

AUTENTIFICACIÓN DE CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS PROCEDENTES DE CODORNIZ, FAISÁN, PERDIZ Y PINTADA MEDIANTE UNA TÉCNICA DE PCR CON CEBADORES ESPECIE-ESPECÍFICOS

AUTHENTICATION OF MEATS AND MEAT PRODUCTS FROM QUAIL, PHEASANT, PARTRIDGE AND GUINEA FOWL BY SPECIES-SPECIFIC PCR

M. Rojas Diéguez, 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 ha desarrollado una técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) empleando cebadores especie-específicos diseñados en el gen mitocondrial 12S ARNr, para la autenticación de carne y productos cárnicos procedentes de codorniz (*Coturnix coturnix*), faisán (*Phasianus colchicus*), perdiz (*Alectoris spp*) y pintada (*Numida meleagris*).

Palabras clave: aves de caza, 12S ARNr, reacción en cadena de la polimerasa, cebadores especie-específicos.

Abstract

Polymerase chain reaction (PCR) based on oligonucleotide primers targeting the mitochondrial 12S rRNA gene has been applied to the specific identification of meats from quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), partridge (*Alectoris spp*), and guinea fowl (*Numida meleagris*).

Key words: game birds, 12S rRNA gene, polymerase chain reaction (PCR), species-specific primers.

Introducción

En España, el consumo de carne procedente de las aves de caza ha aumentado de forma notable en los últimos años. Asimismo, 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 procedente de estas especies, justifica la necesidad de prestar una mayor atención a la adecuada autenticación de las mismas, sobre todo en productos picados, deshuesados, escabechados, patés, etc., donde

desaparecen las características morfológicas que facilitan su identificación. La autenticación 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).

En la actualidad, las técnicas genéticas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituyen una de las alternativas más específicas para llevar a cabo la diferenciación de especies animales (Lenstra *et al.*, 2001). En consecuencia, el objetivo de este trabajo de investigación ha consistido en el desarrollo y aplicación de una técnica de PCR con cebadores especie-específicos, para la identificación y diferenciación de carnes y productos cárnicos procedentes de codorniz, faisán, perdiz, y pintada.

Material y métodos

1. Selección y extracción del ADN de muestras cárnicas

Se utilizaron muestras de tejido muscular procedente de codorniz, faisán, perdiz roja, perdiz chukar, perdiz moruna y pintada. Estas muestras se analizaron crudas y después de someterse a tratamientos térmicos de pasteurización (72°C, 30 minutos) y esterilización (121°C, 20 minutos). Asimismo, se elaboraron mezclas cárnicas binarias que contenían un 0,1, 1, 5, 10 y 25% de tejido muscular de cada especie diana en una matriz de tejido muscular de pollo. Las mezclas binarias se analizaron crudas y tras someterse a un tratamiento térmico de esterilización (121 °C, 20 min). Para determinar la especificidad de los cebadores se emplearon muestras de tejido muscular procedente de varias especies de aves y mamíferos. En este trabajo se analizaron patés, productos picados, escabechados y estofados de codorniz, faisán, perdiz, y pintada.

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

2. Selección de marcadores genéticos y amplificación por PCR

El marcador genético 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-12SEQINV que delimitan un fragmento conservado de aproximadamente 720 pb en todas las especies analizadas.

Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en un volumen total de 25 µL, 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 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, 30 s a 65°C y 45 s a 72°C. La última extensión se prolongó durante 5 min.

La purificación de los productos de PCR amplificados se realizó utilizando el kit de extracción *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN). La secuenciación de los productos de PCR purificados fue llevada a cabo por Sistemas Genómicos S.L. (Parque Tecnológico de Valencia, España).

La alineación y el análisis informático de las secuencias nucleotídicas del fragmento amplificado por los cebadores 12SEQDIR-12SEQINV permitió el diseño de cuatro parejas de cebadores en zonas de la región mitocondrial del gen 12S ARNr: 12SCODIR-12SCOINV, 12SFAISDIR-12SFAISINV, 12SPERDIR-12SPERINV y 12SPINTDIR-12SPINTINV. Estos cebadores se emplearon en una técnica de PCR para la amplificación de fragmentos específicos a partir del ADN extraído del tejido muscular procedente de codorniz, faisán, perdiz y pintada. Como control positivo de amplificación se diseñó la pareja de cebadores conservados 18SEUDIR-18SEUINV a partir de secuencias del gen 18S ARNr disponibles en la base de datos NCBI para varias especies de aves y mamíferos. Estos cebadores delimitan un fragmento de 89 pares de bases en todas las especies analizadas.

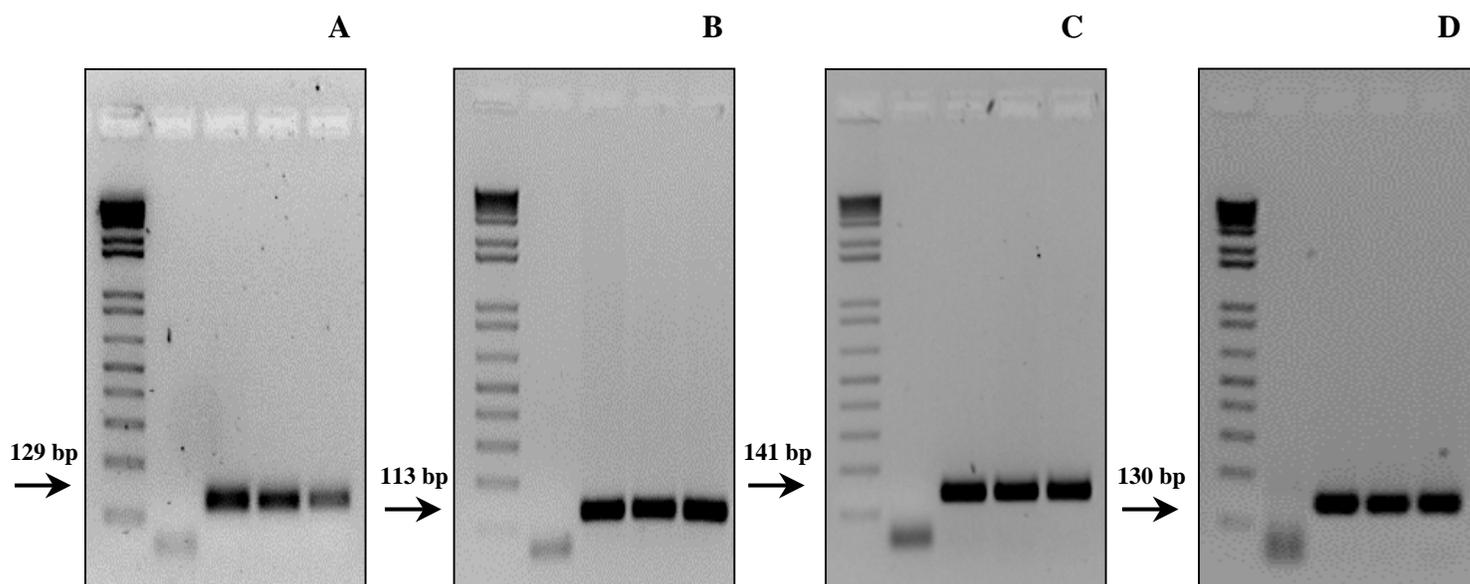
Resultados y discusión

La práctica totalidad de los estudios realizados en la identificación genética de especies animales hacen referencia a especies domésticas como la vaca, oveja, cabra, cerdo y pollo, siendo prácticamente inexistentes los estudios efectuados 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 con cebadores especie-específicos diseñados en el gen mitocondrial 12S ARNr, para la identificación de carnes y productos cárnicos procedentes de codorniz, faisán, perdiz, y pintada.

El estudio informático de las secuencias de la región 12S ARNr disponibles 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. Tras la secuenciación y el análisis de los fragmentos amplificados de la región 12S ARNr en varios individuos de cada especie, se diseñaron cuatro parejas de cebadores para la identificación específica de codorniz, faisán, perdiz y pintada. Los cebadores específicos de codorniz amplificaron un fragmento específico de 129 pb del gen

mitocondrial 12S ARNr. De forma similar, los cebadores específicos de faisán, perdiz y pintada, amplificaron fragmentos de 113, 141 y 139 pb respectivamente. Esta amplificación se produjo tanto en muestras de carne cruda, como en aquellas sometidas a tratamientos térmicos de 72°C durante 30 min y de 121°C durante 20 min (Figura 1). Los cebadores específicos de perdiz amplificaron un fragmento de 141 pb en todas las especies de perdiz analizadas.

La especificidad de los cebadores diseñados se determinó frente a ADNs procedentes de otras especies. Los cebadores permitieron la amplificación del fragmento específico únicamente



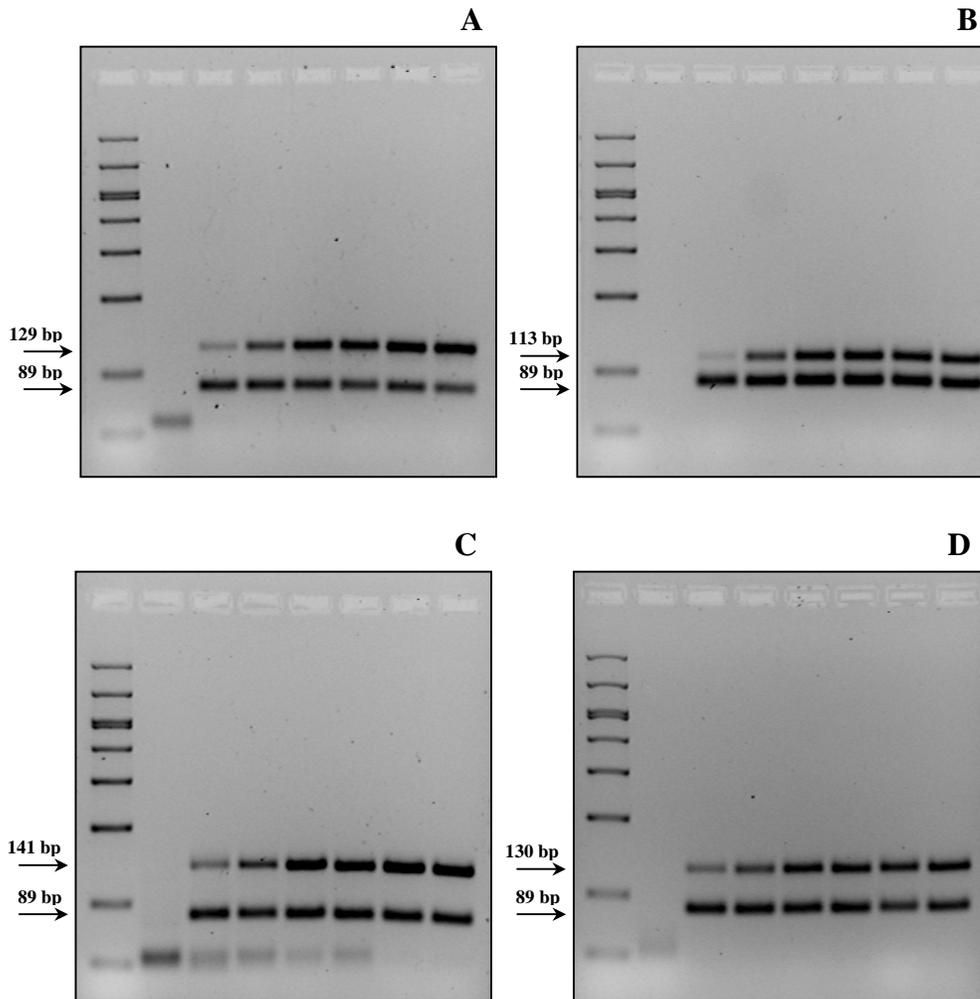
en las muestras que contenían el ADN de la especie diana y no produjeron bandas de amplificación cuando se enfrentaron al ADN de otras especies animales (Tabla 1). Los cebadores conservados 18SEUDIR-18SEUINV amplificaron el fragmento de 89 pb del gen 18S rRNA en todas las especies analizadas.

Tabla 1.- Especificidad de las parejas de cebadores diseñados para la identificación específica de codorniz (12SCODIR-12SCOINV), faisán (12SFAISDIR-12SFAISINV), perdiz (12SPERDIR-12SPERINV) y pintada (12SPINTDIR-12SPINTINV) empleando ADN de varias especies de aves y mamíferos. Los cebadores 18SEUDIR-18SEUINV fueron empleados como control positivo de amplificación del ADN total presente en las muestras

Nombre común	Nombre en latín	12SCODIR 12SCOINV	12SFAISDIR 12SFAISINV	12SPERDIR 12SPERINV	12SPINTDIR 12SPINTINV	18SEUDIR 18SEUINV
Codorniz	<i>Coturnix coturnix</i>	129 pb	- ^a	-	-	89 bp
Faisán	<i>Phasianus colchicus</i>	-	113 pb	-	-	89 bp
Perdiz roja	<i>Alectoris rufa</i>	-	-	141 pb	-	89 bp
Perdiz chukar	<i>Alectoris chukar</i>	-	-	141 pb	-	89 bp
Perdiz moruna	<i>Alectoris barbara</i>	-	-	141 pb	-	89 bp
Pintada	<i>Numida meleagris</i>	-	-	-	130 pb	89 bp
Urogallo	<i>Tetrao urogallus</i>	-	-	-	-	89 bp
Becada	<i>Scolopax rusticola</i>	-	-	-	-	89 bp
Paloma torcaz	<i>Columba palumbus</i>	-	-	-	-	89 bp
Zorzal común	<i>Turdus philomelas</i>	-	-	-	-	89 bp
Pollo	<i>Gallus gallus</i>	-	-	-	-	89 bp
Pavo	<i>Meleagris gallipavo</i>	-	-	-	-	89 bp
Pato de berbería	<i>Cairina moschata</i>	-	-	-	-	89 bp
Oca	<i>Anser anser</i>	-	-	-	-	89 bp
Vaca	<i>Bos taurus</i>	-	-	-	-	89 bp
Oveja	<i>Ovis aries</i>	-	-	-	-	89 bp
Cabra	<i>Capra hircus</i>	-	-	-	-	89 bp
Cerdo	<i>Sus scrofa dom.</i>	-	-	-	-	89 bp
Gamo	<i>Dama dama</i>	-	-	-	-	89 bp
Corzo	<i>Capreolus capreolus</i>	-	-	-	-	89 bp
Ciervo	<i>Cervus elaphus</i>	-	-	-	-	89 bp
Rebeco	<i>Rupicapra rupicapra</i>	-	-	-	-	89 bp
Muflón	<i>Ovis ammon</i>	-	-	-	-	89 bp
Cabra montés	<i>Capra pyrenaica</i>	-	-	-	-	89 bp

^a No aparece amplificación del producto de PCR

El límite de detección se determinó mediante el análisis de mezclas binarias que contenían un 0,1, 1, 5, 10 y 25% de cada especie diana en carne de pollo. Para confirmar la ausencia de inhibición en la técnica de PCR desarrollada se llevaron a cabo reacciones de PCR múltiple, combinando cada pareja de cebadores específicos con los cebadores conservados del gen 18S. El límite de detección del ensayo fue del 0,1% para las cuatro especies analizadas, tanto en las muestras crudas (Figura 2) como en las sometidas a tratamiento térmico.



En este trabajo, se analizaron diversos productos comerciales que contenían carne de codorniz, faisán, perdiz y pintada, obteniéndose resultados satisfactorios al emplear los cebadores específicos diseñados (Tabla 2).

Resultados del análisis mediante PCR de productos cárnicos comerciales de codorniz, faisán, perdiz y pintada empleando los cebadores 12SCODIR-12SCOINV, 12SFAISDIR-12SFAISINV, 12SPERDIR-12SPERINV, y 12SPINTDIR-12SPINTINV. Los cebadores 18SEUDIR-18SEUINV fueron empleados como control positivo de amplificación del ADN total presente en las muestras

Especie presente en la etiqueta	Tipo de producto	12SCODIR 12SCOINV	12SFAISDIR 12SFAISINV	12SPERDIR 12SPERINV	12SPINTDIR 12SPINTINV	18SEUDIR 18SEUINV
Codorniz	Carne estofada	129 pb	- ^a	-	-	89 bp
Codorniz	Carne escabechada	129 pb	-	-	-	89 bp
Codorniz	Carne deshuesada	129 pb	-	-	-	89 bp
Codorniz	Carne picada	129 pb	-	-	-	89 bp
Codorniz	Paté A	129 pb	-	-	-	89 bp
Codorniz	Paté B	129 pb	-	-	-	89 bp
Faisán	Carne estofada	-	113 pb	-	-	89 bp
Faisán	Paté A	-	113 pb	-	-	89 bp
Faisán	Paté B	-	113 pb	-	-	89 bp
Faisán	Paté C	-	113 pb	-	-	89 bp
Faisán	Paté D	-	113 pb	-	-	89 bp
Faisán	Paté E	-	113 pb	-	-	89 bp
Perdiz	Carne estofada	-	-	141 pb	-	89 bp
Perdiz	Carne escabechada A	-	-	141 pb	-	89 bp
Perdiz	Carne escabechada B	-	-	141 pb	-	89 bp
Perdiz	Carne escabechada C	-	-	141 pb	-	89 bp
Perdiz	Carne deshuesada	-	-	141 pb	-	89 bp
Perdiz	Paté A	-	-	141 pb	-	89 bp
Perdiz	Paté B	-	-	141 pb	-	89 bp
Perdiz	Paté C	-	-	141 pb	-	89 bp
Perdiz	Paté D	-	-	141 pb	-	89 bp
Pintada	Carne estofada	-	-	-	130 pb	89 bp
Pintada	Carne picada	-	-	-	130 pb	89 bp
Pintada	Paté A	-	-	-	130 pb	89 bp

^a No aparece amplificación del producto de PCR

Conclusión

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la técnica de PCR desarrollada con cebadores especie-específicos, permite llevar a cabo la autenticación y trazabilidad de carnes y productos cárnicos procedentes de codorniz, faisán, perdiz y pintada de una forma rápida, sencilla y eficaz.

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 2007-60077). María Rojas disfruta de una beca del Ministerio de Educación y Ciencia.

Bibliografía

Girish, PS, Anjaneyulu, ASR, Viswas, KN, Shivakumar, BM, Anand, M, Patel, M y Sharma, B. 2005. Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Sci.*, 70:107-112.

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

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.

MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). 2004. Estudio de caracterización de la avicultura de carne alternativa en España.

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

Rodríguez, MA, García, T, González, I, Asensio, L, Mayoral, B, Lopez-Calleja, I, Hernández, PE y Martín, R. 2003. Identification of Goose, Mule Duck, Chicken, Turkey, and Swine in Foie Gras by Species-Specific Polymerase Chain Reaction. *J. Agric. Food Chem.*, 51:1524-1529.