

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE ATÚN (*Thunnus* spp) EN VENEZUELA UTILIZANDO LA TÉCNICA DE PCR

Identification of Commercial Species of Tuna (*Thunnus* spp) in Venezuela Using PCR Technique

Amarys Aguilar^{1,2}, Guillermina Alonso¹ y Marinela Barrero^{2,*}

¹Laboratorio de Biología de Plásmidos Bacterianos, IBE-UCV. ²Laboratorio de Productos Pesqueros, ICTA-UCV.
Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela, AP 47114, Caracas 1041A, Venezuela.

*Autor para correspondencia: mbarrero@ciens.ucv.ve

RESUMEN

Debido al aumento en la demanda de alimentos pesqueros procesados, tanto las industrias como los organismos reguladores, han desarrollado normativas para asegurar la calidad de estas ventas siendo el etiquetado de los alimentos una de las normas con mayores exigencias a nivel mundial, pero que puede ser alterado. La trazabilidad genética se basa en la identificación de los animales y sus productos a través del estudio de ADN. El objetivo del presente estudio fue evaluar, mediante técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la identificación molecular de algunas muestras de atún, tanto fresco como enlatado, que son comercializados en Venezuela. Se ensayó la PCR asociada a Polimorfismo de la Longitud de Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP), con dos juegos de cebadores y diferentes enzimas de restricción. Los resultados mostraron que una de las especies empleadas en el enlatado del atún es el atún blanco (*Thunnus alalunga*). Este trabajo representa la primera prueba piloto en Venezuela que permitió evaluar la identificación molecular de especies de atún, la cual podrá ser desarrollada para diferentes especies pesqueras.

Palabras clave: Identificación molecular, PCR-RFLP, *Thunnus alalunga*, trazabilidad.

ABSTRACT

Fish processed products demand is increasing at the global word and the regulatory agencies and industries need to control the quality and identity of different fish species by labeling regulations. Genetic traceability is based on the identification of

animals and their products through the study of DNA. The objective of this study was evaluate, by reaction Polymerase Chain (PCR), molecular identification of some samples of tuna, either fresh or canned, that are sold in Venezuela. Using different DNA samples isolated from fresh and canned fish were tested by PCR associated Polymorphism Restriction Fragment Length (PCR-RFLP) with two different sets of primers and restriction enzymes. Results showed that one of the species used for canning was albacore (*Thunnus alalunga*). This study represents the first studies in Venezuela that allowed evaluate the molecular identification of tuna species, which may be developed for different fish species.

Key words: Molecular identification, PCR-RFLP, *Thunnus alalunga*, traceability.

INTRODUCCIÓN

El atún (*Thunnus* spp.) es un pez pelágico de alto precio en el mundo, y éstos se diferencian entre sí dependiendo de la especie [8], siendo organismos oceánicos de coloración azul oscuro en el dorso y el vientre blanco plateado con reflejos irisados. Se pueden localizar en aguas templadas, como el “atún aleta azul” (*T. thynnus*) y la albacora o atún blanco (*T. alalunga*), mientras que también se ubican en aguas cálidas el “atún aleta amarilla” o rabil (*T. albacares*) y el barrilete (*Katsuwonus pelamis*) [1, 8]. Según Giménez [6], la pesca comercial de túnidos se inicia con los palangreros japoneses en la zona del Pacífico a inicios del siglo XX, pero adquiere una alta significación en el Pacífico Oriental Tropical, después de la Segunda Guerra Mundial, y es para mediados de la década de los cincuenta que Venezuela se incorpora en la actividad atunera. En las últimas décadas, los animales de las diferentes especies de túnidos adquirieron un impacto global por la demanda de

sus alimentos procesados, como en el caso del sushi, enlatado, fresco o congelado [6]. En el comercio internacional, los países que participan en la comercialización del pescado son más que aquellos que lo hacen con otros productos alimenticios, y el número sigue aumentando cada vez más [7]. Así, el alto grado de explotación de los recursos en las pesquerías clásicas, junto con el aumento de su consumo a nivel mundial ha llevado a la búsqueda y captura de especies alternativas, incrementando la diversidad de especímenes disponibles para el consumidor, haciendo difícil mantener un control en el procesamiento de alimentos [12].

Estas razones han contribuido a la necesidad de encontrar un sistema para mantener la calidad óptima y la identidad de los productos alimentarios. La trazabilidad es la respuesta a la demanda de los consumidores en relación a la transparencia y se está convirtiendo en sinónimo de seguridad y elevada calidad alimenticia. La trazabilidad se define como la capacidad para documentar todos los elementos relevantes (movimientos, procesos, controles) necesarios para la historia de un producto pudiendo ser utilizada para certificar la calidad de un alimento, su origen y también su seguridad en relación a estándares conocidos. Entonces, la trazabilidad se convierte en la herramienta principal, tanto para asegurar la responsabilidad efectiva de los industriales y operarios de los alimentos, en relación a la calidad final del producto, como para acometer y manejar los riesgos de forma efectiva [5].

La mayoría de los estudios sobre productos procesados de alimentos pesqueros están dirigidos a la identificación de especies de atún (*Thunnus* spp) o salmón (*Salmo* spp), ya que existen, al menos, 17 tipos de pescado de importancia comercial que pueden presentar una carne con textura, sabor, y color similar [5].

Las técnicas de biología molecular pueden ayudar a identificar los pescados y sus productos gracias a su propio ADN (a su "huella" genética) y no a una etiqueta asociada a ellos. Estas metodologías son muy precisas y dado su alto nivel de automatización se disminuyen los errores humanos que pueden estar asociados con los sistemas de etiquetado manuales. Estas cualidades convierten a la biología molecular en una herramienta básica para la trazabilidad en el sector alimentario, y en poco tiempo su uso se está generalizando en los procesos conductores a garantizar la calidad y la seguridad de un alimento [5]. Si bien es una técnica bastante compleja y requiere personal especializado, en los países desarrollados como la Unión Europea y Estados Unidos de Norteamérica (EUA) ésta técnica está adquiriendo cada vez mayor importancia para evitar los posibles fraudes en el etiquetado de productos pesqueros [10, 12, 13]. Con estos avances biotecnológicos y sus aplicaciones se ha creado una nueva terminología que engloba la biología molecular con la industria alimenticia y se denomina la trazabilidad genética, que se basa en la identificación a través del estudio del ADN. De hecho, la molécula de ADN se ha caracterizado por ser variable entre los individuos y esta característica permite distinguirlos entre ellos [4].

Las muestras de ADN pueden ser tomadas de cualquier tejido biológico. En la práctica, la toma de éstas debe ser de bajo costo y de ejecución fácil. Los ensayos de trazabilidad genética deben producirse en un formato adecuado para el análisis de laboratorio y constan de cuatro etapas: aislamiento del material genético presente en la muestra, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los fragmentos de ADN que se quieren identificar, posteriormente se utiliza la técnica de polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLPs) de los productos amplificados o secuenciación de fragmentos de ADN, y por último se puede realizar un análisis filogenético de las secuencias obtenidas, mediante comparación con secuencias conocidas de otras especies. En el caso de los productos pesqueros, el análisis del genoma mitocondrial (ADNmt) (principalmente en regiones de control, en el gen que codifica el citocromo *b* y en los genes que codifican las ATPasa) ha sido usado extensivamente para conocer las relaciones evolutivas entre las especies del género *Thunnus* [10].

La utilización del PCR en la autenticación de los alimentos presenta ventajas sobre los métodos tradicionales basados en la identificación de proteínas específicas de las especies, especialmente si se adapta para la amplificación de fragmentos del ADNmt, que se encuentra en gran cantidad de copias por célula, porque exhibe gran variabilidad en los genes, garantizando la discriminación suficiente entre especies diferentes [2].

El emplear ADNmt o ADN nuclear (ADNn) también puede depender de la integridad del fragmento de ADN objetivo [15]. Cuando el ADN se somete a tratamiento térmico puede ser degradado en fragmentos que van, desde menos de 100pb hasta aproximadamente 500pb [3, 13, 14]. En este caso, es más adecuado analizar el ADNmt debido a su abundancia relativa en comparación con el ADNn sumado al hecho que la estructura circular del ADNmt le otorga una mayor resistencia a la degradación inducida por el calor; además es de herencia materna y no tiene la recombinación en todos los vertebrados, de modo que la secuencia de ADN mitocondrial es más conservadora. En efecto, se ha utilizado el ADNmt para la identificación de especies, incluso en los productos que contengan el material genético posiblemente degradado, como el atún enlatado [1, 8, 10, 13, 16].

El gen del ADNmt comúnmente estudiado en la identificación de especies ha sido el que codifica el citocromo *b* (*cyt b*), utilizándose para identificar peces planos, anchoas (*Anchoa* spp), anguilas (*Anguilla* spp) y muchos otros [2, 3, 17]. Debido a la variación relativamente alta entre-especies y la baja variación intra-especies, la secuencia del gen *cyt b* muestra una variación considerable, que permite incluso la diferenciación de los individuos de especies estrechamente relacionadas [3]. Cuando las variaciones son demasiado pequeñas para ser detectadas de esta forma (<100pb de diferencia), los productos del PCR pueden ser analizados por PCR-RFLP, en la cual el producto de PCR de interés, simplemente es digerido con las enzimas de restricción preseleccionadas y luego su

patrón de restricción es comparado con muestras de referencia para la identificación de la especie [9]. Este procedimiento ha sido ampliamente utilizado en la autenticación de pescados y mariscos, es por ello que puede ser una buena opción para estudios a gran escala que implican la detección de especies de pescados, como aquellas que podrían ser usadas por agencias de inspección de alimentos para hacer cumplir las regulaciones de etiquetado y evitar fraudes [15]. Los resultados de varios estudios han demostrado que el PCR-RFLP es adecuado para el análisis de especies estrechamente relacionadas, para muestras que contienen especímenes mixtas y para las que han sido sometidas a distintos niveles de procesamiento, incluyendo la esterilización por calor evitándose la sustitución de especies de bajo valor económico por otras más costosas [3, 13, 16, 17].

En Venezuela se está comenzando a utilizar la biología molecular en los análisis científicos, industriales y agropecuarios en el ámbito de la alimentación. Sin embargo, hasta la fecha en el país no se había realizado ningún estudio basado en la genética molecular para evitar fraude con los productos pesqueros. El objetivo del presente estudio fue evaluar las técnicas moleculares en productos enlatados de atún, continuando estudios previos, como lo fue la estandarización del método de extracción de ácidos nucleicos [1], aportando así a la industria pesquera al Estado, ensayos que le permitan otorgar a sus productos un alto nivel de seguridad y evitar las sustituciones de materias primas y el fraude.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la identificación molecular y a fin de estandarizar y evaluar la técnica de PCR, diversas muestras de atún enlatados y comercializados en Venezuela fueron obtenidas. Se partió de un conjunto de muestras de ácidos nucleicos (AN) previamente aislados de: atún fresco ofertados en la región capital (en mercados populares (F1j), supermercados (S1m), pescaderías (P1m) y camiones de pescados (C1m)), tejido de bagre rayado (*Pseudoplatystoma tigrinum*, (R1m)) como control experimental; y finalmente, diversas latas de atún comercial, obtenidas en supermercados y mercados populares de la ciudad capital, de lotes diferentes, bajo distintas presentaciones, tales como atún al limón (L1k); en aceite de oliva (A1k), al natural (N1k) y ahumado (H1k), según fue descrito previamente [1].

Amplificación del fragmento del gen mitocondrial del citocromo b

La amplificación de un fragmento de gen del citocromo b utilizando PCR anidado se realizó mediante una modificación del método descrito por Pardo y Pérez-Villareal [10], empleando dos pares de iniciadores: cytBH con L14735 y H276 con L276 (TABLA I).

En todas las reacciones de PCR, el volumen final para la reacción fue de 25 μ L, colocando para cada ensayo: 2,5 μ L de

TABLA I
INICIADORES EMPLEADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN DEL CITOCROMO b POR PCR.

Iniciadores	Secuencia	Tamaño del fragmento
CytBH	5'-CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A-3'	465pb
L14735	5'-AAA AAC CAC CGT TGT TAT TCA ACT A-3'	
H276	5'-ACT AGG AGT AGG AGT ACT ACT C-3'	276pb
L276	5'-ACT TTG GCT CAC TAC TTG GCC-3'	

pb: pares de bases.

Buffer o Solución amortiguadora 10X; 1,75 μ L de MgCl₂ 50mM; 0,5 μ L de dNTP's 10mM (Promega Corporation, Madison WI, EUA); 0,125 μ L de la enzima Taq ADN Polimerasa 5 U/mL (Promega Corporation, Madison WI, EUA); 2,5 μ L de cada iniciador 10 μ M (Albis Venezolana); 0,1 – 1 μ g de la muestra de ADN previamente aislada, o de los productos de la primera reacción de PCR, según sea el caso y agua bidestilada estéril hasta completar el volumen final. Los tubos se colocaron en el termociclador (Personal Mastercycler®, Modelo 950000031, Eppendorf, A. G. Hamburg, Alemania) con las condiciones de temperatura y tiempo adecuados para la amplificación de las secuencias de los genes del *cyt b*, como se indican en la TABLA II.

TABLA II
CONDICIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN DEL CITOCROMO b CON LOS INICIADORES cytBH Y L14735

Condición	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de Ciclos
Calentamiento	94	5min	1
Desnaturalización	92	1min	13
Hibridación con los iniciadores	54	30seg	
Extensión de los cebadores	72	30seg	
Extensión final	72	7min	1
Preservación	4	∞	1

Una vez que las muestras fueron amplificadas se realizó la segunda reacción de PCR. Se tomaron los mismos volúmenes para la mezcla de reacción utilizando en este caso los iniciadores L276 y H276; se colocaron en el termociclador con las condiciones de temperatura y tiempo adecuados para la amplificación, como se indican en la TABLA III. Una vez que las muestras fueron amplificadas, se preservaron en un congelador marca General Electric, Venezuela a -20°C para su análisis posterior.

TABLA III
CONDICIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN POR PCR
ANIDADO DEL GEN DEL CITOCROMO *b* CON
LOS INICIADORES L276 Y H276

Condición	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de Ciclos
Calentamiento	94	5min	1
Desnaturalización	92	30seg	8
Hibridación con los iniciadores	52	30seg	
Extensión de los cebadores	72	30seg	
Extensión final	72	7min	1
Preservación	4	∞	1

Electroforesis de los fragmentos de ADN amplificados

Para la visualización e identificación de los productos de PCR, se utilizaron geles de agarosa al 2% (p/v) en buffer TBE 1X (10X: Tris Base 0,89 M; ácido bórico 0,89M; EDTA 0,02M) con las cámaras de electroforesis horizontal (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA). Se mezclaron las muestras de amplificación con el buffer de carga 6X (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25% y glicerol 30%) (Promega Corporation, Madison WI, EUA), más un marcador de peso molecular (Molecular Ruler de 100pb, Promega Corporation, Madison WI, EUA). La electroforesis se realizó a voltajes entre 80 a 100 V. Posteriormente se trató el gel con una solución de bromuro de etidio (C₂₁H₂₀BrN₃), a una concentración de 0,5 mg/mL, durante 15 min. Se observó el ADN, empleando el equipo Gel Doc 1000 (Bio-Rad Laboratories, Inc. EUA), mediante el programa Multi-Analyst®/PC (Bio-Rad Laboratories, Inc. EUA).

Purificación de los fragmentos de ADN amplificados

Previo al análisis del RFLP se purificaron los fragmentos de PCR empleando el estuche comercial CONCERT™ Rapid PCR Purification System (GIBCO, Life Technologies), siguiendo la metodología estándar recomendada por la casa comercial.

Análisis de los fragmentos de ADN obtenidos a través del RFLP

Se rigieron las condiciones reportadas por Pardo y Pérez-Villarreal [10]. El ADN amplificado para cada muestra se sometió a digestión con diferentes enzimas de restricción (*Bs*YI, *Nde*II, *Bsa*I, *Stu*I y *Tsp*509I), según las especificaciones dadas por la casa distribuidora (Promega Corporation, Madison WI, EUA). Posteriormente, las digestiones fueron analizadas mediante una electroforesis en geles de agarosa.

Electroforesis de los fragmentos de ADN obtenidos

Los fragmentos de ADN que se obtuvieron para cada muestra de atún fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1 - 3% (p/v) en buffer TBE 1X, en las mismas condiciones descritas anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amplificación de un fragmento del gen *cytb* usando PCR Anidada

Los resultados del ADN aislado de las muestras de los diferentes pescados frescos, en la primera y segunda reacción de PCR se muestran en la FIG. 1. Se observaron las amplificaciones esperadas (465pb y 276pb, respectivamente). En la FIG. 2, se representa gráficamente los sitios específicos donde anclan los iniciadores empleados, en algunas de las especies de túnidos empleadas comúnmente a nivel comercial.

Considerando que no se obtuvieron los fragmentos de 276pb esperados con la PCR anidada para el ADN obtenido de las muestras enlatadas, empleando los juegos de iniciadores H276 y L276 (FIG. 3), se recurrió a un análisis *in silico* con los datos depositados en la base de datos GenBank® Versión 2.2.21 (números de acceso NC005317, NC004901 y NC005316), correspondientes a las secuencias de 465pb, la cual fue la amplificada. Se logró determinar el tamaño teórico del fragmento que pudiera ser obtenido con el primer juego de iniciadores y comprobar los fragmentos de restricción esperados después del tratamiento con las diferentes enzimas de restricción. Se pudo demostrar después, experimentalmente, que las enzimas de restricción mantienen el patrón de bandas, sin necesidad de realizar la segunda amplificación (TABLA IV, FIG. 2). Con esta aproximación se obtuvieron los resultados esperados para las muestras tanto frescas como las enlatadas.

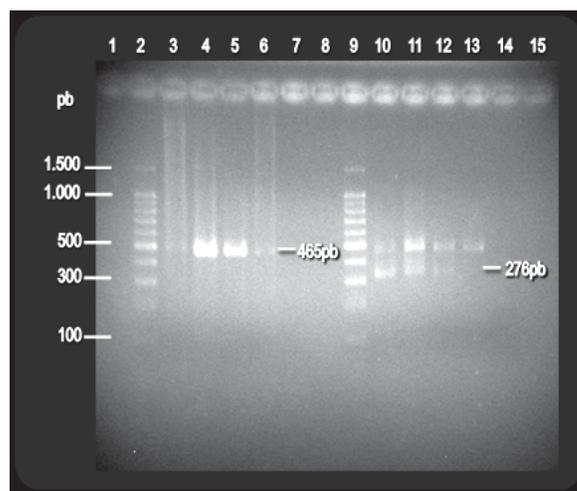


FIGURA 1. REGISTRO FOTOGRÁFICO DE UNA CORRIDA DE ELECTROFORESIS DE LOS DIFERENTES PRODUCTOS DE LA PCR ANIDADA, UTILIZANDO LOS INICIADORES *cyt*BH/L14735, PARA OBTENER FRAGMENTOS DE 465pb Y LOS INICIADORES L276/H276 PARA OBTENER FRAGMENTOS DE 276pb EN LAS MUESTRAS DE ATUNES FRESCOS. CARRIL 3 y 10: PRODUCTO F1j. CARRIL 4 y 11: PRODUCTO S1m. CARRIL 5 y 12: PRODUCTO P1m. CARRIL 6 y 13: PRODUCTO C1m, EN LA PRIMERA REACCIÓN Y ANIDADO RESPECTIVAMENTE. CARRILES 7 Y 14: PRODUCTO R1m (CONTROL NEGATIVO). CARRILES 2 Y 9: MARCADOR DE PESO MOLECULAR (100pb). CARRILES 1, 8 Y 15: VACÍOS.

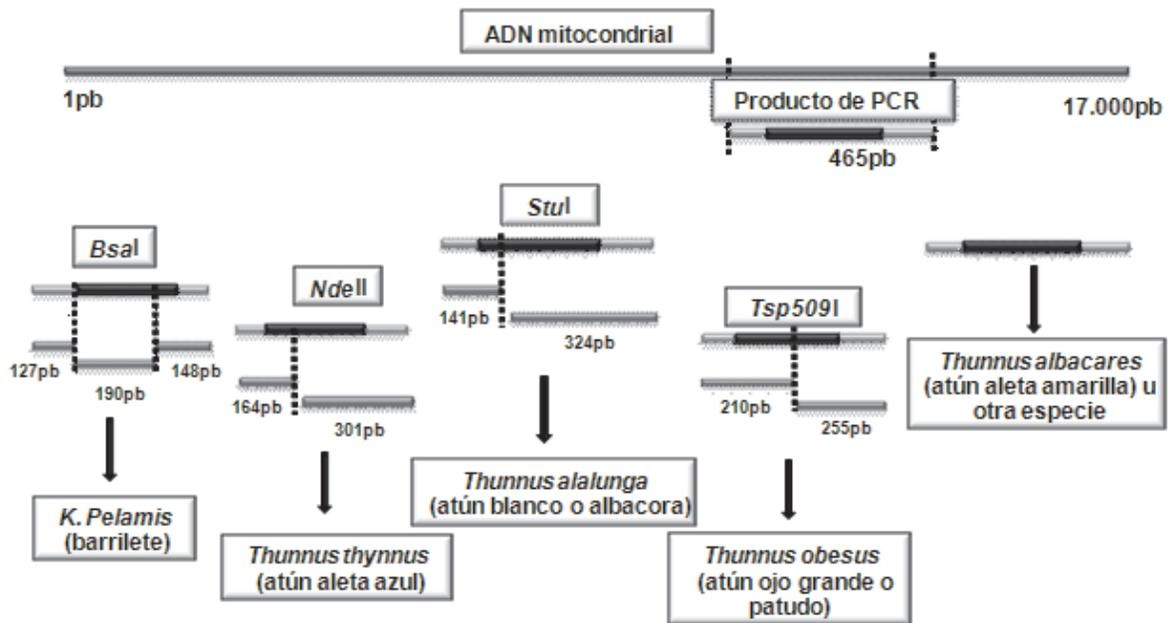


FIGURA 2. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL MAPA DE RESTRICCIÓN OBTENIDO CON LAS DIFERENTES ENZIMAS DE DIGESTIÓN EN DIFERENTES ESPECIES.

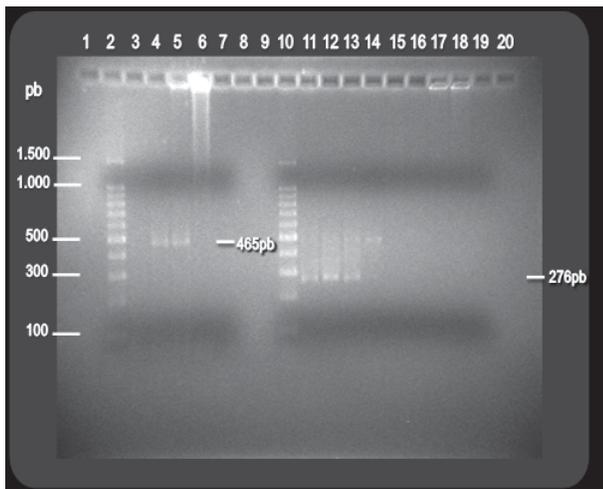


FIGURA 3. REGISTRO FOTOGRAFICO DE UNA CORRIDA DE ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR OBTENIDOS UTILIZANDO LOS INICIADORES L276/H276 (276pb) Y *cytBH/L14735* (465pb), CON LAS MUESTRAS DE ATUNES FRESCOS Y ENLATADOS. CARRILES 3 Y 15: PRODUCTO A1k. CARRILES 4 Y 16: PRODUCTO H1k. CARRILES 5 Y 17: PRODUCTOS N1k. CARRILES 6 Y 18: PRODUCTOS L1k, EN LA PRIMERA REACCIÓN Y ANIDADO RESPECTIVAMENTE. CARRILES 11, 12, 13 Y 14: PRODUCTOS F1j, S1m, P1m Y C1m ANIDADOS. CARRILES 7 Y 19: PRODUCTO R1m (CONTROL NEGATIVO). CARRILES 2 Y 10: MARCADOR DE PESO MOLECULAR (100pb). CARRILES 1, 8, 9 Y 20: VACÍOS.

Pardo [11], previamente reportó que el tamaño de los fragmentos del ADN para identificar muestras de pescados representa un problema cuando se quieren diferenciar especies filogenéticamente cercanas, tales como las especies de túnidos,

condicionando enormemente la elección del fragmento a utilizar como marcador de especie. Por consiguiente, aunque se han descrito métodos capaces de discriminar entre túnidos utilizando marcadores menores de 200 pb es recomendable realizar un estudio previo de la variabilidad inter e intra-específica del fragmento de ADN que se vaya a utilizar como marcador. Una manera de minimizar este efecto, descrito por Pardo y Pérez-Villarreal [10] es incrementar la especificidad de los fragmentos de ADN mediante PCR Anidada, de este modo, los autores reportan la amplificación satisfactoria de un fragmento de 276 pb a partir de conservas de túnidos. Sin embargo, esto puede incrementar el costo de la reacción, lo cual representa una desventaja para países como Venezuela.

Análisis del PCR-RFLP

Los resultados de los productos de PCR de los pescados frescos y los atunes enlatados comerciales, digeridos con las enzimas *Bsal*, *NdeII*, *StuI* y *Tsp509I* se presentan en las FIG. 4 y 5. En la mayoría de las muestras, tanto las frescas como las enlatadas, se observó que la especie comercializada en la lata es el *Thunnus alalunga*, conocida comúnmente como albacora o atún blanco (Carriles 4, 8 y 17 de la FIG. 4; carriles 10 y 15 de la FIG. 5). Las bandas que se observaron fueron de 141 y 324pb, que según la información presentada en la TABLA IV se corresponde a esta especie.

En las muestras en los cuales no hubo digestión de la banda de 465pb se podría inferir catalogarlas correspondientes a la especie *Thunnus albacares* (atún aleta amarilla), que habita en muchas regiones ecuatoriales y tropicales del mundo, aunque también podrían corresponder a otra especie. Para confirmar entre las diferentes posibilidades se debería

TABLA IV
LONGITUDES ESTIMADAS DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN ESPERADOS EN DIFERENTES
ESPECIES DE PESCADOS AL TRATAR EL PRODUCTO DE 465 pb CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

	<i>NdeII</i>	<i>StuI</i>	<i>Tsp509I</i>	<i>BsaI</i>
<i>T. thynnus</i>	(164+301) pb	465 pb	465 pb	465 pb
<i>T. alalunga</i>	465 pb	(141 + 324) pb	465 pb	465 pb
<i>T. obesus</i>	465 pb	465 pb	(210 + 255) pb	465 pb
<i>K. pelamis</i>	465 pb	465 pb	465 pb	(127+190+148) pb

pb: pares de bases.

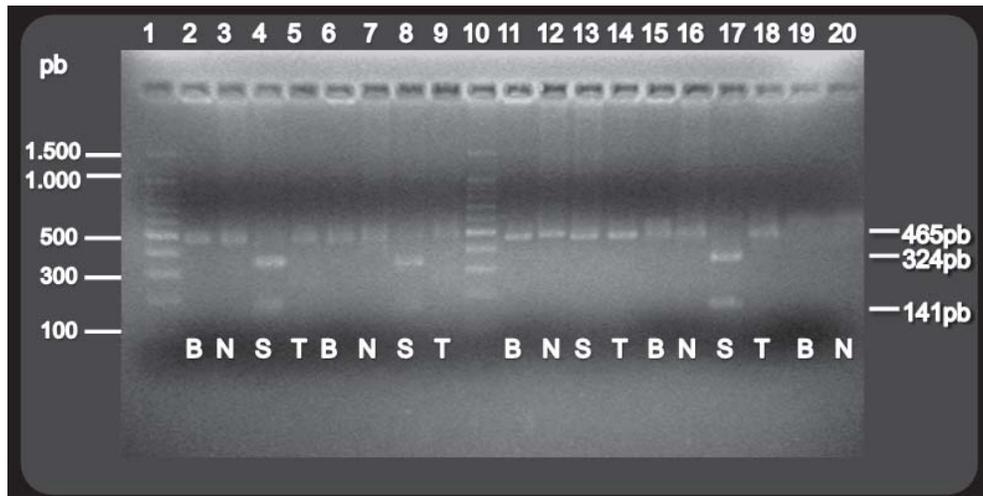


FIGURA 4. REGISTRO FOTOGRÁFICO DE UNA CORRIDA DE ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR DE LAS MUESTRAS DE PESCADOS FRESCOS, DIGERIDOS CON LAS ENZIMAS *BsaI* (B), *NdeII* (N), *StuI* (S) Y *Tsp509I* (T). CARRILES 2, 3, 4 Y 5: PRODUCTO F1j. CARRILES 6, 7, 8 Y 9: PRODUCTO S1m. CARRILES 11, 12, 13 Y 14: PRODUCTO P1m. CARRILES 15, 16, 17 Y 18: PRODUCTO C1m. CARRILES 19 Y 20: PRODUCTO R1m (CONTROL NEGATIVO). CARRILES 1 Y 10: MARCADOR DE PESO MOLECULAR (100pb).

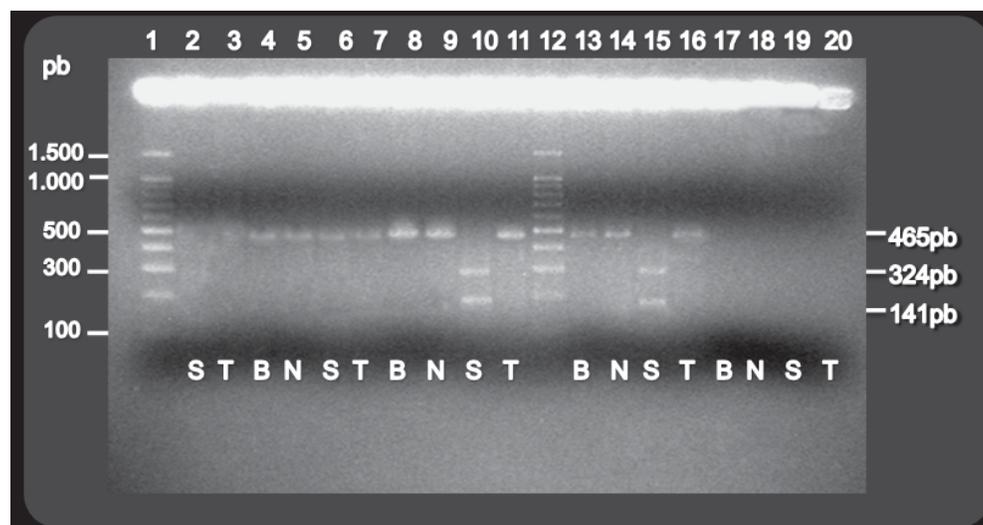


FIGURA 5. REGISTRO FOTOGRÁFICO DE UNA CORRIDA DE ELECTROFORESIS CORRESPONDIENTE A LOS PRODUCTOS DE PCR, DE LOS ATUNES ENLATADOS, DIGERIDOS CON LAS ENZIMAS *BsaI* (B), *NdeII* (N), *StuI* (S) Y *Tsp509I* (T). CARRILES 2 Y 3: PRODUCTO R1m (CONTROL NEGATIVO). CARRILES 4, 5, 6 Y 7: PRODUCTO A1k. CARRILES 8, 9, 10 Y 11: PRODUCTO H1k. CARRILES 13, 14, 15 Y 16: PRODUCTO N1k. CARRILES 17, 18, 19 Y 20: PRODUCTO L1k. CARRILES 1 Y 12: MARCADOR DE PESO MOLECULAR (100pb).

secuenciar el fragmento obtenido o alternativamente digerirlo con una endonucleasa como la enzima *Bs*YI, que permite identificar molecularmente a esta especie.

Los resultados del presente estudio permiten identificar molecularmente diferentes muestras de atún fresco y enlatado, representando uno de los primeros estudios de trazabilidad molecular en Venezuela, como método para la autenticación de especies como forma de inspección de la calidad de los alimentos.

Este desarrollo tecnológico representa un aporte de gran utilidad en el área de análisis de los alimentos para las empresas productoras, empacadoras y distribuidoras y, más aún, para las instituciones reguladoras, ya que sería una alternativa innovadora en los controles a seguir, implementándose la trazabilidad molecular. La metodología empleada, pudiera servir como prueba piloto, para posteriormente ser utilizada en la obtención de otros protocolos para detectar autenticidad en distintos productos.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con el presente trabajo de investigación se pudo diseñar una técnica molecular apropiada y de resultados rápidos, que puede ser implementada con diversos productos pesqueros, como control de calidad y autenticidad. El primer juego de iniciadores (*cyt*BH y L14735) es lo suficientemente específico para amplificar 465 pb de diferentes tipos de pescados y permitir una adecuada identificación molecular con el análisis de RFLP, sin recurrir a una PCR anidada. Así mismo, se infiere que, una de las especies comúnmente empleada en Venezuela como materia prima en la comercialización para las conservas de túnidos es el atún blanco o *Thunnus alalunga*. Este método de identificación es una herramienta precisa y robusta de control del mercado. Se recomienda continuar y fortalecer esta línea de investigación para evaluar los diversos tipos de enlatados que existen en el mercado nacional. El método también debe ser ensayado para comprobar su rendimiento y eficacia cuando es empleado con otro tipo de alimentos y con diversos juegos de iniciadores, para aumentar la especificidad del fragmento amplificado y que permita aplicar ésta y otras técnicas moleculares a nivel industrial y gubernamental como un instrumento útil para autenticar los productos nacionales.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo ha sido financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, CDCH (Proyecto No. CDCH PG 03.6506.2006/2).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] AGUILAR, A.; ALONSO, G.; BARRERO, M. Estandarización del método de extracción de ácidos nucleicos en muestras comerciales enlatadas de atún (*Thunnus* spp). **Rev. Venez. Cien. Tecnol. de Alim.** 2 (1): 061-072. 2011.

- [2] BENÍTEZ, G. Autenticación de especies de salmón en productos comerciales amplificando regiones específicas del ADN mitocondrial, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). 2004. Universidad Nacional Autónoma de México. En línea. [Http://www.pncta.com.mx/pages/pncta_investigaciones_04e.Asp?page=04e1](http://www.pncta.com.mx/pages/pncta_investigaciones_04e.Asp?page=04e1). 11 de Marzo de 2009.
- [3] CHAPELA, M.; SOTELO, C.; PÉREZ-MARTÍN, R.; PARDO, M.; PÉREZ-VILLARREAL, B.; GILARDI, P.; RIESE, J. Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification. **Food Contr.** 18:1211–1215. 2007.
- [4] DALVIT, C.; DE MARCHI, M.; CASSANDRO, M. Genetic traceability of livestock products: A review. **Meat Sci.** 77:437–449. 2007.
- [5] ESTONBA, A.; MANZANO, C. Aplicación de la tecnología del ADN en la seguridad y calidad agroalimentaria. 2006. Universidad del País Vasco. En línea. [Http://www.enpresa.ehu.es/p223content/es/contenidos/informacion/vri_encuentos/es_vri_encu/adjuntos/3_Ez-tonba_L.pdf](http://www.enpresa.ehu.es/p223content/es/contenidos/informacion/vri_encuentos/es_vri_encu/adjuntos/3_Ez-tonba_L.pdf). 17 de Enero de 2009.
- [6] GIMÉNEZ, C. El atún: La Actividad atunera en el contexto de la pesca mundial y venezolana. FUNDATUN, 1era Ed., Caracas, Venezuela.1. Pp 5 – 21. 2009.
- [7] KUNJACHAN, T. Comparando tecnologías de congelación. **Rev. Infopesca Intern.** 21(1): 1-25. 2005.
- [8] LIN, W.F.; SHIAU, C.Y.; HWANG, D.F. Identification of Four *Thunnus* Tuna Species Using Mitochondrial *Cytochrome b* Gene Sequence and PCR-RFLP Analysis. **J. Food Drug Anal.** 13(4):382-387. 2005.
- [9] LIU, Z.J.; CORDES, J.F. Review: DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquacult.** 238:1 –37. 2004.
- [10] PARDO, M; PÉREZ-VILLARREAL, B. Identification of Commercial canned tuna species by restriction site analysis of mitochondrial DNA products obtained by nested primer PCR. **Food Chem.** 86:143-150. 2004.
- [11] PARDO, M. Desarrollo de un método para detectar mezclas de especies de túnidos en conservas de atún claro. 2008. Centro Tecnológico del País Vasco AZTI-Tecnalia. En línea: <http://www.alimentatec.com/muestrapaginas.asp?nodo1=0&nodo2=0&idcontenido=671&content=17>. 13 de Agosto de 2009.
- [12] PÉREZ-MARTÍN, R.; GONZÁLEZ-SOTELO, C. Identificación de especies pesqueras mediante ADN. **CTC Aliment.** 23: 45-49. 2005.
- [13] QUINTEIRO, J.; SOTELO, C. G.; REHBEIN, H.; PRYDE, S. E., MEDINA, I; PÉREZ-MARTÍN, R. I. Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism meth-

- odologies in species identification of canned tuna. **J. Agric. Food Chem.** 46:1662–1669. 1998.
- [14] RAM, J. L.; RAM, M. L.; BAIDOUN, F. F. Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. **J. Agric. Food Chem.** 44: 2460–2467. 1996.
- [15] RASMUSSEN, R.S.; MORRISSEY, M.T. DNA-based methods for the identification of commercial fish and sea-food species. **Compre. Rev. Food Sci. Food Saf.** 7:280-295. 2008.
- [16] REHBEIN, H. Identification of the fish species of raw or coldsmoked salmon and salmon caviar by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. **Europ. Food Res. Technol.** 220:625–632. 2005.
- [17] SOTELO, C.; PINEIRO, C.; GALLARDO, J. M.; PÉREZ-MARTIN, R. I. Fish species identification in seafood products. **Trends Food Sci. Technol.** 4:395-401.1993.