología analítica versátil que permita la realización del control del etiquetado, adulteración y/o contaminación en materias primas y productos elaborados. En la identificación de especies utilizando la técnica de Real Time PCR, la alta especificidad y la estabilidad de la molécula de ADN frente a los tratamientos térmicos utilizados en la elaboración la convierten en una herramienta de control confiable y objetiva.

El objetivo del presente trabajo fue establecer una metodología para la identificación de las especies de pescado de mayor importancia comercial en Argentina mediante el diseño de primers y sondas específicos, utilizando herramientas bioinformáticas y el desarrollo de una metodología de análisis por Real Time

Abstract

The wide diversity of species used for the processing of fishery products makes necessary the development of a versatile analytical methodology that allows the control of labeling, adulteration and/or contamination in raw materials and processed products. In the identification of species using the Real Time PCR technique, the high specificity and stability of the DNA molecule against the thermal treatments used in processing make it a reliable and objective control tool.

The objective of the present work was to establish a methodology for the identification of the most commercially important fish species in Argentina through the design of specific primers and probes, using bioinformatics tools and the development of a Real Time PCR analysis methodology. For most of

PCR. Para la mayoría de las especies estudiadas, el método desarrollado permitió su correcta identificación con alta sensibilidad y especificidad. Se encontraron algunas interferencias en el análisis de merluza austral, atún skipjack y caballa. Los resultados obtenidos permitirán la posibilidad de evaluar la autenticidad de productos de la pesca elaborados a partir de las especies estudiadas.

Palabras clave: Real Time PCR; autenticidad; pescados; Senasa.

the species studied, the method developed allowed their correct identification with high sensitivity and specificity. Some interferences were found in the analysis of southern hake, skipjack tuna and mackerel. The results obtained will allow the possibility of evaluating the authenticity of fishery products made from the species studied.

Keywords: Real Time PCR; authenticity; fish; Senasa.

1. Introducción

El aumento a nivel mundial de la demanda de alimentos de origen pesquero ha llevado a los organismos de control a desarrollar normativas para asegurar la calidad e inocuidad de los mismos. Las regulaciones nacionales e internacionales en materia de productos de la pesca y acuicultura, exigen la identificación de la especie que se está comercializando.

La caracterización de las especies más frecuentemente comercializadas en nuestro país mediante una metodología de control de materias primas y productos elaborados de origen pesquero, permite tanto la comercialización con alto valor agregado de los mis-

mos como el control de autenticidad por parte de la autoridad sanitaria (Reilly, 2018).

La taxonomía de los peces ha estado expuesta a constantes debates y discusiones, debido a que este grupo animal es el más diverso y numeroso entre los vertebrados. La habilidad de estos animales de adaptarse y colonizar distintos ambientes acuáticos, ha provocado una amplia diversificación morfológica y genética entre los peces (Miller y Harley, 2001).

Si bien existen marcadas diferencias morfológicas entre las especies en estudio (figura 1), el hecho de que no siempre sean comercializadas como piezas enteras lleva a la necesidad de utilizar herramientas analíticas para su identificación.

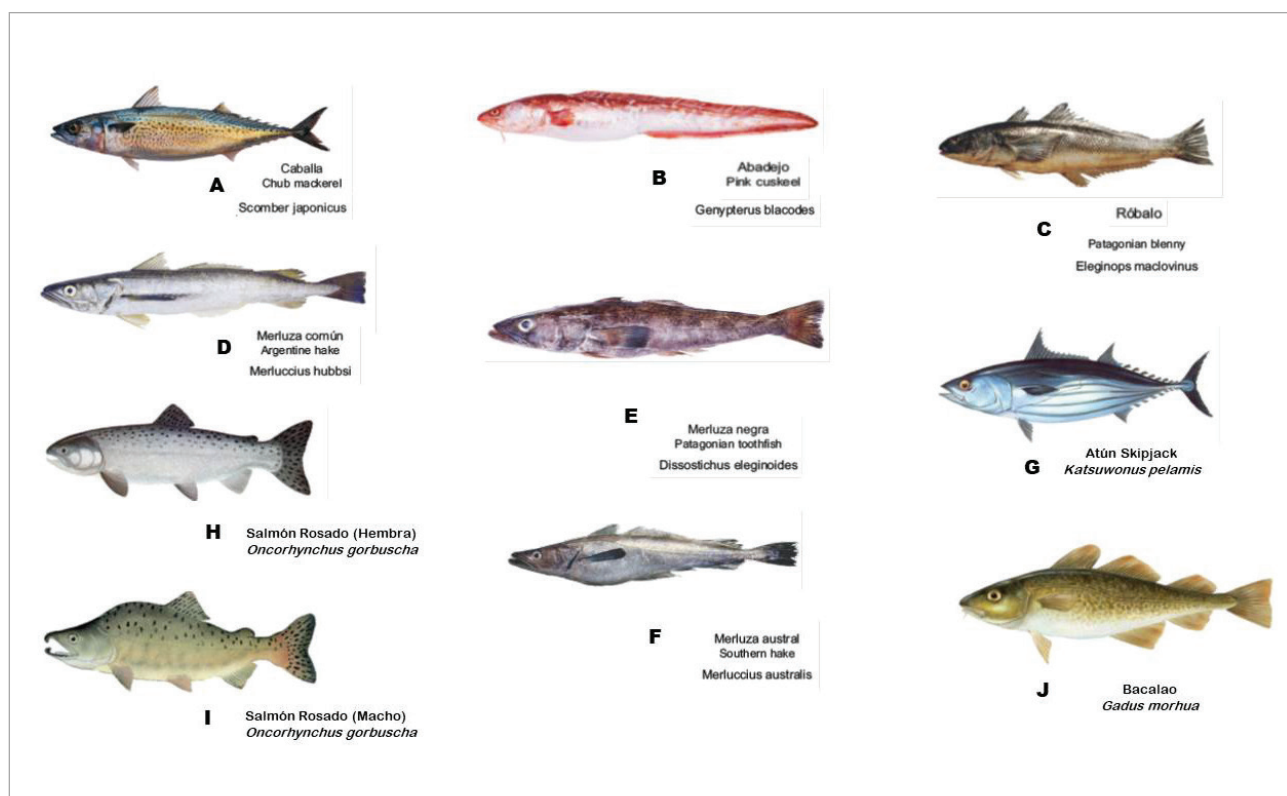


Figura 1: Morfología externa de ejemplares enteros de las especies pesqueras analizadas. A, B, C, D, E y F (www.inidep.edu.ar/especies) y la G, H, I y J (www.fao.org/fishery/en/aqspecies/search).

La bioinformática permite investigar, desarrollar y aplicar herramientas informáticas y computacionales para mejorar el manejo de datos biológicos. Así, se puede analizar información de la secuenciación genómica, proteómica y metabolómica, hasta datos de imagen, clínicos y/o epidemiológicos, desarrollando algoritmos o modelos matemáticos para extraer el máximo conocimiento de estos datos y así poder aplicarlo directamente a la resolución de problemas biológicos o biomédicos (Allen, 2005).

El desarrollo de la técnica de Real Time PCR para la identificación de las especies utilizadas en la elaboración de los alimentos de origen pesquero, se presenta como una herramienta que proporciona resultados analíticos con alta especificidad y sensibilidad, debido a la estabilidad de la molécula de ADN frente a los tratamientos térmicos y al hecho de que el resultado no depende del tejido analizado, ya que todas las células del organismo poseen la misma información genética (Kornblihtt, 2017).

El objetivo del presente trabajo fue establecer una metodología de identificación de las especies de pescado de mayor importancia comercial en Argentina, mediante el diseño de primers y sondas específicos, utilizando herramientas bioinformáticas y el desarrollo de una metodología de análisis por Real Time PCR que permita analizar conjuntamente todas las especies de interés.

Materiales y métodos

Muestras: Se utilizaron muestras de origen comercial tomadas a partir de piezas enteras de caballa (*Scomber japonicus*), róbalo (*Eleginops maclovinus*), abadejo (*Genypterus blacodes*), merluza común (*Merluccius hubbsi*), cortes de atún skipjack (*Katsuwonus pelamis*), salmón rosado (*Oncorhynchus gorbuscha*), merluza austral (*Merluccius australis*), merluza negra (*Dissostichus eleginoides*) y bacalao (*Gadus morhua*).

Mediante la representación taxonómica de las especies del presente estudio (figura 2), podemos decir que, si bien cada nivel taxonómico (orden, familia, género) posee características morfológicas, ecológicas, bioquímicas y filogenéticas únicas, las especies que los conforman pueden discriminarse e identificarse mediante secuencias genéticas particulares empleando diversos métodos moleculares (Real Time PCR, por ejemplo), a pesar de ser especies cercanas y emparentadas entre sí.

De esta manera, nos basamos en el nombre científico de cada especie, establecido por la taxonomía, para poder sentar las bases de cualquier estudio de peces, en lugar de la utilización de nombres locales o comerciales, dado que la misma especie puede tener diferentes nombres en distintas regiones o, por el contrario, el mismo nombre puede estar asignado a diferentes especies.

En el caso de la merluza común y la merluza austral, al pertenecer ambas especies al mismo género taxonómico, contienen secuencias nucleotídicas muy similares entre sí, razón por la cual se diseñó una misma sonda que permite su detección simultánea (sonda hubbsi/australis). Por otra parte, para el róbalo y el abadejo se diseñaron sondas independientes (sonda róbalo/sonda abadejo) y para el resto de las especies se utilizó la sonda FISH.

Diseño de primers y sondas de hidrólisis

Se utilizaron bases de datos bioinformáticas tomando como referencia las secuencias del gen RNA ribosomal 12S (RNAr 12S) y del gen citocromo oxidasa I (COI).

Se realizó una búsqueda en la base de datos nucleotídica NCBI (National Center for Biotechnology Information), que incluye secuencias barcodes de DNA, de la secuencia RNAr 12S mitocondrial de las siguientes especies:

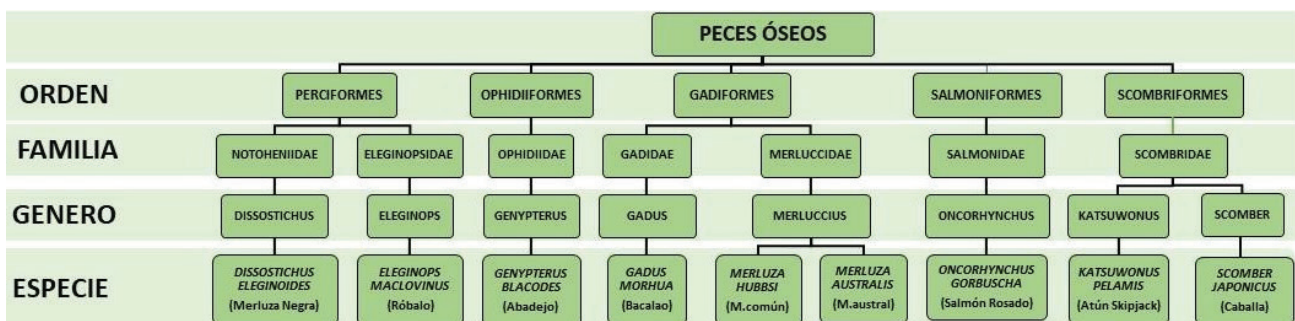


Figura 2: Clasificación taxonómica de las especies de origen pesquero estudiadas.

I) Bacalao (*Gadus morhua*) GI: 5835806, 549037314

II) Salmón rosado (*Oncorhynchus gorboscha*) GI: 134268928, 190349300

III) Atún skipjack (*Katsuwonus pelamis*) GI: 40804664, 281428616, 726965608, 40645290

IV) Merluza negra (*Dissostichus eleginoides*) GI: 394831501

V) Caballa (*Scomber japonicus*) GI: 283767177, 283362058

Se utilizó la herramienta Primer-BLAST de NCBI para el diseño de los primers de las especies cuyo gen RNAr 12S encontramos inicialmente, usando la base de datos de refseq RNA para comparar con todas las secuencias de peces óseos. En este caso en particular, la ubicación de la sonda FISH en el gen RNAr 12S fue la que definió el rango de la secuencia donde deberían ubicarse los primers (Benedetto, Abete y Squandrone, 2010).

Por otra parte, considerando que de algunas especies aún no se cuenta con la secuencia del gen RNAr 12S completa en las bases de datos consultadas, se decidió utilizar como marcador el gen COI en la base de datos del proyecto BOLD (Barcode of Life Data) para el resto de las especies en estudio:

VI) Merluza común (*Merluccius hubbsi*) BIN; BOLD: AAM2029

VII) Merluza austral (*Merluccius australis*) BIN; BOLD: AAB2174

VIII) Róbalo (*Eleginops maclovinus*) BIN; BOLD: AAC9391

IX) Abadejo (*Genypterus blacodes*) BIN; BOLD: ACF2980

Dado que la plataforma BOLD cuenta con un cluster de varias secuencias para cada especie que forman un BIN (Barcode Index Number), se realizó un alineamiento en software MEGA5 para definir una secuencia consenso (>90% de identidad) a utilizar como molde para la construcción y el diseño de primers y sondas.

Se utilizó el software denominado Primer3 ya que permite diseñar simultáneamente la sonda específica y los primers.

Para el diseño de todos los primers, se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros:

- Un tamaño de fragmento amplificado (amplicón) no mayor a 150 pares de bases (pb).
- Temperatura de fusión (T_m) similares entre los primers forward y reverse, con una diferencia de no más de 2 grados (ΔT_m) para los primers y de 8 - 10 grados entre primers y sonda.
- Un contenido de G/C entre 45%-65% para que resulten más termoestables los oligonucleótidos.

Las sondas de hidrólisis fueron marcadas en la región 5' con un fluoróforo reporter 6-carboxifluoresceína (6-FAM) y en la región 3' con un quencher 5-carboxitetrametilrodamina (TAMRA).

Análisis por Real Time PCR

Extracción de ADN: Se utilizó un método desarrollado en nuestro laboratorio para el análisis de especies en productos de origen animal, basado en Tartaglia *et al.* (1998).

Se utilizaron reactivos de grado biología molecular, salvo en los casos indicados. A 0.5 gramos de muestra se le agregaron 4 ml de buffer de extracción de tiocianato de guanidina y 10 ul de solución de proteinasa K (20 mg/ml). Se homogeneizó en vortex por 10 segundos y se incubó en baño termostático a 60°C durante 90 minutos. Una vez finalizada la incubación, los tubos se conservaron en heladera por 15 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 6°C y 3500 rpm durante 15 minutos. Se transvasaron 900 ul del sobrenadante a un tubo de 2 ml con 900 ul de cloroformo y se centrifugó a 13.000 rpm a temperatura ambiente durante 1 minuto. A 500 ul de sobrenadante se le agregaron 500 µl de buffer de extracción (Tiocianato de Guanidina, solución Tris Base 01M pH= 6.4, solución EDTA 0.2M pH=8, solución de Tritón X-100) y 40 ul de una suspensión de sílica en agua y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación constante. Se centrifugó a 13.000 rpm a temperatura ambiente durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Al pellet residual se lo lavó tres veces por resuspensión y posterior centrifugación con 1 ml de buffer de lavado (Tiocianato de Guanidina, solución Tris Base 01M pH= 6.4) dos veces con 1 ml de etanol p.a. 70% y una vez más con 1 ml acetona p.a.

El pellet se dejó secar en estufa a 20°C durante 60 minutos aproximadamente, se le agregó 50 µl de Solución Buffer Tris-EDTA (pH=7.5) y, previa agitación, se incubó por 10 minutos a 56°C en baño termostático. Una vez finalizado se centrifugó a 13.000 rpm y temperatura ambiente durante 1 minuto. El sobrenadante se transvasó a otro tubo y se centrifugó a 13.000 rpm y temperatura ambiente durante 1 minuto. Este paso se repitió dos veces más a fin de eliminar los posibles restos de sílica que pudieran quedar en el sobrenadante y que interfieren en la reacción de amplificación del ADN. El sobrenadante obtenido se almacenó a -20°C hasta el momento de su corrida.

Condiciones de corrida: La amplificación se realizó en un termociclador ROCHE LightCycler 2.0, utilizándose capilares de 20 µl. Para cada determinación se utilizó una alícuota de 2 µl del extracto de DNA en

un volumen final de 20 µl. Se agregaron 10 µl de master Mix (QuantiTec Probe PCR kit- Marca Qiagen), 1,8 µl de Primer forward y 1.8 µl de Primer reverse de la especie a analizar, 1,2 µl de la sonda de hidrólisis especie-específica, 0,8 µl de MgCl₂ [25mM] y 2,4 µl de agua suministrada por QuantiTec Probe PCR kit.

Las condiciones de corrida fueron:

- 1 ciclo de activación para la ADN polimerasa a 95°C por 10 minutos
- Una etapa de ciclado de 30 ciclos de: desnaturalización del ADN a 95°C por 15 segundos e hibridación de los primers y elongación a 60°C durante 1 minuto.
- 1 ciclo enfriamiento a 40°C durante 30 segundos.

Resultados

Diseño de primers y sondas específicas: Para cada especie se encontraron varios pares de primers candidatos, de los cuales se seleccionó solo uno teniendo en cuenta las consideraciones descriptas en el ítem materiales y métodos, y las variables termodinámicas determinadas por los softwares empleados en cada caso (mayor estabilidad, menor probabilidad de formación de loops y que no posean complementariedad entre sí). Las secuencias de primers y sondas diseñadas para las distintas especies se detallan en la Tabla 1.

| | Primer F (5'- 3') | Primer R (5'- 3') |
|---|-------------------------|-----------------------|
| Bacalao (Gadus morhua) | CCCTACGGGTATTGAGCAGTG | CACGCTTTACGCCGTTTTTC |
| Salmón Rosado (Oncorhynchus gorbuscha) | GCCATAAGCGAAAGCTTGACT | TAGGGCCTCTCGTATAACCG |
| Merluz Negra (Dissostichus eleginoides) | AAGGGAACCTCAGCAGTGATAGA | TCAACTTGGGCCTCTCGTAT |
| Caballa (Scomber japonicus) | CCAAGGGAATTCAGCAGTGATT | CTGTCAACTGGGCCTATCG |
| Atún Skipjack (Katsuwonus pelamis) | GCTTAGCCACACCTCAAG | GTGTCTGTCAACTGGGCCT |
| Abadejo (Genypterus blacodes) | AGCAGGAAACCTCTCTCACG | TTGGTACTGTGAAATGGCGG |
| Róbalo (Eleginops maclovinus) | TCTCCCTTCACTTAGCAGGT | AGGGGTGTTTGATACTGGGA |
| Merluza Común (Merluccius hubbsi) | CGGGACAGGTTGAACAGTATAC | CGCTGCTAAGTGAAGTAAAA |
| Merluza Austral (Merluccius australis) | CGGCACAGGTTGAACAGTTT | TGCCTGCTAAGTGAAGTGAGA |
| Sonda hubbsi/australis | CCAGCGTGGACCTCACTATT | 5' FAM; 3' TAMRA |
| Sonda Róbalo | TAACATGAAACCCCTGCCA | 5' FAM; 3' TAMRA |
| Sonda FISH | AAGAGGGCCGGTAAA | 5' FAM; 3' TAMRA |
| Sonda Abadejo | GCCCTTCTGTTGACCTCACT | 5' FAM; 3' TAMRA |

Tabla 1: Secuencias de oligonucleótidos diseñadas para las especies de interés

Análisis de Patrones: Con las condiciones descriptas, se evaluaron las distintas muestras de pescados, verificando previamente que el método de extracción desarrollado para las diferentes matrices de pescado

sea el adecuado. Por otra parte, se evaluaron las posibles reacciones cruzadas o interferencias entre las distintas especies definidas para el presente estudio. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla N°2.

| Muestras Patrón | Primers específicos | | | | | | | | |
|--------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Salmon Rosado | Caballa | Atún Skipjack | Bacalao | Merluza Negra | Merluza hubbsi | Merluza Australis | Abadejo | Róbalo |
| Salmón Rosado | 19.18 (± 0.58) | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Caballa | - | 23.84 (± 1.16) | >25 | - | - | - | - | - | - |
| Atún Skipjack | - | - | 17.14 (± 0.32) | - | 17,60 | - | - | - | - |
| Bacalao | - | - | - | 19.10 (± 0.04) | - | - | - | - | - |
| Merluza Negra | - | - | - | - | 21.11 (± 0.90) | - | - | - | - |
| Merluza Hubbsi | - | - | - | - | - | 24.25 (± 0.65) | - | - | - |
| Merluza Australis | - | - | - | - | - | >25 | 24.34 (± 0.88) | - | - |
| Abadejo | - | - | - | - | - | - | - | 23.99 (± 0.21) | - |
| Robalo | - | - | - | - | - | - | - | - | 17.57 (± 0.56) |

Tabla 2: Valores de Crossing Point (Cp) para los controles positivos de cada especie (remarcados en negrita) y primers específicos.

No se observaron reacciones cruzadas en los análisis de patrones de salmón rosado, bacalao, merluza negra, merluza hubbsi, abadejo y róbalo. En todos los casos se observaron valores de Cp reproducibles entre las corridas de una misma especie, con coeficientes de variación menores a 5% para todas las muestras de pescado analizadas.

Por otra parte, los primers diseñados para detectar la especie merluza hubbsi muestran interferencia con la especie merluza australis (cp>25). Otras interferencias fueron encontradas también al analizar el atún skipjack con los primers de merluza negra y la caballa, cuando se la analizó utilizando los primers diseñados para identificar atún.

Discusión y conclusiones

Analizando los resultados obtenidos, puede observarse que el método desarrollado es apto para el es-

tudio de las distintas especies de pescado de interés comercial, trabajándose con alta sensibilidad y especificidad generada por el óptimo diseño de primers y sondas de hidrólisis.

Es importante destacar que las interferencias encontradas no revisten un particular interés comercial. Los dos tipos de merluza analizados no presentan ventajas comparativas en cuanto al reemplazo o adulteración entre ambas. De la misma manera, la interferencia del atún y la merluza negra en las muestras de caballa y atún, respectivamente, no se presentan como una amenaza posible en la autenticidad de productos de la pesca.

No se encontraron interferencias cruzadas entre las especies más utilizadas para adulterar productos de la pesca, como pueden ser el abadejo, la merluza hubbsi y la caballa en productos elaborados a base de bacalao, merluza negra y atún, respectivamente.

De todas maneras, estas interferencias podrían ser resueltas mediante el rediseño de los primers corres-

pondientes, si se lo considerara estrictamente necesario, para evaluar la autenticidad de un producto en particular.

Los resultados obtenidos permiten evaluar la autenticidad de una amplia diversidad de productos de la pesca elaborados a partir de las especies estudiadas, los cuales pueden incluir filetes de pescados frescos, congelados, conservas y semiconservas, entre otros.

Bibliografía

Allen, G. K. (2005). "Bioinformatics: new technology models for research, education, and services". *Education Centre for Applied Research Bulletin*, 8, 1–9.

Barcode of Life Data (n.d). Fecha de consulta: 5 de marzo de 2023. Disponible en: <http://v4.boldsystems.org/>

Benedetto, A. Abete, M.C. y Squandrone, S. (2010). "Towards a quantitative application of real-time PCR technique for fish DNA detection in feedstuffs". *Food Chemistry*. Disponible en: https://www.academia.edu/30098994/Towards_a_quantitative_application_of_real_time_PCR_technique_for_fish_DNA_detection_in_feedstuffs

Kornblihtt, A. (2017). "Genoma Humano", DELS. Disponible en: <https://salud.gob.ar/dels/entradas/genoma-humano>.

Miller, S. A. y Harley, J. B. (2001). *Zoology*, Fifth Edition. Singapore. McGraw-Hill Education.

National Center for Biotechnology Information (n.d). Fecha de consulta: 5 de marzo de 2023. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Reilly, A. (2018). "Overview of food fraud in the Fisheries". *Fisheries and Aquaculture Circular* N° 1165. FAO. Disponible en: <https://www.fao.org/3/I8791EN/i8791en.pdf>

Tartaglia, M., Saulle, E., Pestalozza, S., Morelli, L., Antonucci, G., & Battaglia, P. A. (1998). Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: a molecular approach to test for the presence of bovine-derived materials. *Journal of food protection*, 61(5), 513–518. Disponible en: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-61.5.513>.