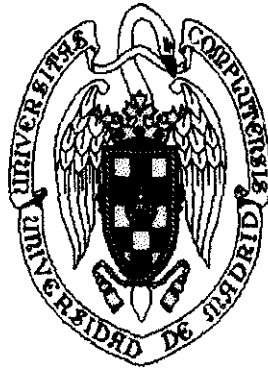


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA III
(HIGIENE Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS)



**UTILIZACIÓN DE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS Y GENÉTICAS
EN LA DIFERENCIACIÓN DE SALMÓN (*Salmo salar*), TRUCHA
(*Oncorhynchus mykiss*) Y PALOMETA (*Brama raii*) AHUMADOS**

Memoria que para optar al grado de
Doctora en Veterinaria presenta la
Licenciada M^a Esther Carrera Puerta

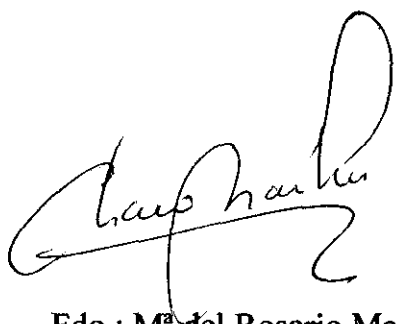
Madrid, octubre de 1999

M^a DEL ROSARIO MARTÍN DE SANTOS, CATEDRÁTICA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA EN LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

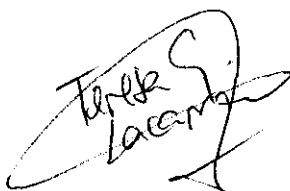
CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada **“Utilización de técnicas inmunológicas y genéticas en la diferenciación de salmón (*Salmo salar*), trucha (*Oncorhynchus mykiss*) y palometa (*Brama raii*) ahumados”**, de la que es autora la Licenciada en Veterinaria M^a Esther Carrera Puerta, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición y Bromatología III (Higiene y Tecnología de los Alimentos) bajo la dirección conjunta del catedrático D. Pablo E. Hernández Cruza, la Profesora Titular Dra. Teresa García Lacarra y de la que suscribe, y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctora en Veterinaria.

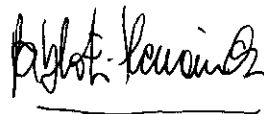
Madrid, octubre de 1999



Fdo.: M^a del Rosario Martín



Fdo.: Teresa García



Fdo.: Pablo E. Hernández

“Lo importante en esta vida no es lo que consigues, sino lo que aprendes, porque lo que consigues lo puedes perder, pero lo que aprendes no lo olvidarás nunca”.

ANÓNIMO

**“Unos nacen grandes,
otros se hacen grandes,
y a otros, la grandeza se les cae encima”...**

W. SHAKESPEARE

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas y entidades que han colaborado directa e indirectamente en la realización de esta Tesis Doctoral, es particular:

Al Profesor Dr. Juan Antonio Ordóñez Pereda, director del Departamento de Nutrición y Bromatología III de la Facultad de Veterinaria de Madrid, por brindarme la oportunidad de realizar mi tesis doctoral en este Departamento.

Expreso mi gratitud a la Prof. Dra. M^a del Rosario Martín de Santos, por su esfuerzo, dedicación e interés en mi formación a lo largo de todo el tiempo que duró este trabajo. A la Prof. Dra. Teresa García Lacarra, por su paciencia y ayuda a lo largo de la realización de esta tesis. Al Prof. Dr. Pablo E. Hernández Cruza, por su apoyo y trato amable.

Mis más sinceras gracias al resto de los Profesores de este Departamento, que siempre me ayudaron amablemente cuando se lo pedí.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de una beca dentro del Plan de Formación de Profesorado y de Personal Investigador.

A todos los doctores y doctorandos de este Departamento, que con su ayuda y compañía han contribuido a hacer más agradables las largas jornadas de trabajo en el laboratorio. A Youssef, Adrian, Adriana, Maribel, Carmen H., Jose María, Beatriz, Jose B., Victor, Sergio, Eva, Carmen P., Begoña, Tomás, Matilde, con los que además de trabajar pude disfrutar de su compañía. A Ana Céspedes, por su ayuda y apoyo constante y al resto de nuestro equipo de investigación, Isabel G., Rosalba, Alicia, Luis y Antonio, por su compañerismo y amistad.

A la Dra. Isabel B. por la ayuda que me prestó en el manejo e inmunización de los conejos y su permanente disponibilidad.

A mis compañeros del I.N.I.A., agradecerles todo lo que aprendí con ellos durante mis primeros pasos en las investigación.

A MARCULTURA S.A. (La Coruña), empresa dedicada al engorde de salmónidos, y a Ahumados Domínguez, S.A., que amablemente me proporcionaron muestras con las que trabajar.

A todos los amigos que durante este período me han dado ánimos y fuerzas para seguir, especialmente a Eva, Sara, Merche, Pepe M. y Ana R.

A toda mi familia y en especial a mis padres y hermanos, por que durante todo momento he contado con su cariño, apoyo y confianza.

ÍNDICE

	Página
I. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR	2
II. INTRODUCCIÓN	
II.1. SITUACIÓN GENERAL DEL MERCADO PESQUERO	9
II.1.1. Producción de salmón y trucha	14
1.1.1. Pescados ahumados	16
1.1.2. Marco legislativo para la comercialización y elaboración de productos pesqueros	16
II.2. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL SALMÓN ATLÁNTICO (<i>Salmo salar</i>), TRUCHA ARCO IRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) Y PALOMETA (<i>Brama raii</i>)	19
II.2.1. Clasificación de los salmónidos	19
II.2.2. Clasificación de los brámidos	23
II.3. MÉTODOS PARA IDENTIFICAR ESPECIES DE PESCADO	25
II.3.1. Métodos basados en el análisis de proteínas	25
3.1.1. Técnicas electroforéticas	27
1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)	28
2. Isoelectroenfoque	29
3. Electroforesis en gradiente de gel	33
4. Electroforesis capilar	33
3.1.2. Métodos cromatográficos	34
3.1.3. Métodos inmunológicos	36
1. Inmunodifusión doble en geles de agar	37
2. Inmunolectroforesis	38
3. Técnicas inmunoenzimáticas ELISA	38
II.3.2. Métodos genéticos	42
3.2.1. Estudios de hibridación	48
3.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	53
1. Secuenciación de fragmentos de ADN amplificados por PCR	57

2. Análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción de regiones del ADN amplificadas por PCR	60
3. Estudio del polimorfismo de conformación de las cadenas sencillas de ADN amplificadas por PCR (PCR-SSCP)	60
4. Estudio del polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD)	64
5. Estudio de secuencias repetitivas del ADN cromosómico	66

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. MATERIALES	76
III.1.1. Material de laboratorio	76
III.1.2. Material biológico	78
1.2.1. Animales de experimentación	78
1.2.2. Origen de las muestras	78
1. Tejido muscular	78
2. Tejido ovárico	79
III.1.3. Productos y reactivos	79
III.2. MÉTODOS	80
III.2.1. Obtención de extractos antigénicos	80
2.1.1. Extracción de las proteínas musculares solubles	80
2.1.2. Determinación de la proteína	80
III.2.2. Obtención de anticuerpos policlonales	83
2.2.1. Pauta de inmunización	83
2.2.2. Sangría final	86
2.2.3. Obtención y conservación del suero	86
2.2.4. Purificación parcial de los inmunosueros	86
2.2.5. Neutralización del suero con antígenos de especies heterólogas	88
III.2.3. Técnicas inmunoenzimáticas	88
2.3.1. Técnica del ELISA indirecto	88
1. Preparación de la muestra antigénica	88
2. Anticuerpos	90

3. Conjugado	90
4. Tampones y reactivos	90
5. Metodología del ELISA indirecto	90
2.3.2. Técnica del ELISA indirecto en paletas	92
1. Preparación de la muestra	92
2. Anticuerpos	92
3. Conjugado	92
4. Tampones y reactivos	93
5. Metodología del ELISA indirecto	93
III.2.4. Técnicas genéticas	93
2.4.1. Elección de los marcadores genéticos	93
2.4.2. Diseño de cebadores	95
1. Gen citocromo <i>b</i>	95
2. Gen citocromo oxidasa II	95
3. Gen 16S ARNr	96
4. Gen <i>p53</i>	96
5. Gen 5S ARNr	96
2.4.3. Extracción del ADN	97
1. Método de extracción de Laird y col. (1991)	97
2. Método de extracción de Bartlett y Davidson (1991)	97
3. Método de extracción de Taggart y col. (1992)	98
4. Método de extracción de DeSalle y col. (1993)	98
2.4.4. Estimación de la concentración y calidad del ADN	99
2.4.5. Amplificación de fragmentos escogidos de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	100
1. Amplificación del gen citocromo <i>b</i>	101
2. Amplificación del gen citocromo oxidasa II (COII)	102
3. Amplificación del gen 16S ARNr	102
4. Amplificación del gen <i>p53</i>	103
5. Amplificación del gen 5S ARNr	103
2.4.6. Electroforesis de los productos de PCR	103
1. Tampones, geles y soluciones empleadas	104
2. Preparación del gel	105

3. Preparación de las muestras	105
4. Condiciones de separación	105
2.4.7. Secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados por PCR	106
1. Purificación de los productos de PCR	106
2. Secuenciación de los productos de PCR purificados	107
2.4.8. Análisis informático de las secuencias de los productos de PCR	107
2.4.9. Estudio del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)	108
1. Gen citocromo <i>b</i>	108
2. Gen citocromo oxidasa II (COII)	108
3. Gen 16S ARNr	109
4. Gen <i>p53</i>	109

IV. RESULTADOS

IV.1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A LAS PROTEÍNAS MUSCULARES SOLUBLES DE SALMÓN (<i>Salmo salar</i>), TRUCHA (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) Y PALOMETA (<i>Brama raii</i>) AHUMADOS	111
IV.2. DESARROLLO DE TÉCNICAS INMUNO-ENZIMÁTICAS (ELISA) PARA IDENTIFICAR MUESTRAS DE SALMÓN (<i>Salmo salar</i>), TRUCHA (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) Y PALOMETA (<i>Brama raii</i>) AHUMADOS	112
IV.2.1. Valoración de la especificidad de los anticuerpos policlonales obtenidos en conejos	112
IV.2.2. Técnica del ELISA indirecto para identificar muestras de pescado ahumado	114
IV.2.3. Técnica del ELISA indirecto en paletas	117
IV.3. DESARROLLO DE TÉCNICAS GENÉTICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SALMÓN (<i>Salmo salar</i>), TRUCHA (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) Y PALOMETA (<i>Brama raii</i>) EN MUESTRAS CRUDAS Y AHUMADAS	117

IV.3.1. Diseño de los cebadores	119
3.1.1. Gen citocromo oxidasa II (COII)	119
3.1.2. Gen 16S ARNr	120
3.1.3. Genes citocromo <i>b</i> , 5S ARNr y <i>p53</i>	120
IV.3.2. Extracción de ADN	120
IV.3.3. Utilización de un fragmento del gen citocromo <i>b</i> como marcador genético para la identificación de especies de pescado	124
3.3.1. Muestras analizadas	124
3.3.2. Amplificación por PCR y secuenciación de los fragmentos amplificados	124
3.3.3. Análisis de restricción de fragmentos del gen citocromo <i>b</i> amplificados por PCR (PCR-RFLP)	128
IV.3.4. Utilización de un fragmento del gen citocromo oxidasa II (COII) como marcador genético para la identificación de especies de pescado	137
3.4.1. Muestras analizadas	137
3.4.2. Amplificación por PCR y secuenciación de los fragmentos amplificados	137
3.4.3. Análisis de restricción de fragmentos del gen COII amplificados por PCR (PCR-RFLP)	140
IV.3.5. Utilización de un fragmento del gen 16S ARNr como marcador genético para la identificación de especies de pescado	155
3.5.1. Muestras analizadas	155
3.5.2. Amplificación por PCR y secuenciación de los fragmentos amplificados	155
3.5.3. Análisis de restricción de fragmentos del gen 16S ARNr amplificados por PCR (PCR-RFLP)	160
IV.3.6. Utilización de un fragmento del gen <i>p53</i> como marcador genético para la identificación de especies de pescado	171
3.6.1. Muestras analizadas	171
3.6.2. Amplificación de los exones 5 y 6 del gen nuclear <i>p53</i> y secuenciación de los fragmentos amplificados	171

3.6.3. Análisis de restricción de fragmentos del gen nuclear <i>p53</i> amplificados por PCR(PCR-RFLP)	175
IV.3.7. Utilización de un fragmento del gen 5S ARNr como marcador genético para la identificación de especies de pescado	175
3.7.1. Muestras analizadas	175
3.7.2. Amplificación del gen 5S ARNr y secuenciación de los fragmentos amplificados	175
V. DISCUSIÓN	
V.1. PRODUCCIÓN DE INMUNOSUEROS Y DESARROLLO DE TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS (ELISA) PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SALMÓN (<i>Salmo salar</i>), TRUCHA (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) Y PALOMETA (<i>Brama raii</i>) AHUMADOS	189
IV.1.1. Obtención de anticuerpos policlonales	189
IV.1.2. Valoración de la especificidad de los anticuerpos policlonales en conejos	191
IV.1.3. Desarrollo de una técnica de ELISA indirecto para identificar muestras de pescado ahumado	193
IV.1.4. Técnica inmunológica rápida del ELISA indirecto en paletas	197
V.2. DESARROLLO DE TÉCNICAS DE PCR PARA AMPLIFICAR MARCADORES GENÉTICOS UTILIZADOS EN LA IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS FRESCAS Y AHUMADAS DE SALMÓN (<i>Salmo salar</i>), TRUCHA (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) Y PALOMETA (<i>Brama raii</i>)	198
V.2.1. Extracción del ADN	199
V.2.2. Elección de los marcadores genéticos	202
V.2.3. Diseño de los cebadores	204
V.2.4. Secuenciación y análisis de restricción de los productos de PCR	207
V.2.5. Diferenciación de muestras frescas y ahumadas de salmón, trucha y palometa mediante PCR-RFLP de un fragmento del	

gen citocromo <i>b</i>	210
V.2.6. Diferenciación de muestras frescas y ahumadas de salmón, trucha y palometa mediante PCR-RFLP de un fragmento del gen COII	214
V.2.7. Diferenciación de muestras frescas y ahumadas de salmón, trucha y palometa mediante PCR-RFLP de un fragmento del gen 16S ARNr	216
V.2.8. Diferenciación de muestras frescas y ahumadas de salmón, trucha y palometa mediante PCR-RFLP de un fragmento del gen <i>p53</i>	219
V.2.9. Utilización de un fragmento del 5S ADNr como marcador genético para la identificación de especies de pescado	222
VI. CONCLUSIONES	226
VII. TRABAJO FUTURO	228
VIII. RESUMEN	234
IX. BIBLIOGRAFÍA	240

I. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR

I. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR

La identidad biológica de los peces se establece basándose en sus caracteres anatómo-biológicos. Sin embargo, muchos pescados se someten después de su captura a operaciones de evisceración, fileteado, picado, etc., antes de su venta al público o a las industrias de transformación. Una vez que el pescado se ha procesado, resulta muy difícil identificar la especie de procedencia.

En la actualidad, los hábitos de consumo, los avances tecnológicos y el comercio internacional, han contribuido a potenciar el consumo de pescado en la población humana. Este aumento del consumo también está relacionado con el incremento de la oferta de pescados procedentes de diversos países y que se presentan al consumidor fileteados, congelados, ahumados, enlatados o incluso precocinados. Por otra parte, la idiosincracia de los consumidores tiende a concentrar la demanda en un reducido grupo de especies, las cuales alcanzan un elevado precio en el mercado. La diferencia de precios favorece la sustitución de las especies de mayor valor económico por las menos valoradas, tanto en las pescaderías como en los establecimientos de restauración colectiva. Este hecho, además de constituir un fraude, tiende a perpetuar la desinformación de los consumidores y la marginación en el mercado de un gran número de especies, muchas de ellas con un excelente valor nutritivo y culinario (Penedo y col., 1992; Sotelo y col., 1993).

En la identificación de pescados ahumados, uno de los mayores problemas radica en la diferenciación del salmón atlántico¹ (*Salmo salar*), la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y la palometa (*Brama raii*). La diferenciación de piezas de salmón y trucha ahumados es, en ocasiones, difícil ya que ni el tamaño (se crían truchas de 8 kg o más), ni el color de la carne, ni el sabor constituyen parámetros fiables de identificación. El dibujo del corte de la pieza tampoco garantiza su diferenciación. Por ello, la puesta a punto de un método de análisis eficaz, rápido y barato que permitiese la identificación de las especies de pescado ahumado citadas cuando se carece de base

(1) Las especies de peces, una vez nombradas en latín, aparecerán con su nombre en castellano.

anatómica, tendría un interés extraordinario para detectar los productos adulterados o etiquetados incorrectamente y para ofrecer una mayor protección a las empresas de transformación y a los consumidores.

Los métodos analíticos utilizados en la diferenciación de especies de pescado incluyen técnicas electroforéticas (Hamilton, 1982; Laird y col., 1982; An y col., 1988; Penedo y col., 1992; Gallardo y col., 1995), cromatografía en fase líquida, HPLC (Osman y col., 1987; Armstrong y col., 1992), técnicas inmunológicas (Taylor y col., 1994a) y técnicas genéticas (Bartlett y Davidson, 1992). Las técnicas electroforéticas y cromatográficas generan perfiles electroforéticos o cromatográficos complejos y bastante similares para las distintas especies de pescado, lo que dificulta su correcta identificación. Por otra parte, tanto las técnicas electroforéticas, como las cromatográficas e inmunológicas desarrolladas hasta el momento para la identificación de especies de pescado, están basadas en el análisis de las proteínas musculares solubles y los resultados obtenidos pueden verse afectados por los tratamientos tecnológicos a que se somete el pescado. Por el contrario, la estabilidad del ADN y la cantidad de información que contiene, confieren a esta molécula una gran especificidad que permite la diferenciación de especies (Bartlett y Davidson, 1991; Hartley y col., 1992; Pendas y col., 1995).

Actualmente, entre las técnicas que se están aplicando con mayor éxito en el análisis de alimentos se encuentran las inmunológicas, basadas en la visualización objetiva de la interacción entre un antígeno y su correspondiente anticuerpo, y las genéticas, que se basan en el reconocimiento específico de fragmentos de ADN (Sharpe, 1994; Fung, 1995).

En este trabajo de investigación se planteó, en primer lugar, la utilización de técnicas inmunológicas, y posteriormente genéticas, para identificar muestras frescas y ahumadas de tres especies de pescado: salmón atlántico, trucha arco iris y palometa. Los objetivos que se pretendían desarrollar fueron los siguientes:

1. Obtención de anticuerpos policlonales frente a proteínas musculares solubles de salmón, trucha y palometa ahumados, y el desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) para identificar dichas especies.
2. Identificación y selección de marcadores genéticos (mitocondriales y nucleares) que permitieran, con la utilización de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuenciación de fragmentos de ADN y digestión con enzimas de restricción, obtener patrones característicos del salmón, trucha y palometa para su correcta identificación.

En la última década, las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) han experimentado un notable desarrollo y difusión en la industria alimentaria. Las ventajas de los métodos inmunoenzimáticos derivan de su sensibilidad, rapidez y bajo coste. Además, estas técnicas son objetivas y automatizables y los reactivos que utilizan son estables (Rittenburg, 1990). Son muchos los ensayos inmunológicos desarrollados en los últimos años para la detección y cuantificación de hormonas, plaguicidas, antibióticos, micotoxinas y proteínas en productos lácteos o cárnicos (Fukal, 1991; Samarajeewa y col., 1991; González y col., 1993; Anguita y col., 1995). Sin embargo, quizás debido a la variedad de especies de pescado comercializadas, los trabajos inmunológicos realizados son escasos (An y col., 1990; Verrez-Bagnis y Escriche-Roberto, 1993; Taylor y col., 1994a). Por ello, el primer objetivo de este trabajo ha consistido en la obtención de anticuerpos y el desarrollo de técnicas inmunológicas, que permitieran diferenciar especies de interés comercial como el salmón, trucha y palometa ahumados. Para ello fue necesario:

1. Inmunizar lotes de conejos con las proteínas musculares solubles de salmón, trucha y palometa ahumados.
2. Comprobar, mediante técnicas de ELISA indirecto, si los inmunoseros obtenidos reconocían a proteínas musculares solubles de especies de pescado distintas de aquéllas frente a las que se obtuvieron.

3. Obtener anticuerpos especie-específicos a partir de los inmunoseros obtenidos en la fase anterior. Para ello se utilizaron técnicas de inmunoadsorción con proteínas musculares solubles de las especies heterólogas.
4. Utilizar los anticuerpos especie-específicos para desarrollar y poner a punto técnicas de ELISA que permitieran diferenciar las especies de pescado citadas.

Otra aproximación metodológica para la diferenciación de especies de pescado y con un gran potencial de desarrollo en los próximos años, consiste en la utilización de técnicas genéticas (Sotelo y col., 1993). Los avances realizados en los últimos años en las técnicas de ingeniería genética, y en concreto, el desarrollo y puesta a punto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han marcado un antes y un después en todas las áreas de investigación biomédica y han demostrado ser muy eficaces en la detección de numerosos microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos (Hill, 1996; Gutiérrez y col., 1997, 1998; González y col., 1999), aplicándose también con éxito en la identificación del origen animal de una carne en productos cárnicos (Chikuni y col., 1990, 1994; Winterø y Thomsen, 1990; Ebbehøj y Thomsen, 1991a; Carnegie, 1994), identificación de especies de pescados (Bartlett y Davidson, 1991, 1992; Hartley y col., 1992; Rehbein y col., 1995, 1997; Ram y col., 1996), detección de proteína de soja (Meyer y col., 1993), gluten (Davidson y Bridges, 1987) y alimentos transgénicos (Meyer y Candrian, 1996).

Recientemente, se ha realizado un esfuerzo notable para identificar marcadores genéticos que han permitido realizar numerosos estudios sobre la evolución y migraciones de determinadas especies marinas. El diseño de estos marcadores genéticos se ha basado en el análisis del ADN, primero en el mitocondrial (ADNmt) y posteriormente en el nuclear (ADNn). Algunas de las ventajas de la utilización de marcadores genéticos en la identificación de especies son:

- La cantidad de muestra requerida para el análisis es mínima.
- Existen muchos marcadores genéticos potenciales.
- Se pueden detectar mutaciones que no conllevan cambios en la composición aminoacídica ni en la movilidad electroforética de las proteínas y que, en consecuencia, no podrían ponerse de manifiesto mediante el análisis electroforético de las mismas.

Muchos de los marcadores genéticos que se han utilizado en el estudio de poblaciones marinas están basados en el ADN mitocondrial (Kocher y col., 1989; Bartlett y Davidson, 1992; Cronin y col., 1993; Chow y Ushima, 1995). Desde un punto de vista filogenético, el ADNmt al ser haploide, ofrece numerosas ventajas para el estudio de la evolución de las especies. Además, cada célula contiene muchas copias de ADN mitocondrial, a diferencia de lo que ocurre con el ADN nuclear.

Los marcadores genéticos basados en el ADN mitocondrial ponen de manifiesto cambios en la secuencia del ADN, como resultado de mutaciones puntuales que incluyen sustituciones de bases. Recientemente, en la identificación de especies, la atención se ha centrado en determinar las diferencias que se observan en el número de copias repetidas de un fragmento de ADN (Hartley y Davidson, 1994). Estas secuencias repetitivas se clasifican de acuerdo al tamaño decreciente del número de bases en satélites, minisatélites y microsatélites. De ellos, los minisatélites y los microsatélites han sido los más utilizados en la identificación de especies.

Además de la utilidad de los minisatélites y microsatélites para la identificación de especies, cada vez es mayor el número de secuencias de genes nucleares específicos que están disponibles en las bases de datos. Con esta información se pueden diseñar cebadores para amplificar genes que permitan establecer diferencias entre especies relacionadas.

En una etapa de máxima expansión de las técnicas de PCR en el análisis de los alimentos, consideramos que su aplicación a la diferenciación de salmón, trucha y palometa ahumados es importante para disponer de una

herramienta útil que facilite la identificación inequívoca de dichas especies. Para llevar a cabo los objetivos propuestos fue necesario:

1. Buscar en las bases de datos (GenBank y EMBL) las secuencias de nucleótidos de diversos genes mitocondriales y nucleares de las especies de interés, como el citocromo *b*, NADH deshidrogenasa, 12S y 16S ARNr, ATPasa, *p53*, etc.
2. Utilizar las secuencias disponibles, para diseñar cebadores adecuados que permitieran amplificar fragmentos génicos en las especies de interés.
3. Extraer el ADN de las muestras de pescado fresco y ahumado.
4. Utilizar los cebadores diseñados y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar las secuencias correspondientes a partir del ADN de las muestras seleccionadas.
5. Secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir del ADN de varios individuos de las distintas especies, para encontrar diferencias entre las secuencias de nucleótidos que se puedan poner de manifiesto por la comparación de sus mapas de restricción.
6. Una vez seleccionadas las endonucleasas de restricción apropiadas, se analizaron diferentes muestras para obtener perfiles de restricción característicos de cada especie.

En la actualidad, el consumo de pescado procesado en nuestro país es creciente. La ausencia de técnicas rápidas y fiables que permitan verificar la autenticidad de las especies de procedencia cuando se carece de base anatómica, representa un problema para las empresas que adquieren estos productos, así como para los Servicios de Control de la Administración, encargados de garantizar el correcto etiquetado de las especies de pescado puestas a la venta. Por ello, consideramos que el desarrollo de marcadores inmunológicos y genéticos, podría tener un gran interés en programas de inspección encaminados a detectar la sustitución fraudulenta de especies o el etiquetado incorrecto de los productos comercializados.

II. INTRODUCCIÓN

II.1. SITUACIÓN GENERAL DEL MERCADO PESQUERO

Desde tiempos remotos, el consumo de los productos del mar ha desempeñado un papel decisivo en las zonas costeras. A diferencia de otros recursos marinos, el pescado está sujeto a un proceso de renovación continuo, y sólo la actuación del hombre en forma de sobrepesca o de contaminación del medio ambiente podría poner fin a este eterno ciclo biológico. Sin embargo, en la actualidad, debido a la elevada demanda de pescado, muchas especies de peces e invertebrados marinos se producen y explotan en condiciones controladas en factorías de acuicultura. Los peces son organismos muy eficientes en la conversión de proteína alimenticia en proteína corporal, eficiencia superior a la que presentan los animales de abasto. Salmones (*Salmo salar*), truchas (*Oncorhynchus mykiss*), carpas (*Cyprinus carpio*), atunes (*Thunnus thynnus*), doradas (*Sparus aurata*), lubinas (*Dicentrarchus labrax*), rodaballos (*Psetta maxima*) y otras especies se obtienen actualmente en acuicultivos y, en el futuro, la explotación industrial del pescado en piscifactorías está llamada a experimentar un gran desarrollo (Sikorski, 1994).

El sector pesquero mundial se caracteriza por una elevada concentración productiva en determinadas zonas que no se corresponde necesariamente con la distribución geográfica del consumo (en general, el pescado sigue siendo más apreciado en las dietas de los países desarrollados). La tendencia en el comercio pesquero internacional se dirige hacia un aumento de la dependencia de los países desarrollados respecto de los suministros externos (Juárez, 1997). En la Tabla 1, se refleja la evolución de las capturas de los principales productores de pescado, destacando el crecimiento de dichas capturas en países como China y Noruega, mientras que descenden en otros como Japón y Canadá.

Japón, Estados Unidos y los países miembros de la Unión Europea (salvo Irlanda, Dinamarca, Suecia y el Reino Unido) no son autosuficientes y recurren a los mercados internacionales para satisfacer las necesidades de su consumo interno. Otros, como Noruega, Islandia, Canadá, países sudamericanos y gran parte de los asiáticos, se están consolidando como

Tabla 1. Capturas pesqueras* de los principales países productores del mundo

País	AÑOS						
	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996
China	7.765.379	8.396.158	9.386.499	10.485.113	11.834.045	13.572.727	15.189.789
Perú	6.868.905	6.898.106	7.502.066	9.003.509	11.999.217	8.937.342	9.515.048
Chile	5.162.773	5.958.878	6.433.314	5.948.451	7.720.578	7.433.864	6.692.653
Japón	9.549.979	8.497.748	7.683.899	7.247.828	6.617.308	5.967.290	5.964.090
Estados Unidos	5.555.475	5.126.791	5.190.717	5.522.917	5.535.349	5.224.567	5.000.799
Rusia Fed.	7.553.544	6.895.699	5.507.465	4.370.009	3.705.082	4.311.809	4.675.731
Noruega	1.596.672	2.012.110	2.430.611	2.415.118	2.333.100	2.525.078	2.638.464
Islandia	1.505.312	1.047.395	1.574.682	1.715.581	1.556.962	1.612.548	2.060.168
Dinamarca	1.475.711	1.751.154	1.953.834	1.613.906	1.873.335	1.999.033	1.681.517
España	1.096.281	1.047.013	1.084.022	1.092.831	1.129.960	1.143.820	1.055.314
Canadá	1.637.730	1.458.230	1.291.999	1.131.484	1.022.747	868.086	900.806
Reino Unido	760.118	790.604	813.083	860.200	877.931	909.902	867.773
Francia	610.477	571.630	570.916	583.001	572.708	601.695	542.187
Suecia	250.982	237.016	307.545	341.897	386.814	404.586	370.881
Países Bajos	406.242	407.166	432.970	461.756	420.053	438.092	363.283
Italia	381.688	405.894	396.103	395.309	396.267	394.020	358.736
Irlanda	215.736	233.290	249.159	278.577	293.616	385.356	332.878
Portugal	318.173	319.636	293.169	287.772	263.187	260.519	260.385
Alemania	326.302	232.430	216.890	253.010	230.063	239.753	236.573
Total	85.880.200	85.088.400	86.208.800	87.278.800	92.682.900	93.001.100	94.625.400

* toneladas métricas

Fuente: F.A.O., Estadísticas de Pesca, 1998.

abastecedores de otros (Tabla 2). Todas estas circunstancias configuran un mercado pesquero caracterizado por una elevada concentración del comercio (entre Japón y la U.E. absorben más del 65% de las importaciones pesqueras mundiales) y por la tendencia a que los países en vías de desarrollo incrementen sus exportaciones en detrimento de las importaciones (Surís y Otero, 1997).

En los últimos años, la necesidad de adaptación a la Política Comunitaria Pesquera, ha condicionado el desarrollo del sector pesquero español, tanto en su vertiente extractiva (descenso en las capturas, adaptaciones en las flotas, formación de empresas mixtas, etc.), como en los aspectos comerciales referidos al mercado interior y al comercio internacional de pescado.

Respecto a la evolución del mercado interior pesquero en España, conviene resaltar que la importancia relativa del pescado en el consumo alimentario global permanece estable (Figura 1).

Por lo que se refiere al comercio exterior, el mercado español se ha hecho muy dependiente de los suministros externos de pescado. El mantenimiento de un elevado consumo medio, unido al descenso y posterior estabilidad de los desembarcos, han propiciado el aumento de las importaciones para satisfacer las necesidades de la demanda interna (Tabla 2).

En términos generales, se importa pescado fresco, congelado, crustáceos y moluscos, mientras que se exportan pescado congelado, moluscos y conservas. El principal destino de las exportaciones se localiza en el resto de los países comunitarios (Portugal e Italia de forma destacada), mientras que el origen de las importaciones es más variado (Argentina, Namibia, Reino Unido, Portugal, Chile, etc.).

Tabla 2. Comercio internacional de productos pesqueros.

Importaciones*				Exportaciones*			
País	1994	1995	1996	País	1994	1995	1996
Europa	18.133.031	20.172.209	20.960.540	Europa	13.686.079	15.065.426	16.537.287
Japón	16.140.465	17.853.481	17.023.945	Tailandia	4.190.036	4.449.457	4.117.865
Estados Unidos	7.043.431	7.141.428	7.080.411	Noruega	2.735.485	3.122.662	3.415.696
Francia	2.796.719	3.221.298	3.194.133	Estados Unidos	3.229.585	3.383.589	3.147.858
España	2.638.737	3.105.684	3.134.893	China	2.320.125	2.835.021	2.856.986
Italia	2.257.462	2.281.316	2.590.985	Dinamarca	2.359.034	2.459.629	2.698.976
Alemania	2.316.449	2.478.817	2.542.957	Canadá	2.182.078	2.314.413	2.291.261
Reino Unido	1.880.350	1.910.091	2.065.025	Chile	1.303.974	1.704.260	1.697.258
Hong Kong	1.647.106	1.831.511	1.928.143	Rusia	1.720.459	1.635.145	1.686.162
Dinamarca	1.415.239	1.573.732	1.618.669	Indonesia	1.583.416	1.666.752	1.678.222
China	855.706	941.293	1.184.170	Corea	1.411.052	1.564.878	1.512.992
Canadá	913.404	1.034.070	1.158.864	Países Bajos	1.435.824	1.447.239	1.470.046
Portugal	669.888	763.245	782.858	España	1.021.015	1.190.676	1.461.486
Noruega	324.142	490.383	535.642	Islandia	1.264.615	1.342.552	1.425.837
Brasil	261.453	397.574	481.552	Perú	979.502	869.727	1.120.391

* en miles de EE.UU.\$

Fuente: F.A.O. Estadísticas de Pesca, 1998

Kilogramos
Litros
Unidades

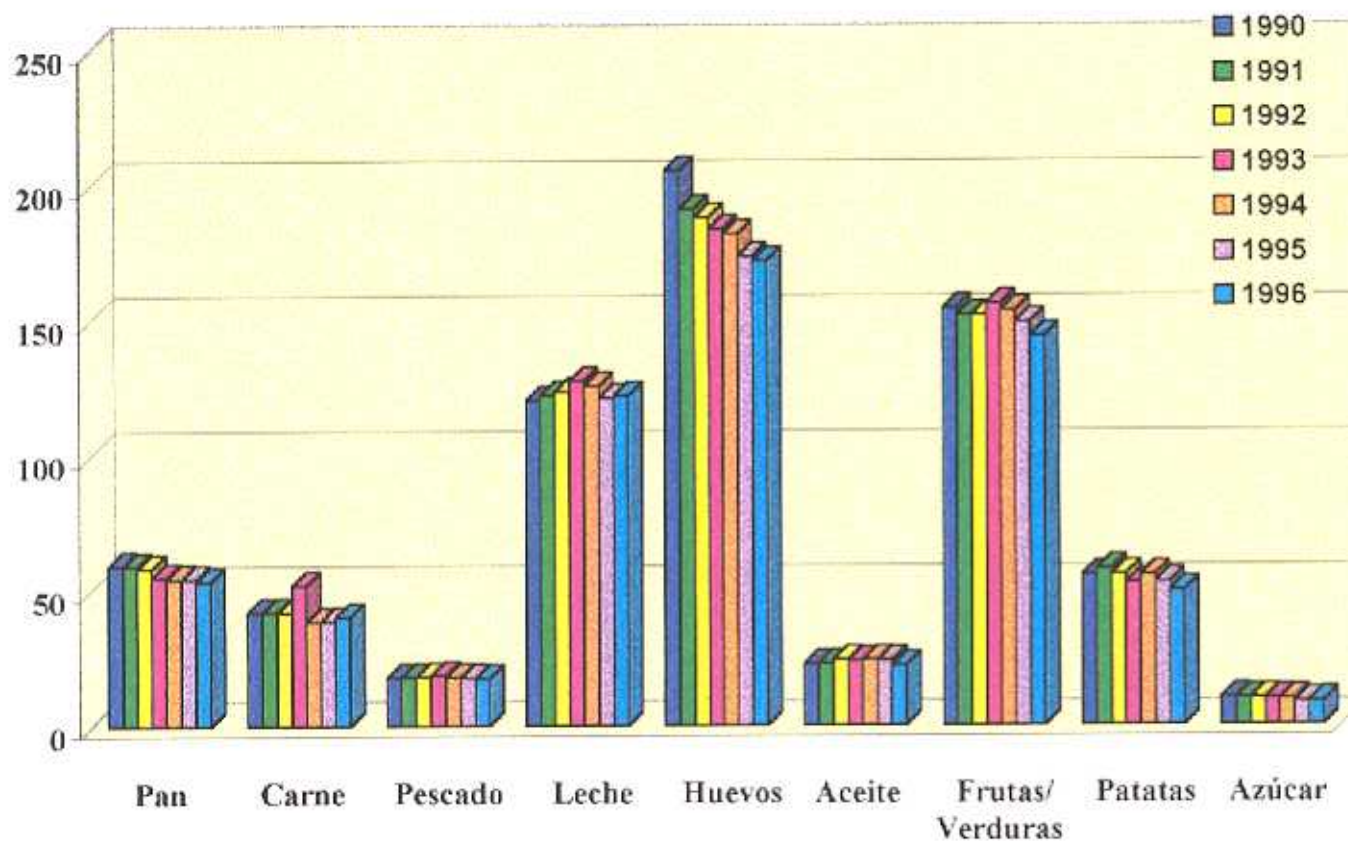


Figura 1. Evolución del consumo de distintos alimentos por habitante y año. Estadísticas de encuestas de presupuestos familiares, INE.

II.1.1. PRODUCCIÓN DE SALMÓN Y TRUCHA

Debido a la limitación de los recursos marinos y a la política de reducción de la flota pesquera de la Unión Europea, la acuicultura ha experimentado un gran desarrollo en nuestro país.

La acuicultura consiste en la reproducción, total o parcial, del ciclo biológico natural de algunas especies acuáticas, controlando estos organismos y el hábitat donde se desarrollan. Existen dos grandes modalidades de cultivo: el cultivo marino (dorada, lubina, rodaballo, salmón, etc.) y el cultivo continental (truchas). Ambos cultivos pueden ser explotados de forma extensiva (sin alteración del medio de cría) o de forma intensiva (control del ciclo y del medio).

En los últimos años se ha producido una expansión del cultivo intensivo en granjas marinas, debido a la gran demanda comercial de productos marinos (dorada/lubina), la peculiaridad de nuestro litoral y las subvenciones tanto del Estado como de la Unión Europea. En el período comprendido entre 1985 y 1996, la producción pasó de ser virtualmente nula a 30.000 toneladas anuales, lo que representó cerca del 200% de las capturas tradicionales de estas especies. Se estima que antes del final del siglo, la producción será de 45.000 toneladas y 3 de cada 4 doradas/lubinas procederán de granjas acuícolas marinas. No obstante, el peso específico de la acuicultura marina de dorada/lubina, sin olvidar el cultivo del rodaballo, es reducido en comparación con los cultivos de truchas y salmones (Doyelle, 1997).

Los salmónidos pertenecientes al género *Salmo* más representativos de nuestra fauna piscícola son el salmón atlántico y la trucha común o *Salmo trutta fario*. El primero se interna en algunos ríos de la cornisa cantábrica entre noviembre y febrero, correspondiendo con la época de desove, mientras que la trucha común está ampliamente distribuida por los ríos y arroyos de nuestra península.

La trucha arco iris se introdujo en la península a finales del siglo pasado procedente del Pacífico, y con el paso de los años se ha adaptado a la climatología y orografía, de tal forma que prácticamente ha desplazado a la

trucha común. Comparada con otras especies de salmónidos, la trucha arco iris se adapta bien a la cautividad, con comportamientos menos agresivos que la trucha común, por lo que sus cualidades naturales para la explotación industrial son muy buenas (Blanco, 1994).

En los últimos años, la población de salmón atlántico se ha reducido notablemente en Europa occidental, al igual que en el norte de España (Asturias y Galicia) debido al deterioro de los hábitats naturales, y a la pesca masiva en alta mar y en los ríos (Larinier y Dartiguelongue, 1989). Islandia es uno de los países que más se han preocupado por la subsistencia de esta especie, estableciendo programas de incubación y suelta de alevines. La mayor parte del salmón atlántico que se consume en Europa procede de instalaciones cerradas, en las que tiene lugar el ciclo completo, realizándose el engorde en jaulas flotantes situadas en lugares resguardados de la costa, destacando por su producción Noruega y Escocia. Conviene señalar que el salmón era una especie poco conocida hasta hace unos años por los consumidores españoles, pero se ha ido abriendo paso en el mercado gracias a la calidad y bajos precios que ofertan los exportadores noruegos.

La producción acuícola española es un sector económico en ascenso que se afianza lentamente, aunque todavía depende mucho de la producción del mejillón (*Mytilus edulis*), que junto con la trucha arco iris constituyen las producciones más sobresalientes. En 1995, la producción acuícola alcanzó un valor de 29.522 millones de pesetas, de los que 13.640 millones correspondieron a la producción de peces, destacando la trucha arco iris con 6.600 millones de pesetas, la dorada con 3.192 millones de pesetas y el rodaballo con 2.335 millones de pesetas.

Según datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, en 1996 estaban en actividad 153 piscifactorías continentales privadas. Su producción en 1995 fue de 21.628 toneladas, de las que la mayor parte correspondieron a la trucha arco iris (21.571 toneladas) (Anónimo, 1997a).

II.1.1.1. Pescados ahumados

Entre los productos de la pesca transformados, la producción que más se ha incrementado en España es la de ahumados. El 47% de la producción de ahumados corresponde a salmón, a pesar de lo cual España es aún deficitaria en este tipo de productos (Tabla 3).

De las importaciones de pescados ahumados, el 80% son de salmón y proceden principalmente de Islandia y de Dinamarca. Hay que aclarar que de “Islandia y Dinamarca” procede el salmón ahumado, aunque lo más frecuente es que el salmón se importe fresco, fundamentalmente de Noruega y Escocia, y se procese en España, para su comercialización como ahumado (Vieites, 1994). De hecho, el salmón Noruego es la materia prima utilizada para elaborar más del 60% de la producción nacional de salmón ahumado. En la última década ha aumentado considerablemente el volumen de producción de ahumados. Sin embargo, el valor económico de la producción permanece estable, debido principalmente a que en los últimos años han aparecido un gran número de empresas que compiten en precios. Además, han aumentado fuertemente las importaciones y la diferenciación de productos en este subsector es baja. A pesar de que las empresas del sector ofrecen una mayor variedad de productos, los consumidores españoles siguen demandando salmón, trucha y palometa, muy por encima de los demás. Esto no impide que surjan productos nuevos, como el hígado de bacalao (*Gadus morhua*) ahumado o lomo y ventresca de salmón, entre otros.

II.1.1.2. Marco legislativo para la comercialización y elaboración de productos pesqueros.

El marco legislativo que sirve de referencia para la elaboración y comercialización de pescados ahumados en España, viene definido en el Real Decreto 1.437/1992 de 27 de noviembre (B.O.E. número 11, de 13 de enero de 1993), por el que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de los productos pesqueros y de la acuicultura; el Real Decreto 1334/1999 de 31 de julio (B.O.E. número 202, de 24 de agosto de 1999), por el que se aprueba la Norma General de Etiquetado, Presentación y Publicidad de productos alimenticios; el Real Decreto 1.882/1994 de 16 de

Tabla 3. Producción de salmones ahumados *

País	1994	1995	1996
Dinamarca	9.056	9.813	13.590
Francia	11.500	12.000	12.010
Reino Unido	11.000	11.000	12.000
Japón	6.234	7.549	8.612
Alemania	5.108	6.986	6.084
Estados Unidos	3.294	3.859	4.084
Bélgica	2.625	2.333	2.802
Italia	2.500	2.500	2.500
Noruega	2.180	2.039	2.350
España	1.499	1.757	1.976
Canadá	1.020	1.100	658
Total	61.098	66.870	72.112

* toneladas métricas

Fuente: F.A.O., Estadísticas de Pesca, 1998

septiembre (B.O.E. número 249, de 18 de octubre de 1994), por el que se establecen las condiciones de sanidad animal aplicables a la puesta en el mercado de animales y productos de la acuicultura; y el Real Decreto 331/1999 de 26 de febrero (B.O.E. número 66, de 18 de marzo de 1999), que contiene el conjunto de especificaciones que han de cumplir, en las diversas fases de comercialización en España, los productos de la pesca y de la acuicultura, tanto de la Unión Europea como de países terceros. Según establece el artículo 4 del Real Decreto 331/1999: “Todos los productos pesqueros frescos, refrigerados o cocidos, además de cumplir con lo establecido en el Real Decreto 212/1992 y el Real Decreto 1.437/1992, deberán llevar en el envase o embalaje correspondiente, y en lugar bien visible, una etiqueta cuyas dimensiones mínimas han de ser de 14 centímetros de longitud por 4 centímetros de altura, en la que en caracteres legibles e indelebles se contemplen como mínimo las siguientes especificaciones”:

- País de origen
- Categoría de calibre
- Categoría de frescura y fecha en que ésta se determine
- Peso neto, en kilogramos, para productos envasados
- **Nombre científico y comercial de la especie**
- Forma de obtención
- Modo de presentación y tratamiento
- Expedidor, número de autorización oficial y domicilio

La exigencia de contemplar en el etiquetado de los productos pesqueros el nombre comercial y científico de la especie de que se trate, hace necesaria la existencia de técnicas fiables, rápidas, económicas y objetivas que permitan confirmar que el producto envasado corresponde con la denominación comercial y científica que aparece en la etiqueta.

Hasta la fecha no se dispone de una única técnica válida para la identificación de todas las especies de interés comercial, y no existen métodos oficiales para la identificación de dichas especies. Por ello, en los próximos años, la investigación debe hacer posible la puesta a punto de la metodología adecuada para llevar a cabo la identificación correcta de las especies de

pescado en productos frescos y procesados, en los que no se dispone de caracteres anatómicos reconocibles.

II.2. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE SALMÓN ATLÁNTICO (*Salmo salar*), TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*) Y PALOMETA (*Brama raii*)

La taxonomía o estudio de las bases teóricas, principios y procedimientos que conducen a la clasificación natural de los peces, surge por la necesidad de diferenciar unas especies de otras (Figura 2).

II.2.1. CLASIFICACIÓN DE LOS SALMÓNIDOS

La clasificación de los salmónidos ha sido objeto de numerosas discusiones y quizás es uno de los grupos taxonómicos que ha planteado mayor dificultad a los científicos. En este grupo encuadramos al salmón atlántico y a la trucha arco iris (Blanco, 1994).

Los salmónidos pertenecen al orden *Salmoniformes*, que incluye los siguientes subórdenes:

Orden	<i>Salmoniformes</i>
Suborden	<i>Salmonoidei</i>
	<i>Argentinoidei</i>
	<i>Stomatoidei</i>
	<i>Giganturoidei</i>
	<i>Esocoidei</i>
	<i>Galaxioidei</i>

El Suborden *Salmonoidei* comprende tres familias:

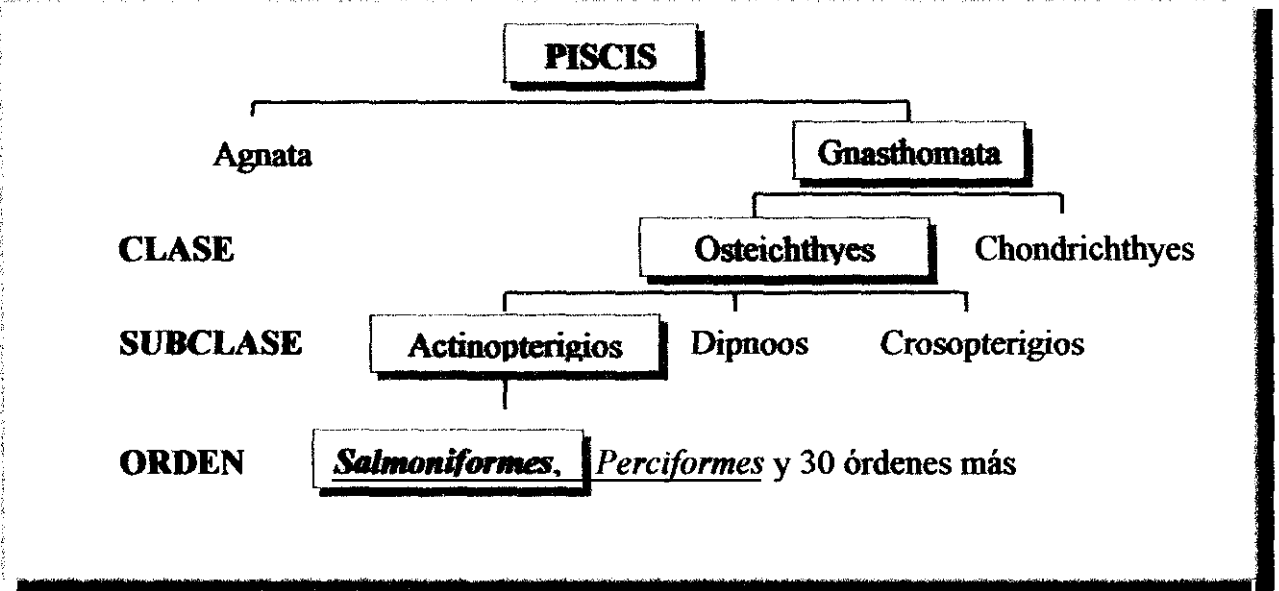


Figura 2. Clasificación taxonómica de los peces (Blanco, 1994).

Suborden	<i>Salmonoidei</i>
Familia	<i>Salmonidae</i> <i>Plecoglossidae</i> <i>Osmeridae</i>

La familia *Salmonidae* está representada por tres subfamilias, basándose en las características morfológicas de estos peces, en la similitud de su desarrollo embrionario y en su origen poliploide (todas las especies contemporáneas de esta familia son tetraploides, por una diploidización en su proceso evolutivo).

Familia	<i>Salmonidae</i>
Subfamilia	<i>Salmoninae</i> (truchas y salmones) <i>Coregoninae</i> (corégonos) <i>Thymallinae</i> (tímalos)

Las características diferenciales de la subfamilia *Salmoninae* con relación a las otras dos subfamilias, se establecen de acuerdo a aspectos morfológicos y de cariotipo.

En la subfamilia *Salmoninae* se agrupan seis géneros:

Subfamilia	<i>Salmoninae</i>
Género	<i>Brachymystax</i> <i>Hucho</i> <i>Salvelinus</i> <i>Salmotimus</i> <i>Oncorhynchus</i> <i>Salmo</i>

Las diferencias osteológicas en éstos géneros se refieren, fundamentalmente, a la configuración y tamaño de los huesos de la región etmoidal, la cual se considera de gran importancia en la configuración craneal de los salmónidos, así como al hueso vómer. Parece que estas características morfológicas pueden estar influidas por la alimentación y por la distancia de los recorridos en las migraciones oceánicas para realizar la puesta.

Las especies motivo de nuestro estudio son el salmón atlántico, que se distribuye geográficamente a lo largo del océano Atlántico, y la trucha arco iris que es una de las truchas del Pacífico Norte. Hasta 1988, esta trucha se incluía provisionalmente en el subgénero *Parasalmo*, dentro del género *Salmo*. Pero la *American Fisheries Society's Committee on Names of Fishes* decidió que las truchas nativas de las cuencas del Pacífico-Norte se encuentran genéticamente más cerca del salmón del Pacífico, *Oncorhynchus*, que de las especies *Salmo* del Atlántico y Europa (como el salmón atlántico y la trucha común europea *Salmo trutta*). Por lo tanto, *Oncorhynchus* es el nombre genérico para designar a todas las truchas nativas de la cuenca del Pacífico, llamadas hasta entonces *Salmo*. Dentro del género *Oncorhynchus* encontramos el salmón japonés (*Oncorhynchus masou*), salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*), salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*), salmón keta (*Oncorhynchus keta*), salmón rosado (*Oncorhynchus gorbuscha*), salmón plateado (*Oncorhynchus kisutch*) y el salmón amago (*Oncorhynchus rhodurus*), entre otros.

El salmón atlántico se caracteriza por tener una boca grande, alcanzando o sobrepasando la perpendicular del centro del ojo; dientes fuertes; vómer generalmente dentado y cuerpo fusiforme. El salmón joven presenta de 8 a 10 bandas transversales azul verdosas sobre los flancos, enlazándose en el dorso y con una serie de manchas rojas intermedias. En el mar presenta dorso gris pizarroso azulado, flancos plateados y vientre nacarado. Pequeñas manchas negras redondeadas o estrelladas se observan sobre la cabeza y el cuerpo. Sus aletas son grisáceas. Posee una aleta adiposa en el dorso entre la única aleta dorsal y la caudal. Durante la reproducción, la

mandíbula de los machos (rara vez de las hembras) se alarga y curva en forma de gancho.



Salmo salar

La trucha arco iris presenta las aletas pectorales, pélvicas y anal sin borde blanco. En el mar, el dorso es pardo verdusco, los flancos y vientre plateados y la cola jaspeada de oscuro. En el río, más oscuro, el jaspeado se encuentra igualmente sobre el dorso, los flancos y la cabeza. Dorso jorobado en los machos adultos, cuyos maxilares son muy ganchudos y fuertemente dentados (Bauchot y Pras, 1993).



Oncorhynchus mykiss

II.2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS BRÁMIDOS

La tercera especie estudiada en este trabajo ha sido la palometa. Esta especie pertenece al orden *Perciformes*, suborden *Percoides*, familia *Brámidos*, en la que encontramos cuatro especies: (Bauchot y Pras, 1993).

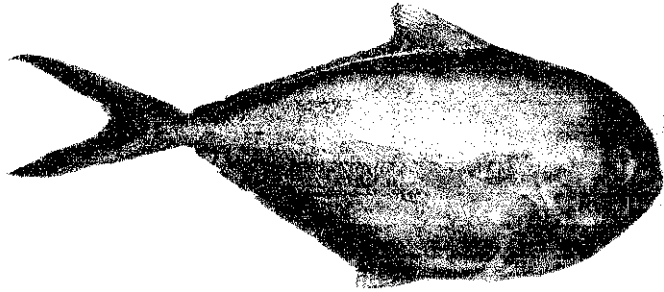
Pterycombus brama

Taractes asper

***Brama raii* (*Brama brama*)**

Taractichthys longipinnis

La palometa es un pez cosmopolita, poco frecuente en las costas europeas, excepto estacionalmente en Portugal. Es mesopelágico durante el día (hasta 400 m) y nada en superficie por la noche. Se aproxima a las costas para la reproducción.



Brama raii

Su dorso es grisáceo negruzco y brillante, los flancos y el vientre plateados. La región interorbital es dorada. Las aletas dorsal y anal orladas de oscuro, mientras que la aleta caudal frecuentemente está orlada de blanco. Su cuerpo es alto, muy ovalado y comprimido; el hocico es muy corto. Las aletas pectorales muy largas y las ventrales muy reducidas.

II.3. MÉTODOS PARA IDENTIFICAR ESPECIES DE PESCADO

La identificación correcta de las especies de pescado es importante porque de ella depende su valoración comercial. Cuando el pescado está fresco y entero, la identificación se realiza mediante la observación de sus características morfológicas externas, como la forma y coloración corporal, forma y disposición de las aletas y escamas, detalles de la cabeza, etc. Las características observadas se comparan con láminas y/o fotografías, o con los criterios descritos en las claves de identificación.

En el caso de filetes de pescado, con y sin piel, o productos elaborados en los que se hayan modificado las características anatómicas esenciales, la identificación resulta compleja incluso para los expertos, especialmente si se trata de especies afines. En estos casos, los criterios morfológicos y organolépticos son insuficientes para la identificación de las especies.

Con el fin de superar las limitaciones de la identificación morfológica se han desarrollado otros métodos alternativos que permiten identificar las especies de pescado en productos procesados.

Todos los seres vivos se caracterizan por la información que contienen sus ácidos nucleicos (genoma) y que determina tanto las secuencias de aminoácidos como los niveles de síntesis de sus proteínas. Teniendo en cuenta que los ácidos nucleicos y las proteínas codificadas en ellos son característicos de cada especie, la mayoría de los métodos desarrollados para la identificación de especies de pescado están basados en el estudio de sus proteínas o de los ácidos nucleicos.

Cada una de estas opciones presenta ventajas e inconvenientes, como se muestra en la Tabla 4 (Ferguson y col., 1995).

II.3.1. MÉTODOS BASADOS EN EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Las proteínas son la expresión del genoma propio de cada especie y poseen carácter informativo (secuencia aminoacídica), siendo esta característica la que permite establecer diferencias entre las especies.

En el músculo de pescado se distinguen tres grupos principales de

Tabla 4. Comparación entre las proteínas y el ADN como marcadores moleculares en la identificación de especies

Ventajas de las proteínas

- Las muestras se pueden analizar rápidamente
- Coste de reactivos relativamente bajo
- Las proteínas tienen una función conocida
- Extensas bases de datos disponibles para muchas especies

Inconvenientes de las proteínas

- Las muestras deben ser frescas o congeladas y encontrarse en buen estado
- Se requieren grandes cantidades de muestras de diversos tejidos, lo que puede requerir el sacrificio del animal
- Bajo número de alelos por *locus*
- Sólo se identifican proteínas detectables mediante tinción histoquímica
- El análisis de perfiles puede resultar difícil, especialmente en individuos poliploides

Ventajas del ADN

- Solo se precisa un tipo de muestra y en pequeña cantidad
- La amplificación, por PCR, permite el examen de pequeñas cantidades de muestra y de especímenes procedentes de museos
- Las muestras se pueden almacenar en etanol o desecadas
- Se dispone de miles de marcadores potenciales
- Algunos *loci* son multialélicos
- Se pueden detectar mutaciones que no originan cambios en la movilidad electroforética de las proteínas

Inconvenientes del ADN

- Análisis relativamente lento y caro
- La sensibilidad de las técnicas exige un manejo muy cuidadoso

proteínas según su función: proteínas sarcoplásmicas, miofibrilares y del tejido conjuntivo. La fracción de proteínas sarcoplásmicas es la que presenta mayores variaciones interespecíficas, incluso entre especies estrechamente relacionadas (Slattery y Sinclair, 1983; Hofmann, 1987). Por este motivo son las que se utilizan con mayor frecuencia para la identificación de especies, tanto en las técnicas electroforéticas como en las inmunológicas y cromatográficas. Sin embargo, las proteínas sarcoplásmicas se desnaturalizan por el calor (Dowdie y Biede, 1983; Yowell y Flurkey, 1986), por lo que el análisis de esta fracción proteica puede resultar inadecuado para la identificación de especies en productos sometidos a tratamiento térmico.

II.3.1.1. Técnicas Electroforéticas

La electroforesis es el método de análisis de proteínas más utilizado para la identificación de especies de pescado (Mackie, 1980; Morrow, 1992). Estas técnicas permiten separar las proteínas en función de su peso molecular o de su carga neta.

La electroforesis consiste en separar moléculas cargadas, como las proteínas o el ADN, en un medio acuoso, bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado entre un electrodo negativo y otro positivo. El requisito fundamental para esa separación es que las moléculas en estudio tengan una carga positiva o negativa en el pH del tampón seleccionado para el análisis. Las moléculas con elevada carga neta tenderán a moverse más rápidamente que aquéllas con menor carga, y a igualdad de carga, se desplazarán más rápidamente las moléculas más pequeñas. Por ello, el desplazamiento depende de la carga y del tamaño de las moléculas que se van a separar.

Las proteínas son moléculas cargadas, pero su carga neta depende del pH de la solución en la que se encuentran, ya que éste determina el grado de ionización de sus grupos amino y carboxilo. Al valor de pH en el que la carga de la proteína es cero se le conoce como valor pI o punto isoelectrico, y es característico de cada proteína.

Para la identificación de especies de pescado y marisco se pueden utilizar diversas técnicas electroforéticas dependiendo del tipo de procesado que haya experimentado el producto analizado.

Cuando el pescado no ha sufrido ningún tratamiento térmico, como ocurre en los pescados refrigerados y congelados, se utilizan extractos acuosos del músculo para su identificación. En este caso se pueden utilizar técnicas de electroforesis convencional en diversos soportes o bien técnicas de isoelectroenfoque que permiten alcanzar un mayor poder de resolución.

En productos tratados por calor, en los que las proteínas solubles han sufrido diversos grados de desnaturalización, existen otras alternativas para el análisis electroforético, como la extracción de proteínas termoestables (parvoalbúminas), la extracción y análisis de proteínas solubilizadas con detergentes o con urea (An y col., 1988) e incluso el análisis de las proteínas desnaturalizadas y sometidas a un proceso de fragmentación con bromuro de cianógeno o con proteasas (Sotelo y col., 1993).

La interpretación de los perfiles electroforéticos requiere calcular la movilidad, el punto isoeléctrico (pI) o el peso molecular de las bandas obtenidas por comparación con un patrón conocido de proteínas. Para identificar especies basándonos en el análisis electroforético, es necesario analizar muestras de referencia en el mismo gel que las muestras problema. Como la comparación visual entre las bandas no es muy exacta, se suelen analizar los geles por densitometría para estimar la cantidad de proteína de cada banda y su posición en el gel (Hamilton, 1982). A medida que se desarrollan técnicas más sensibles para la separación electroforética y posterior tinción de las proteínas, los perfiles electroforéticos obtenidos son más complejos. Por ello, cada vez es más frecuente recurrir a la utilización de analizadores de imágenes y al registro informático de las imágenes obtenidas. De esta forma se pueden comparar los patrones electroforéticos obtenidos en experimentos distintos y se facilita la interpretación de los resultados (Tennyson, 1996).

II.3.1.1.1. *Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil-sulfato-sódico (SDS-PAGE)*

En la electroforesis convencional, la separación de las proteínas tiene lugar en una solución tampón de pH y fuerza iónica determinadas. Si se realiza en geles de poliacrilamida y en presencia de dodecil sulfato sódico

(SDS-PAGE), el SDS provoca una carga neta negativa en las proteínas e interacciona con sus regiones hidrofóbicas dividiéndolas en subunidades que se separan según su tamaño. La electroforesis en geles de poliacrilamida es una buena herramienta para el análisis de las proteínas debido a la flexibilidad de este soporte, un gel formado por monómeros de acrilamida $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH}_2$ y el dímero $\text{N,N}'$ -metilenbisacrilamida como agente de unión. Sin embargo, el manejo de la acrilamida requiere precaución debido a su toxicidad y a las dificultades que a veces experimenta la polimerización del gel.

An y col. (1988), utilizaron la electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) para diferenciar e identificar tres especies de langostinos (rosa, *Penaeus duorarum*; blanco, *Penaeus setiferus* y de roca, *Sicyonia brevirostris*) tanto crudos como cocidos. Para la obtención de los extractos proteicos se comparó la eficacia de varios disolventes: agua, una solución de CINa 0,1 M, SDS al 1% y una solución 8 M de urea. En las muestras de langostino crudo, los extractos acuosos produjeron un patrón electroforético característico de cada especie. Sin embargo, en las muestras tratadas por calor, la cantidad de proteínas extraídas con agua fue menor y no se obtuvieron perfiles específicos de especie. El dodecil sulfato sódico (SDS), mejoró la extracción y el número de bandas proteicas observables en el gel, haciendo posible la identificación de los langostinos cocidos.

La técnica de SDS-PAGE se ha utilizado también para la identificación de especies de gádidos (*Theragra chalcogramma* y *Urophycis chuss*) en muestras crudas y cocinadas y en muestras de surimi (An y col., 1989a). El uso de SDS o urea para la extracción de las proteínas a partir de muestras cocinadas de pescado y de muestras de surimi, permite obtener perfiles especie-específicos con la técnica de SDS-PAGE.

II.3.1.1.2. Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque es una técnica de electroforesis en un gradiente de pH. En este método, las proteínas migran a través de un campo eléctrico hasta que alcanzan el pH correspondiente a su punto isoeléctrico. Cuando lo alcanzan (carga neta cero), cesa su migración y precipitan en bandas muy

finas en las que los puntos de isoelectroenfoque pueden diferir en 0,02 unidades de pH. Por tanto, en la técnica del isoelectroenfoque, la separación depende del punto isoelectroenfoque de la proteína y no de su carga y tamaño.

Inicialmente, la técnica del isoelectroenfoque se realizaba en geles de poliacrilamida, con el fin de evitar los fenómenos de electro-endósmosis asociados a los geles de agarosa y almidón. Sin embargo, bloqueando los grupos cargados de los geles de agarosa es posible establecer gradientes de pH apropiados para isoelectroenfoque. La resolución que se obtiene en geles de agarosa modificada es equivalente a la obtenida con geles de poliacrilamida, pero la agarosa ofrece algunas ventajas en cuanto a manejo, seguridad, tiempo, rapidez y coste económico (Hamilton, 1982).

El isoelectroenfoque tiene un gran poder de resolución para analizar muestras no sometidas a tratamiento térmico. Sin embargo, cuando se analizan proteínas musculares desnaturalizadas por el calor, la electroforesis se debe realizar en condiciones que permitan separar proteínas extraídas con detergentes o urea. También se pueden obtener perfiles específicos de especie a partir de proteínas desnaturalizadas por calor si previamente se fragmentan con proteasas o con compuestos como el bromuro de cianógeno, que rompe las proteínas por los residuos de metionina (Gross, 1966). Estos métodos se han utilizado para identificar especies de pescado en productos enlatados y en derivados del surimi. Sin embargo, los perfiles que se obtienen tras la fragmentación con bromuro de cianógeno no permiten diferenciar especies muy cercanas filogenéticamente como las pertenecientes a las familias de salmónidos o túnidos (Mackie y col., 1999).

Laird y col. (1982), comprobaron que el isoelectroenfoque es una técnica especialmente adecuada para diferenciar especies de pescado con una relación filogenética muy cercana, como el salmón atlántico y las truchas del Pacífico (*Oncorhynchus* sp.), que son difíciles de diferenciar por electroforesis convencional. La resolución obtenida por estos investigadores en geles de poliacrilamida fue ligeramente mejor que la obtenida en geles de agarosa. Otros investigadores han utilizado también el isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida para diferenciar especies como los gádidos, merluza,

Merluccius merluccius; bacalao, *Gadus morhua* o eglefino, *Gadus aeglefinus*, entre otros (Neti y Rehbein, 1988), peces planos, *Solea senegalensis* y *Paralichthys isosceles* (González y col., 1997) (Figura 3), langostinos, langostino blanco, rosa y de roca (An y col., 1989b) y especies de caviar americano, europeo y asiático (Chen y col., 1996).

Abrams y col. (1984), estudiaron el efecto del calor en los perfiles de proteínas de pescado obtenidos por isoelectroenfoque en geles de agarosa. Los resultados obtenidos demostraron que un calentamiento moderado (60-70°C) no interfería en la identificación de las especies analizadas. Tampoco el escabechado afectaba a la identificación.

An y col. (1989a; 1989b), pusieron a punto una técnica de isoelectroenfoque para la diferenciación de pescados y mariscos a partir de muestras crudas y tratadas por calor. Los mejores resultados se obtenían utilizando geles de poliacrilamida con urea.

Algunos de los inconvenientes de la utilización de poliacrilamida se pueden evitar utilizando geles preparados comercialmente y equipos de electroforesis automatizados como el *Phastsystem*TM (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Merchante y Ortín (1993), diferenciaron salmón, trucha, atún fresco y diversos gádidos frescos por isoelectroenfoque (IEF) en *Phastsystem*TM, obteniendo bandas específicas en geles de poliacrilamida con un gradiente de pH de 3-9.

En general puede afirmarse que el isoelectroenfoque es la técnica electroforética más utilizada en la diferenciación de especies de pescado, sobre todo cuando se analizan productos sometidos a algún tratamiento tecnológico que pueda desnaturalizar las proteínas. No obstante, conviene tener en cuenta que para su realización es preciso disponer del equipo instrumental adecuado y que los reactivos y aparatos que se utilizan son caros.

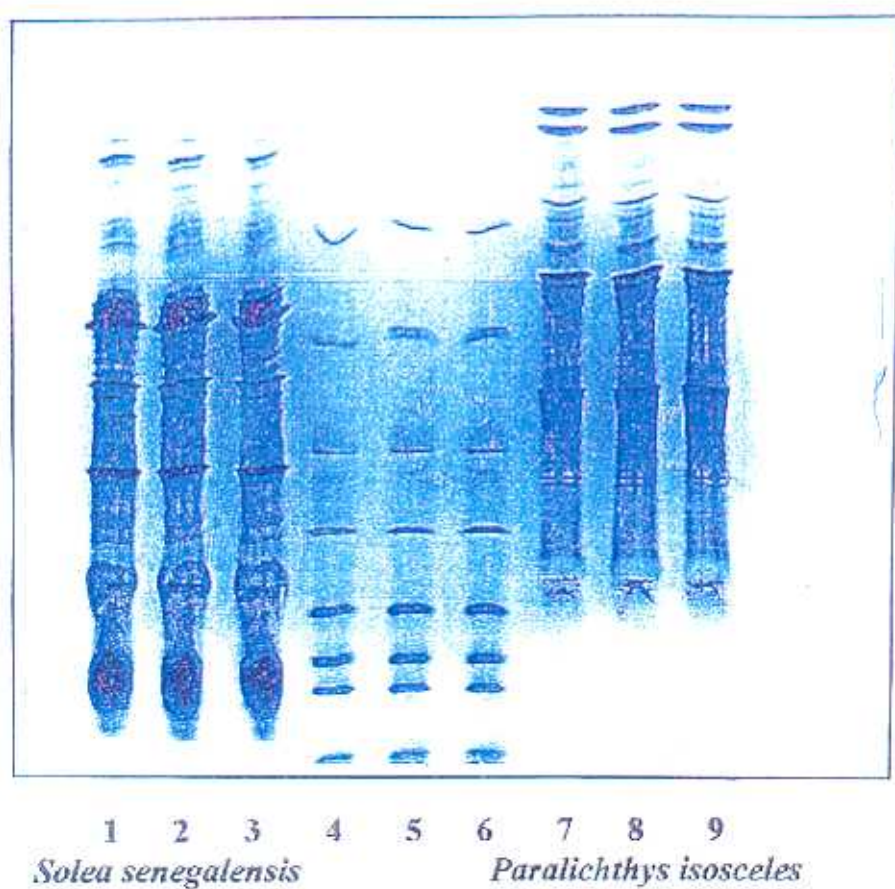


Figura 3. Perfil electroforético de las proteínas solubles de *Solea senegalensis* (1, 2 y 3) y *Paralichthys isosceles* (7, 8 y 9) obtenido mediante la técnica de isoelectroenfoque. Patrón de pl conocidos (4, 5 y 6) (González y col., 1997).

II.3.1.1.3. *Electroforesis en gradiente de gel*

La electroforesis en gradiente de gel es una técnica que utiliza geles que contienen un gradiente de concentración de poliacrilamida, en los cuales las moléculas cargadas se separan esencialmente por el tamaño. El gel actúa como una criba molecular. Esta técnica fue aplicada por Manus y Wrigley (1985), para identificar filetes de pescado de 42 especies distintas (sardina, trucha arco iris, etc.). Los mejores resultados se obtuvieron con gradientes del 3-40%.

II.3.1.1.4. *Electroforesis capilar*

La electroforesis capilar es una técnica que ha experimentado un rápido desarrollo desde los años 80, debido a que permite analizar simultáneamente moléculas de distinta naturaleza química (vitaminas, azúcares, aminoácidos, péptidos, proteínas, polifenoles, etc.) presentes en una misma muestra. En los alimentos, prácticamente todos sus componentes, a excepción de los lípidos, se pueden analizar por electroforesis capilar (Cancalon, 1995a, 1995b). Esta técnica utiliza como soporte un capilar de sílice fundido de 50-250 μm de diámetro que se rellena con un tampón y se somete a un campo eléctrico de hasta 30 KV. Bajo estas condiciones, los cationes de la muestra migran hacia el cátodo en función de su relación carga/masa. Además, debido a la presencia de grupos ionizados en la superficie del capilar se genera un flujo electroosmótico (EOF), es decir, un desplazamiento del tampón de relleno hacia el cátodo. Como resultado se produce un pico de moléculas neutras que migran transportadas por el EOF, mientras que cada molécula negativa se mueve hacia el cátodo a una velocidad determinada por la diferencia entre el flujo electroosmótico y su atracción anódica.

La ventaja de este método con respecto a las otras técnicas de análisis es que permite detectar y cuantificar simultáneamente diferentes moléculas ya que el equipo está dotado de un sistema que elimina el tampón de relleno de la columna y lo reemplaza por otro de forma automática, permitiendo analizar los diferentes componentes de una muestra sin necesidad de incrementar el número de manipulaciones. Otras ventajas de este método son la rapidez del análisis, que puede efectuarse en menos de 10 minutos, aunque se ha

establecido un tiempo medio de 20 minutos (sólo se requieren intervalos de 3 minutos para el lavado y reequilibrado de la columna, entre dos análisis consecutivos) y el pequeño volumen de tampón requerido. A pesar de que inicialmente a esta técnica se le atribuía falta de sensibilidad, este problema se está subsanando en la actualidad mediante la introducción de mejoras en los sistemas de detección.

LeBlanc y col. (1994), utilizaron una técnica de electroforesis capilar para obtener perfiles específicos de especie a partir de proteínas sarcoplásmicas de tres especies de bacalao (*Gadus morhua*, *Ophiodon elongatus* y *Gadus macrocephalus*) y del abadejo del norte (*Pollachius virens*). El tiempo necesario para la separación de las proteínas fue de 9 minutos a un pH óptimo de 7,4 y utilizando un tampón de elevada fuerza iónica (Figura 4).

Gallardo y col. (1995), consiguieron identificar ocho especies de pescados planos utilizando electroforesis capilar. Los extractos acuosos de las distintas muestras, que contienen las proteínas sarcoplásmicas, se separaban bajo la acción de un campo eléctrico y eran detectadas por luz UV en menos de 35 minutos. Los perfiles de las proteínas resultaron ser específicos para cada especie.

II.3.1.2. Métodos Cromatográficos

En los últimos años se han publicado diversos trabajos que proponen la identificación de especies de pescado mediante el análisis cromatográfico de sus proteínas. La técnica más empleada es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando columnas de fase reversa para la separación de proteínas solubles, seguida de la detección con luz ultravioleta de los picos eluidos.

La técnica de HPLC en fase reversa separa las moléculas en función de su hidrofobicidad y es especialmente adecuada para el análisis de proteínas de bajo peso molecular (< 50 KDa), péptidos, aminoácidos y otros compuestos orgánicos de pequeño tamaño.

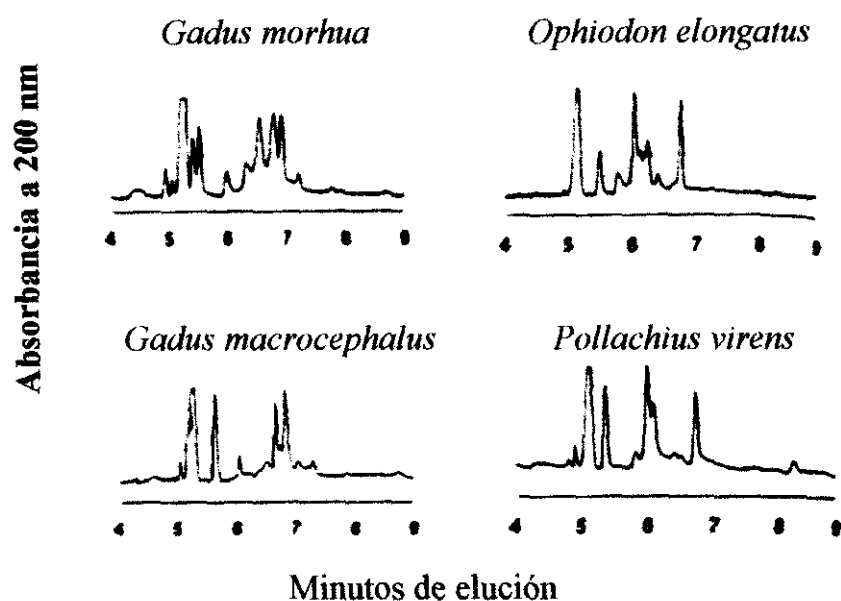


Figura 4. Electroferogramas de los perfiles de proteínas sarcoplásmicas de bacalao fresco (*Gadus morhua*, *Ophiodon elongatus*, *Gadus macrocephalus*) y abadejo del norte (*Pollachius virens*), obtenidos mediante la técnica de electroforesis capilar (LeBlanc y col., 1994).

Osman y col. (1987), aplicaron esta técnica para identificar muestras pertenecientes a 31 especies de pescado crudo, congelado y tratado por calor, entre las que se encuentran la trucha arco iris, la caballa, la carpa, el bacalao o el pez espada, entre otros. Con las muestras de pescado fresco y congelado consiguieron los mismos perfiles específicos para cada especie. Sin embargo, las mismas muestras de pescado sometidas a diferentes tratamientos térmicos (100°C ó 121°C durante 5 o 15 minutos) dieron lugar a cromatogramas significativamente diferentes de los de las muestras de pescado frescas o congeladas, por lo que esta técnica no resulta adecuada para la identificación de muestras de pescado tratadas por calor.

La técnica de HPLC en fase reversa fue utilizada por Armstrong y col. (1992), para la identificación de 15 especies de pescado. Los resultados obtenidos son aplicables para la identificación de muestras crudas, tratadas con radiaciones ionizantes, o desecadas a vacío a temperatura ambiente.

II.3.1.3. Métodos Inmunológicos

Las técnicas inmunológicas consisten en la visualización objetiva de la reacción que tiene lugar entre un antígeno y su correspondiente anticuerpo. La aplicación de estas técnicas a la detección de plaguicidas, microorganismos, toxinas y otros componentes de los alimentos, está adquiriendo cada día mayor importancia debido a las ventajas que aportan frente a los métodos convencionales. Su sensibilidad, especificidad, rapidez y bajo coste las hacen especialmente útiles para el análisis de los alimentos (Samarajeewa y col., 1991).

Las técnicas inmunológicas se diferencian de otras técnicas analíticas en que la alta tecnología reside en las moléculas reactivas (anticuerpos) en lugar de en su soporte instrumental. Las principales ventajas con respecto a técnicas instrumentales, como las cromatográficas y las electroforéticas, incluyen la utilización de cantidades mínimas de muestra, el reducido tiempo de análisis y la utilización de instrumental poco complejo.

Existen en el mercado y en la bibliografía numerosas aplicaciones de las técnicas inmunológicas para la identificación y cuantificación de especies

animales en mezclas cárnicas y en productos lácteos, así como para la detección de proteínas vegetales en alimentos de origen animal (Hernández y col., 1994). Sin embargo, las aplicaciones de las técnicas inmunológicas a la identificación de especies de pescado son más reducidas, quizás debido al elevado número de especies que se comercializan y a su estrecha relación filogenética en algunos casos.

Los métodos inmunológicos que se han aplicado a la identificación de especies en productos pesqueros incluyen las técnicas de inmunodifusión en geles de agar, inmunolectroforesis, técnicas inmunoenzimáticas e *immunodotting*.

II.3.1.3.1. *Inmunodifusión doble en geles de agar*

En esta técnica, el antígeno y el anticuerpo se depositan en los pocillos cortados en un gel de agar y difunden el uno hacia el otro a través del gel. Si existe correspondencia entre ellos, forman complejos antígeno-anticuerpo que precipitan, formando una línea opaca en la región donde se encuentran.

Oberst y col. (1996), utilizaron anticuerpos policlonales frente a parvoalbúminas de *Tilapia guineensis* para diferenciar por la técnica de inmunodifusión doble en geles de agar y otras técnicas inmunológicas, tres especies de *Tilapia* (*Tilapia guineensis*, *Tilapia dageti* y *Tilapia zilli*). A pesar de que el inmunosuero producía bandas de precipitación frente a los extractos proteicos de las tres especies, las bandas producidas se situaban en posiciones distintas según la especie de *Tilapia*, lo que indica que los anticuerpos reaccionaban con determinantes antigénicos diferentes en cada especie analizada.

Domínguez y col. (1997), utilizaron la técnica de inmunodifusión doble para diferenciar filetes frescos de halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) y lenguado (*Solea solea*). Los anticuerpos policlonales obtenidos por inmunización de conejos con proteínas solubles del halibut, presentaban reacciones cruzadas con el extracto proteico del lenguado. Para conseguir anticuerpos específicos de especie, los anticuerpos responsables de las reacciones cruzadas se eliminaron por inmunoabsorción con un polímero

insoluble de proteínas de lenguado. La inmunoadsorción consiguió reducir las reacciones cruzadas, pero también disminuyó el título del suero.

II.3.1.3.2. *Inmunoelectroforesis*

Esta técnica consiste en separar electroforéticamente en un gel de agarosa o de acrilamida proteínas presentes en una mezcla compleja. Posteriormente se corta longitudinalmente en el gel un canal donde se añade el anticuerpo. La difusión del antígeno y el anticuerpo da lugar a la formación de tantos arcos de precipitación como reacciones antígeno-anticuerpo distintas se produzcan.

En 1996, Oberst y col., utilizaron la inmunoelectroforesis para diferenciar tres especies de *Tilapia* (*T. dageti*, *T. guineensis* y *T. zillii*). Los resultados obtenidos por inmunoelectroforesis fueron similares a los descritos en la técnica de inmunodifusión doble, produciendo bandas específicas para cada especie analizada. El suero obtenido frente a parvoalbúminas de *Tilapia guineensis* reaccionaba con las proteínas de las demás especies, aunque no se observaron las mismas bandas en geles de agarosa que en los de poliacrilamida. Es decir, parvoalbúminas con propiedades antigénicas comunes tenían diferente comportamiento electroforético.

II.3.1.3.3. *Técnicas inmunoenzimáticas ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)*

Las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA), constituyen en la actualidad las técnicas inmunológicas más ampliamente utilizadas. Estas técnicas emplean marcadores enzimáticos para la detección y amplificación de las reacciones antígeno-anticuerpo. Las técnicas de conjugación para marcar los antígenos y los anticuerpos con una enzima deben permitir mantener la actividad tanto de la enzima como del anticuerpo o antígeno conjugados. La degradación por la enzima de un sustrato adecuado produce una reacción colorimétrica que permite cuantificar las reacciones antígeno-anticuerpo.

El empleo de enzimas como sustancias marcadoras en los inmunoensayos fue introducido por Engvall y Perlmann (1971). Las enzimas presentan ciertas ventajas con respecto a otras sustancias marcadoras, como

son su disponibilidad en formas altamente purificadas, sencillez de manejo, estabilidad a lo largo del tiempo, bajo coste y facilidad de acoplamiento a las proteínas. Las enzimas que se utilizan con mayor frecuencia en las técnicas inmunoenzimáticas son la peroxidasa de rábano y la fosfatasa alcalina. Los sustratos solubles más comunes para la peroxidasa son: la *o*-fenilendiamina (OPD), el ácido sulfónico de la 2,2'-azino bis-(3 etil-benzotiazolina) (ABTS) y la tetrametilbenzidina (TMB). El sustrato soluble más usado para la fosfatasa alcalina es el *p*-nitrofenil fosfato (*p*NPP).

En las técnicas de ELISA, uno de los dos elementos de la reacción inmunológica (antígeno o anticuerpo), se une por enlaces hidrofóbicos o enlaces covalentes a una fase sólida (poliestireno, polivinilo, nylon, vidrio, nitrocelulosa, sílice, poliacrilamida o agarosa). Cuando se emplea agarosa o poliacrilamida como fase sólida, la separación entre los complejos antígeno-anticuerpo y los antígenos y anticuerpos libres, se realiza por filtración o centrifugación. Cuando la fase sólida es una membrana de nitrocelulosa o nylon hablamos del *immunodotting*. El formato de fase sólida que se ha empleado con mayor frecuencia es una placa de poliestireno de 96 pocillos. En este caso, la separación entre los complejos antígeno-anticuerpo y los antígenos y anticuerpos libres se realiza por lavados sucesivos.

Diversos factores determinan el formato de ELISA más apropiado para el desarrollo de una aplicación específica. Estos incluyen: la muestra objeto del análisis (tipo y cantidad), el tiempo disponible para efectuar cada determinación, el grado de exactitud requerido y los medios materiales y humanos disponibles (infraestructura, equipos de análisis y especialización de los técnicos).

Los formatos de ELISA pueden ser competitivos, cuando se utilizan cantidades limitadas de antígeno o anticuerpo, o no competitivos, cuando los anticuerpos o los antígenos se incorporan en exceso (Gosling, 1990). Los formatos de ELISA más utilizados son el ELISA indirecto, el ELISA competitivo y el ELISA sandwich.

La técnica del *immunodotting* es una técnica inmunoenzimática cualitativa que utiliza como soporte una membrana, generalmente de

nitrocelulosa. Los extractos antigénicos que se desean analizar se depositan en la membrana en forma de gota y, tras un período de incubación y un lavado para eliminar el exceso de antígeno, se añade el suero específico. A continuación, se lava la membrana para eliminar los anticuerpos no unidos a los antígenos y se incorpora un segundo anticuerpo que reconoce como antígeno al anterior y que está conjugado con una enzima. Cuando se añade el sustrato, que en este caso debe producir un precipitado de color al ser degradado por la enzima, se aprecia una mancha coloreada en los lugares en que se ha producido la reacción antígeno-anticuerpo.

En los últimos años se han publicado varios trabajos que utilizan las técnicas inmunoenzimáticas para la identificación de especies en productos de la pesca y sus derivados, aunque su número es muy inferior a los que se refieren a productos cárnicos y lácteos (Hernández y col., 1994; Anguita y col., 1997; Haza y col., 1997). En algunos casos se utilizan anticuerpos policlonales obtenidos frente a proteínas solubles en estado nativo o desnaturalizadas por calor, mientras que en otros casos se utilizan anticuerpos monoclonales frente a proteínas específicas.

Lundstrom (1984), utilizó anticuerpos monoclonales frente a las proteínas solubles extraídas de pescados tratados por calor. Sin embargo, los anticuerpos obtenidos mostraban reacciones cruzadas con numerosas especies de pescado.

An y col. (1990), obtuvieron anticuerpos monoclonales frente a una proteína termoestable específica del langostino de roca (*Sicyonia brevirostris*) denominada proteína M. Utilizando estos anticuerpos y las técnicas de ELISA e *immunodotting* diferenciaron el langostino de roca de otros 23 productos entre los que se incluían carnes, pescados y mariscos frescos y desnaturalizados por el calor. La técnica de ELISA desarrollada permitió detectar hasta 4,3 ng de las proteínas del langostino de roca en mezclas con productos marinos y cárnicos. Verrez-Bagnis y Escriche-Roberto (1993), abordaron la detección de carne de cangrejo (*Chionoecetes opilio*) en derivados del surimi. Estas investigadoras obtuvieron anticuerpos policlonales utilizando como inmunógeno una proteína comercial purificada, la arginina quinasa de la

langosta, que se encuentra en los tejidos de los invertebrados y no en los vertebrados. Los anticuerpos obtenidos reconocían a las muestras de carne de cangrejo; sin embargo dieron una respuesta muy débil frente a los extractos de moluscos analizados (vieira, *Pecten maximus*; calamar, *Omastrephes sagittatus* y lapa, *Patella vulgata*). Al analizar muestras de surimi que no contenían cangrejo, obtuvieron resultados negativos, mientras que en preparaciones de surimi suplementadas con carne de cangrejo existía una correlación entre la cantidad de cangrejo añadido y el nivel de respuesta inmunológica obtenido. La sensibilidad de las técnicas de ELISA indirecto y de *immumodotting* desarrolladas en dicho trabajo permitía detectar de 10-25 g de carne de cangrejo por kilogramo de producto, incluso después de un proceso de esterilización térmica.

La utilización de proteínas específicas como inmunógeno para la obtención de anticuerpos monoclonales fue utilizada por Huang y col. (1995), para identificar especies del género *Lutjanus* en mezclas con otros pescados, mariscos y carnes. Estos investigadores obtuvieron dos anticuerpos monoclonales frente a la proteína α de *Lutjanus campechanus*. El anticuerpo C1C1 mostró reacciones cruzadas con otras especies del género *Lutjanus* pero no frente a otros géneros, por lo que se utilizó para desarrollar técnicas de ELISA e *immunodotting* para diferenciar este género de otras 36 especies de peces y de animales de abasto. El otro anticuerpo monoclonal, C2A2, no presentó reactividad cruzada con el resto de las especies de *Lutjanus* y se utilizó para diferenciar *Lutjanus campechanus* de las otras cuatro especies del género analizadas.

Taylor y col. (1994a), trataron de identificar mediante técnicas de ELISA indirecto y competitivo varias especies de pescado en productos enlatados. En este estudio obtuvieron anticuerpos policlonales frente a extractos de proteínas solubles de sardinas (*Clupea pilchardus*) enlatadas, para diferenciarlas de otras especies como el arenque (*Clupea harengus*) o la caballa (*Scomber scombrus*). Las reacciones cruzadas de los inmunoseros con otras especies se redujeron considerablemente mediante inmunoabsorción de los anticuerpos con extractos antigénicos de las especies de interés. Sin

embargo, estos investigadores no consiguieron diferenciar el bonito de varias especies de túnidos, debido a que las reacciones cruzadas de los inmunosueros obtenidos eran demasiado intensas y no se eliminaban por inmunoabsorción.

Domínguez y col. (1997), aplicaron la técnica de *immunodotting* para detectar la sustitución de halibut por filetes de lenguado y para diferenciar entre bacalao ahumado y anguila ahumada (*Anguilla anguilla*). Para ello, utilizaron inmunosueros obtenidos frente a proteínas hidrosolubles de halibut crudo y de bacalao ahumado. El inmunosuero frente a las proteínas del bacalao no mostró reacciones cruzadas con las proteínas de la anguila. Por el contrario, el inmunosuero obtenido frente a las proteínas del halibut reconocía también a las proteínas de lenguado. Las reacciones cruzadas se eliminaron mediante adsorción del inmunosuero anti-halibut con proteínas de lenguado.

II.3.2. MÉTODOS GENÉTICOS

El avance experimentado en las últimas décadas por las técnicas de biología molecular ha permitido analizar las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos de diferentes organismos e identificar marcadores genéticos que permitieran estudiar la evolución y las migraciones de determinadas especies marinas. El diseño de estos marcadores genéticos se ha basado en el análisis del ADN, primero en el mitocondrial (ADNmt) y posteriormente en el nuclear (ADNn). Algunas de las principales ventajas de la utilización de marcadores genéticos en la identificación de especies son:

- La cantidad de muestra requerida para el análisis es mínima. Para obtener una cantidad suficiente de ADN de elevado peso molecular se necesitan aproximadamente 100 mg de tejido (hígado, músculo esquelético, sangre, etc.), cantidad pequeña si la comparamos con la necesaria para extraer proteínas.
- El ADN es el mismo en todas las células de un organismo, mientras que las proteínas pueden variar de una muestra a otra.
- Existen numerosos marcadores genéticos potenciales.

- Se pueden identificar mutaciones que no conllevan cambios en la movilidad electroforética de las proteínas y que, en consecuencia, no podrían ponerse de manifiesto mediante el análisis electroforético de las mismas.
- El ADN es una molécula muy estable, hasta el punto de que se pueden extraer fragmentos específicos de especie a partir de muestras de tejidos de animales desaparecidos, procedentes de museos (Pääbo y col., 1988, 1989).

La información genética disponible sobre los organismos acuáticos es muy escasa si se compara con la contenida en las bases de datos sobre el hombre u otros animales superiores. Sin embargo, en el caso de peces como el atún (*Thunnus thynnus*) o el salmón se dispone de abundante información, debido a su interés filogenético y comercial (Bartlett y Davidson, 1991, 1992; Block y col., 1993; Carnegie, 1994; Russell y Carnegie, 1994; Chow y Ushiyama, 1995; Alvarado Bremer y col., 1997; Mjølnerød y col., 1997; Hansen y Mensberg, 1998; Quinteiro y col., 1998; Pérez y col., 1999).

El genoma mitocondrial

El ADN mitocondrial (ADNmt) presenta varias diferencias con el ADN nuclear (ADNn) que resultan interesantes para el estudio de la evolución de las especies. Algunas de sus características más relevantes son:

- Es mucho más pequeño que el ADN nuclear (aproximadamente cinco órdenes de magnitud).
- Evoluciona más rápidamente.
- Cada célula contiene muchas copias del ADNmt (frente a una o dos copias del ADNn).
- No contiene intrones.
- El ADNmt animal es haploide y no recombinante (Horak y col., 1974). Su transmisión a la descendencia se realiza exclusivamente por vía materna, por lo que en cada célula se encuentra un único tipo de ADN mitocondrial,

aunque existen casos de heteroplasma (presencia de más de un tipo de ADNmt en una célula) (Hoeh y col., 1991).

El genoma mitocondrial de los animales consiste en una molécula de ADN pequeña, de doble cadena y circular (excepto en *Hydra* y en *Paramecium* que es lineal) de la que se encuentran múltiples copias en cada mitocondria. El tamaño del genoma mitocondrial animal es de aproximadamente 16.500 ± 500 pares de bases (pb), y aunque su tamaño no sigue una distribución filogenética determinada, suele ser algo menor en los vertebrados (Brown, 1985). Por el momento son escasos los animales de los que se ha secuenciado el ADN mitocondrial completo. De ellos, el genoma mitocondrial de mayor tamaño que se ha encontrado es el de la vieira, *Pecten maximus* ($> 39,3$ Kpb) que además presenta gran variabilidad intraespecífica. En los peces, las diferencias en el tamaño dentro de una misma especie pueden ser tan grandes como entre especies distintas (Moritz y col., 1987).

El ADN mitocondrial de los animales comprende 13 genes que codifican proteínas, 2 genes que codifican ARNs ribosómicos (los genes 12S y 16S ARNr), 22 genes que codifican ARNs de transferencia y una región que no codifica proteínas, denominada región control en los vertebrados, en la que se encuentran los lugares de iniciación para la replicación del ADNmt y para la transcripción del ARN (Figura 5).

Los genes mitocondriales codifican enzimas que intervienen en la cadena transportadora de electrones. Se incluyen siete subunidades de NADH deshidrogenasa (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6), el citocromo *b*, tres subunidades de la citocromo oxidasa (CO I, II, III) y dos subunidades de la ATP sintetasa (ATPasa 6 y 8), aunque en algunas ocasiones el gen ATPasa 8 no está presente. El resto de las proteínas necesarias para el funcionamiento bioquímico de la mitocondria proceden del citoplasma celular. Aparentemente, el genoma mitocondrial actual es el resultado de una simplificación del ADN mitocondrial primitivo, más complejo, a partir del cual se ha producido una transferencia progresiva de genes al núcleo celular.

Las dos cadenas del genoma mitocondrial se denominan “L” (ligera) y “H” (pesada). Estos nombres se deben a las marcadas diferencias existentes en

el contenido de G+T de las dos hebras del ADNmt de los vertebrados, que determinan un comportamiento diferente de ambas cadenas en los gradientes de CsCl₂. De los 37 genes estructurales que comprende el ADNmt de los vertebrados, sólo la proteína ND 6 y ocho ARNt, están codificados por la cadena ligera, mientras que el resto se codifican en la cadena pesada.

Inicialmente se pensó que el ADNmt era una molécula muy conservada, puesto que codifica proteínas que desempeñan funciones cruciales en el metabolismo celular. Sin embargo, se ha comprobado que la evolución en el ADNmt es mucho más rápida que en el nuclear. La divergencia en posiciones silentes de los genes mitocondriales que codifican proteínas es de aproximadamente un 10% cada millón de años, diez veces más que en los genes nucleares que codifican proteínas. La tasa media de evolución del ADNmt completo es de 0,5-1% cada millón de años. La tasa de sustituciones silentes, principalmente transiciones (cambios de una purina por otra o de una pirimidina por otra) es de 4-6 veces mayor que la de sustituciones que determinan cambios de aminoácidos. Sin embargo, si en las especies estrechamente relacionadas sólo se tienen en cuenta las transversiones (cambios de una purina por pirimidina o viceversa) ignorando las transiciones, la tasa de evolución del ADNmt es similar a la del nuclear. No todos los genes mitocondriales acumulan mutaciones con la misma velocidad. Genes que codifican proteínas, como COI, II, III y citocromo *b* evolucionan más lentamente y en ellos las transiciones son mucho más frecuentes que las transversiones. En los genes que codifican proteínas son muy poco frecuentes las deleciones y adiciones de nucleótidos, que abundan más en la región de control y en los espacios intergénicos, aunque también se encuentran en los genes que codifican los ARN de transferencia y ARN ribosómicos.

Conviene señalar que el código genético mitocondrial es más degenerado que el código genético universal del núcleo de las células eucariotas. Además, el código genético mitocondrial no es idéntico en todas las especies sino que existen ligeras diferencias entre vertebrados, equinodermos y *Drosophila*, por ejemplo. Las diferencias más notables entre los códigos genéticos mitocondrial y nuclear de los vertebrados, incluyen la utilización del codón TGA como triptófano en lugar de ser codón de terminación y la utilización de ATA como metionina en lugar de isoleucina

(Meyer, 1993). Asimismo, es frecuente que algunos genes mitocondriales carezcan de un codón de terminación completo (por ejemplo TAA) y terminan simplemente en T o en TA. Este código genético simplificado requiere la presencia de un número menor de tipos de ARNt. De hecho, normalmente se suelen encontrar sólo 22 tipos de ARNt en la mitocondria en lugar de los 24 que serían precisos, lo cual puede deberse a que los codones AGA/G no se utilizan como arginina sino como codones de terminación en los mamíferos y en los anfibios.

La secuencia más completa de ADN mitocondrial de peces de que se dispone es del bacalao (Johansen y col., 1990) y de la trucha arco iris (número de acceso L29771, Genbank). El orden en que se encuentran los genes del ADNmt del bacalao coincide con el de los demás vertebrados. De forma similar sucede en el salmón atlántico, como comprobaron Davidson y col. (1989), que construyeron un mapa de su ADN mitocondrial mediante el análisis de los fragmentos obtenidos con enzimas de restricción. Conclusiones similares se pueden extraer de los estudios de restricción y secuenciación parcial realizados en carpas (Araya y col., 1984) y en especies de *Oncorhynchus* (Thomas y Beckenbach, 1989). Estos y otros estudios hacen pensar que la estructura del genoma mitocondrial de los peces no difiere de la estructura consenso de los vertebrados (Araya y col., 1984; Moritz y col., 1987).

El orden de los genes mitocondriales varía ligeramente entre los vertebrados, aunque las diferencias más comunes se deben a transposiciones de los genes que codifican los ARNt. La distribución de los genes ARNt entre los genes que codifican proteínas sugiere que su estructura secundaria actúa como si fueran signos de puntuación durante la transcripción. De hecho, cuando dos genes que codifican proteínas son contiguos y no separados por ARNt (como ocurre entre los genes ATPasa 6 – COIII), en la zona de unión de ambos genes existe una región que puede formar una estructura secundaria estable de horquilla, similar a la estructura secundaria de bucles que posee el ARNt (Thomas y Beckenbach, 1989).

Métodos para el análisis del ADN

Son dos las principales estrategias que se pueden seguir para la caracterización e identificación del ADN. Una posibilidad es la hibridación del ADN aislado con sondas de ADN que incluyen secuencias diana específicas de la especie objeto de estudio. Los métodos de amplificación enzimáticos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), también están basados en la hibridación del ADN con sondas específicas, aunque se diferencian de los primeros en que se utiliza más de una sonda y en que permiten mejorar la especificidad y sensibilidad de los ensayos.

El análisis de los fragmentos de ADN amplificados o no, se puede completar con la secuenciación de la cadena de nucleótidos y su comparación con las secuencias disponibles en las bases de datos para comprobar su identidad. Este método es caro y laborioso. Para ello se suelen utilizar genes que codifican proteínas, aunque sólo el 1% del genoma de los mamíferos cumple este requisito.

El análisis de regiones del ADN que no codifican proteínas ofrece otras posibilidades, como la identificación de elementos repetitivos específicos o el estudio del polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPD), que están experimentando un gran auge en los últimos años (Williams y col., 1990; O'Reilly y Wrigth, 1995; Bielawski y Pumo, 1997; Goodier y Davidson, 1998; Koh y col., 1998; Naish y Skibinski, 1998).

II.3.2.1. Estudios de hibridación

Existen varias formas de analizar las diferencias entre las secuencias de nucleótidos de varias especies. Una de ellas se basa en el principio de la **hibridación**, donde una secuencia predeterminada se utiliza como sonda para encontrar la misma secuencia en muestras problema.

Una sonda de ADN es una secuencia corta de nucleótidos que se une a regiones complementarias de un blanco o diana, permitiendo localizar una secuencia homóloga de ADN en una muestra compleja. La complementariedad entre los nucleótidos determina la hibridación de una sonda con su ADN específico. Para desarrollar una sonda de ADN es

necesario identificar una secuencia específica de nucleótidos, aislarla, reproducirla y marcarla con un compuesto que permita determinar si ha tenido lugar la hibridación con el ADN diana (Tenover, 1988). Los marcadores más utilizados son los radioisótopos ^{32}P , ^{35}S , ^3H , ^{125}I y ^{14}C , aunque también pueden emplearse enzimas como la peroxidasa de rábano, la fosfatasa alcalina, compuestos fluorescentes, el complejo avidina-biotina o el hapteno digoxigenina (Dovey y Towner, 1989).

Las sondas génicas pueden obtenerse por varios procedimientos:

- Mediante síntesis química de los oligonucleótidos, para lo cual es necesario conocer la secuencia de nucleótidos del ADN del organismo a investigar.
- Extrayendo el ADN de las células y fragmentándolo con enzimas de restricción, para que al menos alguno de ellos contenga la secuencia de bases que le confiera especificidad.

A continuación, y con el fin de reproducir esa secuencia, se insertan los fragmentos en un vector plasmídico que favorezca la clonación y propagación. Después de otro tratamiento con endonucleasas y de la separación de los fragmentos por electroforesis, éstos se marcan en un extremo (marcaje terminal) o a lo largo de toda la cadena con la molécula elegida. La hibridación de la sonda marcada con un ADN problema se pone de manifiesto por auto-radiografía, colorimetría o detección de fluorescencia, dependiendo del compuesto empleado como marcaje (Leighton-Jones, 1991; Wolcott, 1991).

Para la identificación de especies se pueden utilizar como sondas, secuencias de nucleótidos específicas de especie. Sin embargo, lo más sencillo es utilizar como sonda ADN nuclear total de la especie de referencia, marcado con un compuesto adecuado (radioactivo o no). El ADN de las muestras problema, desnaturalizado por calor o por tratamiento alcalino, se fija a una membrana de nylon y se incuba con la sonda. La sonda marcada se unirá solamente al ADN de las muestras problema que reconozca como complementario. Esta técnica, denominada *dot blot*, se ha utilizado para la

identificación de carnes de cerdo, vacuno, cabra, oveja y pollo, tanto crudas como sometidas a tratamiento térmico (Chikuni y col., 1990; Winterø y col., 1990; Ebbehøj y Thomsen, 1991a, 1991b). Sin embargo, la presencia de reacciones cruzadas de las sondas con el ADN de especies muy cercanas filogenéticamente (como ocurre entre los rumiantes), puede limitar la aplicación de esta técnica. Cuando no se producen reacciones cruzadas, los límites de detección pueden llegar al 0,1% de la especie analizada en mezclas con otras especies, aunque por lo general no es posible la cuantificación. Una de las ventajas de esta técnica es que es muy sencilla y no requiere el conocimiento de ninguna secuencia en particular de la especie analizada.

Winterø y col. (1990), compararon cuatro métodos para detectar carne de cerdo en mezclas de carne cruda de cerdo y vaca: hibridación del ADN (*dot blot*), inmunodifusión, inmunoelectroforesis en contracorriente e isoelectroenfoque. Utilizando la hibridación del ADN genómico total, detectaron hasta el 0,5% de cerdo crudo en mezclas con vaca. La sensibilidad para detectar carne de cerdo fue del 0,4% en la inmunoelectroforesis a contracorriente, del 1% con la inmunodifusión y del 5% con el isoelectroenfoque.

Otra de las técnicas de hibridación con sondas de ADN que se ha utilizado para la identificación de especies y para estudios filogenéticos y de poblaciones es la denominada *southern blot*. Esta técnica se aplica principalmente al estudio del ADN mitocondrial y comprende varias etapas. En primer lugar se aísla el ADNmt de la muestra y se fragmenta utilizando enzimas de restricción. Los fragmentos de ADN obtenidos se separan electroforéticamente en geles de agarosa y a continuación se transfieren a una membrana de nylon. Seguidamente se sumerge la membrana en una solución de hibridación que contiene una sonda de ADNmt específica de la especie objeto de análisis. La sonda hibrida en los lugares de la membrana donde se encuentre su secuencia complementaria, los cuales se visualizan por autoradiografía. La posición de las bandas obtenidas produce perfiles específicos que permiten identificar la especie o población de procedencia de las muestras por comparación con patrones adecuados (Figura 6).

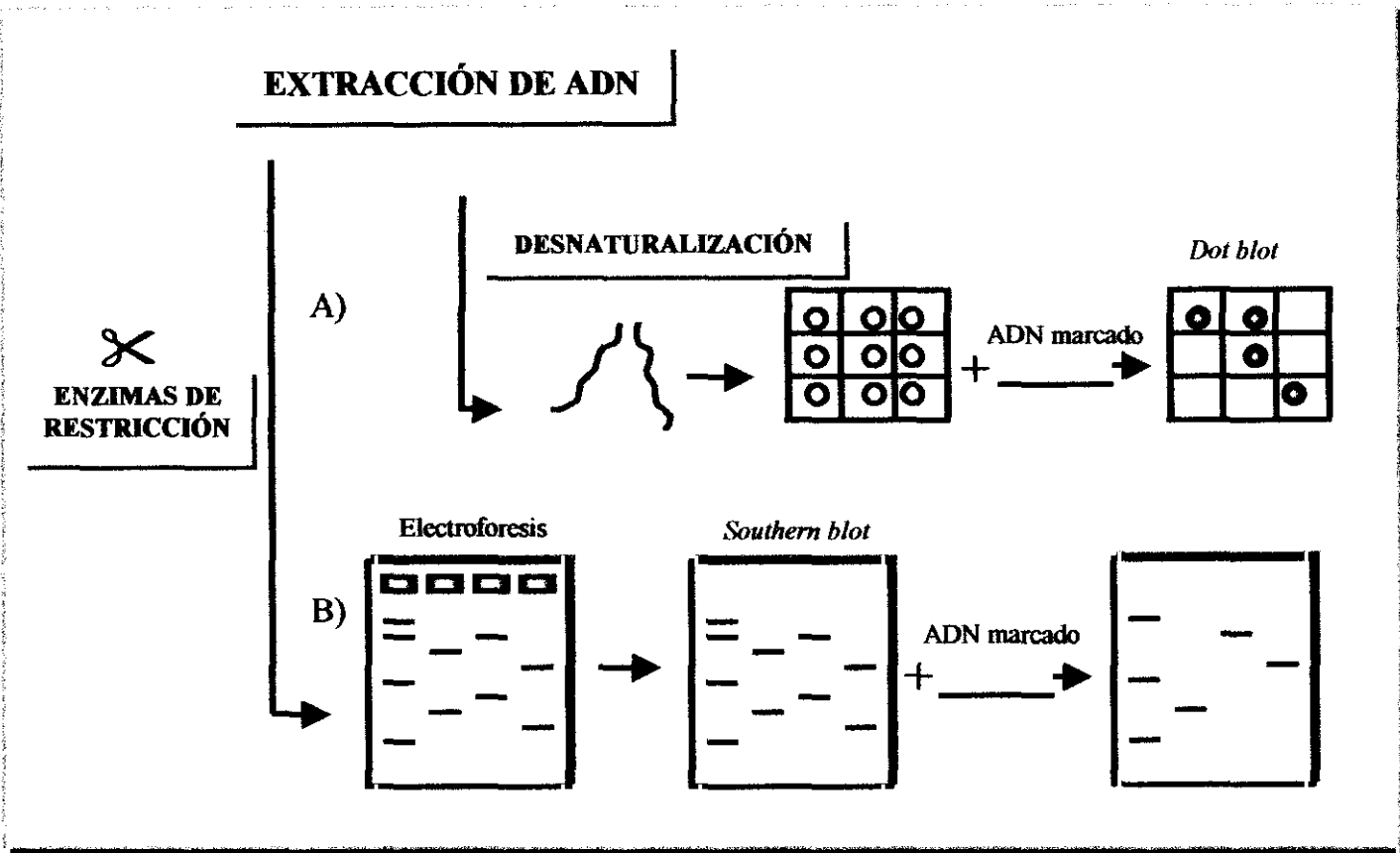


Figura 6. Técnicas de hibridación del ADN. El ADN extraído se puede analizar conforme a dos estrategias diferentes: (A) La técnica de *dot blot* aprovecha las diferencias en el ADN nuclear para diferenciar especies. (B) En la técnica de *southern blot* las enzimas de restricción reconocen y cortan secuencias de la molécula de ADN. Si las secuencias difieren entre las muestras, los fragmentos resultantes difieren en longitud y se separan por electroforesis. Las secuencias específicas de especie se visualizan mediante hibridación de las bandas electroforéticas con sondas de ADN.

Las enzimas de restricción son endonucleasas que cortan enlaces fosfodiéster de secuencias específicas de la molécula de ADN, originando fragmentos de diversos tamaños que se separan por electroforesis. Se conocen más de cien enzimas de restricción, y cada una de ellas reconoce una secuencia de cuatro a ocho nucleótidos de longitud y corta la doble cadena de ADN de una forma determinada. Las enzimas de restricción que cortan las dos cadenas del ADN en la misma posición, como la *Hae* III, producen bordes romos, mientras que las que cortan las dos cadenas de ADN en puntos distintos, como la *Hind* III, originan fragmentos de ADN con extremos cohesivos. El número y posición de los lugares de restricción depende de la secuencia de nucleótidos de la molécula de ADN. Por lo tanto, el número y tamaño de los fragmentos generados reflejan la mayor o menor actividad de las endonucleasas en el genoma celular, y permiten poner de manifiesto mutaciones en determinadas posiciones de la secuencia de nucleótidos. Tales diferencias se conocen como polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) y puede resultar muy útil para diferenciar especies.

El polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del ADN mitocondrial se puede poner de manifiesto utilizando la técnica de *southern blot* o bien, marcando directamente con fósforo radioactivo (^{32}P) los fragmentos de ADN antes de proceder a su separación electroforética. Estas técnicas se han utilizado para estudiar la variabilidad genética de poblaciones de peces de una misma especie en función de su procedencia geográfica. En este sentido, mediante el estudio del RFLP se pueden diferenciar las poblaciones de salmón atlántico europeas de las norteamericanas (Bermingham y col., 1991) y las anadromas de las no anadromas (Palva y col., 1989). También, mediante RFLP se ha estudiado la variabilidad genética de las poblaciones de trucha de río irlandesas (McVeigh y col., 1995) y galesas (Bembo y col., 1994) y de las truchas de lagos canadienses (Grewe y col., 1993; Kornfield y Kircheis, 1994), entre otras especies (Guénette y col., 1993; Vourinen y col., 1993; Wirgin y col., 1993).

II.3.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fue ideada por Kary Mullis a mediados de la década de los ochenta (Saiki y col., 1985) y, al igual que la secuenciación del ADN, ha revolucionado la genética molecular haciendo posible un acercamiento novedoso al estudio y análisis de los genes. Esta técnica permite producir un gran número de copias de una secuencia específica de ADN sin recurrir a la clonación.

La reacción de PCR se basa en la repetición cíclica de tres etapas (Figura 7):

1. Desnaturalización del ADN de doble cadena presente en la muestra para separar las dos cadenas. La desnaturalización se consigue aplicando temperaturas superiores a 90°C.
2. Unión específica de los cebadores (oligonucleótidos sintéticos) a las cadenas sencillas mediante complementariedad de bases. Se deben emplear al menos dos cebadores que, tras unirse cada uno a una cadena diferente, delimiten la secuencia diana que se pretende amplificar. La temperatura a la que se realiza la unión (T_m) es crítica para controlar la especificidad de la reacción y depende, exclusivamente, de la composición de bases de los cebadores. Aunque existen programas informáticos que calculan la temperatura de unión de los cebadores, la fórmula $T_m = [2(A+T) + 4(G+C)] - 5$ está muy difundida en los laboratorios de genética. Cuando los cebadores empleados en una misma reacción poseen T_m diferentes, siempre se aplica la temperatura inferior.
3. Extensión de la cadena de ADN copia a partir de los cebadores mediante la enzima ADN polimerasa. La polimerasa inicia su actividad tras reconocer la unión de los cebadores a las cadenas de ADN de la muestra.

Inicialmente, la polimerasa que se empleaba procedía de *Escherichia coli* (Saiki y col., 1985), pero se desnaturalizaba cuando se sometía a 92°C durante la primera etapa de cada ciclo y, por lo tanto, había que reponerla al inicio de cada fase de extensión, impidiendo la automatización del proceso.

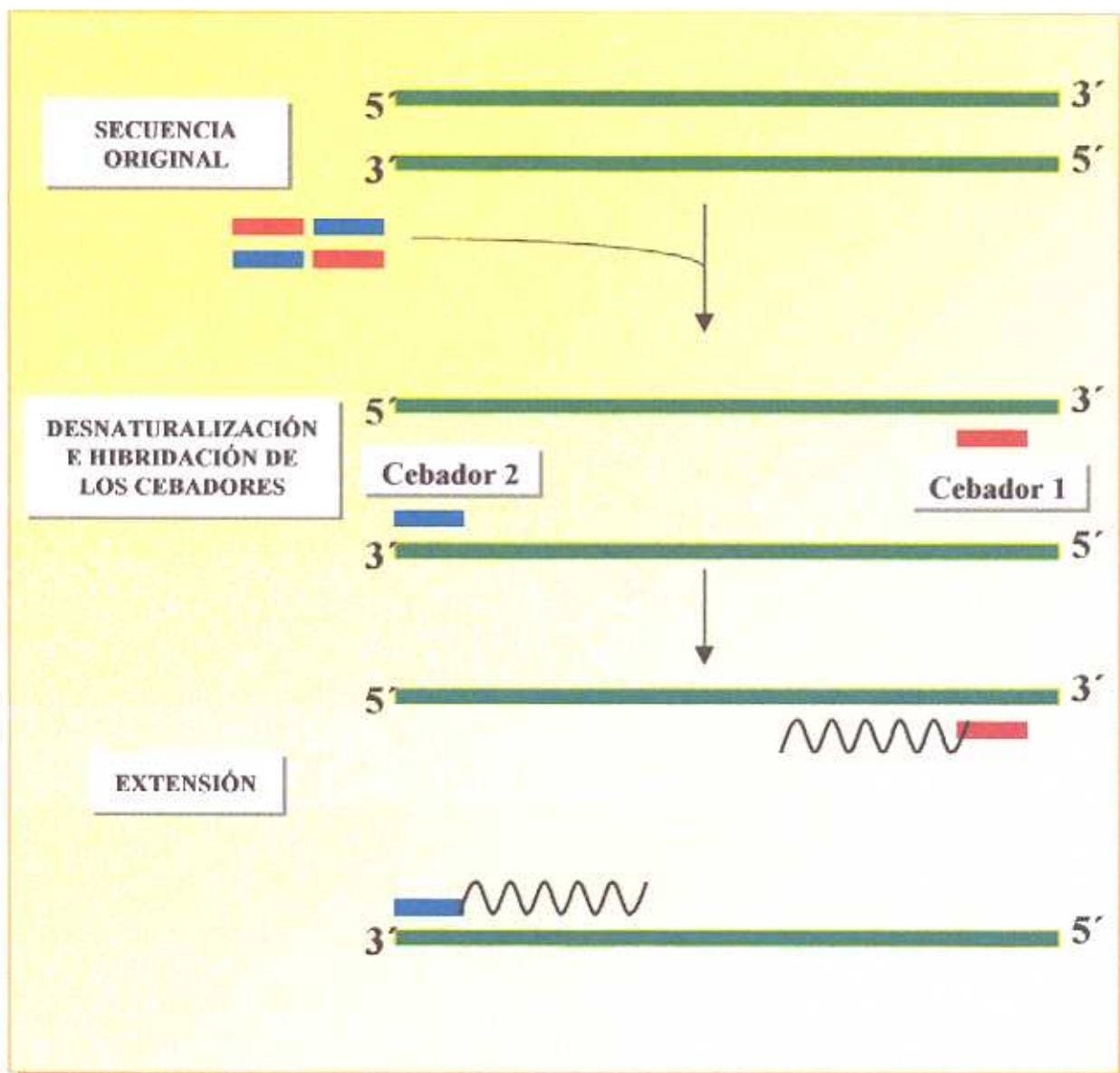


Figura 7. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La introducción de una enzima termoestable, la *Taq* polimerasa (Saiki y col., 1988), junto con el diseño de termocicladores, propiciaron el empleo rutinario de la técnica de PCR en los laboratorios al permitir su completa automatización. La *Taq* polimerasa procede de un microorganismo, *Thermus aquaticus*, cuyo medio natural son las aguas termales y géiseres y, por lo tanto, poseedor de una ADN polimerasa que resiste temperaturas por encima de los 90°C alcanzados durante la fase de desnaturalización. La actividad de la ADN polimerasa requiere la presencia de magnesio, siendo la concentración de este ión un parámetro fundamental para la optimización de la reacción. La temperatura a la que ejerce su acción se sitúa en torno a 72°C. Actualmente existen otras ADN polimerasas termoestables además de la *Taq* polimerasa.

Después de cada ciclo se obtiene como resultado la duplicación de la secuencia de ADN diana delimitada por la pareja de cebadores específicos. Dado que las nuevas copias también sirven como patrones en los ciclos subsiguientes, la cantidad de ADN generado se incrementa exponencialmente. El resultado neto de la reacción en cadena de la polimerasa es que al final de “n” ciclos, la reacción contiene una cantidad teórica de 2^n moléculas de ADN bicatenario que son copia de la secuencia del ADN comprendido entre los cebadores. Un proceso de amplificación de entre 20 y 40 ciclos, amplificará un millón de veces, como mínimo, el número de copias del fragmento de ADN diana que exista en la muestra original. Los fragmentos amplificados se detectan fácilmente mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio. El bromuro de etidio es un compuesto fluorescente que se intercala entre los pares de bases adyacentes del ADN, permitiendo su visualización cuando se ilumina con luz ultravioleta. Cuando los fragmentos esperados son de un tamaño muy pequeño también se pueden emplear geles de poliacrilamida.

Actualmente, además de la técnica de PCR clásica, existen otras modalidades de PCR (PCR anidada, PCR múltiple, RT-PCR), asociaciones de PCR con otras técnicas (PCR-RFLP, PCR-RAPD, PCR-SSCP) y, finalmente, técnicas de amplificación distintas del PCR (LCR, 3SR, Q β). Todas ellas han sido objeto de múltiples revisiones (Wolcott, 1991; Hill, 1996).

Un factor clave para la expansión de las técnicas de PCR ha sido la creciente disponibilidad de cebadores específicos, posibilitada por los avances en las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos, que han permitido conocer las secuencias de un número considerable de genes, y por otra parte, el desarrollo de equipos y reactivos para la síntesis rápida y económica de oligonucleótidos.

Es posible que no conozcamos la secuencia de nucleótidos del gen que nos interesa, pero sí la secuencia de aminoácidos de la proteína que codifica dicho gen. En estos casos se pueden diseñar cebadores que amplifiquen el gen basándonos en el empleo de codones de la especie que estamos estudiando y en posibles homologías con genes similares que hayan sido secuenciados en otras especies. Como es sabido, diferentes codones pueden codificar un mismo aminoácido. Por ello, si al sintetizar un cebador existen dudas sobre la identidad de una base debido a la presencia de un codón ambiguo, dicha base puede ser sustituida por desoxinosina (dI). La dI actúa como un espaciador que tolera cualquier otro nucleótido en la cadena complementaria. Asimismo, se pueden emplear cebadores degenerados; esto es, una mezcla de cebadores que comprenden las distintas combinaciones de bases que pueden ocurrir en las posiciones de los codones ambiguos.

La manipulación de los reactivos empleados en la técnica PCR debe ser extremadamente cuidadosa, ya que si se contaminan con ADN extraño (por ejemplo, procedente de amplificaciones previas) se pueden producir falsos positivos. Para evitarlo, se deben distribuir todos los reactivos en alícuotas, separar en la medida de lo posible la zona de preparación de las muestras de la de procesado, y disponer de un equipo (termociclador, pipetas, etc.) exclusivamente dedicado a esta técnica.

Tras realizar la técnica de PCR y visualizar los resultados, la presencia de amplicones del tamaño esperado se suele considerar la prueba de un resultado positivo. Sin embargo, para tener una certeza absoluta, la identidad del fragmento amplificado debería ser confirmada mediante hibridación con una sonda específica, digestión con enzimas de restricción o secuenciación. En el caso de la identificación de especies, la asociación de la técnica de PCR

con otras técnicas (secuenciación, RFLP, SSCP, etc.) tiene además como objetivo discriminar secuencias de nucleótidos muy semejantes, sobre todo cuando se trata de especies muy relacionadas filogenéticamente (Bossier, 1999).

Las posibilidades de aplicación de la reacción en cadena de polimerasa al análisis de los alimentos no se limitan a la identificación de especies en productos de origen animal. Otras posibles aplicaciones incluyen, por ejemplo, la detección de trigo en alimentos para celíacos (Allmann y col., 1992), detección de microorganismos patógenos (Hill, 1996; Hotzel y col., 1996; Simon y col., 1996; Wang y col., 1997), enumeración de microorganismos alterantes (Earnshaw y Gidley, 1992; Gutiérrez y col., 1997), detección de alimentos e ingredientes alimentarios modificados genéticamente (Du y col., 1992; Padegimas y col., 1993; Meyer, 1995; Gachet y col., 1999), etc. La aplicación rutinaria de estas técnicas se extenderá, con mayor o menor rapidez, dependiendo del desarrollo de métodos sencillos para extraer el ADN del alimento y para eliminar las posibles sustancias inhibitoras presentes en las muestras.

II.3.2.2.1. *Secuenciación de fragmentos de ADN amplificados por PCR*

Mediante la secuenciación de fragmentos de genes específicos se pueden diferenciar especies muy cercanas. El procedimiento consiste en que un fragmento de un gen, por ejemplo el citocromo *b*, se amplifica por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para obtener suficiente ADN y posteriormente se secuencia. Para seleccionar adecuadamente el gen que se debe amplificar conviene tener en cuenta varias premisas: la región del genoma que se va a amplificar debe acumular mutaciones con suficiente rapidez para que organismos estrechamente relacionados tengan diferentes secuencias de nucleótidos, pero con suficiente lentitud para que la variación intraespecífica no sea importante; además, el tamaño del segmento de ADN ha de ser lo bastante largo para detectar diferencias de secuencia entre especies próximas, pero suficientemente corto para poder secuenciarla en un gel estándar de secuenciación. Generalmente conviene seleccionar una región de un gen que codifique una proteína, porque los errores de amplificación y/o

secuenciación pueden detectarse traduciendo la secuencia de nucleótidos y comparándola con la secuencia de aminoácidos conocida del gen.

El análisis de las secuencias obtenidas permite identificar diferencias interespecíficas que permitan distinguir especies filogenéticamente cercanas. La valoración de tales diferencias suele requerir la utilización de programas informáticos complejos. En cualquier caso, la secuenciación es una técnica cara y requiere personal especializado para llevarla a cabo, por lo que en la identificación de especies se buscan técnicas alternativas más baratas y sencillas.

Uno de los genes que se han utilizado con mayor frecuencia para la diferenciación de especies es el gen mitocondrial del citocromo *b*. Actualmente se dispone de la secuencia total o parcial de este gen en numerosas especies animales (Kocher y col., 1989; Irwin y col., 1991), desde insectos hasta la especie humana, pasando por la mayoría de los animales de abasto (Chikuni y col., 1994) y diversas especies de peces (Bartlett y Davidson, 1991; Ram y col., 1996; Árnason y col., 1998; Quinteiro y col., 1998).

La secuencia de aminoácidos del citocromo *b* está muy conservada, pero como los aminoácidos pueden ser codificados por dos o más codones distintos, los genes del citocromo *b* difieren en algunos nucleótidos incluso en especies estrechamente relacionadas. Estudios intra- e interespecíficos muestran que la variación dentro de una especie es menor que entre especies. Por otra parte, Kocher y col. (1989), observaron que un solo par de cebadores permite amplificar un segmento de 309 pb de este gen en la mayoría de los vertebrados.

Además del gen citocromo *b* se han utilizado otros fragmentos del genoma mitocondrial para la diferenciación de especies de pescado, como los genes de los ARN ribosómicos 12S y 16S (DeSalle y Birstein, 1996), subunidades de la NADH deshidrogenasa (Cronin y col., 1991) y la región de control (Nielsen y col., 1994; Alvarado-Bremer y col., 1997).

Si bien la mayoría de los estudios filogenéticos y de diferenciación de especies se han basado en la secuenciación y comparación del ADN mitocondrial, la bibliografía recoge algunos estudios basados en genes nucleares que conviene señalar. Este es el caso de los genes de la hormona del crecimiento (GH), que han servido de base para el estudio de las relaciones filogenéticas y la clasificación de los salmónidos.

Devlin (1993), aisló y secuenció dos tipos de genes de la hormona de crecimiento en el salmón rojo. Estos genes, de aproximadamente 4 kilobases, codifican proteínas de 210 aminoácidos y presentan gran similitud con las hormonas de crecimiento caracterizadas en otros salmónidos, como el salmón atlántico (Johansen y col., 1989) y la trucha arco iris (Agellon y col., 1988). De la comparación de estas secuencias se desprende que la trucha arco iris es más parecida al salmón del Pacífico que al del Atlántico, lo cual explica la reclasificación que se hizo en 1988 de la trucha arco iris desde el género *Salmo* al género *Oncorhynchus*.

En 1996, McKay y col., examinaron las relaciones entre nueve especies de *Oncorhynchus*, el salmón atlántico y la trucha lacustre (*Salvelinus namaycush*), analizando la secuencia de ADN de la subunidad 3 del gen mitocondrial NADH-deshidrogenasa y parte del gen nuclear tipo 2 de la hormona del crecimiento amplificados por PCR. La conclusión de este trabajo fue que el salmón keta y el salmón rosado son especies hermanas, y que el salmón japonés y el salmón amago están más próximos a la trucha del Pacífico que al salmón del Atlántico. Un antepasado común de la trucha arco iris y de la trucha de garganta cortada (*O. clarki*) se separó de la línea proto-*Oncorhynchus* y a partir de él derivaron las siete especies de salmón del Pacífico.

Otro ejemplo de gen nuclear que se puede aplicar para la diferenciación de especies es el gen supresor de tumores *p53*. La proteína codificada por el gen *p53* es muy conservada entre los vertebrados, desde el hombre a los peces (De Fromentel y col. 1992; Mayr y col., 1995). Sin embargo, existen diferencias en la longitud de los intrones de este gen. Esta circunstancia puede utilizarse para identificar especies de peces, como se pone de manifiesto al

comparar las secuencias de dos fragmentos del gen *p53* amplificados a partir del lenguado y de la trucha arco iris (Kusser y col., 1994).

II.3.2.2.2. *Análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones del ADN amplificadas por PCR (PCR-RFLP)*

Aunque la secuenciación de regiones específicas del ADN ha demostrado ser una técnica adecuada para estudios filogenéticos y de poblaciones piscícolas (Carr y Marshall, 1991; Hartley y col., 1992; Lockwood y col., 1993; Nielsen y col., 1994; Baker y col., 1995; Rosel y Block, 1996; Vis y col., 1997), es costosa y laboriosa, lo que la hace inapropiada para el análisis rutinario de los alimentos. Varios investigadores (Chikuni y col., 1994; Meyer y col., 1995; Borgo y col., 1996; Céspedes y col., 1998; Wolf y col., 1999) han comprobado que el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de productos de PCR (PCR-RFLP) es una técnica con gran capacidad discriminatoria para la identificación de especies animales. Con ésta técnica, para identificar una especie no se secuencian los productos de PCR, sino que se digieren con endonucleasas de restricción (Figura 8). Los únicos nucleótidos utilizados en la identificación son los que integran las dianas de restricción de las endonucleasas seleccionadas. Sin embargo, la secuenciación puede ser útil como paso previo para seleccionar enzimas que proporcionen patrones de restricción específicos de especie. La sustitución de una base en la diana de restricción se manifiesta por la diferencia en la longitud de los fragmentos resultantes y su migración electroforética en geles de agarosa.

Los genes sobre los que se ha aplicado la técnica de PCR-RFLP para la diferenciación de especies animales, y de pescado en particular, son prácticamente los mismos que se utilizan con la técnica de PCR-secuenciación, con claro predominio de los genes mitocondriales.

II.3.2.2.3. *Estudio del polimorfismo de conformación de las cadenas sencillas de ADN amplificadas por PCR (PCR-SSCP)*

Uno de los inconvenientes que puede presentar la técnica de PCR-RFLP para la diferenciación de especies en productos procesados es que,

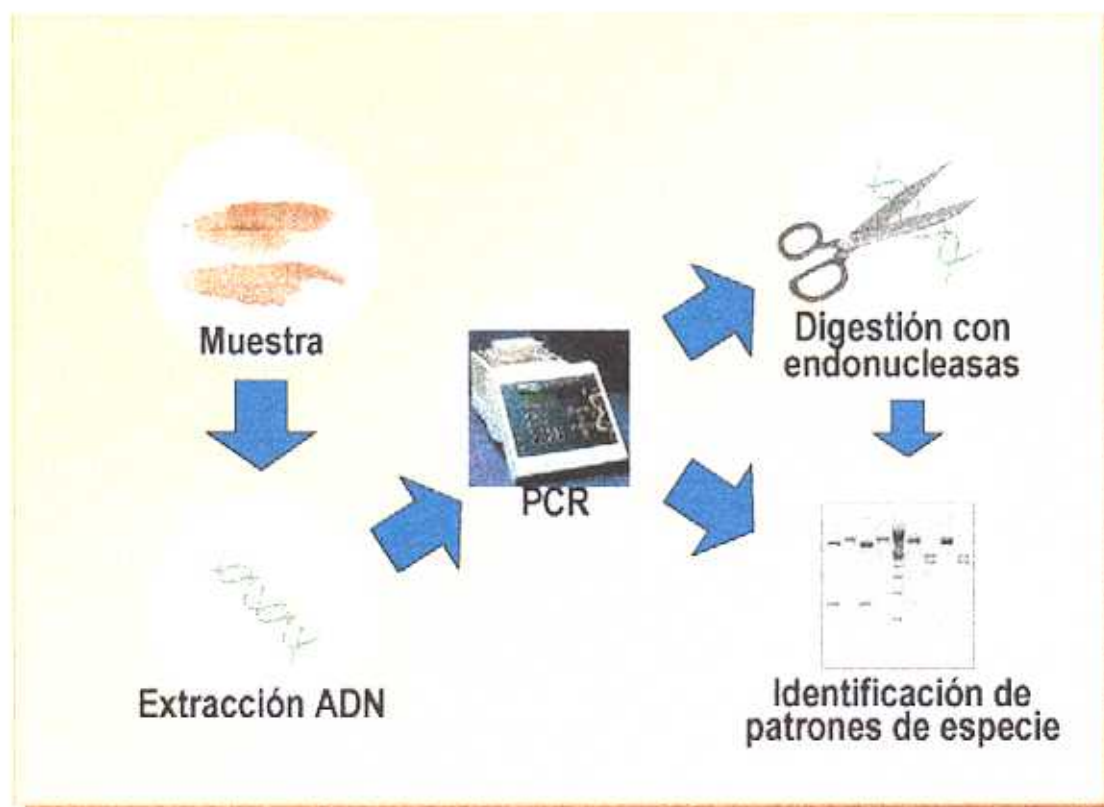


Figura 8. Esquema del análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones del ADN amplificadas por PCR (PCR-RFLP).

debido a la degradación del ADN, sólo se pueden amplificar por PCR fragmentos pequeños de ADN. Estos fragmentos, al ser tratados con enzimas de restricción generan oligonucleótidos demasiado cortos para visualizarse claramente en los geles convencionales de electroforesis. El análisis del polimorfismo de conformación de las hebras de ADN monocatenario (SSCP) puede resultar muy útil en estos casos.

Orita y col. (1989), describieron por primera vez el polimorfismo de la conformación en las cadenas sencillas de ADN. En esta técnica, el ADN bicatenario (ds) se desnaturaliza para obtener las dos cadenas de ADN monocatenario (ss), que a continuación se separan en función de su peso molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. La sensibilidad de esta técnica permite detectar mutaciones puntuales en los productos amplificados por PCR, por lo que se ha utilizado para definir alteraciones genéticas en ciertas enfermedades humanas.

En 1995, Rehbein y col., trataron de diferenciar por SSCP muestras de varias especies de atunes y bonito (*Sarda sarda*) congelados y enlatados. Amplificaron dos regiones diferentes del gen citocromo *b* (de 123 y 148 pb) y obtuvieron perfiles que permitieron diferenciar la mayoría de las especies. Sin embargo, no fue posible distinguir entre la albacora (*Thunnus alalunga*) y el atún rojo (*Thunnus thynnus thynnus*) debido a que su secuencia de nucleótidos es idéntica en este fragmento (Unsel y col., 1995).

En 1997, Rehbein y col., utilizaron este método de análisis del ADN para verificar el correcto etiquetado de pescados crudos o enlatados o de productos elaborados a base de especies de pescado estrechamente relacionadas (atún, anguila, salmón, trucha y esturión, *Acipenser sturio*). Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplificaron segmentos cortos del gen mitocondrial citocromo *b* y analizaron el polimorfismo de conformación de las hebras sencillas de ADN para obtener perfiles específicos de especie. Las hebras de ADN se separaron por electroforesis en geles comerciales de poliacrilamida y se visualizaron por tinción con plata. Las cuatro especies de anguila (*Anguilla anguilla*, *Anguilla rostrata*, *Anguilla japonica* y *Anguilla australis*) dieron lugar a diferentes perfiles con la técnica de PCR-SSCP. Estos resultados concuerdan con los

obtenidos con otras técnicas de análisis de ADN, ya que *A. anguilla* y *A. rostrata* se habían diferenciado anteriormente por análisis del polimorfismo en los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) (Tagliavini y col., 1995), y para la diferenciación de *A. anguilla*, *A. japonica* y *A. bicolor* (Takagi y Taniguchi, 1995) se había utilizado la valoración del polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPD).

Otro objetivo del estudio de Rehbein y col. (1997), fue la diferenciación de filetes y huevos de varias especies de pescado de la familia *Salmonidae*: salvelino (*Salvelinus fontinalis*), trucha común, trucha arco iris y salmón atlántico. Los patrones obtenidos a partir de filetes fueron específicos de especie. En el mercado existen varios tipos de caviar (de esturión) cuyos precios son muy diferentes. En el trabajo citado se obtuvieron productos de PCR a partir del ADN del caviar de esturión beluga, sevruga y osietra, que mediante SSCP originaban patrones que permitían la diferenciación inequívoca de estas tres especies. Finalmente, se ha comprobado que amplificando fragmentos pequeños de ADN (123 y 148 pb) de muestras de arenque, sardina, bacalao, atún y bonito enlatados, se obtienen perfiles específicos de especie a pesar de la degradación de proteínas y ADN acaecidos durante el proceso de esterilización (Mackie y Taylor, 1972; Chikuni y col., 1990).

La técnica de PCR-SSCP fue aplicada por Rea y col. (1996), para diferenciar el cerdo y el jabalí europeos. Sin embargo, debido a la similitud de la secuencia de ADN con que trabajaron (región D-loop del ADN mitocondrial) no fue posible diferenciar estos animales pertenecientes a la misma especie: *Sus scrofa domestica* (cerdo) y *Sus scrofa fera* (jabalí).

Aunque en la técnica de PCR-SSCP se espera visualizar dos bandas de ADN monocatenario (ssDNA) para cada gen amplificado, pueden encontrarse más de dos bandas con distinta intensidad. Esto es debido a que la conformación de las cadenas sencillas de ácidos nucleicos varía en función de factores ambientales como la temperatura, la concentración del tampón de electroforesis o la presencia de agentes desnaturalizantes en el gel, lo cual modifica su movilidad en el mismo.

Las ventajas de la técnica de PCR-SSCP con respecto a otras técnicas genéticas para identificar especies son:

- Es posible analizar fragmentos de ADN degradado.
- Cambios puntuales en la secuencia de nucleótidos del ADN monocatenario (ADNss) determinan una conformación diferente de las moléculas, que pueden separarse electroforéticamente.
- El SSCP es una técnica rápida y fácil de desarrollar.

En cuanto a los inconvenientes de esta técnica conviene señalar que:

- Es necesario analizar muestras de referencia en el mismo gel junto con las muestras problema.
- Los patrones SSCP aportan menos información que la secuenciación de las cadenas de ADN.
- Antes de trabajar con geles preformados comerciales, tipo *PhastSystem™*, la técnica requería el uso de nucleótidos radioactivos y de geles grandes.

II.3.2.2.4. Estudio del polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD)

Williams y col., describieron en 1990 el polimorfismo basado en la amplificación al azar de segmentos de ADN utilizando cebadores de secuencia corta y arbitraria (RAPD: *Random Amplified Polymorphism DNA*). Trabajaron con muestras de ADN humano, de semilla de soja, de maíz y de *Neurospora crassa*. Cada especie originó un perfil de bandas de ADN distinto, pero también se observó polimorfismo entre individuos de la misma especie. También demostraron que la modificación de un solo nucleótido en los cebadores producía una modificación completa en el perfil del ADN amplificado, revelando nuevos polimorfismos.

La especificidad del RAPD se basa en la utilización de ADN nuclear purificado de un único individuo y no implica el conocimiento previo de la secuencia del ADN con que se trabaja. Estas características, que facilitan la realización de las pruebas, tienen el inconveniente del gran polimorfismo

intra- e interespecífico observado. Asimismo, el RAPD no permite detectar ADN de un determinado organismo en mezclas complejas de ADN, lo que puede limitar su aplicación al análisis de alimentos (Meyer y Candrian, 1996). Por otra parte, los perfiles electroforéticos que se obtienen son generalmente muy complejos y deben ser analizados mediante sistemas informáticos de captura e interpretación de imágenes. Otro aspecto a considerar para la aplicación de esta técnica es su elevada sensibilidad a las condiciones de la reacción de PCR, tales como el ADN diana, la concentración de magnesio o los intervalos de tiempo/temperatura de los ciclos de amplificación.

En 1990, Welsh y McClelland trabajaron con este tipo de marcador genético al que denominaron AP-PCR (cebador arbitrario-PCR). Obtuvieron variación intra- e interespecífica trabajando con 5 especies de *Staphylococcus*, 11 cepas distintas de *Streptococcus pyogenes* y tres variedades de arroz, *Oryza sativa*, y concluyeron que existía la posibilidad de extender el método a otras especies cuyos genomas tuvieran un tamaño entre 5×10^4 y 3×10^9 pares de bases, como los virus, el hombre y las plantas.

Mediante la aplicación del RAPD, Comincini y col. (1996), analizaron la relación genética de cinco cérvidos: *Cervus elaphus*, *Dama dama*, *Capreobus capreobus*, *Odocoileus hemious hemious* y *Muntjac muntjac vaginalis*. Amplificando las muestras con ocho cebadores diferentes consiguieron resultados reproducibles que incluían entre 5 y 10 bandas monomórficas comunes a todas las muestras y multitud de bandas polimórficas con un tamaño comprendido entre 50 y 2.000 pares de bases (pb). Utilizando programas informáticos identificaron marcadores específicos de especie, tanto por la longitud como por la intensidad de los fragmentos amplificados, que permitieron distinguir correctamente las especies analizadas, incluso dentro de la misma subfamilia.

Koh y col. (1998), analizaron un total de 29 cebadores de 10 nt de longitud con un contenido variable en GC (del 50 al 80%) para obtener perfiles de amplificación diferentes en varias especies de animales (jabalí, cerdo, vaca, búfalo, venado, perro, gato, conejo y canguro). Los patrones de identificación obtenidos con los cebadores que contenían un 80% de GC eran

más claros que los obtenidos con el resto de los cebadores. Ocho de los diez cebadores con un 80% de GC permitían diferenciar visualmente las especies analizadas. Según estos investigadores, la capacidad de discriminación del método RAPD es prácticamente ilimitada, ya que siempre es posible utilizar nuevos cebadores escogidos al azar.

La técnica de RAPD se ha utilizado también para la diferenciación genética de 3 especies de pescado del género *Oreochromis*, en las que también se estudió la variabilidad genética intraespecífica (Dinesh y col., 1996). Utilizando un único cebador de 16 nt de longitud, identificaron 13 marcadores genéticos que permitían distinguir las 3 especies analizadas.

Harding y col. (1997), trataron de obtener perfiles polimórficos para estudiar por RAPD la relación genética intraespecífica del bogavante americano (*Homarus americanus*) capturado en tres regiones separadas ecológica y geográficamente. Sin embargo, el análisis fenotípico de las bandas obtenidas no permitió apreciar diferencias significativas entre las muestras capturadas en las distintas localizaciones.

Bielawski y Pumo (1997), investigaron la variación genética existente entre las percas (*Morone saxatilis*) de cinco ríos distintos de la costa este de los Estados Unidos. Después de seleccionar cinco cebadores de los cuarenta inicialmente escogidos, los resultados demostraron que la variación del ADN nuclear en la perca de la costa atlántica es extremadamente baja.

II.3.2.2.5. Estudio de secuencias repetitivas del ADN cromosómico

Los marcadores genéticos basados en el ADN mitocondrial ponen de manifiesto cambios en la secuencia del ADN, como resultado de mutaciones puntuales. Recientemente, en la identificación de especies, la atención se ha centrado en determinar las diferencias que se observan en el número de copias repetidas de un fragmento de ADN (Brooker y col., 1994; Hartley y Davidson, 1994; Angers y col., 1995; Galvin y col., 1995; Garrido-Ramos y col., 1995). Distribuidos por todo el genoma de los organismos eucariontes se encuentran bloques de secuencia similar o idéntica. Estas secuencias se clasifican de acuerdo al tamaño decreciente del número de bases en: satélites,

minisatélites y microsatélites. De ellos, los minisatélites y microsatélites han sido los más utilizados en la identificación de especies.

Los satélites consisten en unidades repetitivas de cientos a miles de pares de bases que se repiten miles o incluso millones de veces. Se pueden aislar del ADN genómico mediante centrifugación en un gradiente de cloruro de cesio. Se les denomina satélites porque tras su separación en los gradientes aparecen como una banda distinta de la banda de ADN genómico.

Los minisatélites son secuencias de ADN de 9 a 64 pares de bases que se repiten de dos a cientos de veces en un determinado *locus* del cromosoma. Algunos minisatélites son los fragmentos de ADN más variables que se conocen, con una heterozigosidad próxima al 100%, y un nivel de mutación del 2% por generación. Se han utilizado minisatélites polimórficos para la identificación de un gran número de especies que incluyen mamíferos, aves y peces.

Los microsatélites son secuencias de 1 a 5 pares de bases que se repiten hasta 100 veces en un determinado *locus*. Los microsatélites están distribuidos aleatoriamente por el cromosoma y no se localizan como los minisatélites, en las regiones próximas al centrómero y telómero. Tienen dos características muy interesantes para la identificación de especies, como son el polimorfismo y la heredabilidad. Su alto polimorfismo permite tener un gran número de alelos distintos en cada locus, y por lo tanto, una gran capacidad de discriminación. Se han descrito microsatélites en el hombre, ratón, rata, perro, cerdo, caballo, abejas, salmón, trucha y bacalao (Angers y col., 1995).

El polimorfismo de los microsatelites fue demostrado por Tautz (1989), y por Weber y May (1989). Durante los dos años que siguieron a su presentación, se utilizaron como marcadores genéticos en estudios médicos y forenses. Su uso ha continuado extendiéndose en la década de los 90 (sólo en 1994 se publicaron más de 200 artículos con el término microsatélite en el título). Al principio, los estudios se centraron en extraer el ADN genómico, cortarlo con enzimas de restricción, transferirlo a membranas de nitrocelulosa e hibridarlo con sondas de minisatélites o microsatélites. En la Tabla 5 se

Tabla 5. Sondas multi/ocus de minisatélites utilizadas para obtener perfiles específicos en peces.

Sonda(s)	Especies	Aplicación	Referencia
(GACA) ₄ (CT) ₉	<i>Poecilia latipinna</i>	Análisis de variación de poblaciones	Laughlin y Turner (1994)
33.6	<i>Salmo trutta</i>	Análisis de variación de poblaciones	Prodohl y col., 1992
pSPT18.15	<i>Oreochromis niloticus</i>	Análisis de ginogénesis	Carter y col., 1991
pSPT19.6			
33.15	<i>Hoplostethus atlanticus</i>	Análisis de variación de poblaciones	Baker y col., 1992
M13			
3'HVR			
B2-2	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Identificación de estructura familiar en poblaciones	Stevens y col., 1993
PYNZ132	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Estudios de paternidad	Rico y col., 1991

O'Reilly y Wright, 1995

muestran algunas de las sondas de minisatélites que se han utilizado para estudiar el polimorfismo *multilocus* en varias especies de peces.

El polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción obtenido con sondas de mini y microsatélites (Figura 9) refleja variación alélica en muchos *loci* simultáneamente (Jeffreys y col., 1985a; Epplen y col., 1991). Estos marcadores altamente polimórficos son especialmente apropiados para los análisis de paternidad y en medicina forense, pero son inadecuados para muchos estudios genéticos de poblaciones debido a la incapacidad de asignar un *locus* específico a las bandas observadas. Además, esta metodología resulta menos sensible (se requiere mayor cantidad de ADN de partida), más laboriosa y más cara que los métodos basados en la amplificación por PCR, los cuales permiten visualizar la variación alélica en determinados loci de mini o microsatélites.

La tendencia actual para el estudio del polimorfismo de mini y microsatélites en un *locus* determinado se basa en la especificidad de las regiones de ADN que lo flanquean y en las variaciones del número de repeticiones de la unidad básica. Las secuencias de los fragmentos de ADN que bordean el *locus* se utilizan para diseñar cebadores que permiten su amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (Jeffreys y col., 1994), por lo que es imprescindible conocer la secuencia de esta zona. Los productos de PCR se visualizan mediante electroforesis. Estas técnicas son más sencillas que las basadas en el *southern blot*, pero tienen el inconveniente que no se pueden aplicar para amplificar fragmentos mayores de 4 o 5 Kb.

La principal ventaja de los marcadores *multilocus* es que las sondas pueden producir hibridaciones cruzadas entre distintos taxones (Georges y col., 1988). En consecuencia, una única sonda se puede utilizar para identificar individuos genéticamente distintos. Sin embargo, en los perfiles aparecen múltiples bandas que en algunos casos son difíciles de interpretar. Las ventajas de los marcadores genéticos de un solo *locus* frente a los *multilocus*, son que:

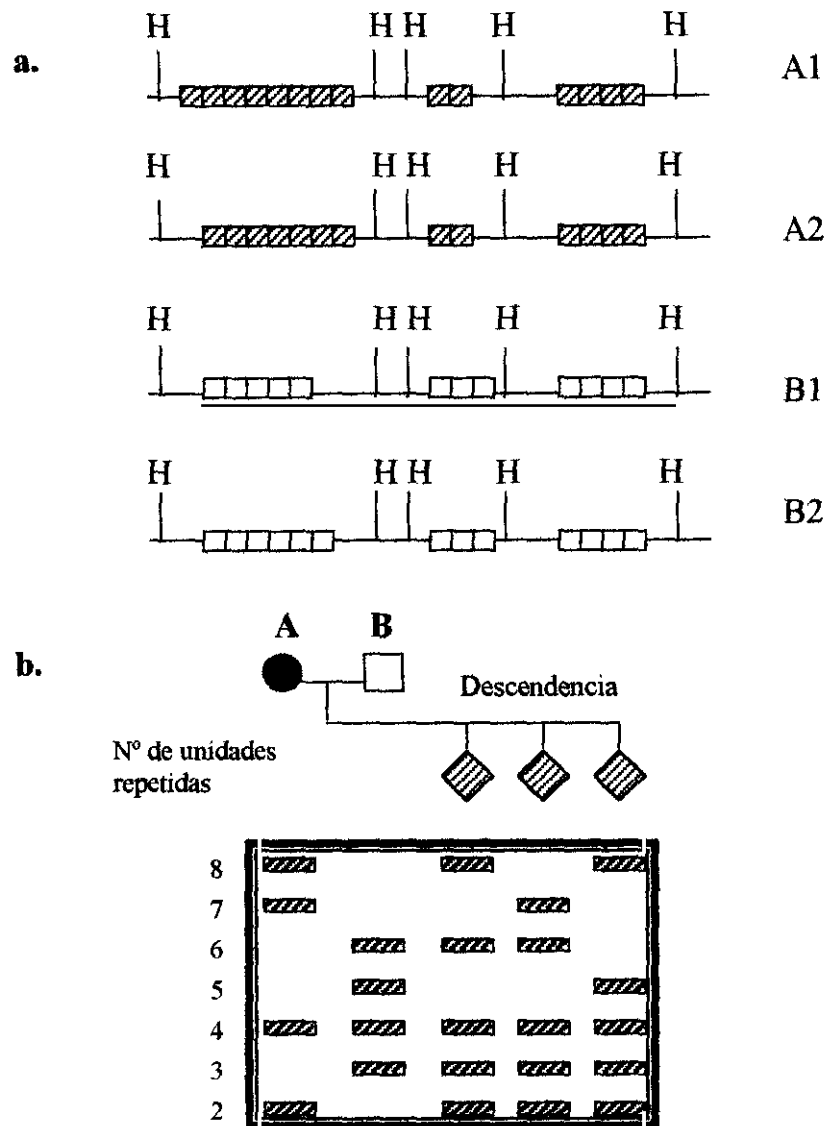


Figura 9. **a)** Base molecular de un marcador de ADN multilocus. A1, A2 y B1, B2, muestran la organización de tres loci minisatélite en cromosomas homólogos en los individuos A y B, respectivamente. El ADN genómico de los dos padres se digiere con la enzima de digestión *Hae* III. , unidades de repetición del minisatélite; H: digestión con *Hae* III. **b)** Digestión del ADN. Utilizando la técnica del *southern blot*, se detectan múltiples minisatélites simultáneamente por hibridación con una sonda marcada radioactivamente de secuencia homóloga a la del minisatélite (O'Reilly y Wright, 1995).

- Los perfiles de las bandas son menos complejos y es poco probable la co-migración de alelos de loci no homólogos.
- Ya que las bandas se atribuyen a cada *locus*, se puede estimar la frecuencia de los alelos.
- Utilizando estándares de alelos se pueden comparar muestras problema en un gel.

Entre las limitaciones de los marcadores *unilocus* conviene señalar la complejidad de los mecanismos de mutación que generan variación en algunos minisatélites, entre los que se incluyen deleciones, duplicaciones intra-alélicas y recombinación inter-alélica (Wright, 1993).

Gracias al conocimiento de las secuencias de nucleótidos en especies como el bacalao del Atlántico (Brooker y col., 1994), salmón atlántico (Slettan y col., 1993;) y trucha común (Estoup y col., 1993), se sabe que muchos microsatélites consisten en tramos ininterrumpidos de unidades idénticas repetidas en tándem, y que la mayoría de las diferencias entre los alelos parecen debidas al aumento o disminución del número de repeticiones de unidades de idéntica longitud. Por el contrario, casi todos los minisatélites analizados en peces están compuestos por varios tipos de unidades repetitivas, agrupadas en unidades más grandes que se repiten (Bentzen y Wright, 1993; Harris y Wright, 1995).

Se han desarrollado sondas específicas de especie para analizar *locus* de secuencias repetitivas en gádidos, salmónidos y *Tilapia*, entre otros. Galvin y col., (1995), evaluaron la variabilidad genética del bacalao y encontraron diferencias significativas en la frecuencia de alelos de las poblaciones del noreste Atlántico y entre las poblaciones del este y oeste del Atlántico. Entre los salmónidos existen niveles de polimorfismo moderados, con *loci* que exhiben entre 5 y 10 alelos y valores de heterocigosidad comprendidos entre el 36 y el 77%. Bentzen y Wright (1993), identificaron la secuencia de nucleótidos del minisatélite *Ssal* del salmón atlántico que contiene 16 pares de bases repetidas. La sonda *Ssal* desarrollada para el salmón atlántico se ha

utilizado también para obtener perfiles específicos en otros salmónidos como el salmón keta, (Taylor y col., 1994b).

El alto nivel de variación alélica de algunos minisatélites hace que la utilización de métodos convencionales de separación por tamaño refleje solamente parte de su variación real. Los minisatélites pueden diferir no sólo en el número de copias de las unidades que se repiten, sino también en el patrón de distribución de diferentes tipos de repeticiones. Jeffreys y col., (1990), estudiaron la variación en la secuencia de unidades de repetición en moléculas sencillas (haploides) utilizando en primer lugar enzimas de restricción, que reconocen y cortan determinados tipos de unidades repetitivas. De esta manera, se observaron variaciones que antes no se conocían. Posteriormente (Jeffreys y col., 1991), desarrollaron un método basado en la amplificación por PCR, denominado MVR-PCR, para identificar la variabilidad interna de las unidades repetitivas que integran un minisatélite. Con este método, la secuencia de una unidad de repetición del minisatélite se determina utilizando cebadores complementarios a los diferentes tipos de subunidades repetitivas y un cebador que hibrida en la zona que bordea el locus del minisatélite (Figura 10). Después de varios ciclos, se obtienen distintas series de productos de PCR cuya longitud depende del número de repeticiones obtenidas a partir de cada subunidad repetitiva.

La presencia de microsatélites en peces teleósteos es abundante. Unidades repetitivas del tipo $(GT)_n$ aparecen, como media, cada 7 Kb en el bacalao del Atlántico (Brooker y col., 1994), 11-56 Kb en el salmón atlántico (McConnell y col., 1995) y cada 23 Kb en la trucha común (Estoup y col., 1993). La frecuencia de aparición del microsatélite $(CT)_n$ se reduce a un tercio de la frecuencia con que aparece el $(GT)_n$ (Estoup y col., 1993).

Morris y col. (1996), clonaron y secuenciaron varios microsatélites $(GT)_n$ y $(GA)_n$ de la trucha arco iris. En su trabajo concluyeron que los marcadores microsatélites aislados de una especie de salmónidos (trucha arco iris) son, en general, útiles para realizar estudios de otras especies de salmónidos (trucha de garganta cortada, salmón keta, salmón plateado, salmón real, salmón atlántico y salvelino). La utilización de estos marcadores en

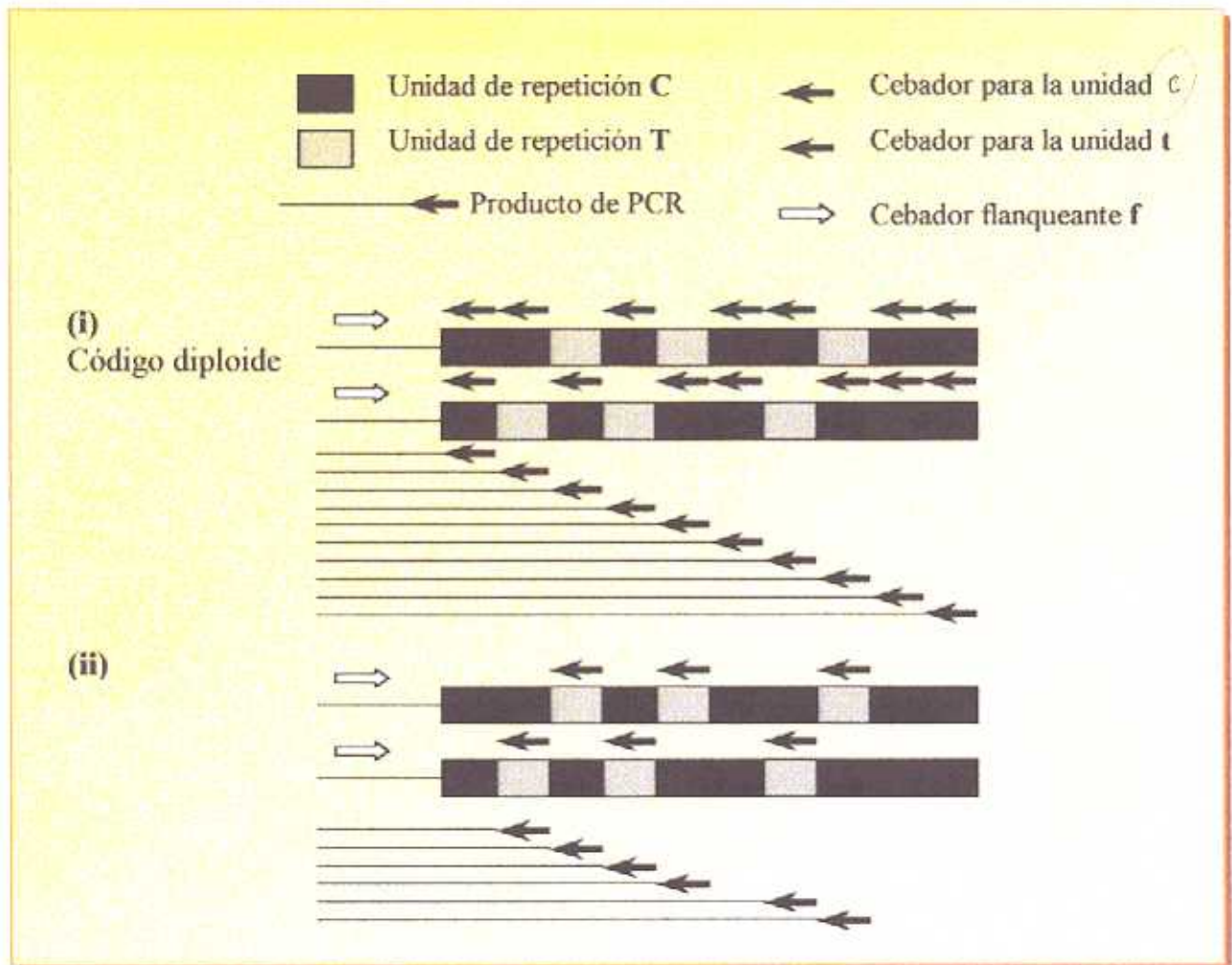


Figura 10. Variación repetitiva de un minisatélite del locus *Ssa197* del salmón atlántico. Dos reacciones de amplificación se desarrollaron en experimentos separados. En la primera reacción (i) el PCR se lleva a cabo con el cebador f (a la izquierda de la cadena de ADN) y el cebador c (complementario a la unidad de repetición C). En la segunda reacción (ii), la reacción de PCR se desarrolla con el cebador f y el cebador t (complementario a la unidad de repetición T). En ambas reacciones, los productos de PCR corresponden en longitud a la distancia entre el cebador flanqueante (f) y la unidad de repetición (C o T). Los productos más largos se generan por un aumento en la distancia entre las unidades de repetición (O'Reilly y Wright, 1995).

especies relacionadas reduce enormemente el tiempo y el coste de la investigación genética en la acuicultura.

Slettan y col. (1997), caracterizaron cinco nuevos microsatélites del salmón atlántico y analizaron éstos y otros microsatélites previamente publicados (Slettan y col., 1995a, 1995b, 1996). Excepto uno de los cinco microsatélites, el resto mostraron un alto grado de polimorfismo y secuencias más largas que las observadas en los vertebrados superiores. Este fenómeno se ha observado también en el bacalao y en la trucha arco iris (Brooker y col., 1994).

Entre los numerosos estudios de microsatélites de pescados y mariscos publicados en los últimos años conviene señalar los trabajos de Patton y col., (1997) en *Coregonus nasus*; los de May y col., (1997) en el esturión,; Bagshaw y Buckholt (1997) en el genoma del langostino *Penaeus vannamei*; Harris y Wright (1995) en Tilapia (*Oreochromis niloticus*) y los de Garrido-Ramos y col., (1995) sobre las relaciones filogenéticas de la familia *Esparidae*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. MATERIALES

III.1.1. MATERIAL DE LABORATORIO

Para la preparación de los tampones y diversas disoluciones acuosas se empleó agua destilada obtenida en un aparato de filtración "Millipore" mod. Elix 3. También se empleó agua bidestilada obtenida en un destilador "Nanopure" mod. Branstead.

Las pesadas ordinarias se efectuaron en una balanza monoplato "AND" mod. EW-600. Para las pesadas de precisión se utilizó la balanza analítica "AND" mod. ER-120.

Las mediciones de pH se realizaron con un pHmetro "Metrohm" mod. 654.

Los tampones se disolvieron mediante agitación electromagnética y, en algunos casos, aplicando calor con placas "Nuova II" mod. Thermolyne. Los agitadores de tubos empleados fueron "Heidolph" mod. REAX 2.000.

La desgasificación requerida en la preparación de los tampones se realizó mediante un aparato de ultrasonidos "Selecta" mod. Ultrasons y con una bomba de vacío "Eyela" mod. Aspirator A-3S.

Las incubaciones que requerían un control preciso de la temperatura se efectuaron en un baño de agua termostatado "Grant" mod. Y14 y en una estufa "Heraeus" mod. KB-500. Las incubaciones en agitación se realizaron en un incubador-agitador orbital "Lab-line" mod. 35.271.

Las muestras y reactivos se conservaron en arcones congeladores "Kelvinator" mod. ACK-55, así como en frigoríficos "Aspes" y "Kelvinator" mod. AKR-20 y en un armario frigorífico "Kelvinator" termostatado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

Las centrifugaciones se realizaron en una centrifuga refrigerada "Sorvall" mod. RC-5B, equipada con rotores SS-34 y GSA. Para centrifugar

(2) La cita de marcas de aparatos, reactivos, etc., no implica recomendación alguna por parte de la autora.

pequeños volúmenes de muestra se utilizaron centrífugas "Heraeus" de los modelos Biofuge A, equipada con rotor tipo 1.220; Megafuge 1.0, equipada con rotor tipo 2.150 y Biofuge 15R equipada con rotor tipo HFA 3.042.

Las diálisis de las muestras se efectuaron con *cassettes* de diálisis "Slide-A-Lyzer" mod. 10K (Pierce) y con membranas tubulares "Serva" mod. 27/32 o "Medicell International LTD" mod. 6-27/32.

Las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro "Kontron" mod. Uvikon 820 y en un espectrofotómetro de doble haz "UV-VIS Hitachi" mod. U-2.000, registrándose los resultados en una impresora térmica Uvikon LS-4B y en un registrador Uvikon 21.

Las placas de ELISA de poliestireno de 96 pocillos que se emplearon en las técnicas inmunoenzimáticas eran de "Nunc" mod. Maxisorp. La agitación de las placas se hizo en agitadores de placas de ELISA "Wallac" mod. 1.296-001 Delfia Plateshake y para las medidas espectrofotométricas se utilizó un lector espectrofotométrico de placas de ELISA Labsystems iEMS Reader MF. Para los ELISA en paletas, se utilizaron viales con paletas "Nunc" mod. DK 4.000.

Las muestras se homogeneizaron en un triturador "Polytron" mod. PCU y en un homogeneizador "Colworth" mod. Stomacher 400.

La esterilización húmeda del material utilizado en este trabajo se realizó mediante un autoclave "Selecta" mod. Autester G, utilizando cintas de papel indicador para comprobar la efectividad del proceso.

Para la amplificación de los fragmentos génicos de interés (reacción en cadena de la polimerasa, PCR) se utilizó un termociclador Techne mod. "Progene", equipado con tapa calefactora.

Las electroforesis de los ácidos nucleicos en geles de agarosa se realizaron en una cubeta de electroforesis horizontal para ácidos nucleicos "HORIZON 58" Life Technologies, GIBCO BRL, con una fuente de alimentación POWER PAC 300, BioRad.

La visualización de los fragmentos génicos amplificados por PCR se

realizó utilizando un transiluminador de luz ultravioleta y un sistema de documentación de imágenes mod. Geldoc 1.000 UV de BioRad.

Todas las manipulaciones de material genético se efectuaron en una campana de flujo laminar “Telstar” mod. AV-100, equipada con una lámpara ultravioleta.

Como material general de laboratorio se utilizaron pipetas y micropipetas automáticas, así como pipetas multicanal “Labsystems”, agitadores, mecheros de gas, termómetros, jeringuillas, hojas de bisturí, etc. El material de vidrio empleado en las experiencias descritas fue siempre de tipo “Pyrex”.

III.1.2. MATERIAL BIOLÓGICO

III.1.2.1. Animales de experimentación

En la obtención de anticuerpos policlonales se emplearon conejos machos blancos de raza Nueva Zelanda, de 3,5 kg de peso. Los conejos se mantuvieron en el animalario del Departamento de Nutrición y Bromatología III de la Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, alimentados con dieta de mantenimiento para conejos y agua potable *ad libitum*.

III.1.2.2. Origen de las muestras

En este trabajo se han utilizado dos tipos de muestras:

III.1.2.2.1. Tejido muscular

El tejido muscular procede de tres especies de pescado distintas, cada una de ellas en estado fresco y ahumado. El número total de muestras analizadas estuvo comprendido entre 130 y 140.

1. Muestras frescas

Los ejemplares frescos de salmón atlántico, trucha arco iris y palometa procedían de pescaderías ubicadas en la Comunidad Autónoma de Madrid.

2. Muestras ahumadas

Las muestras de salmón atlántico, trucha arco iris y palometa ahumados se adquirieron en distintos centros comerciales de la Comunidad Autónoma de Madrid. Las marcas comerciales fueron las siguientes:

- Salmón: Ahumados Domínguez (Alcorcón), Skandia (Málaga), Valkiria (Málaga), El Rey Vikingo (Málaga), Wonder (Parla) y Pescaderías Coruñesas (Madrid)
- Trucha: Eurosalmón (Alcorcón), Pryca (Madrid), Skandia (Málaga), Ahumados Domínguez (Alcorcón), Wonder (Parla) y Pescaderías Coruñesas (Madrid).
- Palometa: Ahumados Domínguez (Alcorcón), Skandia (Málaga), Valkiria (Málaga) y Wonder (Parla).

III.1.2.2.2. Tejido ovárico

1. Muestras frescas

Las huevas u ovarios de salmón atlántico y de trucha arco iris fueron suministradas por MARCULTURA S.A. (La Coruña), empresa dedicada al engorde de salmónidos. Dichos tejidos se mantuvieron en refrigeración con hielo hasta su llegada al laboratorio. Las muestras correspondieron aproximadamente a 25 individuos de cada especie.

2. Muestras ahumadas

Las muestras de huevas ahumadas analizadas estaban etiquetadas como salmón y pertenecían a las marcas comerciales Royal (Barcelona), SOF (Madrid) y Skandia (Málaga).

III.1.3. PRODUCTOS Y REACTIVOS

Los productos químicos y biológicos utilizados en los experimentos descritos en este trabajo fueron suministrados por alguna de las siguientes firmas: Panreac (Barcelona, España), Sigma (St. Louis, USA), Merck (Darmstadt, Alemania), Pharmacia (Uppsala, Suecia), Boehringer Mannheim (Barcelona, Madrid), Fluka (Buchs, Switzerland), Difco (Detroit, USA), Life

Technologies (Maryland, USA), Biotools (Madrid, España), Finnzymes (Espoo, Finland), BioVentures (Tennessee, USA), Isogen (Utrecht, Holanda), Ecogen (Barcelona, España), BioRad (Hercules, USA), New England BioLabs (Beverly, USA).

Los reactivos empleados en las técnicas genéticas eran reactivos para biología molecular, es decir, libres de ADNasas, ARNasas y ADN.

III.2. MÉTODOS

III.2.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ANTIGÉNICOS

III.2.1.1. Extracción de las proteínas musculares solubles

La identidad biológica de las muestras utilizadas como antígenos (*Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* y *Brama raii*) fue comprobada *in situ* en la industria transformadora Ahumados Domínguez, S.A. atendiendo a sus características morfológicas.

Para la preparación de los extractos antigénicos de salmón, trucha y palometa ahumados, 40 g de tejido muscular se homogeneizaron en 200 ml de solución salina (8,5 g/l NaCl), se mantuvieron en agitación durante 2 h a 20°C y se centrifugaron a 3.500 x g durante 30 min a 10°C. Los sobrenadantes se filtraron a través de un papel de filtro Whatman n°1, se liofilizaron y se almacenaron en envases herméticos en refrigeración a 4°C hasta su uso (Figura 11). El extracto antigénico correspondiente a las proteínas musculares solubles obtenidas de salmón ahumado se denominó PSS, el de proteínas musculares solubles de trucha ahumada PST y el de palometa ahumada PSP.

III.2.1.2. Determinación de la proteína

La determinación del contenido proteico de los extractos antigénicos de pescado ahumado se realizó según la técnica de Lowry modificada por Markwell y col. (1978). Esta técnica se basa en el desarrollo del color que se produce al reaccionar las proteínas con iones cúpricos y con el reactivo de Folín Ciocalteau en dos etapas que se describen a continuación:

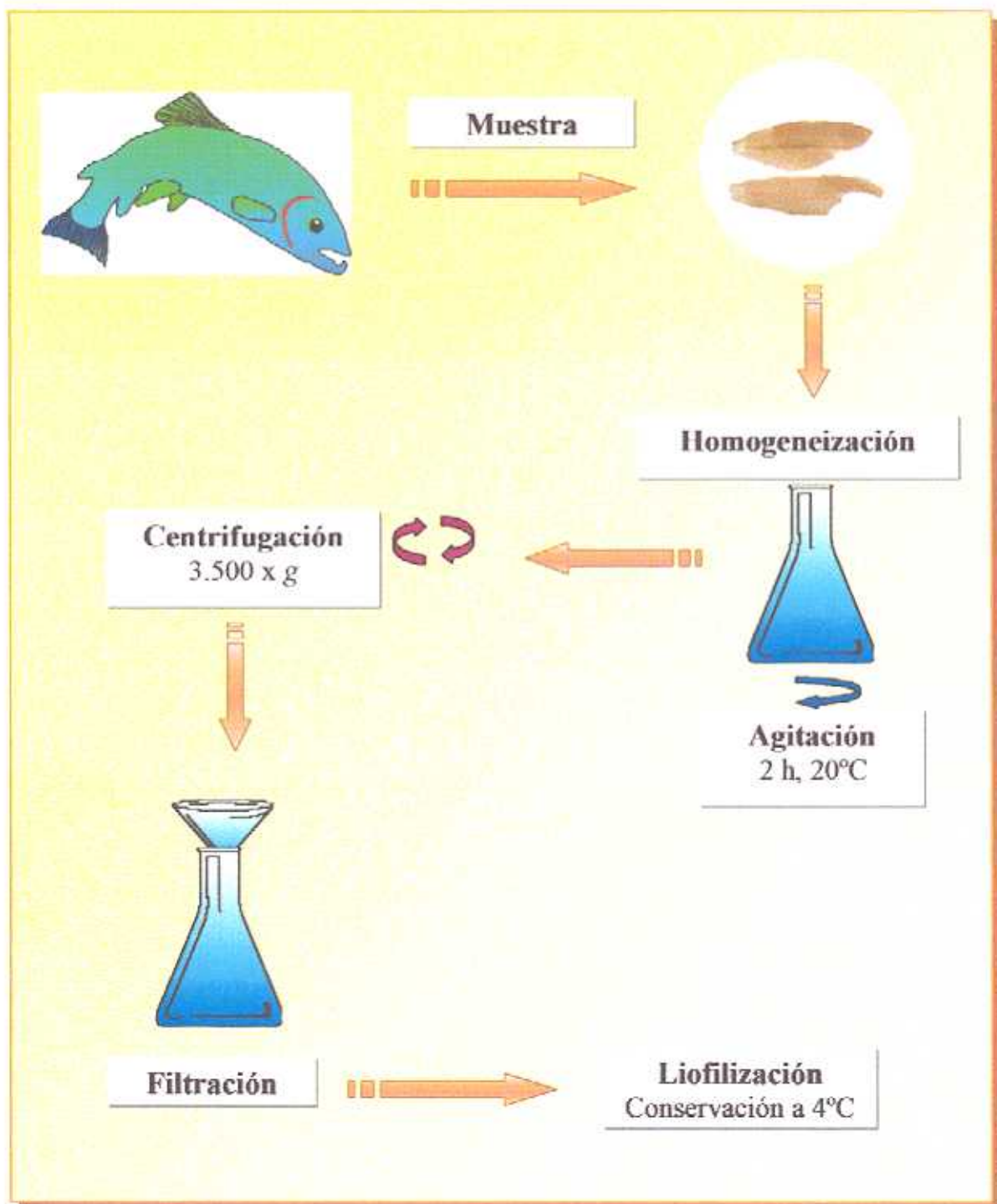


Figura 11. Esquema de la extracción de las proteínas musculares solubles a partir de una muestra de pescado.

1. En condiciones alcalinas, el cobre (Cu^{2+}) forma un complejo con los enlaces peptídicos de las proteínas (reacción de tipo Biuret), reduciéndose a Cu^+ .
2. El Cu^+ , junto con la tirosina y el triptófano, reacciona con el reactivo de Folín Ciocalteau originando un compuesto inestable que se reduce lentamente hasta dar lugar al reactivo molibdeno-túngstico de color azul. Dependiendo fundamentalmente de su contenido en tirosina y triptófano, las proteínas producen un color azul de distinta intensidad.

Esta técnica pone de manifiesto los grupos fenoles de las proteínas y por ello, es necesario evaluar los resultados en relación con una curva patrón construida con anterioridad.

El método permite medir entre 10-100 $\mu\text{g/ml}$ y, como en cualquier técnica colorimétrica, existen variaciones según la proteína que se mida y según las condiciones del ensayo.

Reactivos:

- Solución A: Na_2CO_3 al 2%, NaOH al 0,4%, dodecil sulfato sódico (SDS) al 1% y tartrato sódico potásico ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) al 0,16% en agua destilada.
- Solución B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 4% en agua destilada.
- Solución C: Se obtiene mezclando 100 volúmenes de la solución A con 1 volumen de la solución B.
- Solución D: Reactivo de Folín Ciocalteau diluido en agua destilada en la proporción 1:1 (v/v).

Procedimiento:

La determinación de la proteína se realizó en dos etapas:

1. Se construyó la recta patrón a partir de una batería de tubos que contenían 1 ml de agua destilada y entre 10-100 μg de proteína muscular soluble. Las muestras se diluyeron en el mismo volumen (1 ml) y se preparó un blanco con agua destilada.

2. Se añadieron 3 ml de la solución C a cada tubo y, después de agitar, se dejaron los tubos en reposo a 20°C durante 45 minutos. A continuación, se añadieron 0,3 ml de la solución D a cada tubo y de nuevo, después de agitar, se dejaron los tubos en reposo a 20°C durante 45 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 660 nm.

III.2.2. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

Los anticuerpos policlonales se encuentran en el suero de los animales de laboratorio sometidos a la exposición continuada a un antígeno. Constituyen una mezcla heterogénea de anticuerpos procedentes de muchos clones de linfocitos B, que reaccionan frente a distintos determinantes antigénicos (Figura 12). La afinidad y especificidad de estos anticuerpos varía según los lotes de animales empleados en la inmunización, por lo que generalmente es preciso purificar los inmunosueros antes de su utilización en los inmunoensayos.

III.2.2.1. Pauta de inmunización

Para obtener los inmunosueros se emplearon 3 lotes de 2 conejos machos de la raza Nueva Zelanda de 3-3,5 Kg de peso. Al primer lote se le inoculó el extracto antigénico de proteínas musculares solubles de salmón ahumado (PSS); al segundo lote el extracto antigénico de proteínas musculares solubles de trucha ahumada (PST); y al tercer lote el extracto antigénico de las proteínas musculares solubles de la palometa ahumada (PSP).

La inmunización de cada lote comenzó con dos inoculaciones (una intradérmica, en varios puntos de la espalda del animal, y otra intramuscular) del extracto antigénico correspondiente (5 mg de proteína) emulsionado en 0,5 ml de Adyuvante Completo de Freund y 0,5 ml de solución salina estéril (CINa al 0,85%). Las inoculaciones se prolongaron durante 4 meses a intervalos de 1-2 semanas (Tabla 6), sustituyendo el Adyuvante Completo de Freund por el Incompleto a partir de la segunda inoculación.

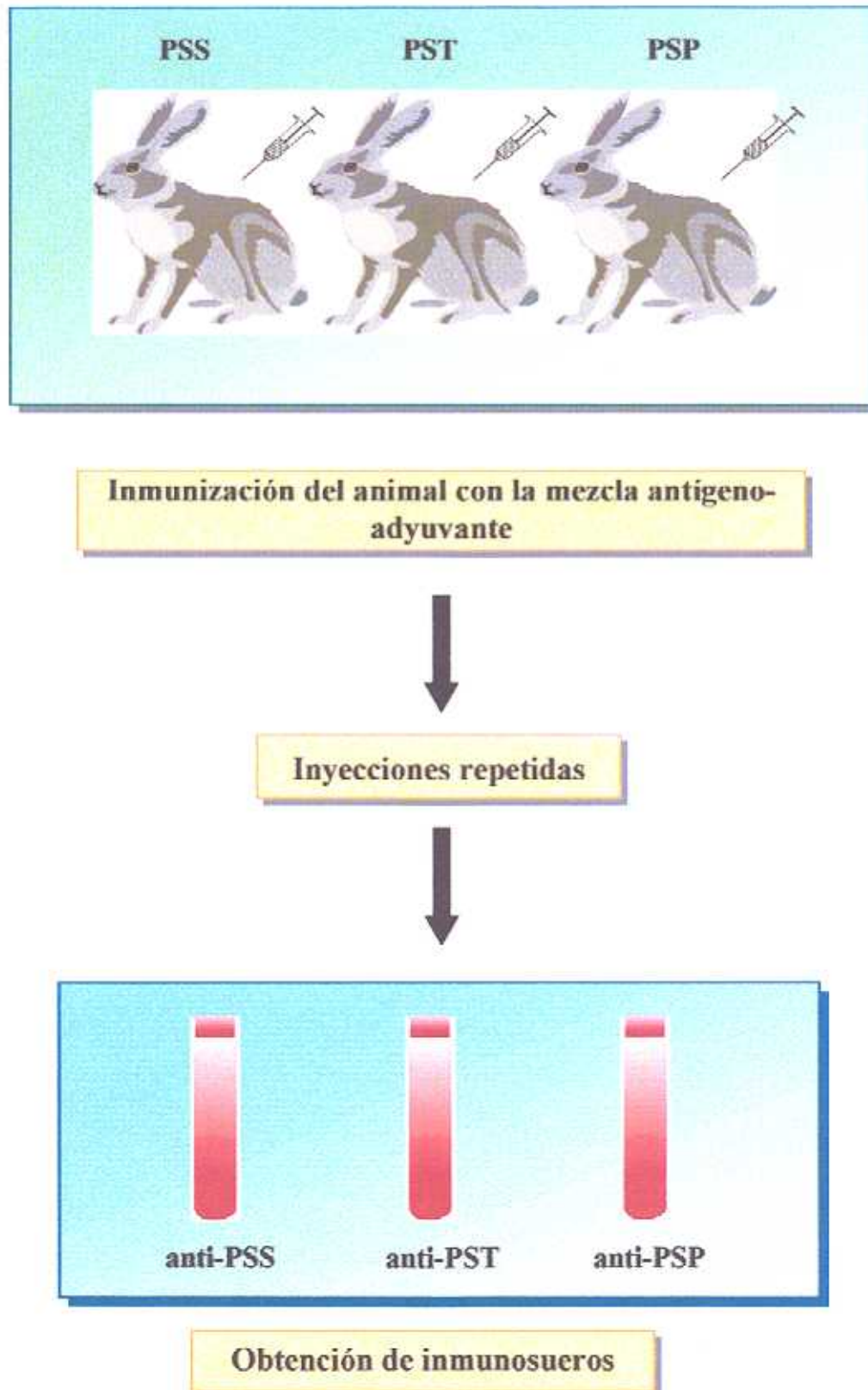


Figura 12. Obtención de inmunosueros.

Tabla 6. Pauta de inmunización de los conejos por inoculación de los extractos antigénicos de salmón, trucha y palometa.

EXTRACTOS ANTIGÉNICOS								
Días	PSS (mg)	PST (mg)	PSP (mg)	SSE (ml)	ACF (ml)	AIF (ml)	Inoculación	Sangría
0	-	-	-	-	-	-	-	S ₀
13	5	5	5	0,5	0,5		SC	-
20	5	5	5	0,5	-	0,5	SC	S ₁
27	5	5	5	1	-	1	ID/IM	-
41	5	5	5	0,5	-	0,5	SC	S ₂
55	5	5	5	0,5	-	0,5	SC	-
62	5	5	5	1	-	1	ID/IM	S ₃
97	5	5	5	0,5	-	0,5	SC	S ₄
122	5	5	5	1	-	1	IM	S ₅

PSS: Proteína Soluble de Salmón
 PST: Proteína Soluble de Trucha
 PSP: Proteína Soluble de Palometa
 SSE: Solución Salina Estéril
 ACF: Adyuvante Completo de Freund
 AIF: Adyuvante Incompleto de Freund
 SC: Inoculación Subcutánea
 ID: Inoculación Intradérmica

IM: Inoculación Intramuscular
 S₀: Sangría inicial
 S₁: Sangría día 20
 S₂: Sangría día 41
 S₃: Sangría día 62
 S₄: Sangría día 97
 S₅: Sangría día 122

Antes de la primera inoculación del extracto antigénico se realizó una sangría inicial (S_0) para comprobar la ausencia de reactividad de los sueros de los animales frente al antígeno correspondiente. Así mismo, a los 20, 41, 62, 97 y 122 días de la primera inoculación, se realizaron sangrías parciales de la arteria central de la oreja, con el fin de verificar la eficacia de la inmunización.

Antes de proceder a la sangría final de los conejos, se comprobó, mediante la técnica del ELISA indirecto, que el título de los sueros procedentes de las sangrías parciales era suficiente.

III.2.2.2. Sangría final

Pasados 130 días del comienzo del proceso de inmunización y una vez comprobado que el título de los inmunosueros era el adecuado, se efectuó la sangría final (S_F) de los animales. Para tal fin se anestesiaron los animales por vía intravenosa en la vena marginal de la oreja con pentobarbital (35 mg/kg de peso). A continuación, se colocaron sobre una mesa en decúbito supino, inmovilizándoles las cuatro extremidades y, seguidamente, se les introdujo una aguja (18G) entre el cuarto y el quinto espacio intercostal de la región torácica. Cuando la aguja ya estaba en posición intracardiaca, se fue recogiendo la sangre en tubos de vidrio hasta el desangrado completo del animal.

III.2.2.3. Obtención y conservación del suero

La sangre se mantuvo 3 horas a temperatura ambiente para facilitar la formación del coágulo. A continuación, se separó cuidadosamente el coágulo de las paredes de los tubos con ayuda de una espátula y se mantuvo a 4°C durante 18 h para favorecer su retracción. El suero se trasvasó a tubos de centrifuga y se centrifugó durante 20 min a 3.000 x g a una temperatura de 4°C. El sobrenadante obtenido se dividió en alícuotas previa adición de azida de sodio (0,01% p/v). Los viales de vidrio que contenían el suero se conservaron en congelación a -20°C, hasta el momento de su utilización.

III.2.2.4. Purificación parcial de los inmunosueros

Los inmunosueros obtenidos frente a las proteínas solubles de salmón ahumado (anti-PSS), trucha ahumada (anti-PST) y palometa ahumada (anti-PSP), se purificaron parcialmente mediante precipitación selectiva con sulfato amónico al 50%.

La precipitación con sulfato amónico es uno de los métodos más utilizados para la separación de las proteínas de una solución acuosa. El método se basa en que las proteínas solubles forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua a través de sus grupos polares. Cuando se añaden concentraciones elevadas de iones fuertemente cargados como el amonio y el sulfato, éstos compiten con las moléculas proteicas por el agua. De esta forma, las proteínas, al perder su unión con las moléculas de agua, disminuyen su solubilidad, lo que origina su precipitación. La concentración de sulfato amónico necesaria para precipitar las inmunoglobulinas varía con la especie animal de la que proceden, aunque la más conveniente en la mayoría de los casos es una solución al 50% (Harlow y Lane, 1988).

La precipitación de las inmunoglobulinas de los inmunosueros anti-PSS, anti-PST y anti-PSP se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Harlow y Lane (1988). Para ello:

- Se centrifugaron 10 ml de suero a 3.000 x g durante 30 min y el sobrenadante se trasvasó a un vaso de precipitado.
- Se añadieron (gota a gota y agitando al mismo tiempo) 10 ml de sulfato amónico saturado (76,1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en 100 ml de agua destilada) cuyo pH se había ajustado a 7,4 con NaOH 1 N inmediatamente antes de su empleo.
- La mezcla se mantuvo en reposo una noche a 4°C y se volvió a centrifugar a 3.000 x g durante 30 min para recuperar las inmunoglobulinas precipitadas.
- Eliminado el sobrenadante, las inmunoglobulinas presentes en el sedimento se resuspendieron en 5 ml de tampón fosfato salino

(PBS, de pH 7,2) y, a continuación, se dializaron en tampón PBS con azida de sodio (10 $\mu\text{l/ml}$) durante 16 h a 4°C. Finalizada la diálisis, las inmunoglobulinas se distribuyeron en alícuotas de 5 ml, manteniéndose a -20°C hasta su utilización.

III.2.2.5. Neutralización del suero con antígenos de especies heterólogas

Con el fin de evitar las reacciones cruzadas de los anticuerpos policlonales frente a las proteínas de especies de pescado distintas de aquellas frente a las que se obtuvieron, se procedió a su neutralización. Para ello, los anticuerpos anti-PSS, anti-PST y anti-PSP, diluidos 1:2.000 en PBSTM (tampón PBS con un 1% de Tween 20 y un 1% de leche desnatada en polvo), se mezclaron con una cantidad apropiada de los extractos antigénicos de las especies heterólogas de pescado ahumado. El suero anti-PSS se bloqueó con 0,5 mg del extracto antigénico de trucha (PST) y 0,5 mg del de palometa (PSP) por ml de suero diluido. El suero anti-PST se bloqueó con 1,5 mg/ml de los extractos antigénicos de salmón (PSS) y de palometa (PSP), y el suero anti-PSP se bloqueó con 0,1 mg/ml de los extractos antigénicos de salmón (PSS) y de trucha (PST). Las mezclas de cada suero con los extractos antigénicos heterólogos se incubaron durante 1 h a 37°C y se utilizaron directamente en la técnica de ELISA indirecto.

III.2.3. TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS

III.2.3.1. Técnica del ELISA indirecto

En esta técnica, los antígenos se fijan por adsorción pasiva a una superficie inerte (placas de poliestireno de 96 pocillos o paletas de poliestireno). A continuación se incorporan los anticuerpos específicos, que al reconocer al antígeno quedan unidos a él. El complejo formado se detecta por un segundo anticuerpo marcado con una enzima, que reconoce como antígenos a los anticuerpos específicos. La reacción se visualiza porque al actuar la enzima sobre un sustrato adecuado se libera un compuesto coloreado, que se puede cuantificar espectrofotométricamente (Figura 13).

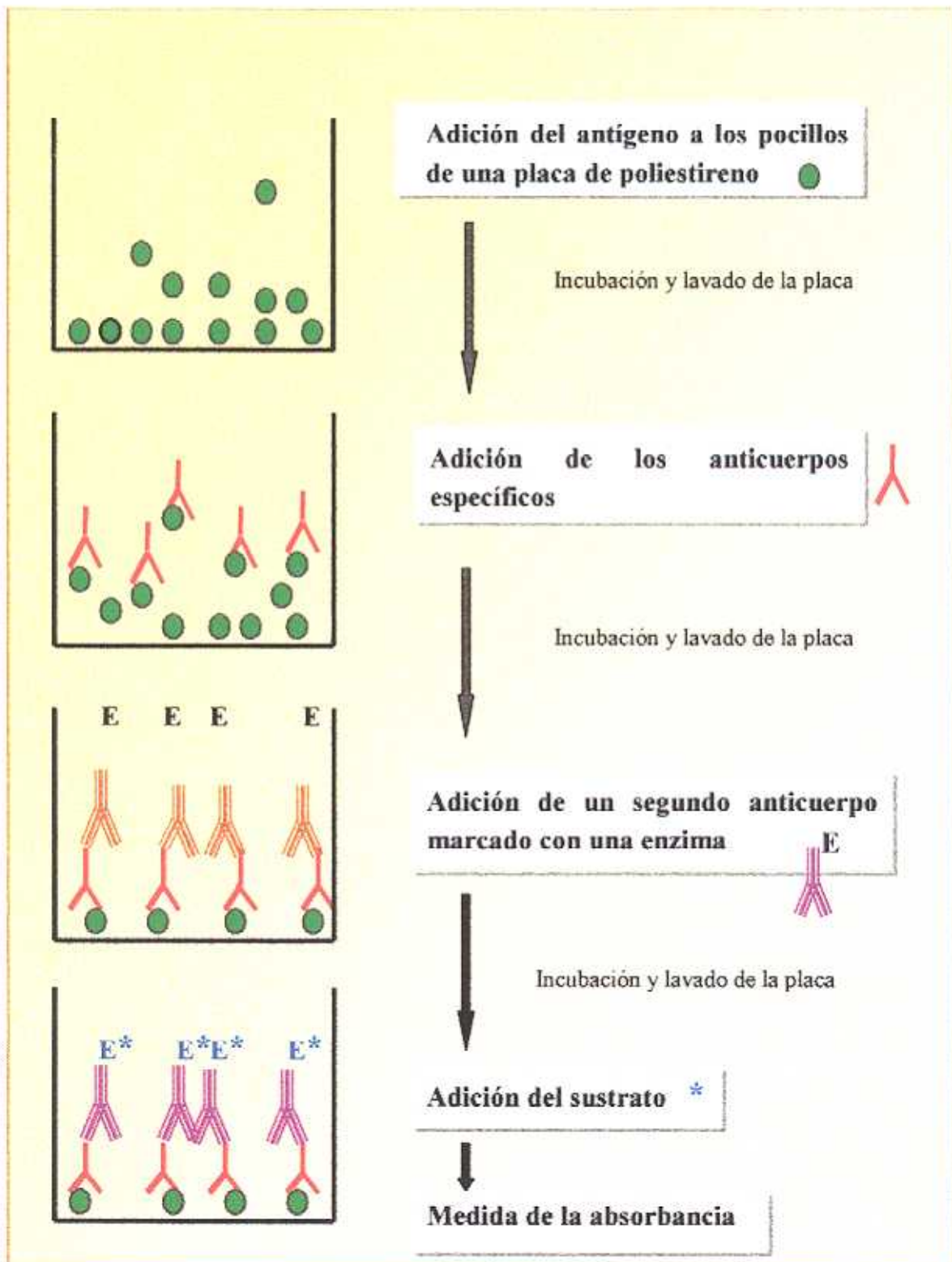


Figura 13. Modelo teórico de un ELISA indirecto para la detección y cuantificación de un antígeno en una muestra problema.

III.2.3.1.1. Preparación de la muestra antigénica

Para la preparación de las muestras de salmón, trucha y palometa utilizadas como antígenos en la técnica de ELISA indirecto, se procedió como se describe a continuación: 40 g de salmón, trucha o palometa ahumados se homogeneizaron en 200 ml de solución salina (8,5 g/l NaCl), se agitaron durante 2 h a 20°C y se centrifugaron a 3.500 x g durante 30 min a 10°C. Los sobrenadantes se filtraron a través de un papel de filtro Whatman n° 1 y se analizaron inmediatamente o se conservaron a -20°C hasta su uso.

Para su utilización en el ELISA indirecto, las muestras de salmón se diluyeron 1:300 en tampón PBS, las muestras de trucha 1:45 y las muestras de palometa 1:800 en el mismo tampón.

III.2.3.1.2. Anticuerpos

Se utilizaron los anticuerpos anti-PSS (anti-proteína de salmón), anti-PST (anti-proteína de trucha) y anti-PSP (anti-proteína de palometa), parcialmente purificados mediante precipitación de las inmunoglobulinas con sulfato amónico (ver sección III.2.2.4) y neutralizados con los extractos antigénicos de las especies heterólogas (ver sección III.2.2.5).

III.2.3.1.3. Conjugado

Se empleó un conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de conejo obtenidas en cabra y marcadas con la enzima peroxidasa de rábano (Dako). El conjugado se utilizó diluido 1:2.000 en tampón PBSTM.

III.2.3.1.4. Tampones y reactivos

a) Tampón PBS de pH 7,2

NaCl	—————	(0,14 M)	8,0 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	—————	(8,1 mM)	2,9 g
KH ₂ PO ₄	—————	(1,5 mM)	0,2 g
KCl	—————	(2,7 mM)	0,2 g
Agua destilada			1 l

b) Tampón PBST

Se prepara como el tampón PBS y se le añade un 1% de Tween 20.

c) Tampón PBSTM

Se prepara con el tampón PBST y se le añade un 1% de leche desnatada en polvo.

d) Sustrato

El sustrato empleado fue la solución 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Boehringer Mannheim). Después de 10 min de incubación, la reacción se paró con H_2SO_4 1 M.

e) Solución de tapizado

Gelatina al 1% en tampón PBS.

III.2.3.1.5. Metodología del ELISA indirecto

Los pocillos de una placa de ELISA se sensibilizaron con 100 μl del antígeno correspondiente, diluido en PBS, y la placa se incubó durante 1 h a 37°C, tras lo cual se lavó 5 veces con tampón PBST. A continuación, para tapizar las zonas del pocillo en las que no se hubiera adsorbido el antígeno, se añadieron a cada pocillo 200 μl de gelatina al 1% en tampón PBS. La placa se mantuvo 30 min a 37°C y los pocillos se lavaron 5 veces con tampón PBST para eliminar el exceso de gelatina. Seguidamente, se añadieron a cada pocillo 100 μl de los anticuerpos neutralizados, diluidos en PBSTM y se incubaron en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, los pocillos se lavaron cinco veces con tampón PBST para eliminar los antígenos heterólogos y los anticuerpos libres. A continuación, se depositaron 100 μl del conjugado diluido en tampón PBSTM y, de nuevo, la placa se mantuvo en el agitador de placas de ELISA durante 1 h a temperatura ambiente. Tras lavar los pocillos cinco veces con agua destilada para eliminar los restos del conjugado libre, se añadieron a cada pocillo 150 μl del sustrato TMB y la placa se agitó durante 10 min a temperatura ambiente. La reacción se paró adicionando 50 μl de H_2SO_4 1 M. El color azul, resultante de la degradación

del sustrato por la enzima, vira a amarillo al parar la reacción. La intensidad de la reacción se cuantificó midiendo la absorbancia de cada pocillo a 450 nm en un lector espectrofotométrico de placas de ELISA.

En cada ensayo se realizaron los siguientes controles:

- Control del antígeno: gelatina + anticuerpo + conjugado + sustrato
- Control del anticuerpo: antígeno + gelatina + conjugado + sustrato
- Control del conjugado: gelatina + conjugado + sustrato
- Control del sustrato: gelatina + sustrato

Si la absorbancia a 450 nm de alguno de los controles era mayor de 0,150 el experimento se consideraba nulo.

III.2.3.2. Técnica del ELISA indirecto en paletas

La técnica del ELISA indirecto en paletas es una técnica rápida y sencilla, que requiere escaso instrumental para su desarrollo.

III.2.3.2.1. Preparación de la muestra

La preparación de las muestras de salmón, trucha y palometa utilizadas como antígenos en la técnica de ELISA indirecto en paletas se llevó a cabo como se describe en la sección III.2.3.1.1.

Las muestras antigénicas de salmón, trucha y palometa se utilizaron diluidas 1:10 en PBS.

III.2.3.2.2. Anticuerpos

Se utilizaron los anticuerpos policlonales anti-PSS, anti-PST y anti-PSP previamente neutralizados y diluidos 1:2.000 en PBSTM (sección III.2.2.5). El suero anti-PSS se neutralizó con 0,75 mg de PST y 0,5 mg de PSP por mililitro de suero diluido. El suero anti-PST se neutralizó con 1,5 mg de los extractos antigénicos PSS y PSP, y el suero anti-PSP fue neutralizado con 0,1 mg de los extractos antigénicos de salmón y trucha.

III.2.3.2.3. *Conjugado*

Se empleó un conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de conejo obtenidas en cabra y marcadas con la enzima peroxidasa de rábano (Dako), diluido 1:1.500 en PBSTM.

III.2.3.2.4. *Tampones y reactivos*

Todos los tampones y reactivos se prepararon como se describe en la sección III.2.3.1.4.

III.2.3.2.5. *Metodología del ELISA indirecto en paletas*

Las paletas de poliestireno (Nunc) se introdujeron en criotubos de polipropileno (Nunc) en los que se había depositado 1 ml de la muestra antigénica correspondiente (Figura 14). Durante 15 min, se enroscaron y desenroscaron varias veces los tapones de los criotubos para facilitar la adsorción de los antígenos a las paletas. A continuación, las paletas y los criotubos se lavaron cuidadosamente con agua corriente evitando invertir los tapones. Seguidamente, las paletas se incubaron durante 15 minutos con 1 ml de los anticuerpos policlonales neutralizados correspondientes, diluidos en PBSTM. Finalizada la incubación, las paletas se lavaron de nuevo con agua del grifo para eliminar aquellos anticuerpos que no hubiesen reaccionado. A continuación, se incubaron las paletas durante 15 minutos con 1 ml de conjugado diluido en PBSTM. Tras lavar las paletas con agua del grifo para eliminar los restos de conjugado libre, se introdujeron en un criotubo que contenía 1 ml de sustrato. La reacción positiva se identificó visualmente por el desarrollo de color azul. Todas las incubaciones se realizaron a 20°C.

III.2.4. TÉCNICAS GENÉTICAS

III.2.4.1. *Elección de los marcadores genéticos*

Para la elección de los marcadores, se comenzó por realizar una búsqueda bibliográfica de secuencias de genes que pudieran resultar adecuados al objetivo de este trabajo. Interesaban genes con regiones conservadas en diferentes especies para amplificar el mismo fragmento de ADN en todas ellas, pero a la vez, que tuvieran suficientes diferencias como

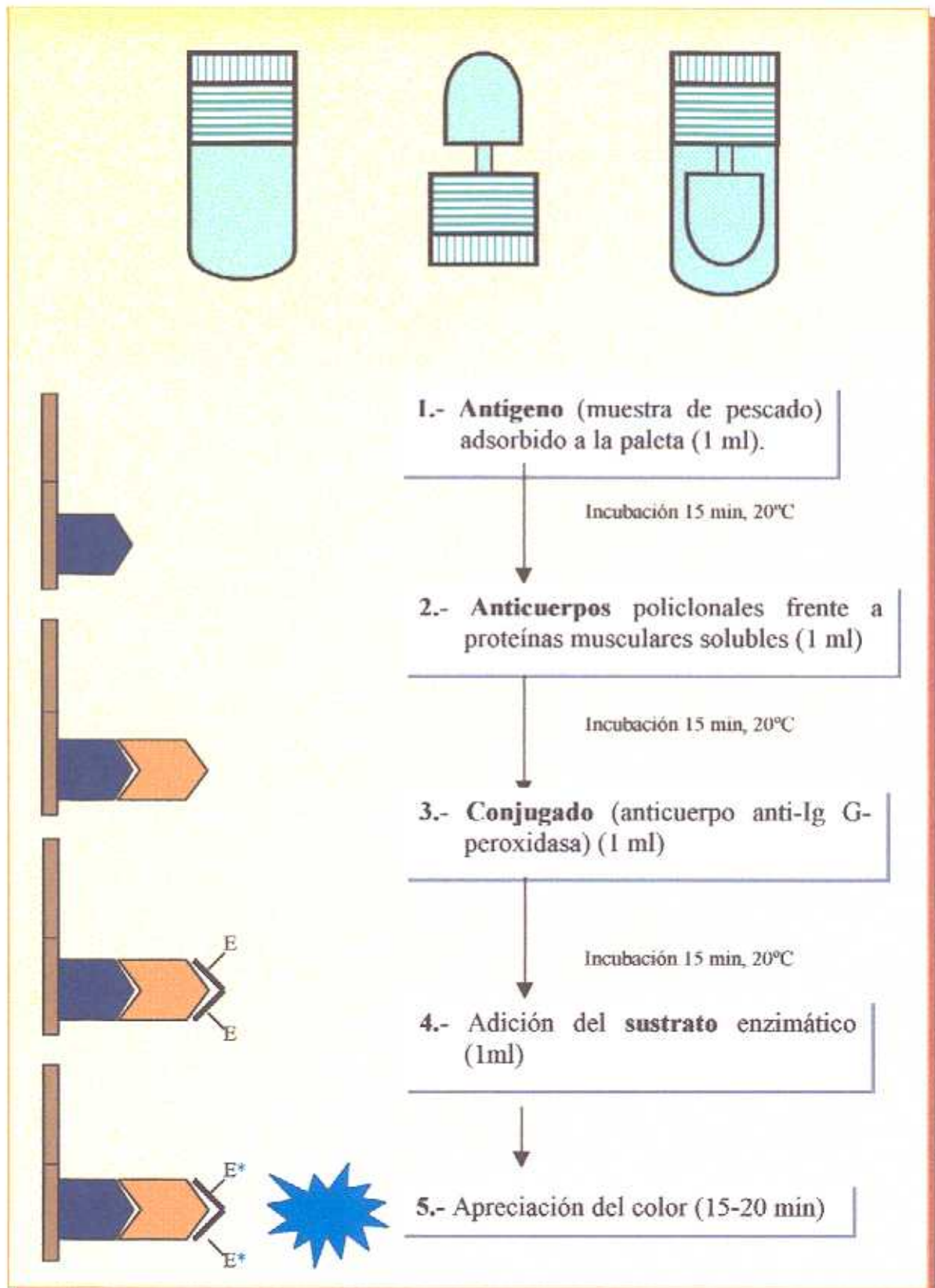


Figura 14. ELISA indirecto en paletas para la identificación rápida de especies de pescado ahumado utilizando anticuerpos policlonales.

para distinguir una especie de otra.

Finalmente se eligieron tres genes mitocondriales (citocromo *b*, citocromo oxidasa II y 16S ARNr) y dos genes nucleares (5S ARNr y *p53*).

III.2.4.2. Diseño de cebadores

Los cebadores utilizados para amplificar los marcadores genéticos elegidos se exponen a continuación:

III.2.4.2.1. Gen Citocromo *b*

CYTB-1: 5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA- 3' (26 nucleótidos, $T_m = 69^\circ\text{C}$)

CYTB-2: 5'-CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A- 3' (25 nucleótidos, $T_m = 67^\circ\text{C}$)

Estos cebadores fueron diseñados por Barlett y Davidson (1991), para la amplificación de una región conservada del gen citocromo *b* en especies de túnidos.

La síntesis de los oligonucleótidos CYTB-1 y CYTB-2 se realizó en el Centro de Secuenciación Automatizada de ADN, ubicado en el Departamento de Microbiología II de la Universidad Complutense de Madrid.

III.2.4.2.2. Gen Citocromo oxidasa II (*COII*)

Para diseñar cebadores que amplificaran el gen mitocondrial de la subunidad II de la citocromo oxidasa (*COII*), se buscaron las secuencias de este gen disponibles en las bases de datos GenBank y EMBL. A continuación, utilizando el programa PRIME del paquete informático Genetic Computer Group (GCG, Universidad de Wisconsin), se diseñaron los cebadores CYTO-1 y CYTO-2 sobre las secuencias disponibles del gen *COII* de salmón y trucha.

Con el programa FASTA del mismo paquete informático, se compararon las secuencias de los cebadores diseñados con toda la base de datos de secuencias para comprobar la concordancia de éstos con el gen *COII* en todas las especies disponibles. La síntesis de los cebadores CYTO-1 y CYTO-2 la realizó una casa comercial (ISOGEN).

CYTO-1: 5'-TCC TTC ATT TTC ACG ACC- 3' (18 nucleótidos)

CYTO-2: 5'-TGC GTC CAT TTT TAC ACC- 3' (18 nucleótidos)

III.2.4.2.3. *Gen 16S ARNr*

Los cebadores 16S-1 y 16S-2, utilizados para amplificar parte del gen 16S ARNr, se diseñaron como se ha descrito en el gen COII, a partir de las secuencias disponibles en las bases de datos GenBank y EMBL y utilizando los programas del paquete informático GCG.

Las secuencias de nucleótidos de estos cebadores, que fueron sintetizados por ISOGEN, son:

16S-1: 5'-CAC CAC AAC ATA CAT ACC C- 3' (19 nucleótidos)

16S-2: 5'-CGT TAA ACC CAT AGT CAC AG- 3' (20 nucleótidos)

III.2.4.2.4. *Gen p53*

Kusser y col. (1994), diseñaron este par de cebadores basándose en una región de ADN complementario del gen supresor de tumores *p53* de la trucha arco iris. Los cebadores p53-5 y p53-7 amplifican los exones 5 y 6 de dicho gen, entre los que se encuentra un intrón.

p53-5: 5'-ACT CGC CAG ACC TGA ACA AG- 3' (20 nucleótidos,
T_m = 57°C)

p53-7: 5'-CTG AGG AGG CTC ATA GGG GA- 3' (20 nucleótidos,
T_m = 59°C)

La síntesis de estos cebadores se realizó en el Centro de Secuenciación Automatizada de ADN de la U.C.M.

III.2.4.2.5. *Gen 5S ARNr*

En los organismos eucariotas superiores, el gen 5S ARNr consta de una secuencia conservada de 120 pb y de un espaciador no codificante (NTS) de longitud variable. Pendas y col. (1995), diseñaron los cebadores que a continuación se detallan basándose en la región conservada del gen 5S ARNr de la trucha arco iris.

5S-1: 5'-TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC- 3' (21 nucleótidos,

$T_m = 63^\circ\text{C}$)

5S-2: 5'-CAG GCT GGT ATG GCC GTA AGC- 3' (21 nucleótidos,

$T_m = 63^\circ\text{C}$)

La localización de los cebadores 5S-1 y 5S-2 en la región codificante 5S corresponde a los nucleótidos 1-21 y 24-45, respectivamente.

El Centro de Secuenciación Automatizada de ADN de la U.C.M. sintetizó estos oligonucleótidos.

III.2.4.3. Extracción del ADN

En el desarrollo de este trabajo se utilizaron diversos métodos de extracción del ADN a partir de muestras de pescado fresco y ahumado. (Laird y col., 1991; Bartlett y Davidson, 1991; Taggart y col., 1992; DeSalle y col., 1993).

III.2.4.3.1. Método de extracción de Laird y col. (1991)

Este protocolo fue descrito por Laird y col. (1991), para el aislamiento de ADN a partir de tejidos de mamíferos. Para ello se homogeneizaron 100 mg de muestra (tejido muscular) con 500 μl de tampón de lisis (100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 5 mM EDTA; 0,2% SDS; 200 mM ClNa) y 200 $\mu\text{g/ml}$ de proteinasa K. La lisis se desarrolló a 55°C durante toda la noche y a continuación se centrifugó el lisado a $15.000 \times g$ durante 10 min.

El sobrenadante se añadió a otro tubo que contenía un volumen igual de isopropanol y se mantuvo a -80°C durante 30 minutos. El ADN precipitado se separó por centrifugación a $15.000 \times g$ durante 20 min y se lavó dos veces con etanol (70%), en agitación, durante una hora. Tras una última centrifugación, se decantó el etanol, se secó al vacío el sedimento y se resuspendió el ADN en 100 μl de agua estéril.

III.2.4.3.2. Método de extracción de Bartlett y Davidson, (1991)

El método fue desarrollado por Bartlett y Davidson (1991), para la extracción de ADN de túnidos y está basado en un procedimiento descrito previamente para el aislamiento de ARN (Chomczynski y Sacchi, 1987). En

este caso, 3,5 g de muestra (tejido muscular) se trocearon y homogeneizaron con 10 ml de tampón de lisis (4 M tiocianato de guanidina, 25 mM citrato sódico, 0,5% sarcosyl y 0,1 M 2-mercaptoetanol) y 1,5 ml de acetato sódico 2 M. Posteriormente, se añadieron 10 ml de fenol saturado en agua y 4 ml de cloroformo-álcohol isoamílico (49:1). Se agitó vigorosamente y se depositó en hielo durante 15 min. A continuación, las muestras se centrifugaron a 10.000 x g durante 20 min a 4°C y los sedimentos se lavaron con 5 ml de etanol (70%) helado. Finalmente, se secó a vacío el sedimento y se resuspendió en agua estéril.

III.2.4.3.3. *Método de extracción de Taggart y col. (1992)*

Este método fue desarrollado por Taggart y col. (1992) para el aislamiento rutinario de ADN de salmónidos y se realizó como se describe a continuación: 100 mg de muestra (tejido muscular) se mezclaron con 390 µl de tampón de lisis (0,2 M EDTA, 0,5% sarcosyl) y 10 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y la mezcla se incubó durante toda la noche a 42°C. Terminada la lisis, se añadieron 2 µl de ARN-asa (10 mg/ml), se agitó la mezcla y se incubó 1 h a 37°C. A continuación, se añadieron 400 µl de fenol (equilibrado a pH 8). Los tubos se agitaron vigorosamente durante 20 s y más suavemente durante 10 min. Seguidamente, se añadieron 400 µl de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1) y se agitó de la misma manera que con el fenol equilibrado. Se centrifugaron los tubos a 12.000 x g durante 3 min. La fase acuosa se recogió con una punta de pipeta ancha para evitar dañar la molécula de ADN y se depositó en un tubo limpio junto con 2 volúmenes de etanol helado, donde se dejó precipitar durante 10 min. Posteriormente, se centrifugó y se lavó dos veces el sedimento durante 1 h con etanol (70%). Finalmente, el sedimento lavado se dejó secar a temperatura ambiente y el ADN se resuspendió en 100 µl de agua estéril.

III.2.4.3.4. *Método de extracción de DeSalle y col. (1993)*

Este método permite extraer ADN total (genómico y mitocondrial) a partir de tejidos animales. El protocolo se desarrolló como se describe a continuación: 100 mg de tejido muscular u ovárico se homogeneizaron en 500

µl del tampón de extracción TSM (0,2 M Tris-base, 0,1 M EDTA, 1% SDS) y 6 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Las muestras se incubaron toda la noche a 55°C en agitación. Después de la incubación, los tubos se colocaron en hielo durante 30 min, se centrifugaron a $11.500 \times g$ durante 10 min y los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios. El ADN se extrajo dos veces con un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en una relación 25:24:1, y otra vez con un volumen igual de cloroformo. Seguidamente, el ADN se precipitó con dos volúmenes de etanol a -20°C durante 30 min. Se centrifugó a $15.000 \times g$ durante 10 min, se descartó el etanol y se resuspendió el ADN en 500 µl de tampón TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1 mM EDTA). A continuación se añadieron 50 µl de acetato amónico 5 M y 1 ml de etanol absoluto para precipitar el ADN por segunda vez. Tras invertir varias veces el tubo, se dejó reposar 20 min a -20°C. Finalmente, se centrifugó a $15.000 \times g$ durante 10 min, se descartó el etanol, se dejó secar el sedimento de ADN y se resuspendió en 100 µl de agua estéril. La concentración de ADN se estimó midiendo la absorbancia a 260 nm.

III.2.4.4. Estimación de la concentración y calidad del ADN

Para estimar la concentración de ADN se puede emplear un método electroforético (analizando la muestra problema en un gel de agarosa junto a patrones de concentración conocida) y/o un método espectrofotométrico. Para cuantificar el ADN o ARN espectrofotométricamente se realizan lecturas de una dilución adecuada de la muestra a 260 nm (absorbancia máxima de ADN y ARN) y 280 nm (absorbancia máxima de las proteínas). La lectura a 260 nm permite calcular la concentración de ácido nucleico en la muestra. Una unidad de densidad óptica (1 D.O.) corresponde aproximadamente a 50 µg/ml de ADN bicatenario, 40 µg/ml de ADN monocatenario o ARN y a 20 µg/ml de oligonucleótido monocatenario (Sambrook y col., 1989).

ADN/ARN	Absorbancia máxima a 260 nm
Proteínas	Absorbancia máxima a 280 nm
Sales minerales	Absorbancia máxima a 230 nm

La pureza del ADN se comprueba utilizando las relaciones de

absorbancia ABS 260/280 y 230/260. Una muestra de ADN pura presenta una relación ABS 260/280 comprendida entre 1,8-2,0. Si existe contaminación con proteínas o fenol, la relación será significativamente menor. La relación ABS 230/260 debe estar comprendida entre 0,3 y 0,7.

Por lo tanto, para que nuestra muestra de ADN tenga una calidad aceptable:

$$\text{ABS } 260/280 = 1,8-2,0$$

$$\text{ABS } 230/260 = 0,3-0,7$$

La integridad del ADN obtenido se puede apreciar electroforéticamente. Para ello, las muestras de ADN se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa D-1 (Hispanlab) al 1,5% disuelta en tampón TAE (0,04 M Tris-acetato, 0,001 M EDTA) al que se incorporaron 0,5 µg/ml de bromuro de etidio para visualizar el ADN bajo luz ultravioleta. La banda de ADN extraído se comparó con el patrón XIV, marcador de peso molecular de ADN (Boehringer Mannheim). Cuanto más íntegro está el ADN, la banda que se observa está más definida y es de mayor tamaño; sin embargo, un ADN difuminado en el gel y de un peso molecular pequeño es un ADN degradado.

III.2.4.5. Amplificación de fragmentos seleccionados de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar los fragmentos génicos seleccionados (sección III.2.4.1) se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando ADN extraído de las muestras de salmón, trucha y palometa (sección III.2.4.3) y los cebadores descritos en la sección III.2.4.2.

Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en tubos de polipropileno estériles de pared fina y capacidad de 0,6 ml. El volumen final de cada reacción fue de 50 µl. La preparación de las reacciones se realizó en una campana de flujo laminar equipada con lámpara ultravioleta para evitar contaminaciones. Cada reacción contenía:

- Tampón de PCR (Tris-HCl 10mM, pH 8,8; KCl 50 mM y 0,1% Triton X-100). Suministrado por el fabricante a una concentración 10 veces superior a la de uso.
- Cl_2Mg 1,5 mM
- dNTPs: 200 μM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP).
- Cebadores
- ADN
- 2 U de ADN polimerasa DynaZyme II (procedente de *Thermus brockianus*)
- Agua estéril (c.s.p. 50 μl)

Las concentraciones de ADN, cebadores y cloruro magnésico se optimizaron para cada gen y juego de cebadores utilizado y, en todos los ensayos, se preparaba además una reacción de control negativa que no contenía ADN. Una vez incorporados al tubo todos los componentes de la reacción, se agitaron y se centrifugaron brevemente para depositar la mezcla en el fondo del tubo antes de introducirlos en el termociclador. La adición de aceite mineral no es necesaria, puesto que el termociclador utilizado (mod. "Progene", Techne) posee tapa calefactada que evita la evaporación.

Una vez finalizados los ciclos de temperatura programados, los productos de PCR se conservaron a 4°C hasta comprobar electroforéticamente el resultado de la amplificación. A continuación, los tubos que contenían productos de interés se conservaron a -20°C hasta su utilización posterior.

A continuación se muestran las condiciones de la reacción de PCR para cada pareja de cebadores:

III.2.4.5.1. Amplificación del gen citocromo *b*

Con los cebadores CYTB-1 y CYTB-2 se amplificó un fragmento del gen citocromo *b* de 358 pb a partir de muestras frescas y ahumadas de salmón atlántico y trucha arco iris.

La reacción de PCR se preparó incorporando a los componentes comunes de la mezcla (tampón PCR 10x, Cl_2Mg , dNTPs, polimerasa y agua)

50-1.000 ng de ADN y 10 pmol de cada cebador (CYTB 1 y CYTB 2). Una vez mezclados todos los componentes de la reacción, los tubos se sometieron a los siguientes ciclos de temperatura:

94°C	3 min	}	x1
92°C	1 min	}	x30
50°C	1 min		
72°C	2 min		
72°C	10 min	}	x1

III.2.4.5.2. Amplificación del gen COII

La utilización de los cebadores CYTO-1 y CYTO-2 permitió amplificar un fragmento de 464 pb a partir de muestras crudas y ahumadas de salmón y trucha.

Cada reacción de amplificación contenía 2-20 ng de ADN y 50 pmol de cada cebador. Los ciclos de temperatura utilizados fueron:

94°C	3 min	}	x1
94°C	30 seg	}	x35
49°C	30 seg		
72°C	1 min		

III.2.4.5.3. Amplificación del gen 16S ARNr

Con la pareja de cebadores 16S-1 y 16S-2, se amplificó un fragmento de 950 pb del gen mitocondrial 16S ARNr a partir del ADN de muestras frescas y ahumadas de salmón y de trucha.

Para ello se utilizaron 20-50 ng de ADN y 50 pmol de cada cebador en las reacciones de amplificación. Los ciclos térmicos empleados en la reacción en cadena de la polimerasa fueron:

94°C	3 min	}	x1
------	-------	---	----

92°C	30 seg	}	x35
55°C	30 seg		
72°C	1 min		

III.2.4.5.4. Amplificación del gen *p53*

Utilizando los cebadores *p53-5* y *p53-7*, se amplificó un fragmento de ADN nuclear, de longitud variable según las especies, correspondiente a los exones 5 y 6 del gen *p53*. Para ello se necesitaron 1.000 ng de ADN y 50 pmol de cada cebador por reacción. Las condiciones programadas en el termociclador fueron:

94°C	3 min	}	x1
92°C	1 min	}	x35
56°C	1 min		
72°C	2 min		
72°C	10 min	}	x1

III.2.4.5.5. Amplificación del gen *5S ARNr*

La pareja de cebadores *5S-1* y *5S-2* se utilizó para amplificar varios fragmentos de ADN nuclear, de longitud variable según la especie, correspondientes al gen *5S ARNr*. En este caso, se utilizaron entre 0,1-1 ng de ADN y 10 pmol de cada cebador. Las condiciones de la reacción PCR fueron:

94°C	3 min	}	x1
92°C	45 seg	}	x35
65°C	45 seg		
72°C	45 seg		

III.2.4.6. Electroforesis de los productos de PCR

Los productos de la amplificación por PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa para visualizar y estimar el tamaño de los fragmentos de ADN.

La agarosa es un polímero lineal cuya estructura básica es D-galactosa-3,6-anhidro L-galactosa, extraída de algas marinas. Las moléculas de ADN (cargadas negativamente) migran a través del gel hacia el ánodo cuando se aplica una corriente alterna y tal migración es inversamente proporcional al $\log_{10}$ del número de pares de bases (Helling y col., 1974). Por ello, las moléculas con un peso molecular mayor migran más lentamente que las de peso molecular inferior.

III.2.4.6.1. *Tampones, geles y soluciones empleadas*

1. Gel

Se compone de agarosa D-1 (Hispanlab) al 1,5% disuelta en tampón TAE al que se adicionan 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio para visualizar el ADN bajo luz ultravioleta.

2. Tampón Tris Acetato (TAE)

Tris base	_____	242,0 g
Ácido acético glacial	_____	57,1 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	_____	100,0 ml
Agua milliQ	_____	840,0 ml

3. Solución de transporte

Azul de bromofenol	_____	0,05% (w/v)
Glicerol	_____	60,0% (w/v)
Agua destilada	_____	resto

4. Patrón 100 bp DNA Ladder (GibcoBRL)

El patrón consiste en 15 bandas correspondientes a fragmentos de ADN que difieren entre ellos en 100 pb, entre 100 y 1.500 pb, más un fragmento adicional de 2.072 pb. La intensidad de la banda de 600 pb es aproximadamente 2 ó 3 veces mayor que la del resto.

5. Patrón BioMarker Low (50 pb) (BioVentures)

Contiene bandas de 1.000, 700, 525, 500, 400, 300, 200, 100 y 50

pares de bases.

6. Patrón Mass Ruler (BIO-RAD)

Consiste en cinco bandas de peso molecular y concentración conocida: 10 ng de 100 pb; 20 ng de 200 pb; 50 ng de 500 pb; 70 ng de 700 pb; y 100 ng de 1.000 pb.

7. Patrón XIV marcador de peso molecular de ADN, (Boehringer)

Contiene 15 bandas de fragmentos de ADN con un tamaño de 100 a 1.500 pb y una banda adicional de 2.642 pb.

III.2.4.6.2. *Preparación del gel*

En un matraz Erlenmeyer se disolvió la agarosa en tampón TAE calentándolo hasta ebullición en un horno microondas. A continuación, se enfrió la solución hasta una temperatura aproximada de 60°C y se añadieron 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Finalmente, el gel se vertió en la cubeta de electroforesis y se introdujo el peine formador de los pocillos.

Una vez que el gel se polimerizó, se retiró el peine y se añadió un volumen suficiente de tampón de electroforesis TAE para cubrir totalmente el gel, quedando así listo para cargar las muestras en los pocillos.

III.2.4.6.3. *Preparación de las muestras*

En cada pocillo del gel se depositaron 8 µl del producto de amplificación por PCR mezclados con 2 µl de la solución de transporte. En todos los ensayos se reservaba un carril para introducir un patrón adecuado de tamaño molecular de ADN.

III.2.4.6.4. *Condiciones de separación*

Las electroforesis se realizaron manteniendo el voltaje constante (100 V) durante un tiempo de aproximadamente 1 h. Finalizada la electroforesis, las bandas de ADN del gel se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se registraron con un sistema de documentación de geles, GelDoc System 1.000 PC (BioRad).

III.2.4.7. Secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados por PCR

III.2.4.7.1. Purificación de los productos de PCR

La secuenciación de los fragmentos de ADN amplificado requiere purificar previamente la banda de interés de los productos de PCR para separar el ADN de restos de agarosa, cebadores y nucleótidos sobrantes. El procedimiento que se llevó a cabo fue el siguiente: 120 μ l de producto de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa LM-2 (Hispanlab) al 1%, con 1 μ g/ml de bromuro de etidio, a 100 V durante 90 min. La banda de ADN se cortó bajo luz UV y se purificó utilizando el kit de extracción QIAquick Gel (QIAGEN) como se describe a continuación:

- La banda de ADN se incubó durante 10 min a 50°C con 3 volúmenes del tampón QG del kit de extracción.
- Una vez que la mezcla se disolvió y adquirió un color amarillo (indicador de un pH adecuado), se mezcló con un volumen de isopropanol igual al del gel.
- A continuación, se aplicó la mezcla en una columna QIAquick introducida en un tubo de microcentrífuga y se centrifugó durante 1 min a 10.000 x g.
- Se descartó el eluato, se añadieron 0,5 ml de tampón QG a la columna y se centrifugó de nuevo durante 1 min a 10.000 x g.
- La columna se lavó añadiendo 0,75 ml de tampón PE y centrifugando durante 1 min.
- Finalmente, la columna se introdujo en un tubo limpio y el ADN se eluyó de la matriz con 30 μ l de agua milliQ estéril y centrifugando 1 min a 10.000 x g.

Todos los tampones empleados fueron suministrados por el fabricante del kit.

La purificación de los fragmentos amplificados de los genes citocromo *b*, citocromo oxidasa II, 16S ARNr, *p53* y 5S ARNr se llevó a cabo por este

método.

III.2.4.7.2. *Secuenciación de los productos de PCR purificados*

Los productos de PCR purificados se secuenciaron en el Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Madrid) utilizando el cebador CYTB-1 para el gen citocromo *b*, el cebador CYTO-1 para el gen citocromo oxidasa II, los cebadores 16S-1 y 16S-2 para el gen 16S ARNr, ya que, debido a la longitud de este gen, fue necesario secuenciarlo en ambas direcciones y el cebador p53-7 para el gen *p53*. La secuenciación se realizó con el kit dRhodamine Terminator Cycle Sequencing (Perkin/Elmer) en un secuenciador automático ABI PRISM modelo 377 (Perkin/Elmer).

La secuenciación automática se realiza con un kit que consta de una mezcla que contiene tampón de la reacción, cloruro de magnesio, desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), la enzima ADN polimerasa y didesoxiterminadores marcados con cuatro diclororodaminas (dR6G, dROX, dR110, dTAMRA), cada una de ellas con una absorción máxima a una longitud de onda determinada. A esta premezcla se añade el ADN (50 ng) y el cebador. La temperatura de hibridación del cebador con el ADN diana de la reacción ha de ser 5°C inferior a la temperatura de hibridación del cebador, y la temperatura de elongación es de 60°C. Los productos de la reacción se visualizan en geles de poliacrilamida, en donde cada base se corresponde con una banda de color, y a su vez con un pico del cromatograma.

III.2.4.8. **Análisis informático de las secuencias de los productos de PCR**

Para analizar las secuencias se utilizó el paquete de programas Genetic Computer Group (GCG), Versión 9.0 (Universidad de Wisconsin).

En primer lugar, se utilizó el programa SEQED, que introduce, modifica y construye secuencias partiendo de otras ya existentes. Con el programa PILEUP se analizaron las secuencias del mismo gen pertenecientes a distintas muestras y, con el programa PRETTY, se obtuvo la secuencia

consenso de todas las secuencias alineadas y se apreciaron las diferencias entre ellas. Asimismo, se utilizó el programa MAP, que indica los puntos de corte de enzimas de restricción sobre una secuencia de nucleótidos y traduce la secuencia de nucleótidos a aminoácidos.

III.2.4.9. Estudio del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

En la mayoría de los casos no fue necesario purificar los productos de PCR como paso previo a la digestión con endonucleasas de restricción.

Las digestiones de los genes citocromo oxidasa II, 16S ARNr y *p53*, se llevaron a cabo en volúmenes de 20 µl con 14 µl de ADN amplificado, la enzima de restricción correspondiente y 2 µl del tampón de digestión 10x recomendado por el fabricante. Las digestiones del gen citocromo *b* se realizaron en un volumen total de 30 µl, con 20 µl de ADN, la enzima de restricción correspondiente y 3 µl del tampón de digestión 10x.

Los fragmentos de ADN resultantes se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa MS-8 (Hispanlab) al 3%, con 1 µg/ml de bromuro de etidio, durante 1 hora a 100 V. El tamaño de los fragmentos se estimó por comparación con un marcador comercial de tamaño molecular (BioVentures).

III.2.4.9.1. Gen citocromo *b*

Los productos de PCR obtenidos con los cebadores CYTB-1 y CYTB-2 a partir de muestras frescas y ahumadas de salmón, trucha y palometa se digirieron con endonucleasas de restricción sin ser purificados previamente. Se utilizaron dos enzimas: *Eco* RV y *Taq* I (New England Biolabs, Beverly, USA). Las digestiones se llevaron a cabo con 10 U de enzima por reacción. Las reacciones de digestión se incubaron durante 3 horas a 37°C (*Eco* RV) o a 65°C (*Taq* I).

III.2.4.9.2. Gen citocromo oxidasa II (*COII*)

Las endonucleasas *Nci* I y *Sau* 3AI (New England Biolabs) se

utilizaron para digerir los productos de PCR del gen citocromo oxidasa II de muestras frescas y ahumadas de salmón atlántico y trucha arco iris. Las digestiones se realizaron a 37°C durante 3 horas, con 10 U de enzima y empleando como ADN el producto de PCR sin purificar.

III.2.4.9.3. *Gen 16S ARNr*

Las enzimas de restricción que mostraron polimorfismo entre el salmón atlántico y la trucha arco iris fueron *Hpa* I y *Bst* EII (New England Biolabs). Los fragmentos amplificados del gen 16S ARNr se cortaron sin purificación previa con estas dos endonucleasas. Las digestiones con *Hpa* I se realizaron con 15 U de enzima y las de *Bst* EII con 50 U. Las incubaciones fueron de 15 h a 37°C (*Hpa* I) o a 60°C (*Bst* EII). Los fragmentos de ADN digerido se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa D-1 (Hispanlab) al 1,5% en tampón Tris acetato, con 1 µg/ml de bromuro de etidio, durante 1 hora a 100 V.

III.2.4.9.4. *Gen p53*

Los fragmentos de ADN amplificados con los cebadores p53-5 y p53-7, a partir de muestras ahumadas de salmón y de trucha, se trataron con las endonucleasas de restricción *Eco* RV, *Taq* I y *Hinf* I (New England, Biolabs). Los productos de PCR se digirieron sin purificación previa, con 10 U (*Eco* RV y *Taq* I) o con 20 U (*Hinf* I) de la enzima correspondiente, durante 3 h a 37°C (*Eco* RV y *Hinf* I) o a 65°C (*Taq* I).

IV. RESULTADOS

IV.1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A LAS PROTEÍNAS MUSCULARES SOLUBLES DE SALMÓN (*Salmo salar*), TRUCHA (*Oncorhynchus mykiss*) Y PALOMETA (*Brama raii*) AHUMADOS

Para la obtención de los inmunosueros, se emplearon tres lotes de dos conejos que se inmunizaron con los extractos antigénicos obtenidos como se describe en el apartado III.2.1.1. La concentración de proteína de los extractos antigénicos, determinada por el método de Markwell y col. (1978), fue:

Salmón (PSS):	250 µg proteína/mg de extracto liofilizado
Trucha (PST):	200 µg proteína/mg de extracto liofilizado
Palometa (PSP):	110 µg proteína/mg de extracto liofilizado

Antes de comenzar el protocolo de inmunización, se extrajo una muestra de sangre a los conejos (S_0), y el suero obtenido se analizó mediante la técnica del ELISA indirecto frente a los extractos antigénicos de interés (PSS, PST, PSP). Después de comprobar que ninguno de los conejos presentaba reactividad inmunológica frente a dichos extractos antigénicos, los animales se consideraron aptos para su inmunización.

Durante la inmunización de los conejos se realizaron cinco sangrías parciales para comprobar si producían anticuerpos frente a las proteínas musculares solubles de los pescados utilizados como antígenos, así como para detectar si existían o no reacciones cruzadas con las proteínas musculares de otras especies de pescado. En la sangría parcial S_1 , efectuada a los 20 días de la primera inoculación, se detectó una reacción inmunológica significativa de los inmunosueros frente a sus respectivos extractos antigénicos. En las sangrías realizadas a los 41, 62, 97 y 122 días, se apreció un incremento significativo de la respuesta inmunológica de los conejos frente a los extractos antigénicos de interés, y por ello, a los 130 días de iniciar el proceso de inmunización se efectuó la sangría final (S_F).

Los inmunosueros procedentes de la sangría final se purificaron parcialmente por precipitación con sulfato amónico (ver sección III.2.2.4.).

IV.2. DESARROLLO DE TÉCNICAS INMUNO-ENZIMÁTICAS (ELISA) PARA IDENTIFICAR SALMÓN (*Salmo salar*), TRUCHA (*Oncorhynchus mykiss*) Y PALOMETA (*Brama raii*) AHUMADOS

IV.2.1. VALORACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES OBTENIDOS EN CONEJOS

Mediante un ELISA indirecto se determinó la capacidad de los anticuerpos policlonales anti-PSS, anti-PST y anti-PSP, precipitados con sulfato amónico, para reconocer los extractos antigénicos de salmón atlántico, trucha arco iris y palometa ahumados.

En primer lugar se determinaron las concentraciones óptimas de los reactivos utilizados en el ensayo, siguiendo la metodología del ELISA indirecto descrita en el apartado III.2.3.1.5. Los resultados obtenidos en experiencias preliminares indicaron que la dilución más apropiada de los anticuerpos anti-PSS, anti-PST y anti-PSP, así como la del conjugado de anti-inmunoglobulinas de conejo-peroxidasa era la de 1:2.000.

En la Figura 15 se puede observar cómo todos los anticuerpos policlonales analizados mostraron una fuerte reactividad cruzada frente a los extractos antigénicos de especies heterólogas. En consecuencia, tales inmunoseros no se podrían utilizar para identificar las especies de pescado ahumado, a no ser que se sometieran previamente a un proceso de purificación.

Para utilizar estos inmunoseros en un ELISA indirecto e identificar las especies de interés, los anticuerpos policlonales anti-PSS, anti-PST y anti-PSP se hicieron específicos de especie mezclándolos con los extractos antigénicos liofilizados de las especies heterólogas, en un proceso conocido como neutralización. Las concentraciones de los extractos antigénicos que permitieron eliminar las reacciones cruzadas de los inmunoseros se determinaron experimentalmente como se describe en la sección III.2.2.5. Este es un procedimiento efectivo para eliminar las reacciones cruzadas sin la

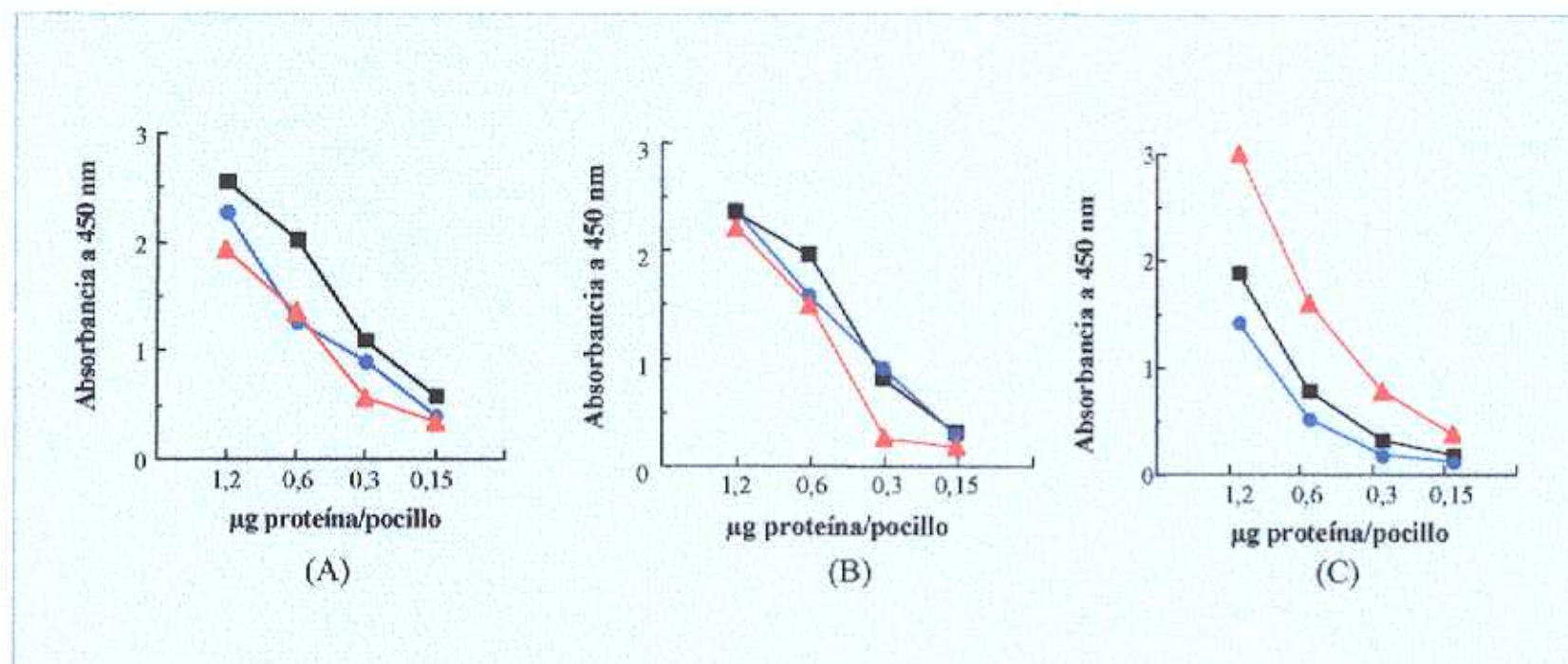


Figura 15. Resultados de un ELISA indirecto para el análisis de las proteínas musculares solubles de muestras de salmón (■), trucha (●) y palometa (▲) ahumados, utilizando los anticuerpos policlonales sin neutralizar anti-PSS (A), anti-PST (B) y anti-PSP (C).

necesidad de utilizar columnas de purificación por cromatografía de afinidad que contengan como ligandos los antígenos heterólogos.

La efectividad de la neutralización de los anticuerpos anti-PSS, anti-PST y anti-PSP se observa en la Figura 16. Una vez que los anticuerpos fueron neutralizados con las proteínas heterólogas, reconocían única y exclusivamente al extracto antigénico frente al cual se produjeron.

IV.2.2. TÉCNICA DEL ELISA INDIRECTO PARA IDENTIFICAR MUESTRAS DE PESCADO AHUMADO

Una vez que se disponía de anticuerpos policlonales específicos de especie, se puso a punto una técnica de ELISA indirecto en placas para la identificación inequívoca de muestras de salmón, trucha y palometa ahumadas.

Previamente a su análisis, cada muestra de pescado ahumado se preparó como se describe en la sección III.2.3.1.1, para obtener un extracto líquido de proteínas solubles que, una vez diluido en tampón PBS, se utilizó como antígeno en la técnica del ELISA indirecto (sección III.2.3.1.5).

Se analizaron muestras de cinco marcas comerciales diferentes de salmón, trucha y palometa ahumadas frente a los anticuerpos policlonales anti-PSS, anti-PST y anti-PSP. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7, donde se observa que una marca comercial de palometa ahumada no fue reconocida por ninguno de los tres inmunosueros (anti-PSS, anti-PST y anti-PSP). Como se puede apreciar en la tabla, los valores de absorbancia de muestras heterólogas para cada inmunosuero son similares a los valores de los controles negativos. Por el contrario, las muestras de salmón alcanzan valores de absorbancia superiores a 1,5 con el inmunosuero anti-PSS, las de trucha valores superiores a 1,2 con el inmunosuero anti-PST y las de palometa valores superiores a 2,5 con el suero anti-PSP. En consecuencia, los resultados obtenidos en el ELISA indirecto permiten identificar claramente las muestras ahumadas de salmón atlántico, trucha arco iris y palometa.

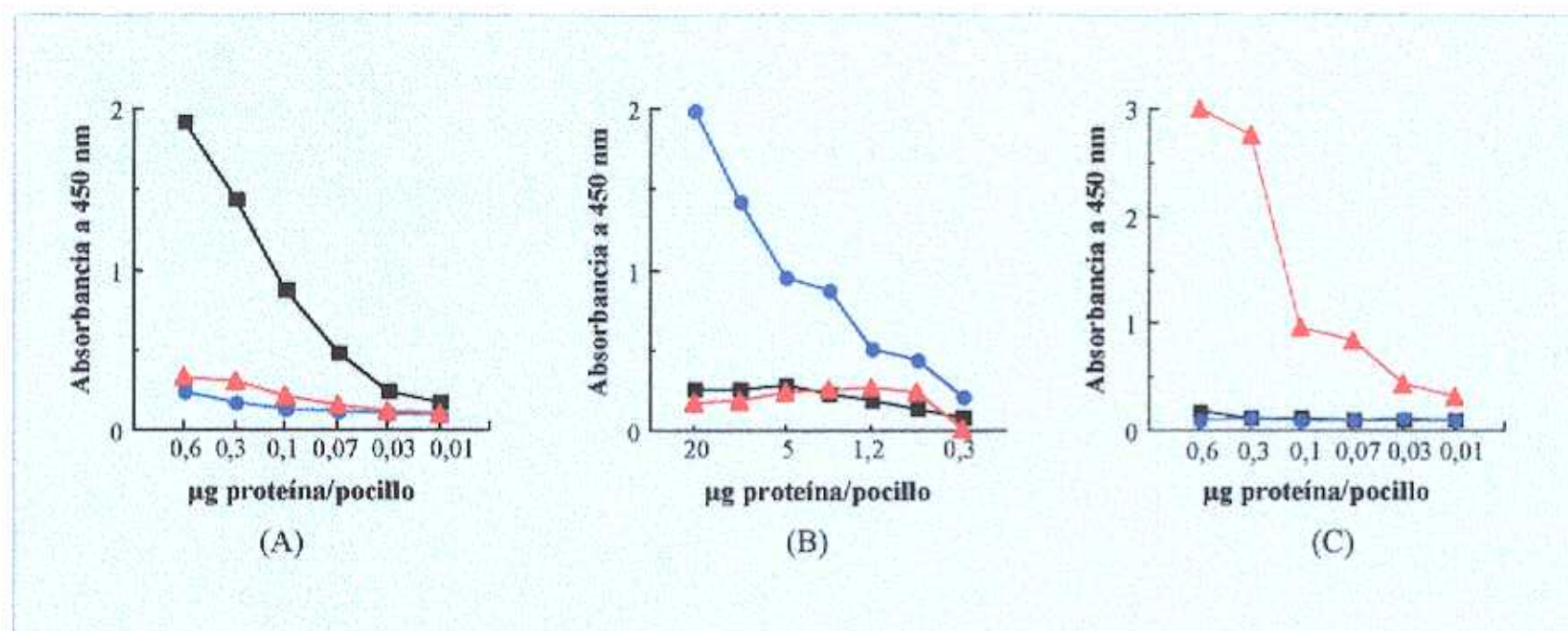


Figura 16. Resultados de un ELISA indirecto para el análisis de las proteínas musculares solubles de muestras de salmón (■), trucha (●) y palometa (▲) ahumados, utilizando los anticuerpos policlonales neutralizados anti-PSS (A), anti-PST (B) y anti-PSP (C).

Tabla 7. Resultados de un ELISA indirecto para el análisis de muestras de pescado ahumado*.

Especie analizada (denominación comercial)	n ¹	Inmunosuero		
		anti-PSS	anti-PST	anti-PSP
Salmón	50	1,861 ± 0,29	0,314 ± 0,02	0,293 ± 0,07
Trucha	50	0,465 ± 0,21	1,256 ± 0,35	0,302 ± 0,16
Palometa	29	0,253 ± 0,34	0,302 ± 0,04	2,532 ± 0,12
	1	0,150 ± 0,21	0,173 ± 0,12	0,256 ± 0,27

* Los resultados se expresan como valores de absorbancia a 450 nm

1) Número de muestras analizadas

IV.2.3. TÉCNICA DEL ELISA INDIRECTO EN PALETAS

Las mismas muestras de pescado ahumado que se analizaron por ELISA indirecto en placas (sección III.2.3.1.1) se analizaron mediante el ELISA indirecto en paletas (sección III.2.3.2). Los extractos líquidos de proteínas solubles se utilizaron en este caso diluidos 1:10 en tampón PBS para sensibilizar las paletas de los tubos.

En la Figura 17 se muestran los resultados obtenidos al analizar muestras de salmón, trucha y palometa ahumadas. El desarrollo de color azul, resultante de la degradación del sustrato TMB por la peroxidasa, permitió comprobar a simple vista la identidad biológica de las muestras. Existe una clara diferencia entre la intensidad de color desarrollada en las muestras positivas para cada inmunosuero y la alcanzada por los controles negativos y muestras heterólogas.

IV.3. DESARROLLO DE TÉCNICAS GENÉTICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SALMÓN (*Salmo salar*), TRUCHA (*Oncorhynchus mykiss*) Y PALOMETA (*Brama raii*) EN MUESTRAS CRUDAS Y AHUMADAS

En primer lugar, con el fin de disponer de un número suficiente de copias de fragmentos específicos de ADN, se seleccionaron genes adecuados y se pusieron a punto técnicas de amplificación de determinados fragmentos génicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La búsqueda bibliográfica de genes apropiados para el objetivo de este trabajo (identificación de especies), condujo a la selección de tres genes mitocondriales (citocromo *b*, citocromo oxidasa II y 16S ARNr) y dos nucleares (*p53* y 5S ARNr). Todos ellos tienen en común que determinados fragmentos de su secuencia de nucleótidos están muy conservados entre los vertebrados. Se consultaron las bases de datos EMBL y GenBank con ayuda del programa STRINGSEARCH del paquete informático GCG, para obtener información sobre cada uno de los genes elegidos y se rescataron las secuencias de salmón, trucha y palometa disponibles como paso previo al diseño de cebadores.

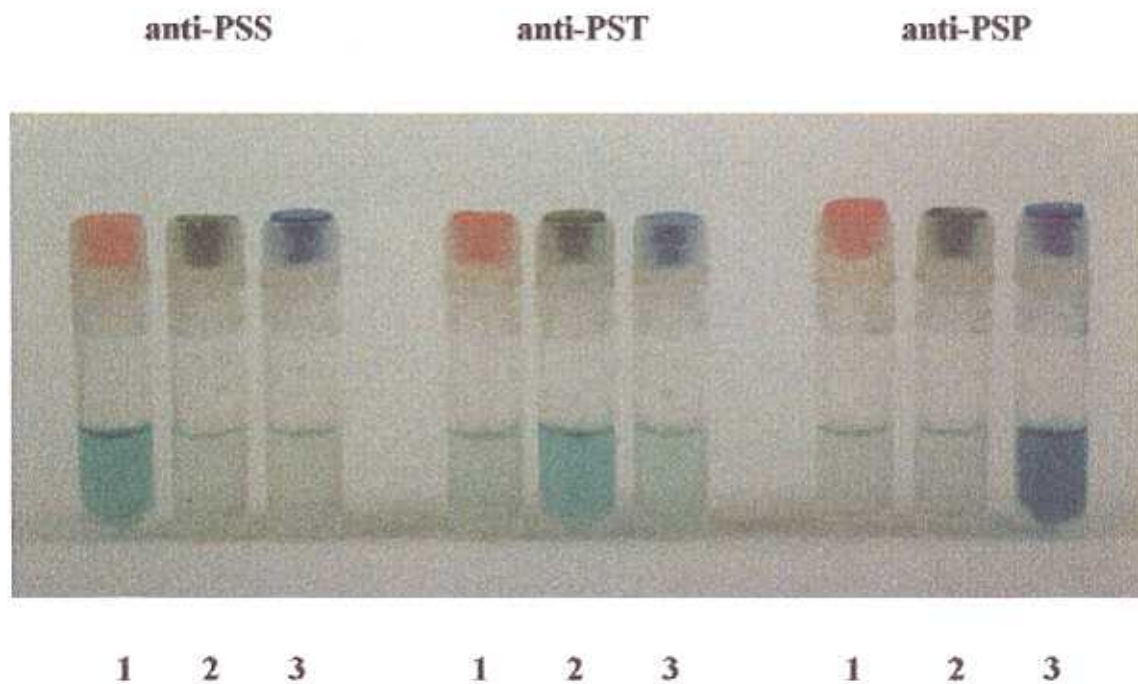


Figura 17. Resultados de un ELISA indirecto en paletas para la identificación de muestras ahumadas de (1) salmón, (2) trucha y (3) palometa, utilizando los anticuerpos policlonales neutralizados anti-PSS, anti-PST y anti-PSP.

IV.3.1. DISEÑO DE LOS CEBADORES

IV.3.1.1. Gen citocromo oxidasa II (COII)

Como base para el diseño de cebadores para la amplificación del gen mitocondrial COII, se utilizaron las siguientes secuencias de las bases de datos EMBL y GenBank:

- L29771 *Oncorhynchus mykiss*, genoma mitocondrial completo (16.660 nucleótidos)
U12145 *Salmo salar*, gen mitocondrial citocromo oxidasa II (934 nucleótidos)
L04501 *Salmo salar*, (Hardiman y col., 1994), gen mitocondrial citocromo oxidasa II (448 nucleótidos)

Mediante el programa PRIME del paquete informático GCG, se obtuvieron un total de 25 parejas posibles de cebadores capaces de amplificar un fragmento del gen COII en una secuencia de salmón rescatada de la base de datos GenBank (U12145). Los parámetros introducidos en el programa PRIME para restringir la búsqueda fueron:

- longitud del fragmento amplificado: 100-900 pb
- Tm: 50-65°C
- diferencia en Tm de los cebadores: < 2°C

A continuación se analizaron las posibilidades de hibridación de cada pareja de cebadores con el resto de secuencias disponibles del gen COII. Así mismo, se comprobó mediante el programa FASTA la especificidad de los cebadores preseleccionados para hibridar con secuencias de genes de la citocromo oxidasa II.

Los cebadores que mejor satisfacían las condiciones que se fijaron como premisas fueron los siguientes:

CYTO-1: 5'-TCC TTC ATT TTC ACG ACC-3' (18 nt, Tm = 47°C)

CYTO-2: 5'-TGC GTC CAT TTT TAC ACC-3' (18 nt, Tm = 47°C)

IV.3.1.2. Gen 16S ARNr

El diseño de cebadores para amplificar el gen 16S ARNr se realizó de forma análoga a lo descrito para el gen COII (sección IV.3.1.1). Como secuencia diana en el programa PRIME se utilizó la del genoma mitocondrial de trucha (L29771). Los parámetros opcionales seleccionados en el programa fueron:

- longitud del fragmento amplificado: 400-1.600 pb
- Tm: 50-65°C
- diferencia en Tm de los cebadores: < 2°C

Igualmente se comprobó la hibridación de las posibles parejas de cebadores con una secuencia de salmón atlántico (U12143) y su especificidad para el gen 16S ARNr.

La pareja de cebadores que mejor cumplía los criterios fijados fue:

16S-1: 5'-CAC CAC AAC ATA CAT ACC C- 3' (19 nt, Tm = 51°C)

16S-2: 5'-CGT TAA ACC CAT AGT CAC AG- 3' (20 nt, Tm = 53°C)

IV.3.1.3. Genes Citocromo *b*, 5S ARNr y *p53*

Los cebadores utilizados para amplificar los genes citocromo *b*, 5S ARNr y *p53* se seleccionaron a partir de los datos disponibles en la bibliografía existente. En la sección III.2.4.2 se muestran las secuencias de los cebadores seleccionados.

IV.3.2. EXTRACCIÓN DE ADN

De todos los métodos ensayados para la extracción de ADN de muestras de pescado (Bartlett y Davidson, 1991; Laird y col., 1991; Taggart y col., 1992; DeSalle y col., 1993), el que proporcionó ADN de mayor calidad para su utilización en la reacción de PCR fue el de DeSalle y col. (1993) (sección III.2.4.3.4).

Con el método de extracción de Bartlett y Davidson (1991) se obtuvieron concentraciones de ADN muy elevadas a partir de las muestras de trucha y palometa (aproximadamente 5.000 µg/ml), mientras que con las

muestras de salmón se obtuvieron apenas 700 µg/ml. La relación de los valores de absorbancia 260/280 (1,8) y 230/260 (0,4) mostró un ADN de pureza aceptable, si bien, mediante electroforesis en gel de agarosa se comprobó que el ADN estaba muy degradado (Figura 18-A). Las bandas obtenidas en los productos de PCR fueron débiles o inexistentes.

La concentración de ADN obtenida con el método de Laird y col. (1991) a partir de muestras de salmón y trucha fue de 900 µg/ml, y 450 µg/ml para las muestras de palometa. Aunque la Figura 18-B muestra que la integridad del ADN de salmón y trucha era aceptable, los valores de absorbancia 260/280 ($< 1,6$) y 230/260 ($> 0,7$) inducen a pensar que se extrajeron proteínas y sales junto con el ADN.

El ADN obtenido con el método de Taggart y col. (1992), presentó una relación de absorbancias 230/260 que superaba la unidad, por lo que el método retenía gran cantidad de sales minerales, como el EDTA, que coprecipita con el ADN e inhibe la reacción de PCR. El ADN obtenido tenía una gran integridad (Figura 18-C) y su concentración fue de 100-300 µg/ml.

Mediante el método clásico de DeSalle y col. (1993), se obtuvo el ADN en aproximadamente 2 horas y media, tras digerir la muestra durante una noche. La concentración de ADN estimada a partir de la absorbancia a 260 nm fue de 500-1000 µg/ml en las muestras de salmón y 300-800 µg/ml en las muestras de trucha y palometa. La pureza del ADN extraído en las tres especies se consideró aceptable tras comprobar que las relaciones de absorbancia ABS 260/280 y 230/260 eran de $1,8 \pm 0,1$ y $0,5 \pm 0,1$ respectivamente. Mediante electroforesis en gel de agarosa se observó que la integridad del ADN era mayor en las muestras frescas que en las ahumadas y en las muestras de salmón y trucha que en las de palometa (Figura 19).

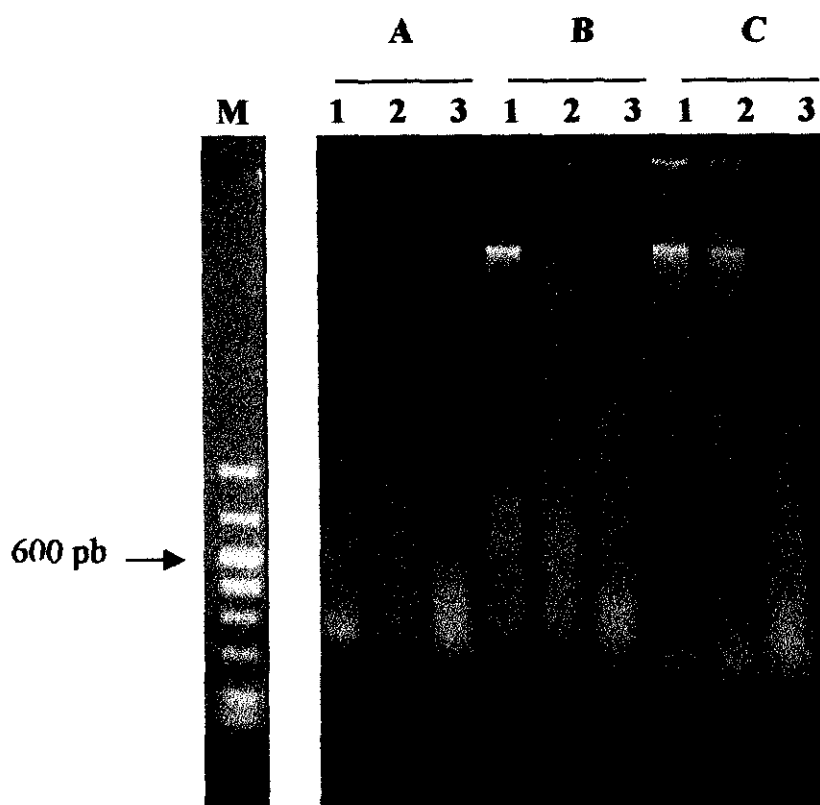


Figura 18. Análisis electroforético del ADN obtenido de muestras musculares de (1) salmón ahumado, (2) trucha ahumada y (3) palometa ahumada por el método de (A) Bartlett y Davidson (1991), (B) Laird y col. (1991) y (C) Taggart y col. (1992). M = marcador de peso molecular 100 pb.

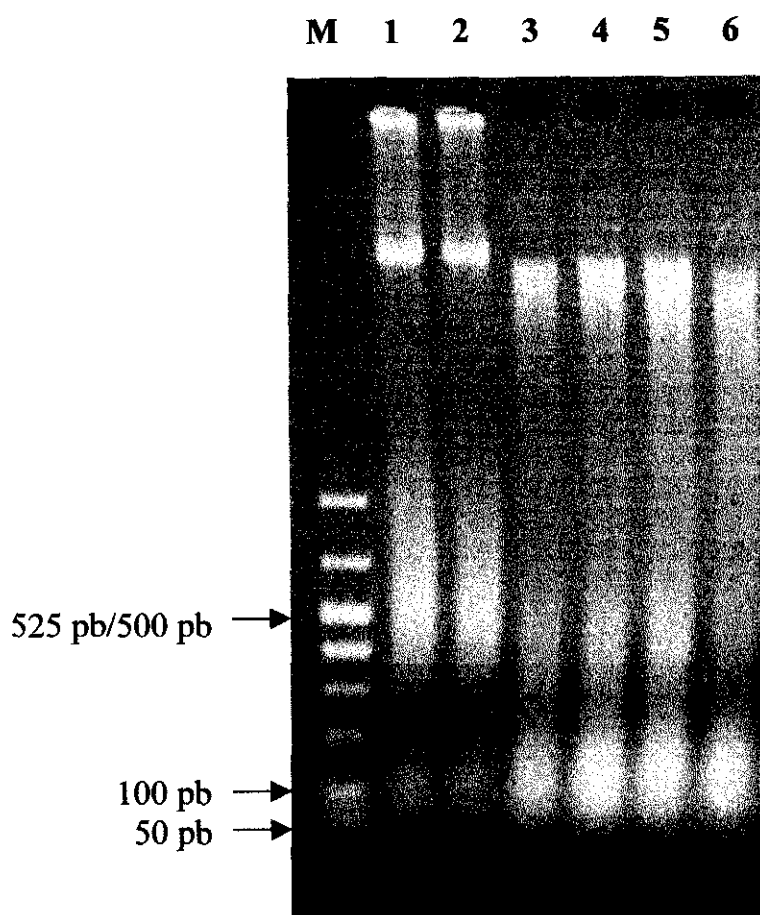


Figura 19. Análisis electroforético del ADN obtenido por el método de DeSalle y col. (1993), de muestras de tejido muscular de (1) salmón fresco, (2) trucha fresca, (3) salmón ahumado, (4) trucha ahumada, (5) palometa fresca y (6) palometa ahumada. M = marcador de peso molecular 100 pb.

IV.3.3. UTILIZACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN CITOCROMO *b* COMO MARCADOR GENÉTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE PESCADO

IV.3.3.1. Muestras analizadas

El marcador genético citocromo *b* se utilizó para analizar ADN procedente de muestras de tejido muscular de salmón, trucha y palometa frescas y ahumadas.

IV.3.3.2. Amplificación por PCR y secuenciación de los fragmentos amplificados

Los cebadores CYTB-1 y CYTB-2 amplificaron un fragmento de 358 pb del gen mitocondrial citocromo *b* en todas las muestras frescas y ahumadas de salmón, trucha y palometa (Figura 20). La amplificación se llevó a cabo según las condiciones descritas en la sección III.2.4.5.1.

Los productos de PCR de una muestra de salmón, trucha y palometa ahumados, purificados como se describió en la sección III.2.4.7.1, se secuenciaron en Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC, donde se utilizó un secuenciador automático ABI-PRISM 377 y el kit dRhodamine Terminator Cycle Sequencing como método de secuenciación. El cebador utilizado en las reacciones de secuenciación fue el CYTB-1. Las secuencias obtenidas se alinearon y se compararon con dos secuencias de salmón (X76253 y U12146) y otra de trucha (L29771) de la base de datos GenBank (Figura 21). En la región secuenciada (307 nucleótidos, excluyendo los cebadores) la homología entre salmón y trucha fue del 93,8% (23 nucleótidos distintos), entre salmón y palometa fue del 83% (52 nucleótidos distintos) y entre trucha y palometa fue del 83,4% (51 nucleótidos distintos). Se observó un polimorfismo intraespecífico del 4,5% en los salmones, del 0,3% en las truchas y del 0,6% en las palometas. Conviene señalar que en el caso de las palometas encontramos dobles picos en un 11% de las posiciones secuenciadas.

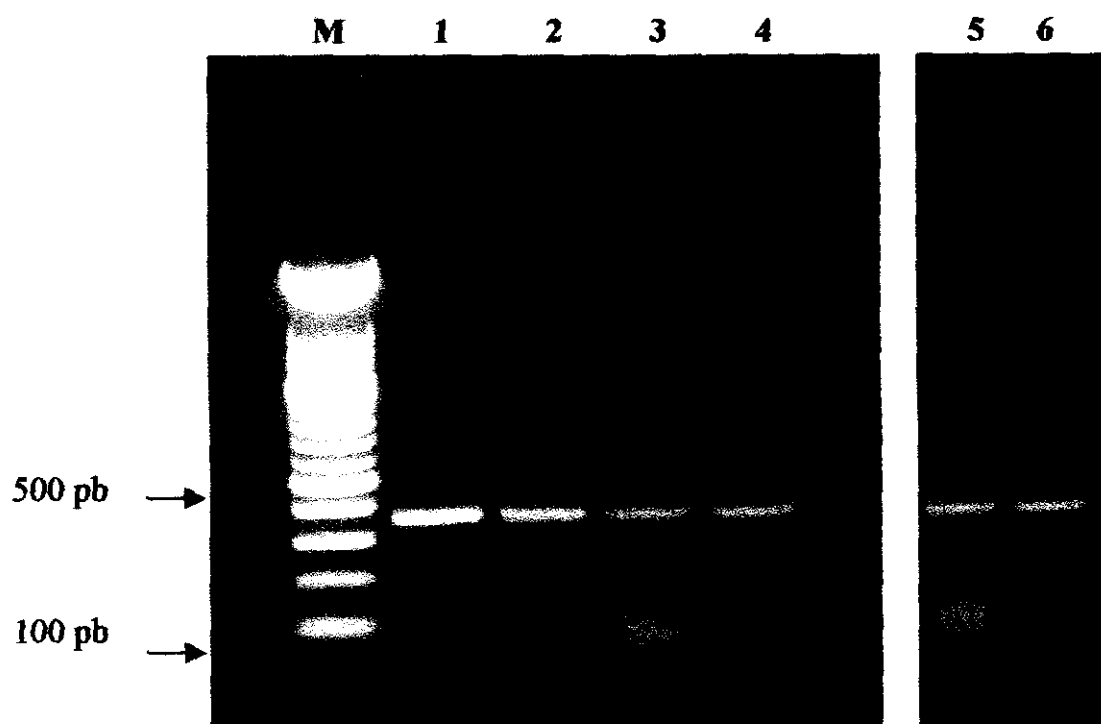


Figura 20. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen mitocondrial citocromo *b* de (1) salmón fresco, (2) salmón ahumado, (3) trucha fresca, (4) trucha ahumada, (5) palometa fresca y (6) palometa ahumada. M= marcador de peso molecular 100 pb.

Figura 21. Secuencias de ADN de parte del gen citocromo *b* de dos salmones, dos truchas y dos palometas alineadas con las secuencias homólogas de trucha (número de acceso L29771) y de salmón (X76253 y U12146) de la base de datos GenBank. Las dianas de restricción de las enzimas *Eco* RV (5'-GAT↓ATC-3'), *Taq* I (5'-T↓CGA-3') y *Nsp* I (5'-PuGATG↓Py-3') se encuentran sombreadas. Los nucleótidos en negrita de la secuencia de la trucha indican la posición de los cebadores CYTB-1 y CYTB-2 utilizados en la reacción de amplificación. (~) base no secuenciada; (.) base igual a la de la secuencia L29771; (N) base no identificada; Y = T+C; W = T+A; M = A+C; R = A+G.

	1				50
L29771	CCTTCTAATA	TCTCAGTCTG	GTGAAACTTT	GGCTCACTAC	TAGGCCTATG
Trucha Sk	~~~~~	~~~~~	~~~~~		
Trucha D	~~~~~	~~~~~	~~~~~T...	T.	
Palometa D	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~.	.G..A..T..
Palometa S	~~~~~	~~~~~	~~~~~T...	T.	.G..A..T..
Salmon D1	~~~~~	~~~~~	~~~~~.	T	
X76253	~~~~~	~~~~~	~~~~~.C..	T	
U12146	~~~~~	~~~~~	~~~~~.	T	
Salmon D2	~~~~~	~~~~~	~~~~~.	T	

	51				100
L29771	TTTAGCTACC	CAAATTCTTA	CCGGGCTCTT	CCTAGCCATG	CACTATACCT
Trucha Sk		C....			
Trucha D	.C....C..T		.A.....		C....
Palometa D	CC.TATCG.T	Y..C.	.A..C....	Y..A	..Y..C..A.
Palometa S	CC.TATCG.T	C.	.A..C....	Y..A	..Y..C..A.
Salmon D1	.C....C...	C....		A	C....
X76253	.C....C...			A	C....
U12146	.C....C...	C....		A	C....
Salmon D2	.C....C...	C....		A	C....

	101				150
L29771	CCGACATTTT	AACAGCTTTC	TCCTCTGTTT	GCCACATCTG	CCGAGATGTT
Trucha Sk	C..				
Trucha D	CG.				
Palometa D	G.	C...	A.M.,Y.,CR	CA.....Y..	...M.,Y...
Palometa S	.Y.....G.	W.....C...	A.M.,Y.,CR	CA.....Y..	...M.,Y...
Salmon D1	...T..C..	T		T..	
X76253	...T..C..	T		T..	
U1214	...T..C..	T		T..	
Salmon D2	...T..C..	T		T..	

***Eco* RV**

Figura 21. (continuación)

Taq I

	151				200
L29771	AGTTACGGCT	GACTCATTCG	AAACATCCAT	GCCAACGGAG	CATCTTTCTT
Trucha Sk					
Trucha D	.A.....T.				
Palometa D	.AY..Y..T.	.G..T..C..	M..T..R..	G.	.M..C....
Palometa S	.AC..Y..T.	.G..T..C..	M..T..R..	G.	.M..C....
Salmon D1	..C..T....	C..	T.....T..C	..T.....	
X76253	..C..T....	C..	T.....T..C	..T.....	
U12146	..C..T....	C..	T.....T..C	..T.....	
Salmon D2	..C..T....	C..	T.....T..C	..T.....	

	201				250
L29771	TTTTATCTGT	ATTTATATAC	ATATCGCCCG	AGGACTTTAC	TACGGCTCGT
Trucha Sk					
Trucha D	C.....C	C..T.	T....		
Palometa D	C..C.....C	CCYT.	.Y..T.GA..	...M..W..T	..Y..T..C.
Palometa S	C..C.....C	CCYT.	.Y..T.GA..	...M..W..T	..Y..T..C.
Salmon D 1	C.....		C.....	T	..T..T..C.
X76253	C.....		C.....	T	..T..T..C.
U12146	C.....		C.....	T	..T..T..C.
Salmon D2	C.....		C.....	T	..T..T..C.

	251				300
L29771	ACCTCTACAA	AGAAACCTGG	AATATCGGAG	TTGTACTTTT	ACTTCTCACT
Trucha Sk					
Trucha D		A	T....	T..C.	...A..A...
Palometa D	Y.....	...R....A	..Y..T..M.	.W..T..C.	C..AT.ARTM
Palometa S	Y.....	...R....A	..Y..T..M.	.W..T..C.	C..AT.ARTM
Salmon D1	.T..A..T..	A		C.	
X76253	.T..A..C..			C.	
U12146	.T..A..T..	A		C.	
Salmon D2	.T..A..T..	A		C.	

	301				350
L29771	ATAATAACTG	CCTTTGTAGG	CTACGTCCTC	CCGTGAGGAC	AAATATCATT
Trucha Sk					
Trucha D				C.....	
Palometa D	M.	T..	Y..Y.....	..M.....	
Palometa S	M.	Y..T..	Y..Y.....	..M.....	
Salmon D1		C.....	T..T	..A.....	
X76253		C.....			
U12146		C.....	T..T	..A.....	C..
Salmon D2		C.....		..A.....	N.N..

	351
L29771	CTGAGGGG
Trucha Sk	~~~~~
Trucha D	
Palometa D	
Palometa S	
Salmon D1	
X76253	~~~~~
U12146	A.
Salmon D2	~

IV.3.3.3. Análisis de restricción de fragmentos del gen citocromo *b* amplificados por PCR (PCR-RFLP)

Las secuencias de salmón, trucha y palometa obtenidas en este trabajo se compararon para encontrar diferencias que permitieran identificar el origen específico de las muestras. En las bases de datos se encontraron asimismo dos secuencias del gen citocromo *b* de salmón y una de trucha.

U12146 *Salmo salar*, gen mitocondrial citocromo *b* (1.214 nucleótidos)

X77525 *Salmo salar*, gen mitocondrial citocromo *b* (249 nucleótidos)

L29771 *O. mykiss*, genoma mitocondrial completo (16.660 nucleótidos)

Mediante el programa MAP (GCG) se realizaron los mapas de restricción de las secuencias de los fragmentos amplificados de salmón (Figura 22), trucha (Figura 23) y palometa (Figura 24) y se tradujeron a aminoácidos las secuencias de nucleótidos. Comparando los mapas de restricción de las tres secuencias de salmón con las dos secuencias de trucha y de palometa y siguiendo criterios de especificidad de especie y disponibilidad comercial, se eligieron las endonucleasas *Eco* RV y *Taq* I (New England BioLabs, Beverly, MA, USA) para analizar las muestras de salmón, trucha y palometa. No se encontraron diferencias entre las secuencias aminoacídicas deducidas de las secuencias de nucleótidos de salmón y trucha, pero sí se observaron 6 aminoácidos distintos al comparar dichas secuencias con la cadena peptídica codificada en los productos de PCR de la palometa.

La Figura 25 muestra los resultados obtenidos en la digestión de los productos de PCR de muestras de salmón. La presencia de una única diana de restricción para la enzima *Eco* RV, dio lugar a dos fragmentos de 105 pb y 253 pb. Sin embargo, la enzima *Taq* I no cortó los productos de PCR del salmón. Con las endonucleasas *Eco* RV y *Taq* I no se encontró polimorfismo intraespecífico entre las muestras de salmón analizadas.

Los resultados obtenidos en el análisis de restricción de las muestras de trucha se muestran en la Figura 26. Los productos de PCR de la trucha no se fragmentaron con la enzima *Eco* RV. Sin embargo, la digestión de productos de PCR de trucha con la enzima *Taq* I corroboró la existencia de una diana de

Figura 22. Mapa de restricción y secuencia aminoacídica de un fragmento del gen citocromo *b* de *Salmo salar* (número de acceso X76253, GenBank). Las enzimas seleccionadas (*Eco* RV) aparecen en **negrita**. La diana de restricción de dicha enzima (5'-GAT↓ATC-3') se muestra sombreada.



Figura 22. (continuación)

		Sth132I		
	BsaJI			NgoGV
	AvaI			NlaIV
	MnlI			DrdII

CTGTATTTATATACACATCGCCCGAGGACTTTATTATGGTTCCTATCTATATAAAGAAAC
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 GACATAAATATATGTGTAGCGGGCTCCTGAAATAATAACCAAGGATAGATATATTTCTTTG

 C I Y M H I A R G L Y Y G S Y L Y K E T

		RsaI		
	Hpy188IX	TatI		Pfl11108I

CTGAAATATCGGAGTTGTACTTCTACTTCTCACTATAATAACTGCCTTCGTAGGC
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 295
 GACTTTATAGCCTCAACATGAAGATGAAGAGTGATATTATTGACGGAAGCATCCG

 W N I G V V L L L L T M M T A F V G

Figura 23. (continuación)

```

                                ScrFI
                                EcoRII |
                                MnlI  | |
                                RsaI
CviJI RsaI  BceFI  | | | Hpy188IX  TatI |
|      |      |      | | |      |      |
15670 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 15729
TACGGCTCGTACCTCTACAAAGAAACCTGGAATATCGGAGTTGTACTTTTACTTCTCACT
ATGCCGAGCATGGAGATGTTTCTTTGGACCTTATAGCCTCAACATGAAAATGAAGAGTGA

Y G S Y L Y K E T W N I G V V L L L L T

                                CviJI
                                HaeIII
                                NgoGV|
                                NlaIV|
                                BseMII
                                MnlI  |
                                Sth132I |
                                MaeII  BscGI | Hpy188IX |||
                                CviJI | MnlI | | MnlI | |||
                                | | | | | | | | | |||
15730 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 15787
ATAATAACTGCCTTTGTAGGCTACGTCTCCCGTGAGGACAAATATCATTCTGAGGGG
TATTATTGACGGAACATCCGATGCAGGAGGGCACTCCTGTTTATAGTAAGACTCCCC

M M T A F V G Y V L P W G Q M S F W G A

```

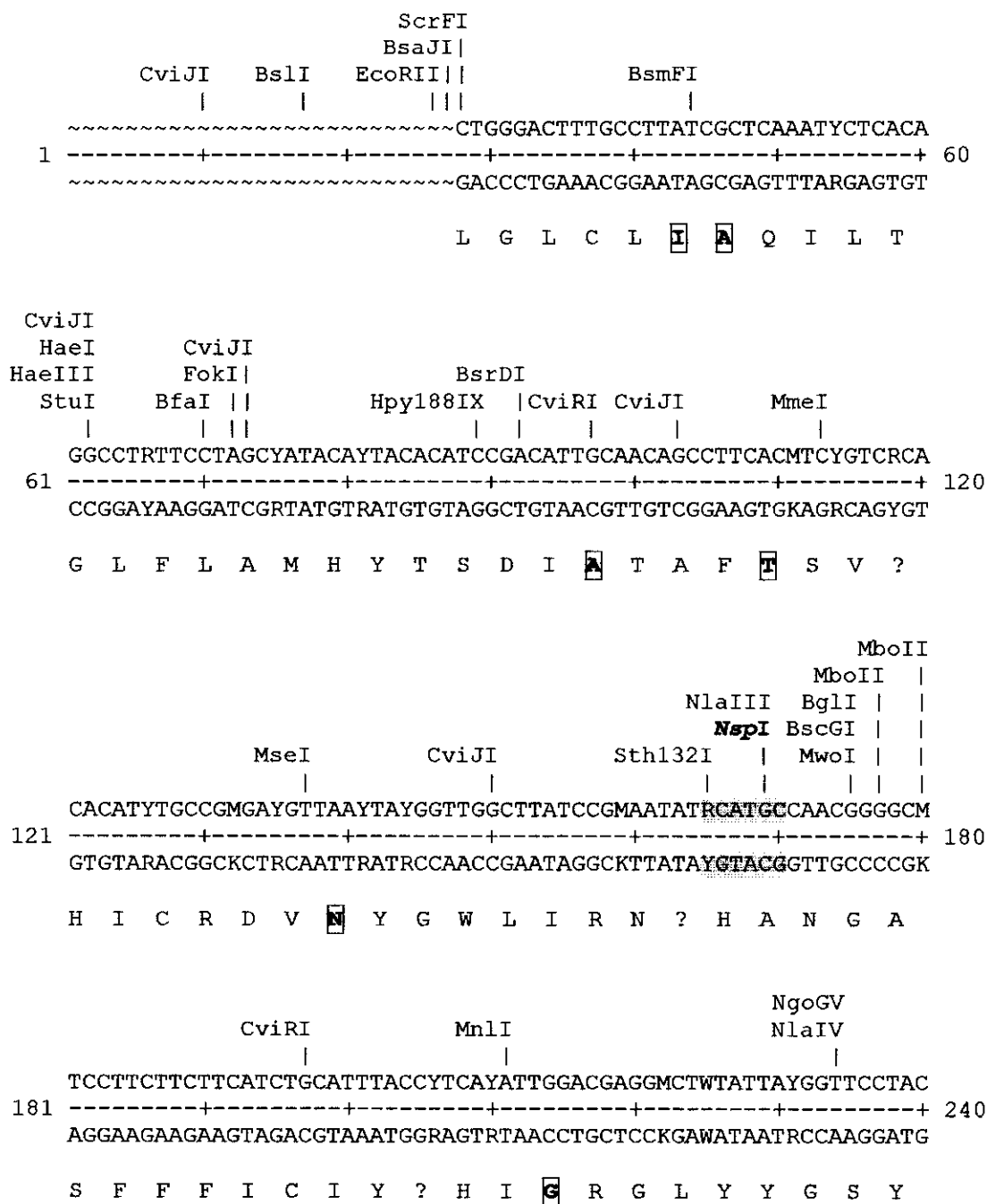


Figura 24. (continuación)

```

                                MboII
                                |
CTYTACAAAGARACCTGAAAYATTGGMGTTCTTCTCCTATTARTMATAATAACMGCC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
GARATGTTTCTYTGGACTTTRTAACCKCAWCAAGAAGAGGATAATYAKTATTATTGKCGG

L Y K E T W N I G V V L L L L ? M M T A

                                DdeI
                                |
                                BseMII Hpy188IX
                                |
                                MnlI      MnlI      |MnlI      |
                                |          |          |          |
TTTGTTGGYTAYGTCCTCCCMFGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGGG
301 -----+-----+-----+-----+-----+ 348
AAACAACCRATRCAGGAGGGKACTCCTGTTTATAGTAAGACTCCCCC

F V G Y V L P W G Q M S F W G G
```

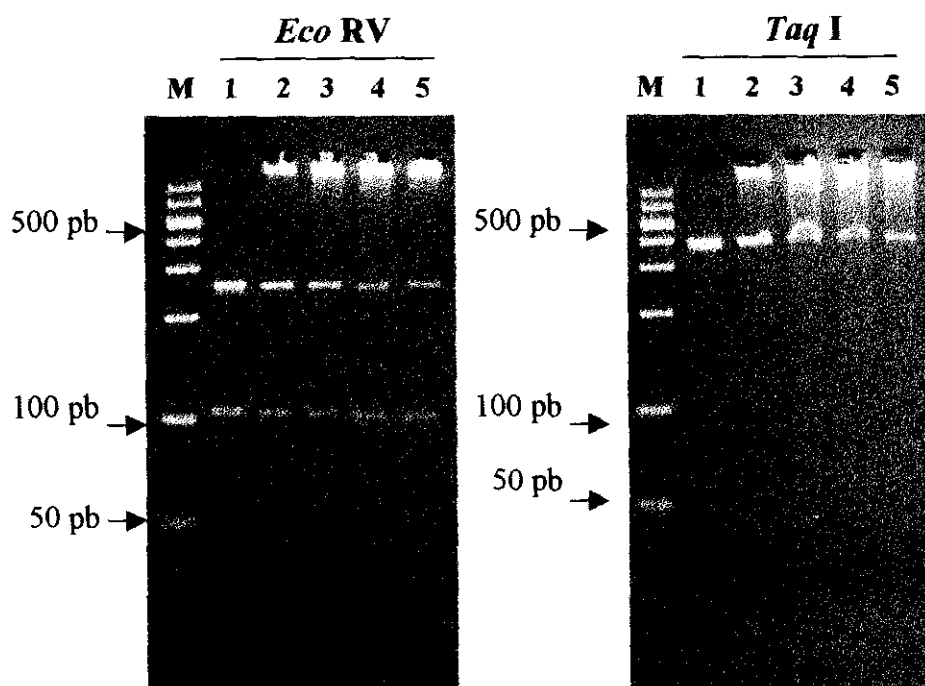


Figura 25. Perfil de restricción de los productos de PCR del gen mitocondrial citocromo *b* de salmón, digeridos con *Eco RV* y *Taq I*. Muestras: (1) salmón fresco; (2) salmón ahumado Valkiria; (3) salmón ahumado El Rey Vikingo; (4) salmón ahumado Skandia; (5) salmón ahumado Domínguez. M = marcador de peso molecular 100 pb.

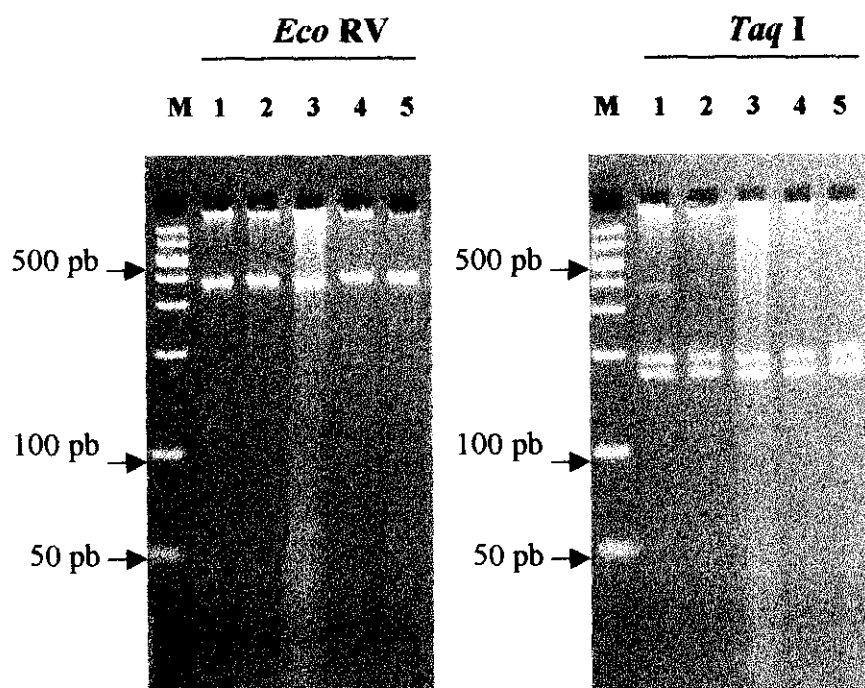


Figura 26. Perfil de restricción de los productos de PCR del gen mitocondrial citocromo *b* de trucha, digeridos con *Eco RV* y *Taq I*. Muestras: (1) trucha fresca; (2) trucha ahumada Skandia; (3) trucha ahumada Eurosalmón; (4) trucha ahumada Pryca; (5) trucha ahumada Domínguez. M = marcador de peso molecular 100 pb.

restricción que producía dos fragmentos de 168 pb y 190 pb. No se encontró polimorfismo intraespecífico con ninguna de las dos enzimas ensayadas para las muestras frescas y ahumadas de trucha analizadas.

Ninguna de estas dos enzimas (*Eco* RV y *Taq* I) reconocieron puntos de corte en los productos de PCR de palometa; sin embargo, la enzima *Nsp* I reconoció un punto de corte en los productos de PCR de palometa que originaron dos fragmentos de 177 y 181 pares de bases, mientras que los productos de PCR de salmón y trucha no se fragmentaron (Figura 27). Las muestras de palometa analizadas tampoco mostraron polimorfismo intraespecífico.

IV.3.4. UTILIZACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN CITOCROMO OXIDASA II (COII) COMO MARCADOR GENÉTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE PESCADO

IV.3.4.1. Muestras analizadas

El marcador genético COII se utilizó para analizar ADN procedente de muestras musculares de salmón, trucha y palometa frescas y ahumadas, así como huevos frescos de salmón y trucha y ahumadas de salmón.

IV.3.4.2. Amplificación por PCR y secuenciación de los fragmentos amplificados

Todas las muestras de ADN de salmón y trucha sometidas a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los cebadores CYTO-1 y CYTO-2 y las condiciones descritas en la sección III.2.4.5.2, dieron lugar a una banda electroforética correspondiente a un fragmento de 464 pb (Figura 28). Sin embargo, no se amplificó ningún fragmento en las muestras de ADN de palometa sometidas a la reacción de PCR bajo las mismas condiciones.

Dos muestras de salmón y dos de trucha se seleccionaron al azar con el fin de secuenciar los productos de PCR obtenidos en dichas especies. Como paso previo a la secuenciación, los productos de PCR se purificaron utilizando un kit comercial para extraer bandas de ADN de geles de agarosa de bajo



Figura 27. Perfil de restricción de los productos de PCR del gen mitocondrial citocromo *b* obtenidos de muestras de salmón, trucha y palometa digeridos con *Nsp* I. Muestras: (1) salmón ahumado; (2) trucha ahumada y (3) palometa ahumada. M = marcador de peso molecular 100 pb.

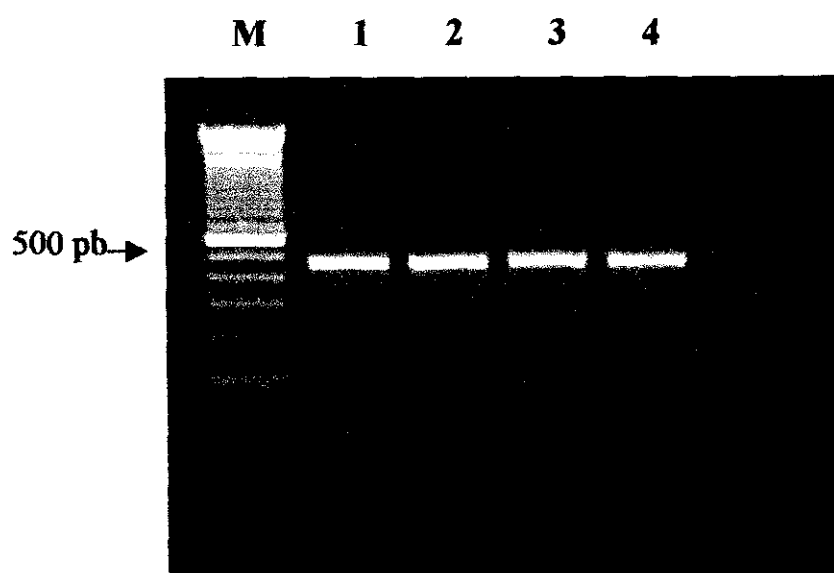


Figura 28. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen citocromo oxidasa II (COII) de: (1) salmón fresco; (2) salmón ahumado; (3) trucha fresca y (4) trucha ahumada. M = marcador de peso molecular 100 pb.

punto de fusión (sección III.2.4.7.1). Una vez purificados se enviaron al Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC. El cebador utilizado en las reacciones de secuenciación fue el CYTO-1. En las Figuras 29 y 30 se muestran los cromatogramas y las secuencias de nucleótidos correspondientes a productos de PCR de salmón y trucha. La Figura 31 muestra el resultado de la comparación de las cuatro secuencias obtenidas en este trabajo (dos de salmón y dos de trucha), alineadas junto a otras de las mismas especies que se obtuvieron de las bases de datos. De los 428 nucleótidos secuenciados (excluyendo los cebadores) encontramos 37 nucleótidos diferentes (8,7%) entre las especies de salmón y trucha. La variación intraespecífica entre las secuencias de nucleótidos de salmón fue del 1,4%, y entre las secuencias de trucha del 1,2%.

IV.3.4.3. Análisis de restricción de fragmentos del gen COII amplificados por PCR (PCR-RFLP)

Una vez obtenidas las secuencias de nucleótidos de los fragmentos amplificados de salmón y trucha, se realizaron sus mapas de restricción y se tradujeron a aminoácidos para tratar de localizar puntos de corte específicos que permitieran identificar dichas especies y analizar posibles diferencias en sus cadenas peptídicas. En la Figura 32 se muestran el mapa de restricción y la secuencia aminoacídica de una secuencia de salmón, y en la Figura 33 los correspondientes a una secuencia de trucha. La comparación de las secuencias aminoacídicas de salmón y trucha puso de manifiesto cambios en dos aminoácidos, el residuo 33 es lisina en salmón y metionina en trucha, mientras que el residuo 109 de la secuencia es treonina en salmón y valina en trucha. Se obtuvieron los mapas de restricción de todas las secuencias de salmón y trucha disponibles con el fin de seleccionar enzimas que no presentaran variación intraespecífica.

Teniendo en cuenta la disponibilidad comercial de las enzimas y el análisis de los mapas de restricción de salmón y trucha, se seleccionaron las endonucleasas *Nci* I y *Sau* 3AI como las más apropiadas para la diferenciación de las dos especies.

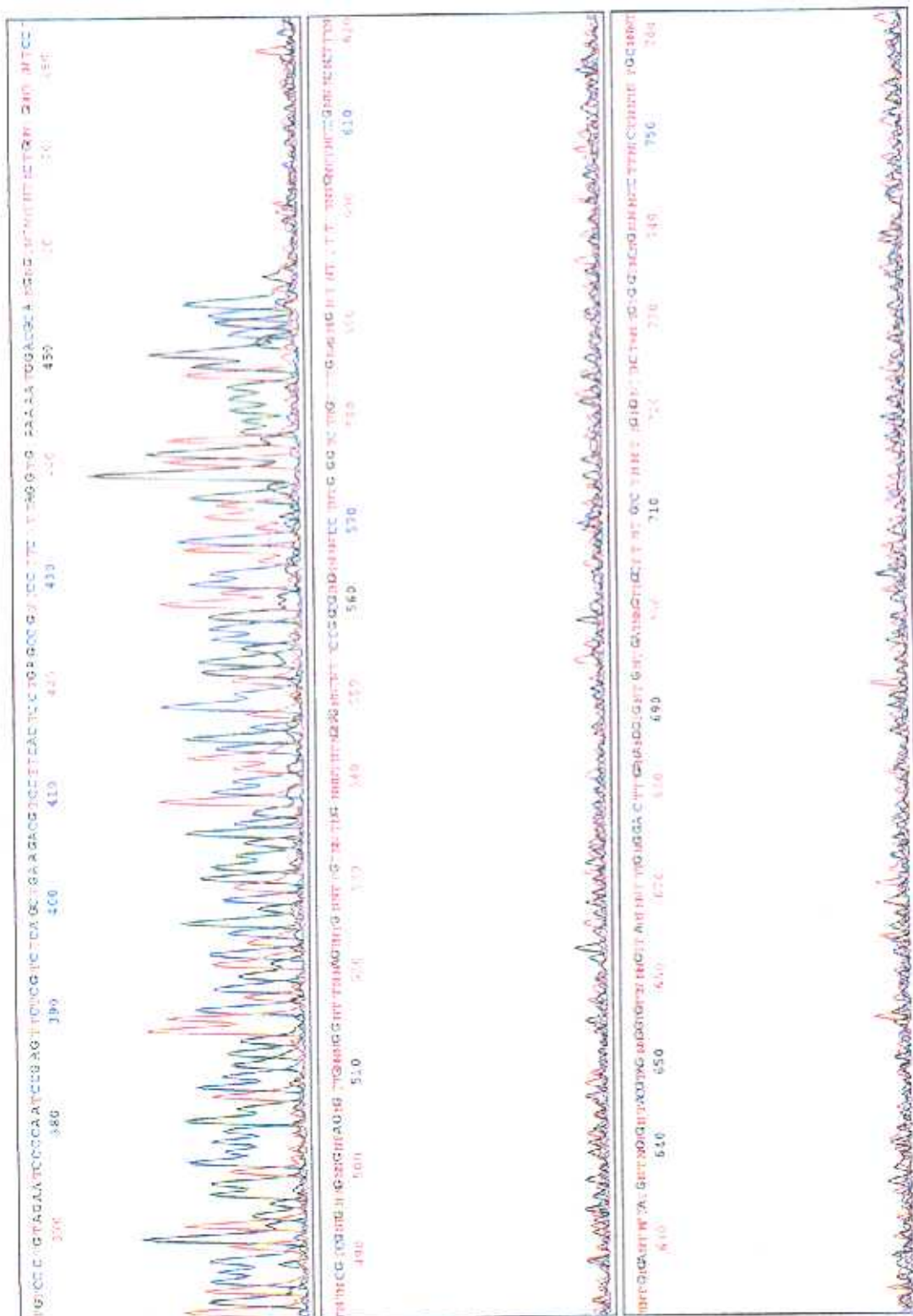


Figura 29. (continuación)

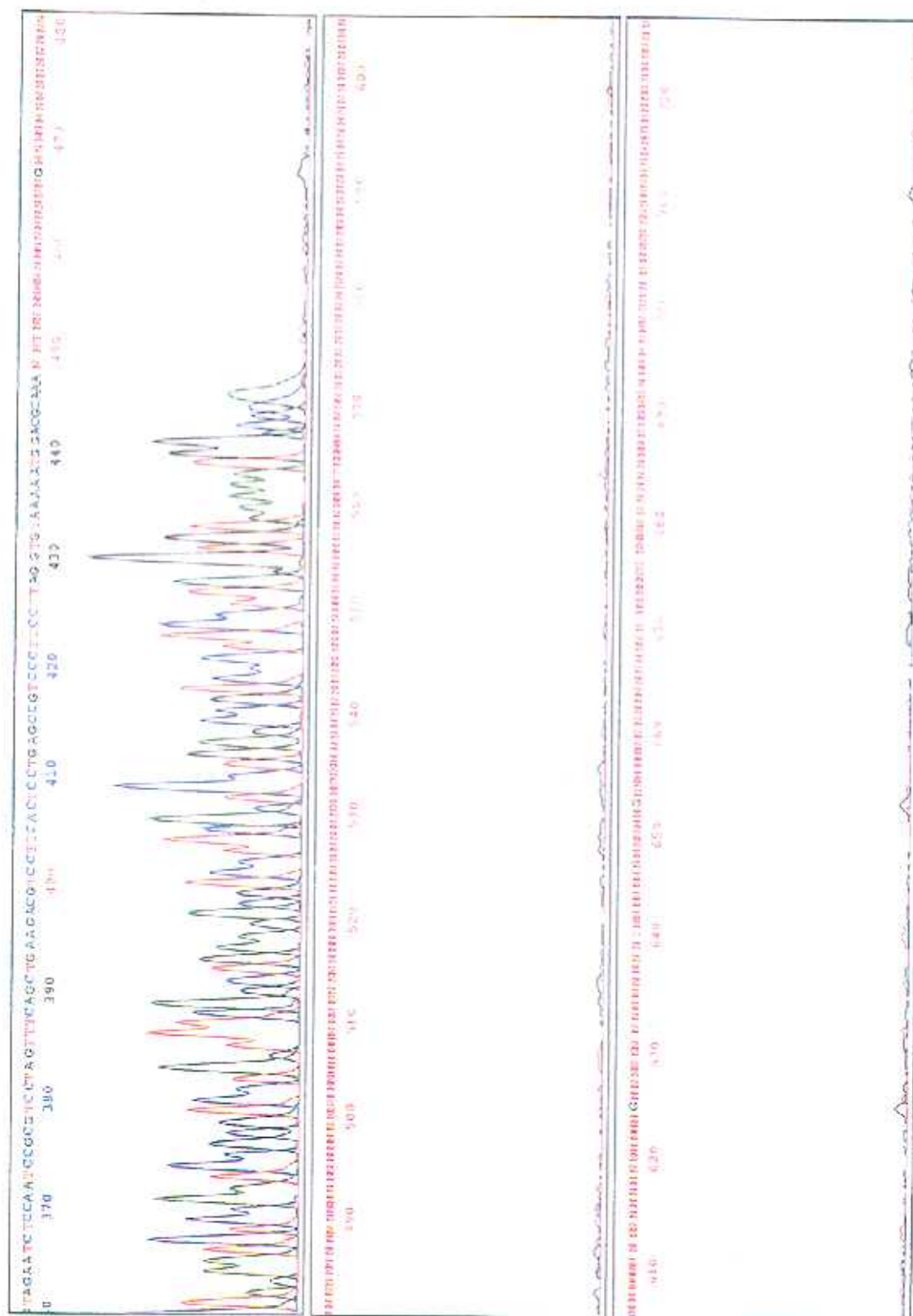


Figura 30. (continuación)

Figura 31. Comparación entre las secuencias de nucleótidos de un fragmento del gen COII de dos productos de PCR de salmón y dos de trucha obtenidos en este trabajo, con secuencias de trucha (número de acceso L29771) y de salmón (números de acceso U12145 y L04501) obtenidas de la base de datos GenBank. Las dianas de restricción de las enzimas *Nci* I (5'-CC↓CGG-3') y *Sau* 3AI (5'-↓GATC-3') se muestran sombreadas. Los nucleótidos en negrita de la secuencia de la trucha indican la posición de los cebadores CYTO-1 y CYTO-2 utilizados en la reacción de amplificación. (~) base inexistente; (.) base igual a la de la secuencia L29771; (N) base no identificada.

	1				50
L29771	TTCTTCATTT	CCACGACCAC	GCTCTTATGA	TTGTTCTTCT	TATCAGCACA
Trucha fresca	~~~~~	~~~~~GA	N.	N...G.C...	
Trucha ahumada	~~~~~	~~~~~	N.	N...N.C...	T.
U12145	~~~~~	~~~~~T			
L04501	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Salmón ahumado	~~~~~	~~~~~	~~~~~	A..NG.C...	
Salmón fresco	~~~~~	~~~~~CA		G.N...	
	51				100
L29771	CTAGTGCTTT	ATATCATCGT	AGCAATAGTC	TCTACTAAAC	TTACTAATAT
Trucha fresca	N.....	.N.....			A
Trucha ahumada	N...N....	N.			A
U12145		T..			C....N.A
L04501	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Salmón ahumado		T..			C....C.A
Salmón fresco		T..			C....C.A
	101		Sau 3AI		150
L29771	GTATATCCTT	GATTCTCAAG	AAATCGAGAT	CGTTTGGACT	GTCTCCCGAG
Trucha fresca					
Trucha ahumada					
U12145			A..		T...
L04501	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Salmón ahumado			A..		T...
Salmón fresco			A..		T...
	151				200
L29771	CAGTTATCCT	TATTCTCATC	GCTCTCCCTT	CCCTCCGAAT	TCTCTATCTT
Trucha fresca					
Trucha ahumada					
U12145		C....T..T	..C....C.	...T....	...T..C...
L04501	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~C...
Salmón ahumado		C....T..T	..C....C.	...T....	...T..C...
Salmón fresco		C....T..T	..C....C.	...T....	...T..C...

Figura 32. Mapa de restricción y secuencia aminoacídica de un fragmento del gen COII de *Salmo salar* (número de acceso U12145, GenBank). La enzima seleccionada (*Nci* I) aparece en negrita. La diana de restricción de dicha enzima (5'-CC↓CGG-3') se muestra sombreada, y los aminoácidos que difieren con la secuencia de *O. mykiss* enmarcados.

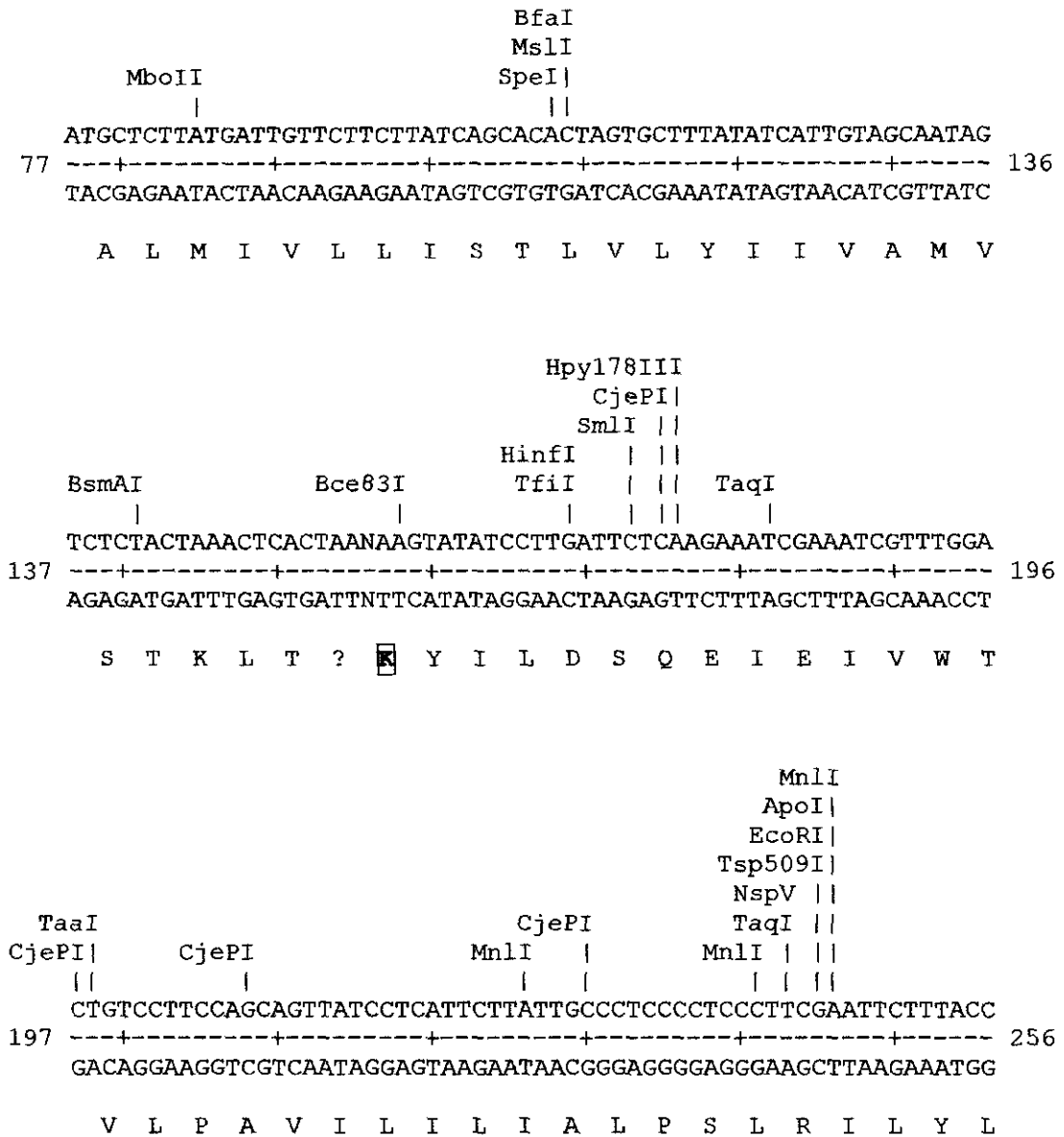


Figura 32. (continuación)

```

                                BsrDI
                                BstEII|
                                MaeIII|
                                HphI  ||
                                RleAI | SimI|
                                MseI  | Tsp45I|
                                |  |  |  |
TTATAGACGAAATTAATGACCCACACCTTACTATTAAAGCAATGGGTCACCAATGATACT
257 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 316
AATATCTGCTTTAATTACTGGGTGTGGAATGATAATTTTCGTTACCCAGTGGTTACTATGA

    M D E I N D P H L T I K A M G H Q W Y W

                                HinfI
                                BsmFI |
                                MboII |
                                CviJI |
                                PleI  ||
                                BbsI  |||
                                Eco57I | DdeI |||
                                |  |  |  |  |
GAAGCTATGAATACACCGACTACGAAGACTTAGGCTTTGACTCTTATATAGTCCCCACCC
317 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 376
CTTCGATACTTATGTGGCTGATGCTTCTGAATCCGAAACTGAGAATATATCAGGGGTGGG

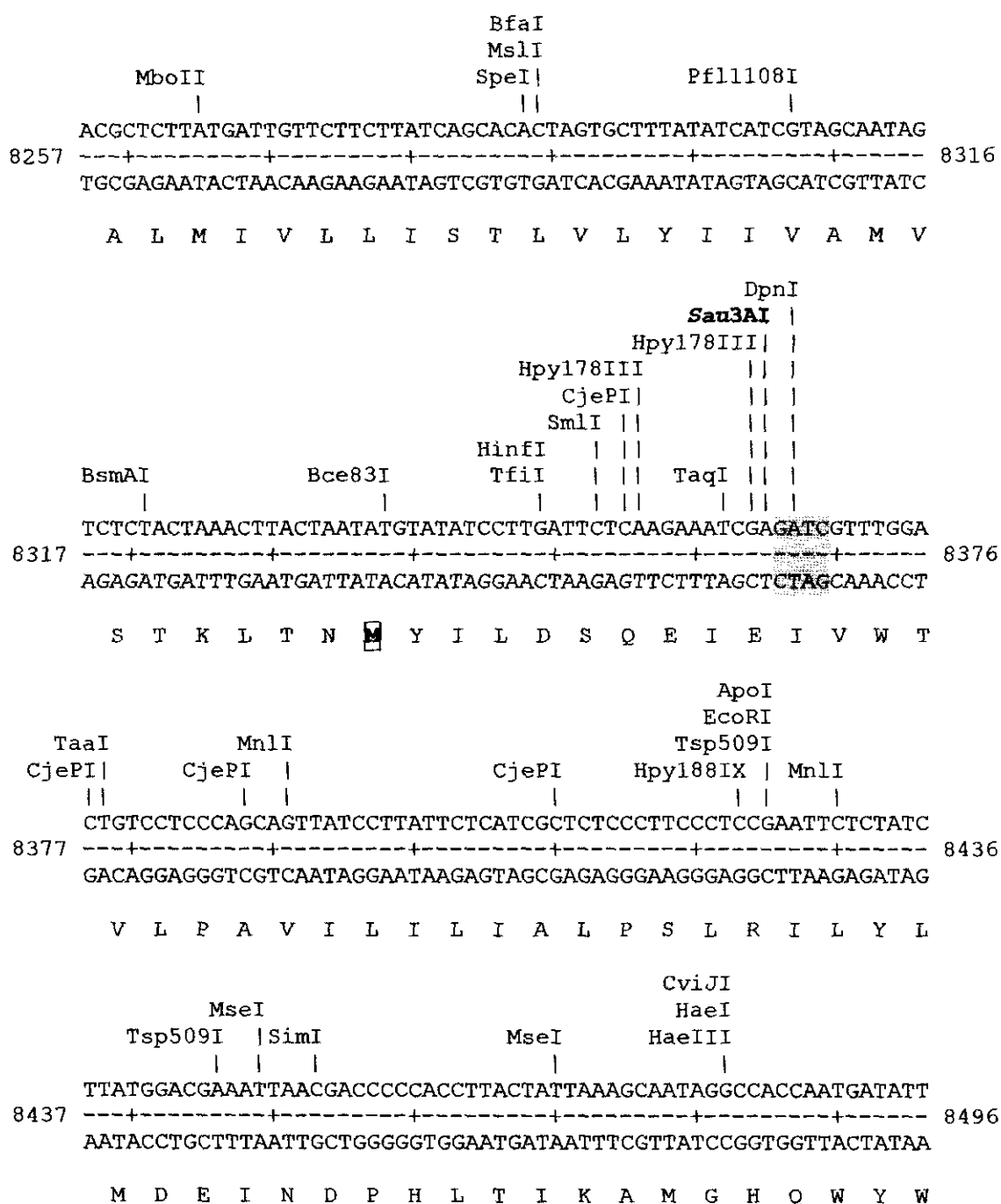
    S Y E Y T D Y E D L G F D S Y M V P T Q

                                Sth132I
                                BbsI|
                                MboII|
                                Tsp509I|
                                MspI  ||
                                NciI  ||
                                ScrFI  ||
                                MseI TaqII| ||
                                |  |  |  |  |
AAGACTTAACGCGCGGTC AATTTTCGTCTTCTAGAAACAGACCATCGAATGGTTGTCCCTG
377 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 436
TTCTGAATTGCGGCGCAGTTAAAGCAGAAGATCTTTGTCTGCTAGCTTACCAACAGGGAC

    D L T P G Q F R L L E T D H R M V V P V

```


Figura 33. Mapa de restricción y secuencia aminoacídica de un fragmento del gen COII de *Oncorhynchus mykiss* (número de acceso L29771, GenBank). La enzima seleccionada (*Sau* 3AI) aparece en negrita. La diana de restricción de dicha enzima (5'-↓GATC-3') se muestra sombreada, y los aminoácidos que difieren con la secuencia de *S. salar* enmarcados.



Las secuencias de salmón presentan un único punto de corte para la enzima *Nci* I, mientras que en las de trucha no aparece ningún punto de corte para esta enzima. Asimismo, las secuencias de salmón carecen de los dos puntos de corte que presentan las de trucha para la enzima *Sau* 3AI.

Las digestiones de los productos de PCR del gen COII de salmón y trucha con las enzimas *Nci* I y *Sau* 3AI se realizaron en un volumen total de 20 µl, con 14 µl de ADN y 10 U de enzima, como se describió en la sección III.2.4.9.2. Los fragmentos resultantes de la digestión se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa MS-8 al 3% en tampón TAE.

En la Figura 34 se muestran los resultados del análisis de restricción de los productos de PCR de muestras musculares frescas de salmón y trucha. La diana de restricción de la enzima *Nci* I presente en muestras de salmón dio lugar a la formación de dos fragmentos de 133 pb y 331 pb. Como se esperaba, la enzima *Nci* I no cortó los productos de PCR de la trucha arco iris. La digestión de los productos de PCR de muestras de trucha con la enzima *Sau* 3AI, originó tres fragmentos (de 108 pb, 127 pb y 229 pb) debido a la presencia de dos dianas de restricción. Sin embargo, esta enzima no cortó los productos de PCR de salmón.

Cuando se utilizaron huevos frescos de salmón atlántico y trucha arco iris como material de partida para la extracción del ADN, los productos de PCR obtenidos con los cebadores CYTO-1 y CYTO-2 mostraron el mismo tamaño que los obtenidos de muestras de tejido muscular. Asimismo, los perfiles de restricción obtenidos con las endonucleasas *Nci* I y *Sau* 3AI a partir de los productos de PCR de huevos frescos fueron idénticos a los obtenidos a partir del tejido muscular. Sin embargo, ninguna de las tres muestras comerciales de huevos ahumadas analizadas coincidió con el perfil de restricción de las huevos de salmón atlántico frescos, a pesar de que estaban etiquetadas como “huevos de salmón ahumados” (Figura 35, líneas 5, 6 y 7). El perfil de la muestra 5 coincide con el de *Oncorhynchus mykiss*, mientras que los perfiles de las muestras 6 y 7 no se corresponden con ninguna de las dos especies estudiadas.

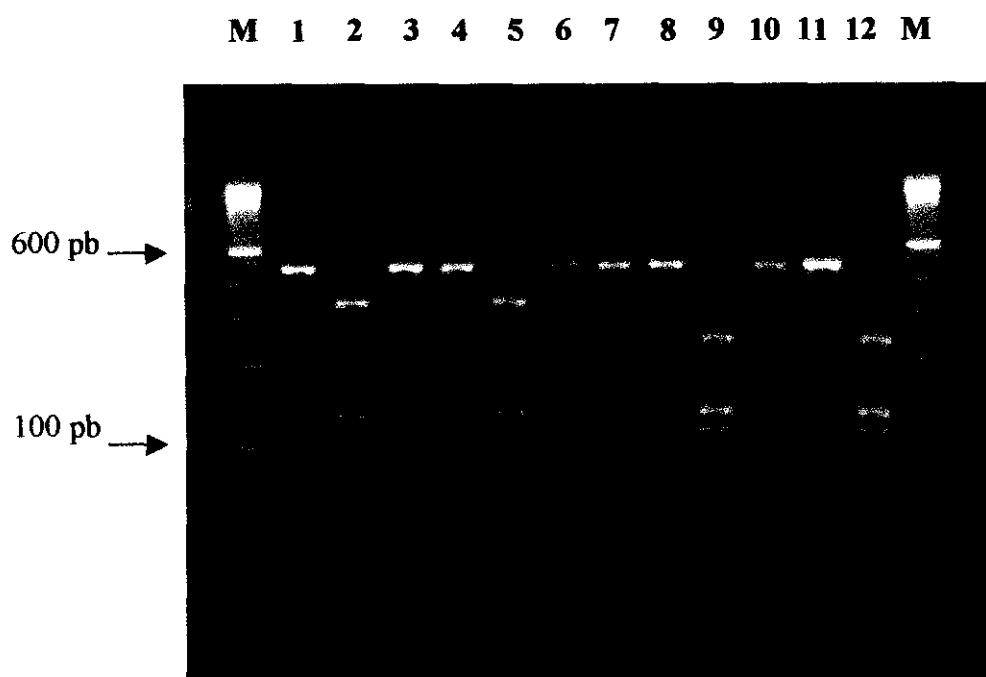


Figura 34. Perfil de restricción de los productos de PCR del gen COII obtenidos de muestras de salmón fresco (1-3); salmón ahumado (4-6); trucha fresca (7-9) y trucha ahumada (10-12). Muestras 1, 4, 7 y 10 sin digerir; 2, 5, 8 y 11 digeridas con *Nci* I; 3, 6, 9 y 12 digeridas con *Sau* 3AI. M = marcador de peso molecular 100 pb.

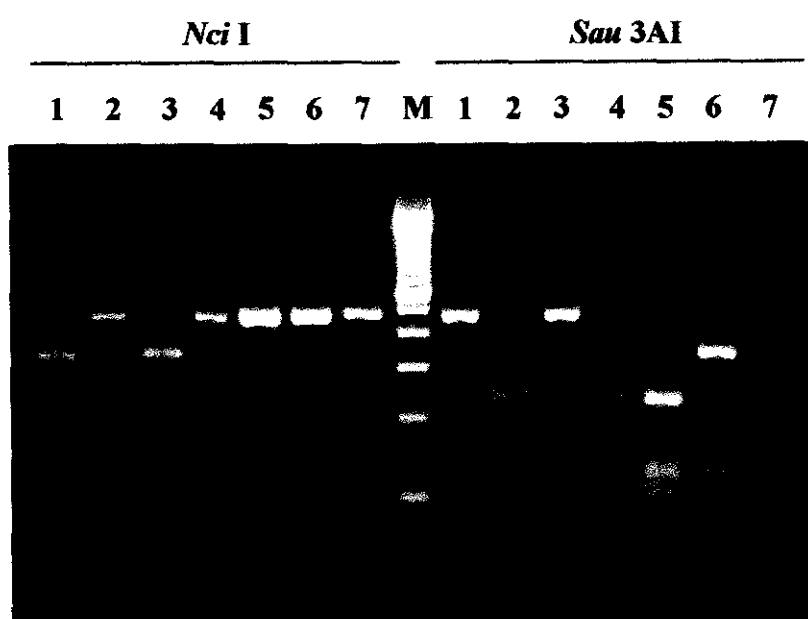


Figura 35. Perfil de restricción de los productos de PCR del gen mitocondrial COII obtenidos de muestras de (1) salmón fresco; (2) trucha fresca; (3) huevas frescas de salmón; (4) huevas frescas de trucha y (5, 6 y 7) huevas ahumadas de salmón. M= marcador de peso molecular 100 pb.

IV.3.5. UTILIZACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN 16S ARNr COMO MARCADOR GENÉTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE PESCADO

IV.3.5.1. Muestras analizadas

El marcador genético 16S ARNr se utilizó para analizar ADN procedente de muestras musculares de salmón, trucha y palometa frescos y ahumados, de las huevas frescas de salmón y trucha y ahumadas de salmón.

IV.3.5.2. Amplificación por PCR y secuenciación de los fragmentos amplificados

El análisis electroforético de los productos de PCR obtenidos con los cebadores 16S-1 y 16S-2, tal y como se describe en la sección III.2.4.5.3, permitió comprobar que en todas las muestras frescas y ahumadas de salmón y trucha se amplificaba un fragmento de ADN de 950 pb (Figura 36). Por el contrario, utilizando el ADN extraído de las muestras de palometa no se amplificó ningún fragmento.

Los productos de PCR del gen 16S ARNr de una muestra de salmón y otra de trucha se purificaron según se describe en la sección III.2.4.7.1, y se secuenciaron en el Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. De cada muestra secuenciada se obtuvieron dos cromatogramas, uno utilizando el cebador 16S-1 y otro con el 16S-2. La secuencia parcial obtenida con el cebador 16S-1 se superpuso con la inversa y complementaria de la obtenida con el cebador 16S-2 para obtener la secuencia completa de cada producto de PCR. Mediante un análisis detallado de los cromatogramas se trataron de identificar las bases que el secuenciador automático dejó como indeterminaciones (N).

La Figura 37 muestra la alineación y comparación de las secuencias de salmón y trucha ahumados obtenidas en este trabajo junto a las secuencias de salmón (U12143) y de trucha (L29771) extraídas de la base de datos GenBank. En los 911 nucleótidos amplificados (excluyendo los cebadores) se observó un porcentaje de homología entre ambas especies de 95,2%. El polimorfismo intraespecífico del salmón fue de 1,2% y el de la trucha 0,9%.

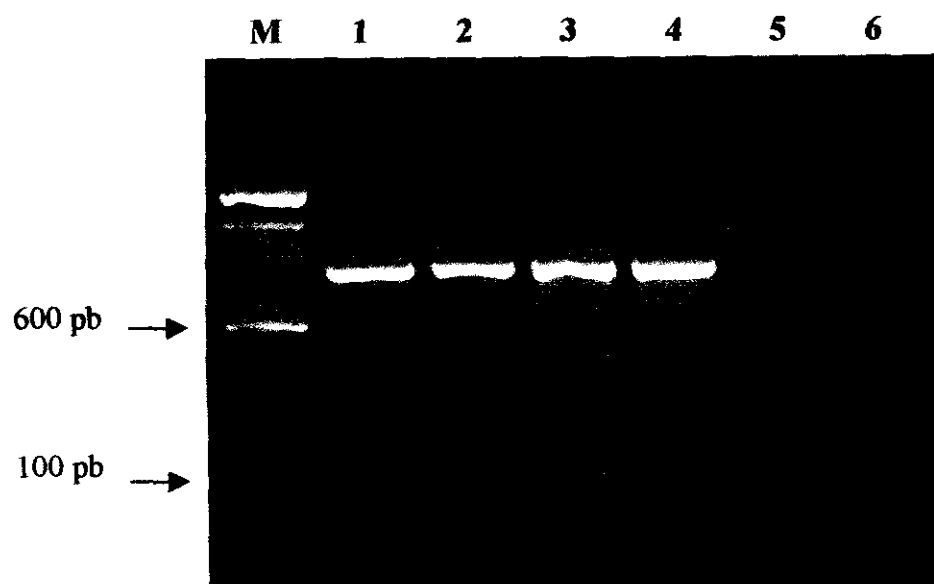


Figura 36. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen mitocondrial 16S ARNr de (1) salmón fresco, (2) salmón ahumado, (3) trucha fresca, (4) trucha ahumada, (5) palometa fresca y (6) palometa ahumada. M = marcador de peso molecular 100 pb.

Figura 37. Secuencias de ADN de parte del gen 16S ARNr de un salmón y una trucha alineadas con la secuencia homóloga de trucha (número de acceso L29771) y de salmón (número de acceso U12143) de la base de datos GenBank. Las dianas de restricción de las enzimas *Hpa* I (5'-GTT↓AAC-3') y *Bst* EII (5'-G↓GTAACC-3') se muestran sombreadas. Los nucleótidos en negrita de la secuencia de la trucha indican la posición de los cebadores 16S-1 y 16S-2 utilizados en la reacción de amplificación. (~) base inexistente; (.) base igual a la de la secuencia L29771; (N) base no identificada.

L29771	1	CACCACAACA	TACATACCCC	AATAAACTT	AGAATTAAGT	CAACAAACCA	50
Trucha fresca		~~~~~	~~~~~	A.....	.G..T.....		
Salmón fresco		~~~~~	~~~~~	T.....	.A..C.....		
U12143				T.....	.A..C.....		
L29771	51	TTTTCCACC	TTAGTAGGGG	CGACCGAAAA	GGAGATAA~T	TGAGCAACAG	100
Trucha fresca			N...	N...C.....	...N.T..~.		
Salmón fresco			C...	...G.....	...A.C..T.		
U12143			C...	...G.....	...A.C..T.		
L29771	101	AAAAAGTACC	GCAAGGGGAA	GCTGAAAGAG	AATTGAAATA	ACCCATTTAA	150
Trucha fresca			A..		..T.....T.		
Salmón fresco			A..		..A.....C.		
U12143			~.A..		..A.....C.		
L29771	151	GCCTAGAGAA	GCAGAGATTA	AATCTCGTAC	CTTTTGCATC	ATGATTTAGC	200
Trucha fresca		G..					
Salmón fresco		A..					
U12143		A..					
L29771	201	CAGCACACCT	GAGCAAAGAG	AACTTTAGTT	TAGGCCCCCG	AAACTAGACG	250
Trucha fresca		C...T			T.....		
Salmón fresco		A...C			C.....		
U12143		A...C			C...~.		
L29771	251	AGCTACTCCG	GGACAGCCTA	TTGTAGGGCC	AACCCGTCTC	TGTGGCAAAA	300
Trucha fresca				..G.....			
Salmón fresco				..A.....			
U12143		~		..A.....			
L29771	301	GAGTGGGACG	AGCCCCGAGT	AGAGGTGATA	AACCTATCGA	GCCTAGTTAT	350
Trucha fresca				T.	N.		
Salmón fresco				C.			
U12143		~		C.			

Figura 37. (continuación)

	351		400
L29771	AGCTGGTTGC TTAGGAAATG AATAGAAGTT CAGCCCCCGG GCTTTCTTAG		
Trucha fresca	N.....N..N..C..T.....		
Salmón fresco	T..C.....		
U12143	T..C.....		
	401		450
L29771	GACCTTAAGG TAAAACTAAT ATTGTCCCAA AGAAACCAGG AGAGTTAGTC		
Trucha fresca	T....T A.....G.....G..		
Salmón fresco	C....C C.....A.....A..		
U12143	C....C C.....A.....A..		
	451		500
L29771	AAAGGAGGTA CAGCTCCTTT GAACAAGGAC ACAACCTTAA CAGGCGGCTA		
Trucha fresca			
Salmón fresco	N.....		
U12143			
	501	Bst EII	550
L29771	AGGATCATAG TT-CCAAGGT AACCTGTTAC AGTGGGCCTA AGAGCAGCCA		
Trucha fresca	G..A.C...T.....		
Salmón fresco	A..N.T...C.....N...T...		
U12143	A..A.T...C.....		
	551		600
L29771	CCTGCACAGA AAGCGTTAAA GCTCAGACAG ATACAAACCT CTTATCCTGA		
Trucha fresca	C.....C.....		
Salmón fresco	T.N.....N..N. GG.TN.N.....		
U12143	T.....T..G.....		
	601		650
L29771	TAAGAAATCC CACCCCCCTA ACCGTACTAA GCCGTTCCAT GCCCCCATGG		
Trucha fresca	...G.....C.....C.C.....		
Salmón fresco	.G.A.....T.....N.....T.A.....		
U12143	...A.....T.....T.A.....		
	651		700
L29771	AAGAGATTAT GCTAGAATGA GTAATAAGAG AGTACAACCTC TCTCCAGCA		
Trucha fresca	...A.....T.....		
Salmón fresco	...C.....G.....		
U12143	...C.....G.....		
	701		750
L29771	CATGTGTAAG TCGGACCGGA CCCCCACCG ACAATAACG AACCCAAACC		
Trucha fresca	C.....C.....A..		
Salmón fresco	G.....G..		
U12143	G.....G..		
	751		800
L29771	AAGAGGGAAC TGTAGGCCAG AACAAACACC AAGAAAAACC TACACCAACA		
Trucha fresca	G.....C...A.....C.....		
Salmón fresco	C.....T...G.....T.....		
U12143	C.....T...G.....T.....		
	801		850
L29771	AATCGTTACC CCCACACAGG AGTGCCCCAA GGGAAAGACC CAAAGGAAGA		
Trucha fresca	C.....C.CA.....C.....		
Salmón fresco	A.....T.AC.....T.....		
U12143	A.....T.AC.....T.....		

Hpa I

Figura 37. (continuación)

	851		900
L29771	GAAGGAACTC	GGCAAACACA	AGCCTCGCCT GTTTACCAAA AACATCGCCT
Trucha fresca			
Salmón fresco			
U12143			
	901		950
L29771	CTTGCAAATC	AAAACATAGA	GGT~~CCGCC TGCCCTGTGA CTATGGGTTT
Trucha fresca	C.....	G..AG	A.GTC..... ..G~~~~~ ~~~~~~
Salmón fresco	T.....	GCNNG	A.GNC..... ..G~~~~~ ~~~~~~
U12143	T.....	A..AG	A.GTC..T.. ...C.....
	951		
L29771	AACG		
Trucha fresca	~~~~		
Salmón fresco	~~~~		
U12143			

IV.3.5.3. Análisis de restricción de fragmentos del gen 16S ARNr amplificados por PCR (PCR-RFLP)

Con el programa MAP se construyeron los mapas de restricción de las secuencias del gen 16S ARNr de salmón y trucha. A partir de ellos (Figuras 38 y 39) se seleccionaron endonucleasas apropiadas para diferenciar las dos especies de pescado estudiadas.

Como resultado de la comparación de los mapas de restricción de las secuencias disponibles, y siguiendo criterios de especificidad de especie y disponibilidad comercial, se eligieron las endonucleasas *Hpa* I y *Bst* EII.

La Figura 40 muestra los resultados obtenidos después de la digestión de los productos de PCR de muestras musculares frescas y ahumadas de salmón y trucha. En las secuencias de salmón existe un punto de corte para la enzima *Hpa* I, dando lugar a dos fragmentos de 804 pb y 146 pb. Sin embargo, en las secuencias de trucha no hay ninguna diana de restricción para la enzima *Hpa* I. Asimismo, la enzima *Bst* EII corta los productos de PCR de trucha, originando dos fragmentos de 513 pb y 437 pb, mientras que los productos de PCR de salmón permanecen inalterados. Estos resultados, detectables por electroforesis en gel de agarosa, corroboran perfectamente los mapas de restricción de las secuencias de ADN disponibles y confirman la ausencia de polimorfismo intraespecífico entre las muestras analizadas.

La Figura 41 muestra el análisis de restricción de los productos de PCR del gen 16S ARNr obtenidos a partir de huevos frescos de salmón y trucha y huevos ahumados de salmón. Los resultados obtenidos coinciden con los de tejido muscular en el caso de huevos frescos de salmón y trucha (Figura 41, líneas 3 y 4). Sin embargo, igual que sucede con el gen COII, los perfiles de huevos de salmón ahumados (Figura 41, líneas 5, 6 y 7) no coincidieron con el perfil de restricción de las muestras frescas.

Figura 38. Mapa de restricción de un fragmento del gen 16S ARNr de *Salmo salar* (número de acceso U12143, GenBank). La enzima seleccionada (*Hpa* I) aparece en negrita y su diana de restricción (5'-GTT↓AAC-3') se muestra sombreada.

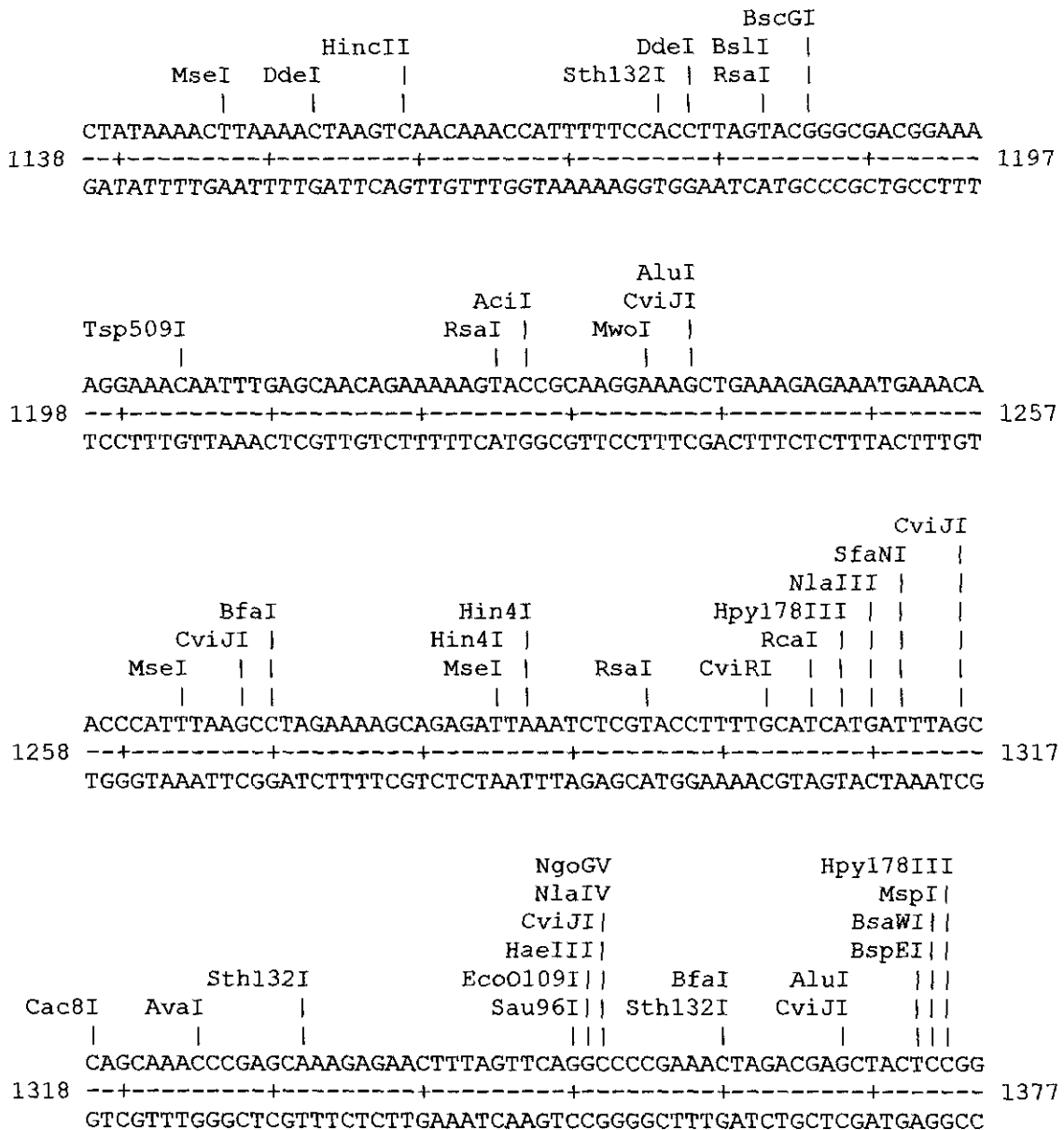


Figura 38. (continuación)

CviJI
 HaeIII
 Sau96I |
 BslI | | BsmAI
 CjePI | | BsmBI
 EcoNI | | Sth132I |
 CviJI | | BscGI | CjePI CviJI |
 | | | | |
 ACAGCCTATTATAGGGCCAACCCGTCTCTGTGGCAAAGAGTGGACGAGCCCCGAGTAGA
 1378 ----- 1437
 TGTCGGATAATATCCCGGTTGGGCAGAGACACCGTTTTCTCACCTGCTCGGGGCTCATCT

BfaI
 CviJI |
 MaeIII TaqI | | AluI Bpu10I
 Tsp45I HphI | | CviJI DdeI CviJI
 | | | | |
 GGTGACAAACCTATCGAGCCTAGTTATAGCTGGTTGCTTAGGAAATGAATAGAAGTTCAG
 1438 ----- 1497
 CCACTGTTTGGATAGCTCGGATCAATATCGACCAACGAATCCTTTACTTATCTTCAAGTC

CviJI
 HaeI AvaII
 HaeIII EcoO109I
 Bce83I | Psp5II
 ScrFI | | Sau96I
 BsaJI | | Sse8647I BsmFI
 EcoRII | | DdeI | SmlI | MnlI
 | | | | |
 CCCCCTGGCCTTCTTAGGACCTCAAGGTAAACTAACCTTGTCCCAAAGAAACCAAGAGA
 1498 ----- 1557
 GGGGGACCGGAAGAATCCTGGAGTTCCATTTTGATTGGAACAGGGTTTCTTTGGTTCTCT

Sau3AI
 Bpu10I |
 DdeI |
 CviJI |
 Fnu4HI | |
 TauI | |
 MnlI AluI
 MseI | CviJI
 Hin4I | | RsaI | AceIII MseI AciI | |
 | | | | |
 GTTAATCAAAGGAGGTACAGCTCCTTTGAACAAGGACACAACCTTAACAGGCGGCTAAGG
 1558 ----- 1617
 CAATTAGTTTCTCCATGTCGAGGAACTTGTTCTGTGTTGGAATTGTCCGCCGATTCC

Figura 38. (continuación)

```

          CviJI
    CviJI      TaaI  |
MnlI |      SfcI |  |
    | |      ||  |
CCAAGCCAAGAGGGAAC TGTAGCCCAGAACAAATACCGAGAAAAACCTACATCAACAAAT
1858 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1917
GGTTCGGTTCTCCCTTGACATCGGGTCTTGTATTATGGCTCTTTTGGATGTAGTTGTTTA

          RleAI
          BsiHKA I |
HincII      Bsp1286I |
HpaI      MslI  | |
MseI |      BslI  | | | EarI      MboII
    ||      | |  | | |      |
CGTTAACCCACACAGGAGTGCTCACAGGGAAGACCTAAAGGAAGAGAAGGAACTCGGC
1918 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1977
GCAATTGGGGTGTGTCCTCACGAGTGTCCTTTCTGGATTTCCTTCTCTTCCTTGAGCCG

          AvaII
          EcoO109I
          BsmFI      Psp5II
          MnlI MnlI  Sau96I
          |      |
AAACACAAGCCTCGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCTTGTAATCAAAACATAAGAGG
1978 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 2037
TTTGTGTTCGGAGCGGACAAATGGTTTTTGTAGCGGAGAACATTTAGTTTTGTATTCTCC

          MaeIII
          Tsp45I
          FauI  |
          Sth132I | |
          Cac8I || |
          AciI  | || |
NcoGV | | || |
NlaIV | | || | MseI
    | | | || | |
TCCCGCCTGCCCTGTGACTATGGGTTTAACG
2038 -----+-----+-----+-----+-----+----- 2068
AGGGCGGACGGGACACTGATACCCAAATTGC

```

Figura 39. Mapa de restricción de un fragmento del gen 16S ARNr de *Oncorhynchus mykiss* (número de acceso L29771, GenBank). La enzima seleccionada (*Bst* EII) aparece en negrita y su diana de restricción (5'-G↓GTAACC-3') se muestra sombreada.

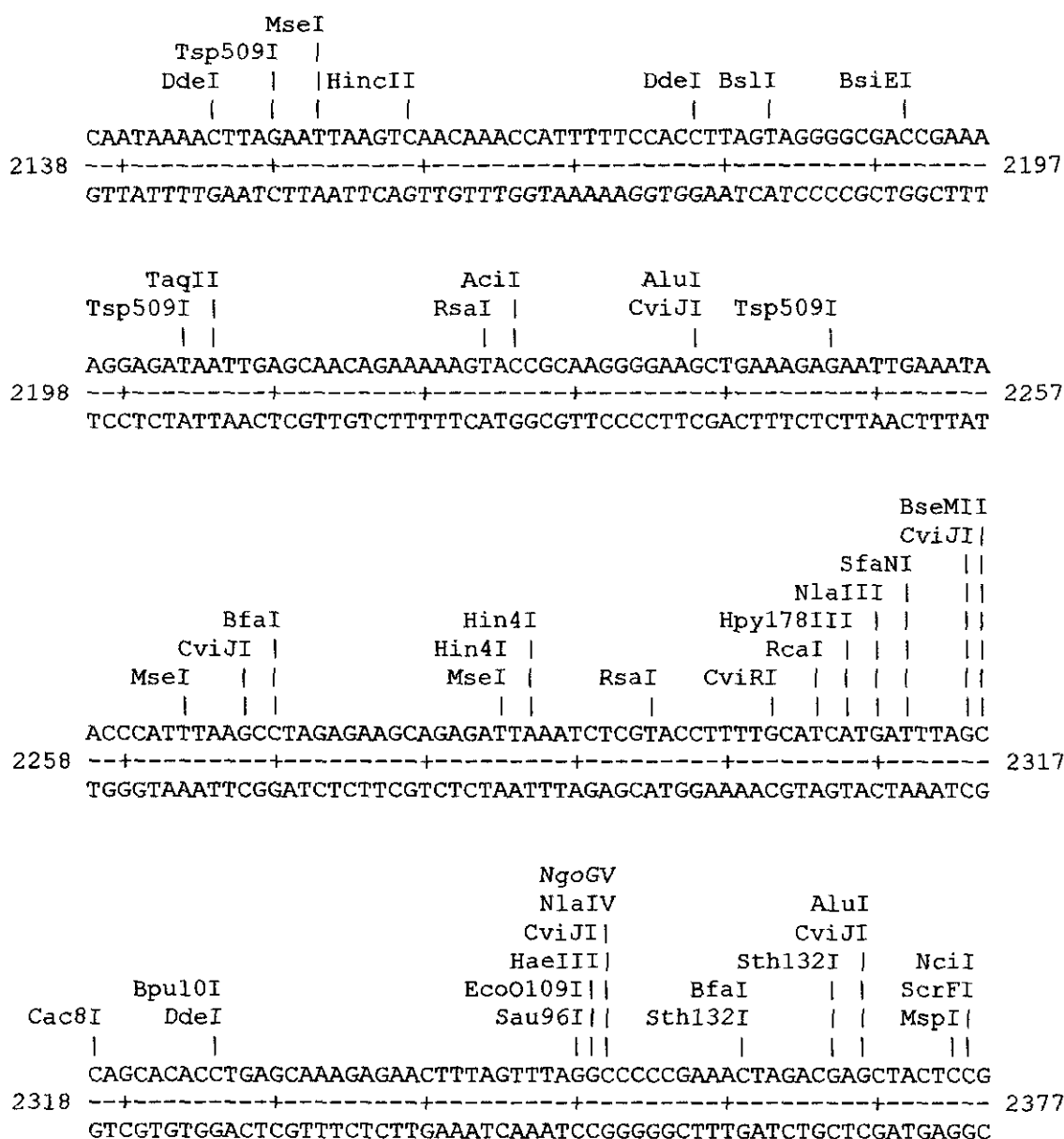


Figura 39. (continuación)

```

Bpu10I
DdeI
CviJI |
Fnu4HI ||
TauI ||
AciI ||
MseI |
AceIII |
RsaI |
AluI |
MnII |
BsaXI |
Hin4I |
2558 AGAGTTAGTCAAAGGAGGTACAGCTCCTTTGAACAAGGACACAACCTTAACAGGCGGCTA
----- 2617
TCTCAATCAGTTTCCTCCATGTCGAGGAACTTGTTCTGTGTTGGAATTGTCCGCCGAT

DdeI
BsgI |
CviJI ||
MwoI
BspMI |
BbvI ||
CviJI |
Fnu4HI |
TseI |
AarI |
TaaI |
Sau96I |||
TspRI ||
HaeIII |||
MaeIII |
BsaJI |
StyI |
DpnI |
Sau3AI |
AlwI |
2618 AGGATCATAGTTCCAAGGTAACCTGTTACAGTGGGCCTAAGAGCAGCCACCTGCACAGAA
----- 2677
TCCTAGTATCAAGGTTCCATTGGACAATGTCACCCGGATTCTCGTCGGTGGACGTGTCTT

Hpy188IX
DdeI |
AluI | |
CviJI | |
MseI | | |
BseMII |
Hpy178III |
Hin4I |
HaeIV |
MnII |
Bcefi |
2678 AGCGTTAAAGCTCAGACAGATACAAACCTCTTATCCTGATAAGAAATCCCACCCCCCTAA
----- 2737
TCGCAATTTTCGAGTCTGTCTATGTTTGGAGAATAGGACTATTCTTTAGGGTGGGGGGATT

NlaIII
BsaJI |
BstDSI |
EarI |
NcoI |
StyI |
BfaI |
MboII |
TatI |
2738 CCGTACTAAGCCGTTCCATGCCCCCATGGAAGAGATTATGCTAGAATGAGTAATAAGAGA
----- 2797
GGCATGATTCGGCAAGGTACGGGGGTACCTTCTCTAATACGATCTTACTCATTATTCTT

```

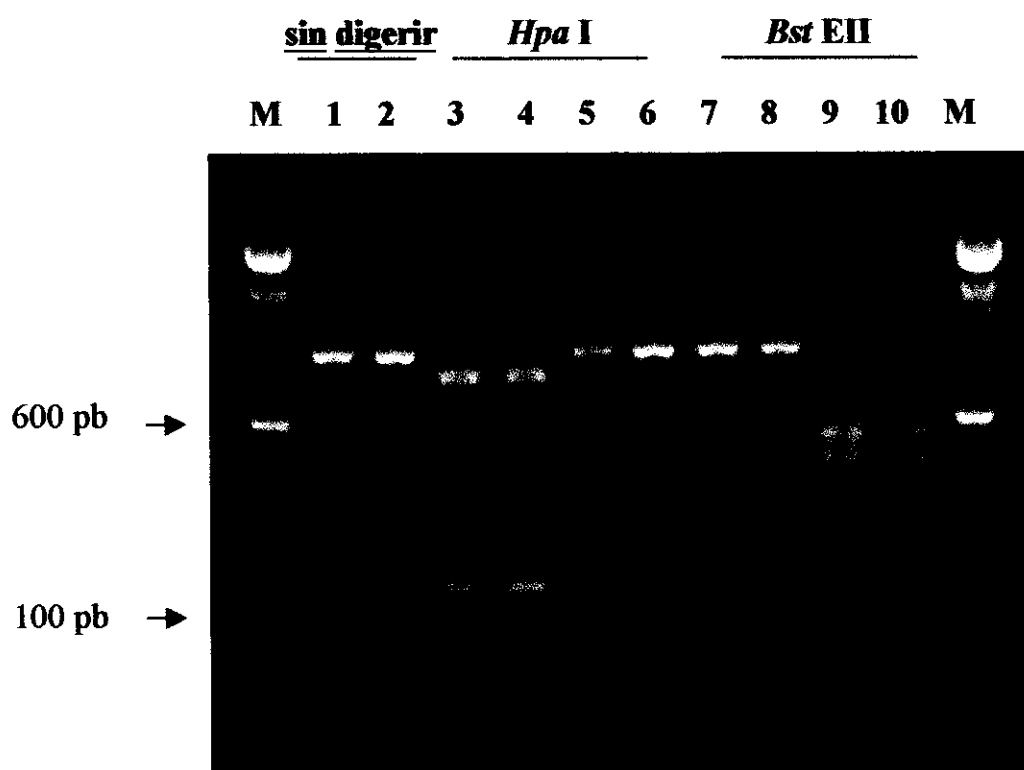



Figura 40. Perfiles de restricción de los productos de PCR del gen 16S ARNr obtenidos de muestras de salmón atlántico y trucha arco iris. Muestras: (1, 3, 7) salmón fresco, (2, 5, 9) trucha fresca, (4, 8) salmón ahumado y (6, 10) trucha ahumada. M= marcador de peso molecular 100 pb.

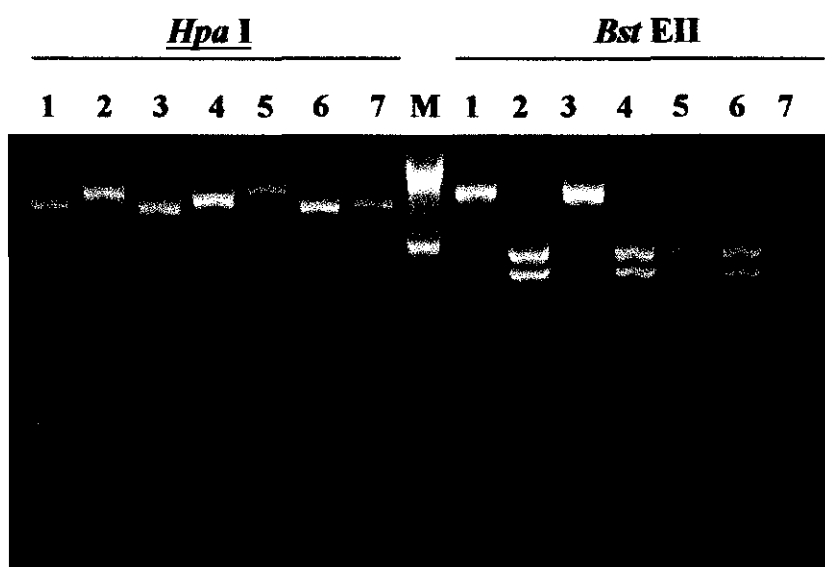


Figura 41. Perfil de restricción de los productos de PCR del gen mitocondrial 16S ARNr obtenidos de muestras de (1) salmón fresco, (2) trucha fresca, (3) huevas frescas de salmón, (4) huevas frescas de trucha y (5, 6 y 7) huevas ahumadas de salmón. M= marcador de peso molecular 100 pb.

IV.3.6. UTILIZACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN *p53* COMO MARCADOR GENÉTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE PESCADO

IV.3.6.1. Muestras analizadas

El marcador genético nuclear *p53* se utilizó para analizar ADN de muestras de tejido muscular fresco y ahumado de salmón, trucha y palometa.

IV.3.6.2. Amplificación de los exones 5 y 6 del gen nuclear *p53* y secuenciación de los fragmentos amplificados

Utilizando los cebadores *p53-5* y *p53-7* y las condiciones de la reacción de PCR descritas en la sección III.2.4.5.4 se amplificó un fragmento de 532 pb en todas las muestras de salmón analizadas, mientras que con las muestras de trucha se obtuvo un fragmento de 518 pb (Figura 42). Con las muestras de palometa no se consiguió amplificar ningún fragmento.

Los productos de PCR de una muestra de salmón y otra de trucha, una vez purificados (ver sección III.2.4.7.1), se enviaron al Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC para ser secuenciados utilizando el cebador *p53-7*. En la Figura 43 se muestra la alineación de dichas secuencias con una secuencia de trucha arco iris (Kusser y col., 1994). Mediante la comparación de la secuencia de trucha con las bases de datos se pudo identificar la región comprendida entre los nucleótidos 194 y 420 como intrón, mientras que los nucleótidos 1 a 193 corresponden al exón 5 y de las posiciones 421 a 533 al exón 6. Las diferencias detectadas entre las dos secuencias de trucha se reducen a la inserción de una timina en la región del intrón. Sin embargo, la comparación de la secuencia de salmón con las de trucha muestra diferencias de tamaño y secuencia en el intrón y una homología en las regiones correspondientes a exones (excluyendo cebadores) del 98,5%.

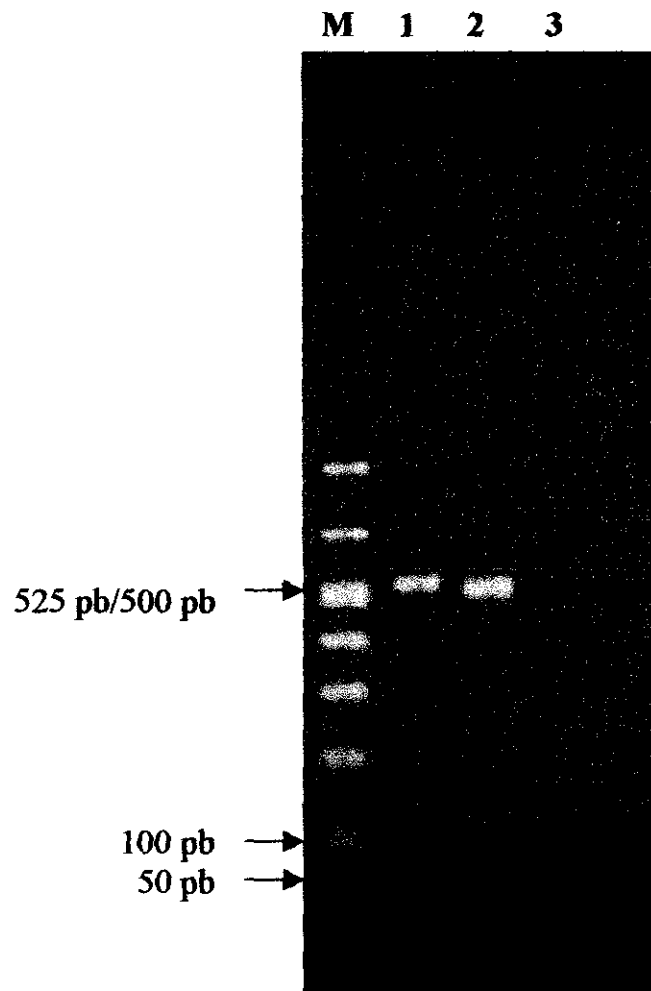


Figura 42. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen *p53* de (1) salmón ahumado, (2) trucha ahumada y (3) palometa ahumada. M = marcador de peso molecular 100 pb.

Figura 43. Secuencias de ADN de parte del gen *p53* de un salmón y una trucha alineadas con la secuencia homóloga de *Oncorhynchus mykiss* (Kusser y col., 1994). Las dianas de restricción de las enzimas *Eco* RV (5'-GAT↓ATC-3'), *Hinf* I (5'-G↓ANTC-3') y *Taq* I (5'-T↓CGA-3'), y el intrón se encuentran sombreados. Los nucleótidos en negrita de la secuencia de la trucha indican la posición de los cebadores p53-5 y p53-7 utilizados en la reacción de amplificación. (–) base no secuenciada; (.) base igual a la de la secuencia de Kusser y col. (1994); (N) base no identificada.

	1		50
Kusser	ACTCGCCAGA CCTGAACAAG TTGTTCTGCC AGTTGGCGAA GACTTGTC		CA
Trucha			
Salmón			..A....A..
	51		100
Kusser	GTTTCAGATCG TGGTGGACCA CCCTCCTCCT CCTGGGGCAG TGGTACGAGC		
Trucha			
Salmón	T.		
	101		150
Kusser	CCTGGCCATC TATAAGAAGC TGAGTGACGT GGCTGACGTG GTGAGACGCT		
Trucha			
Salmón			
	151		200
Kusser	GCCCTCACCA CCAGAGCACC AGCGAGAACA ATGAAGGTAC ACAACACAGC		
Trucha			
Salmón			...T.....
	201		250
Kusser	GGGAAAGGCT ACTCTTACCC ATACTAAAAC ATGTTAGATT GATCTAGAAT		
Trucha			
Salmón			
	251		300
Kusser	GT.....GCTTGG ATGCAGTATA GAGGGTCCAC ACTATAAAG		
Trucha			
Salmón	..TATACAGT GTGCTT. [C.]		
		<i>Taq</i> I	
	301		350
Kusser	GAGTTTAAAC GTCA-TTTAT ACTTACACTT GTTGCCCT-AT TGAATGAGTA		
Trucha			
Salmón	T.....		CC. [A.]
		<i>Hinf</i> I	

Figura 43. (continuación)

	351	Eco RV	400
Kusser	ACGCAAATGT TTTGACTGAT AGGATATCCT CAGTGTGTCG CTTAATACTC		
Trucha			
Salmón	T.....G....T....T.....		
	401		450
Kusser	~GTGTTTTC TGTGCCTTAG GTCCTGCCCC GCGAGGTCAC CTGGTCAGAG		
Trucha	~.....		
Salmón	AA.....		
	451		500
Kusser	TTGAGGGGAA CCAGCGATCA GAGTATATGG AGGATGGTAA CACTCTGAGA		
Trucha			
Salmón	G.....N.....		
	501	533	
Kusser	CACAGTGTGC TCGTCCCCTA TGAGCCTCCT CAG		
Trucha	~~~~~		
Salmón	..N......N.~~~~~		

IV.3.6.3. Análisis de restricción de fragmentos del gen nuclear *p53* amplificados por PCR (PCR-RFLP)

Mediante el programa MAP (GCG) se realizaron los mapas de restricción de las secuencias de los fragmentos amplificados de salmón (Figura 44) y trucha (Figura 45) y se tradujeron a aminoácidos las secuencias de nucleótidos. Comparando los mapas de restricción de la secuencia de salmón con las dos secuencias de trucha y siguiendo criterios de especificidad de especie y disponibilidad en el laboratorio, se eligieron las endonucleasas *Eco* RV, *Hinf* I y *Taq* I (New England BioLabs, Beverly, MA, USA) para diferenciar las muestras de salmón y trucha. La comparación de las secuencias aminoacídicas de salmón y trucha puso de manifiesto un cambio en un aminoácido, el residuo 17 del exón 6 es alanina en salmón y serina en trucha.

En la Figura 46 se muestran los resultados obtenidos tras digerir los productos de PCR de salmón. Como se puede apreciar, la enzima *Eco* RV no cortó los productos de PCR de salmón. La enzima *Hinf* I reconoció un punto de corte originando dos fragmentos de 185 pb y 347 pb y la endonucleasa *Taq* I reconoció también un lugar de restricción, produciendo dos fragmentos de 267 pb y 265 pb. En la Figura 47 se observa cómo la digestión con la enzima *Eco* RV de los productos de PCR de trucha originó dos fragmentos de 156 pb y 362 pb, mientras que las otras dos enzimas (*Hinf* I y *Taq* I) no cortaron ningún producto de PCR de trucha.

IV.3.7. UTILIZACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN 5S RNAr COMO MARCADOR GENÉTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE PESCADO

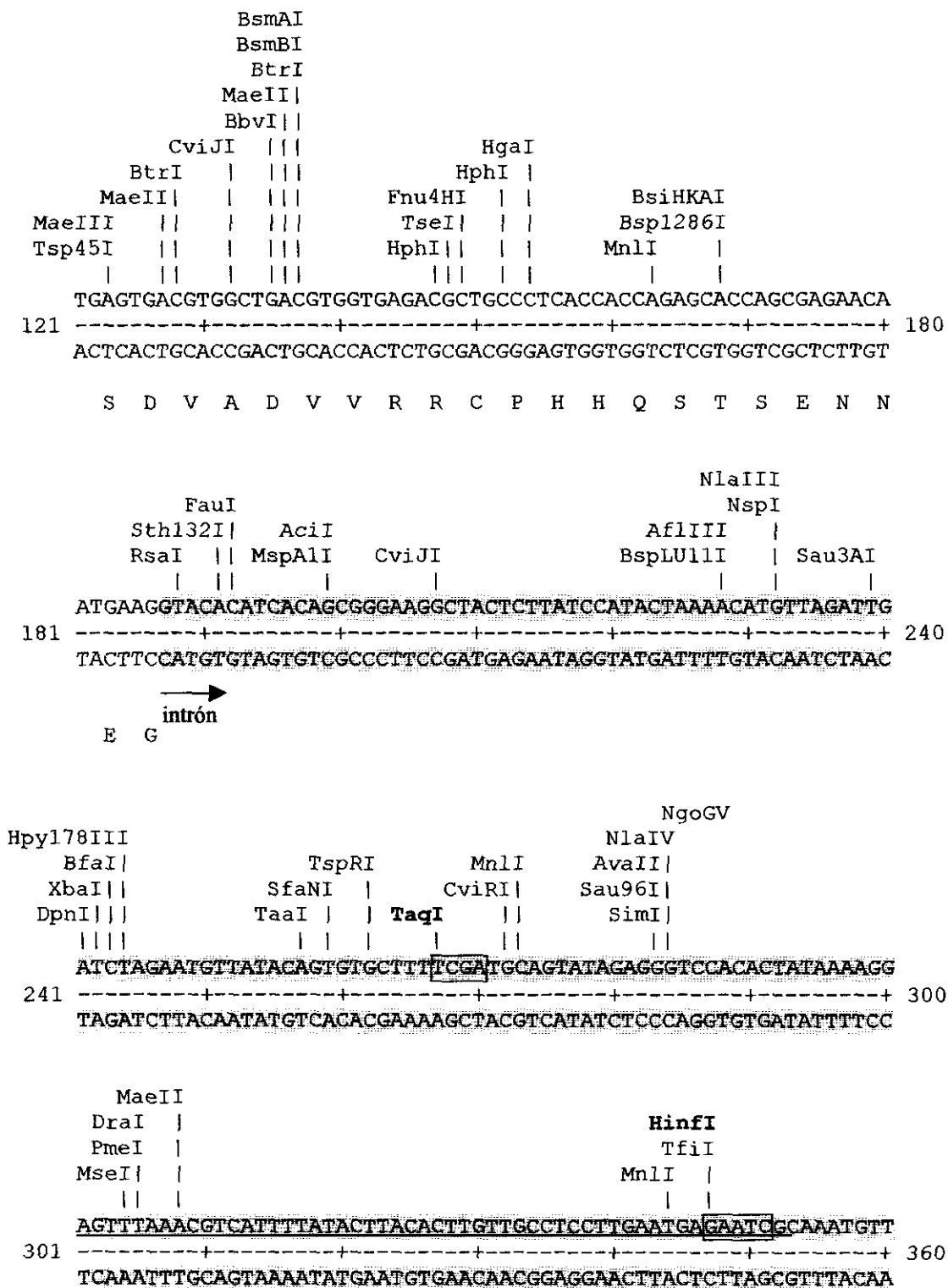
IV.3.7.1. Muestras analizadas

El marcador nuclear 5S ARNr se utilizó para analizar ADN de muestras de tejido muscular de salmón, trucha y palometa ahumados.

IV.3.7.2. Amplificación del gen 5S ARNr y secuenciación de los fragmentos amplificados

Utilizando los cebadores 5S-1 y 5S-2 y la reacción en cadena de la

Figura 44. (continuación)



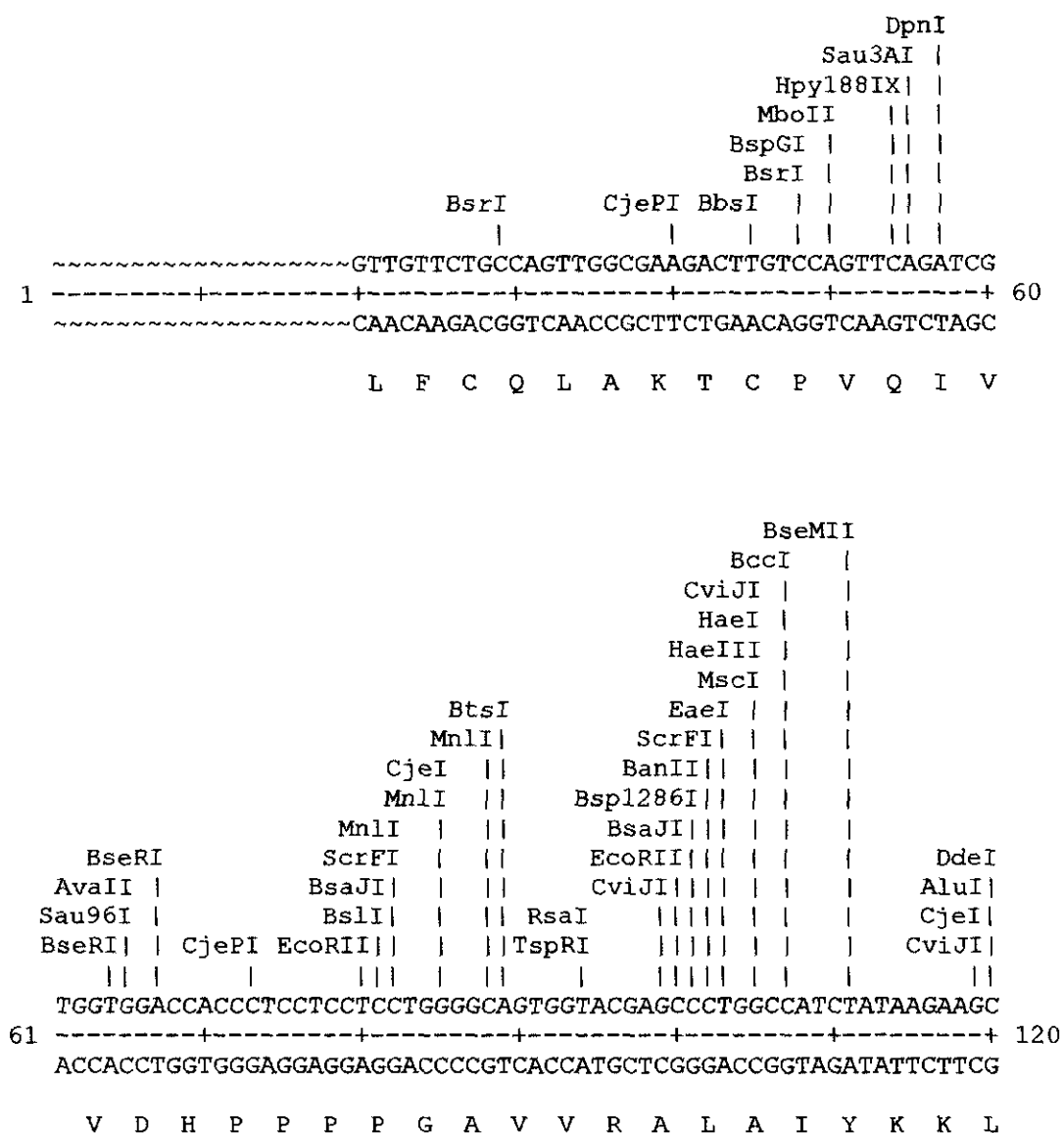


Figura 45. (continuación)

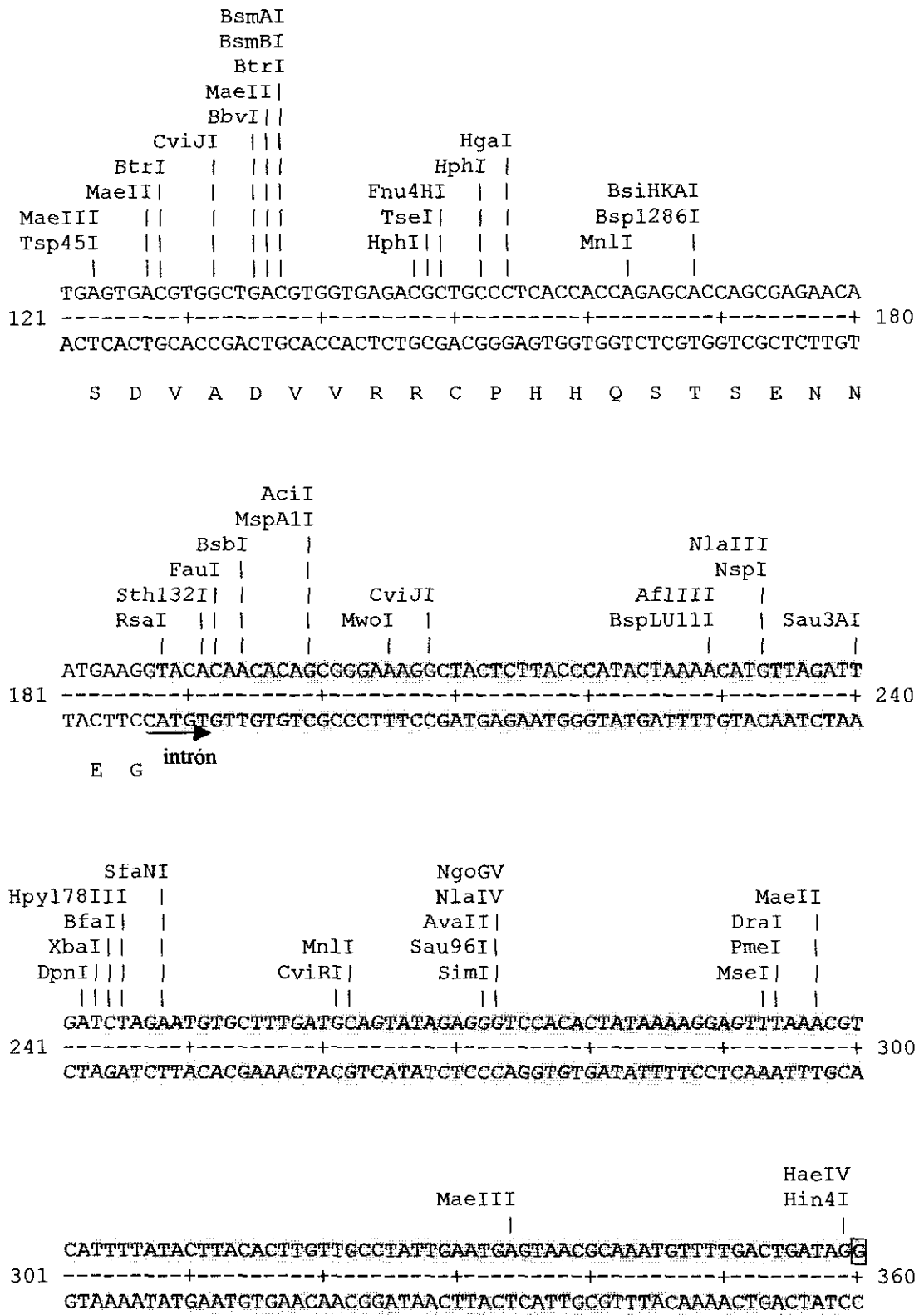
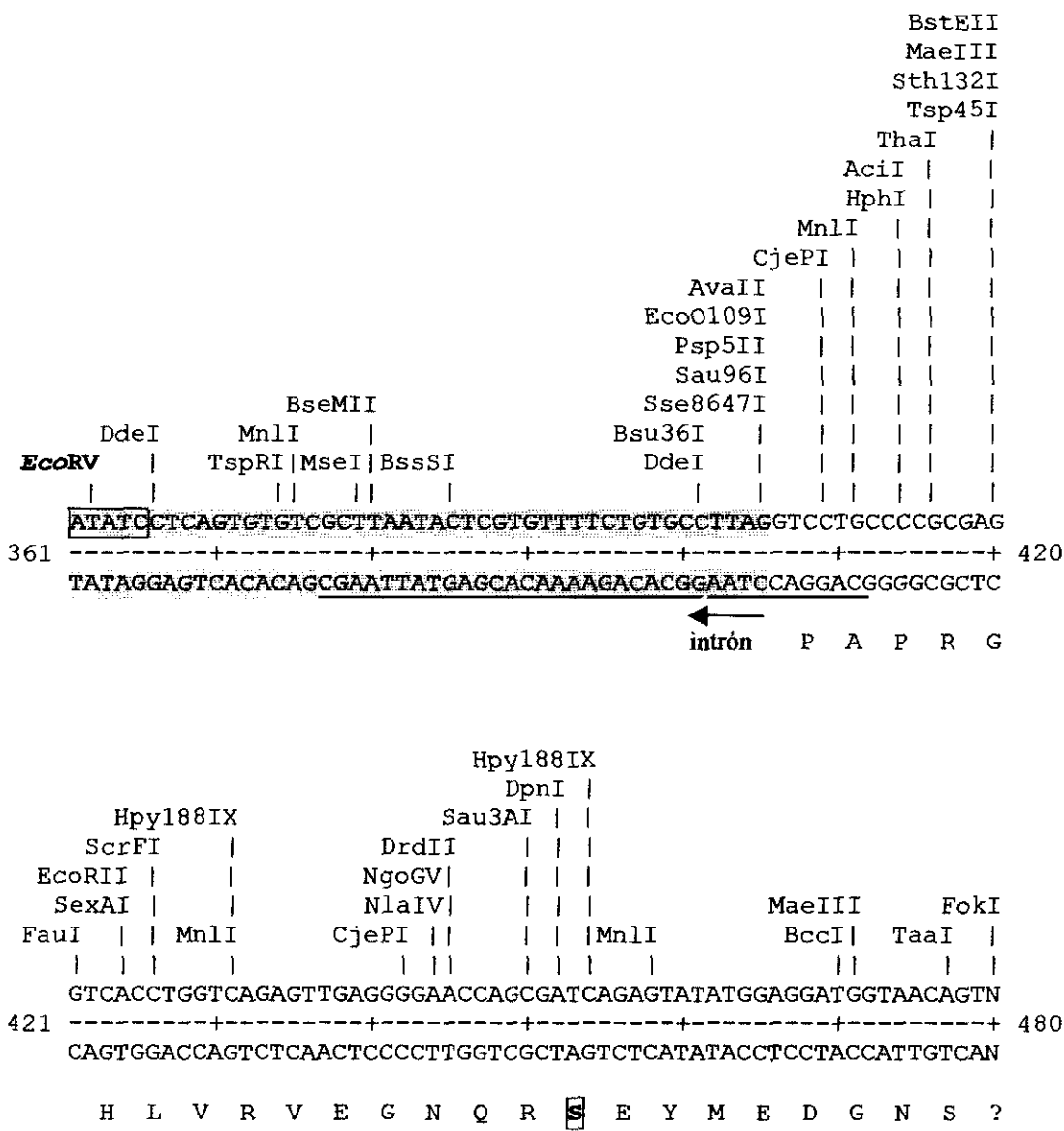


Figura 45. (continuación)



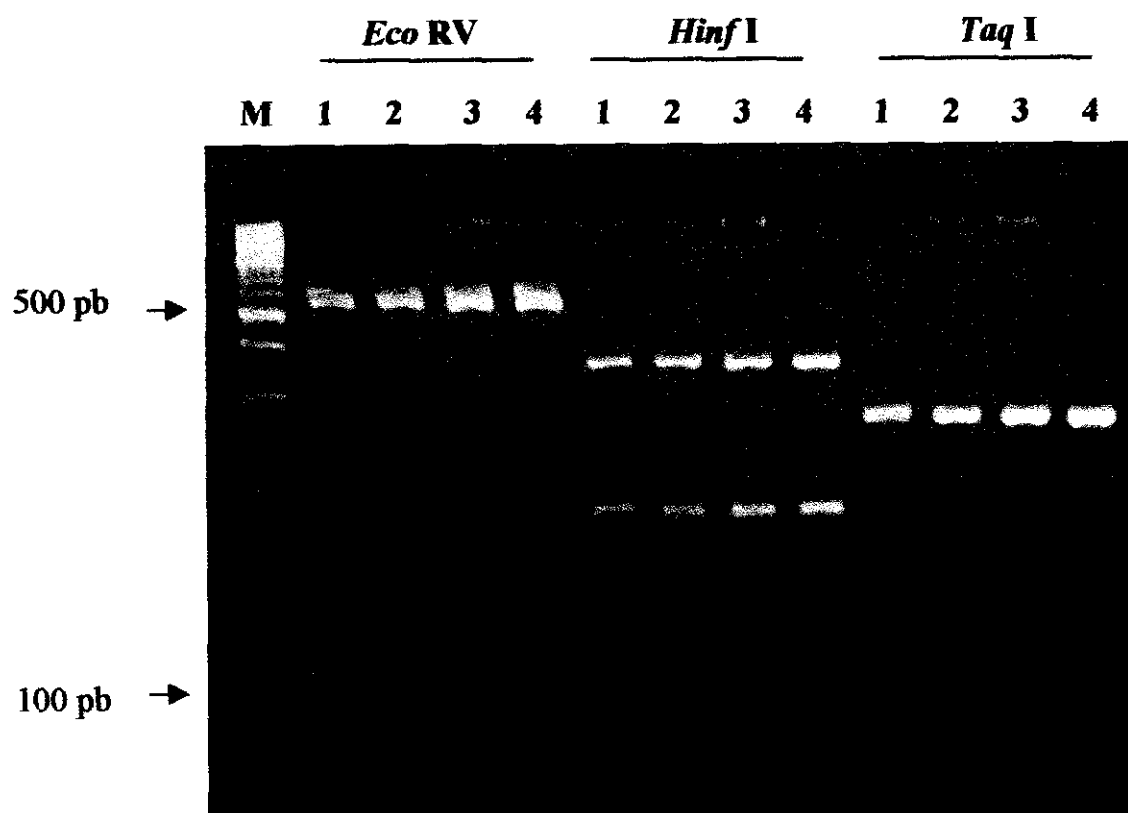


Figura 46. Perfil de restricción de los productos de PCR del gen *p53* obtenidos de muestras de salmón atlántico digeridos con *Eco RV*, *Hinf I* y *Taq I*. Muestras: (1) salmón ahumado Valkiria; (2) salmón ahumado El Rey Vikingo; (3) salmón ahumado Skandia y (4) salmón ahumado Domínguez. M = marcador de peso molecular 100 pb.

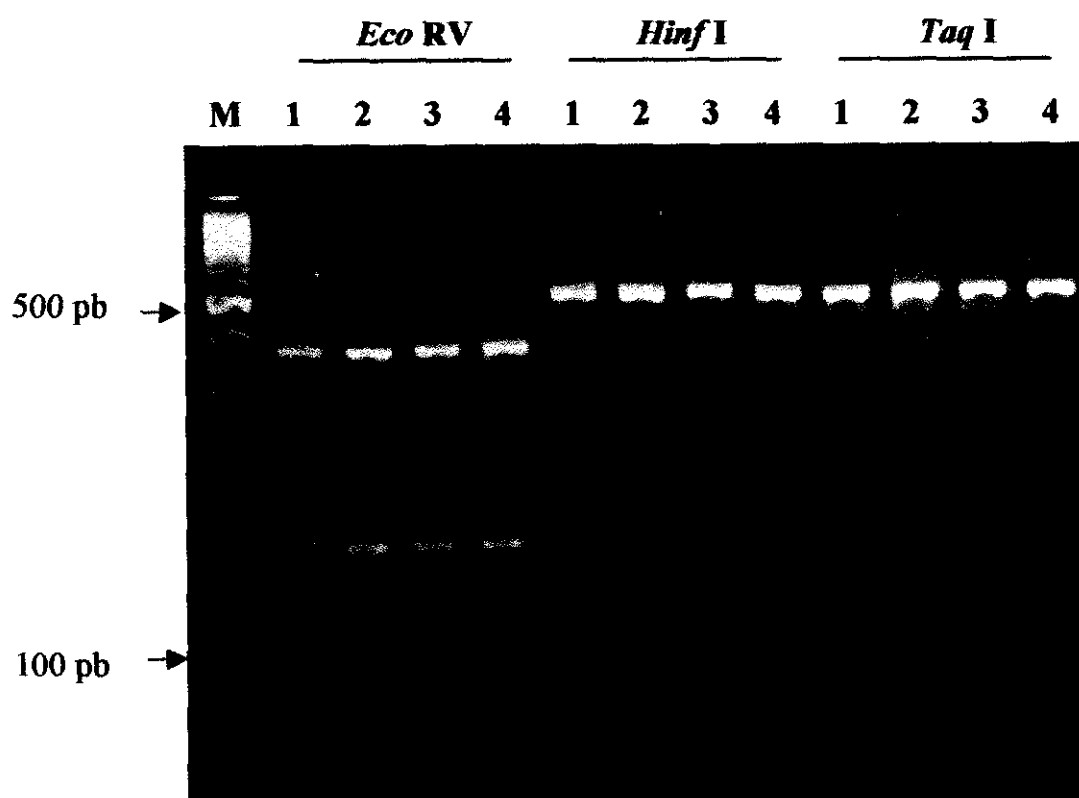


Figura 47. Perfil de restricción de los productos de PCR del gen *p53* obtenidos de muestras de trucha digeridos con *Eco RV*, *Hinf I* y *Taq I*. Muestras: (1) trucha ahumada Skandia; (2) trucha ahumada Eurosalmón; (3) trucha ahumada Pryca y (4) trucha ahumada Domínguez. M = marcador de peso molecular 100 pb.

polimerasa (PCR), en las condiciones descritas en la sección III.2.4.5.5, se amplificaron fragmentos de ADN de distinto tamaño según la especie analizada (Figura 48). Los productos de PCR de muestras de salmón ahumado dieron lugar a dos fragmentos de 256 pb y 525 pb aproximadamente, las muestras de trucha ahumada originaron dos fragmentos de 294 pb y 350 pb aproximadamente y los productos de PCR de palometa ahumada dos fragmentos de 450 pb y 550 pb aproximadamente. En cada especie, todos los individuos analizados dieron lugar al mismo perfil de amplificación.

A pesar que la diferente longitud de los fragmentos obtenidos por la reacción de PCR permite identificar directamente las muestras de salmón, trucha y palometa ahumados, se consideró conveniente comprobar mediante secuenciación que los fragmentos amplificados correspondían efectivamente al gen 5S ADNr. Para ello, el fragmento de 256 pb de salmón, el de 294 pb de trucha y el de 550 pb aproximadamente de palometa, una vez purificados (ver sección III.2.4.7.1), se secuenciaron en el Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC utilizando el cebador 5S-1. En la Figura 49 se muestra la alineación de dichas secuencias con la secuencia publicada de salmón atlántico (Pendas y col., 1994). En la región codificante (120 pb) las secuencias de trucha y palometa eran iguales y sólo se apreciaron dos nucleótidos diferentes entre éstas y la secuencia de salmón (Pendas y col., 1994), y un nucleótido diferente entre nuestra secuencia de salmón y la publicada por Pendas y col. (1994). Sin embargo, la región correspondiente al espaciador muestra notables diferencias en tamaño y secuencia entre las tres especies.

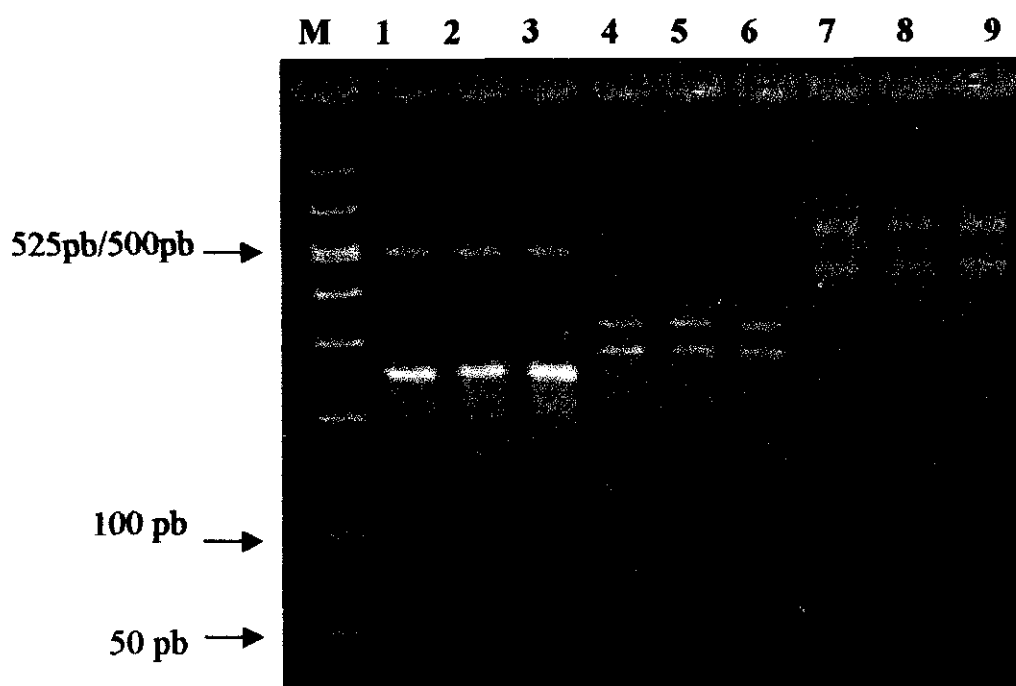


Figura 48. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen nuclear 5S ARNr de (1) salmón ahumado Domínguez, (2) salmón ahumado Skandia, (3) salmón ahumado El Rey Vikingo, (4) trucha ahumada Domínguez, (5) trucha ahumada Skandia, (6) trucha ahumada Pryca, (7) palometa ahumada Domínguez, (8) palometa ahumada Valkiria y (9) palometa ahumada Ubago. M= marcador de peso molecular 100 pb.

Figura 49. Secuencias de ADN de parte del gen 5S ARNr de un salmón, una trucha y una palometa alineadas con la secuencia homóloga de *S. salar* (Pendas y col., 1994). Los nucleótidos en negrita de la secuencia del salmón indican la posición de los cebadores 5S-1 y 5S-2 utilizados en la reacción de amplificación. La región codificante conservada se muestra subrayada.

	1				50
Pendas	TACGCCCGAT	CTCGTCCGAT	CTCGGAAGCT	AAGCAGGGTC	GGGCCTGGTT
Salmon	~~~~~	~~~~~	~.....		
Trucha	~~~~~	~~~~~	~.....N..		
Palometa	~~~~~	~~~~~	~~~~~..		
	51				100
Pendas	<u>AGTACTTGGA</u>	<u>TGGGAGACCT</u>	<u>CCTGGGAATA</u>	<u>CCAGGTGCTG</u>	<u>TAAGCATTTT</u>
Salmon		G			
Trucha		G			T....
Palometa		G			T....
	101				150
Pendas	GTCCACGAGG	GTGTGCTCTT	GCACTATTTT	ATCAGCAACA	CTGCCTTGTA
Salmon					
Trucha	GTCACCTGCT	TGTGGAATTT	CAACTCTTTG	TCCGTTTTTT	CCCACAAGGC
Palometa	CTTCTCTTCT	GTCATCAACA	GATGGCGCTG	ATGCTTCGTT	NGTGGGGACA
	151				200
Pendas	TTAAGCATTT	AATGATGAAT	TGACTAAATG	TCTG~TTTAT	CAGACTCACT
Salmon				T.....	
Trucha	TGAAATATGT	GCCCTCGCTT	TGAAATAAGT	AAGCAAGGTT	AGTTTGTATT
Palometa	GACAGGGCTT	TGGATTATGA	ATAGTTTAGT	TTAGTCTTCT	TTTCAAATAT
	201				250
Pendas	TTGACTATAT	ATGTTGTAGC	AA~~~~~	~~~~~	~~~~~
Salmon			~~~~~	~~~~~	~~~~~
Trucha	TCATCCAACA	ATCTGTGCTA	CAAATTATGG	CTACAGTATA	TGCAATTTCA
Palometa	GNATATAAAA	CAGACAATTT	NCAATTCATC	CATTAACAAG	GAATAACACA

Figura 49. (continuación)

	251						300
Pendas	~~~~~	GAGATTGTTT	CTC	<u>GCTTACG</u>	<u>GCCATACCAG</u>	<u>CCTG</u>	
Salmon	~~~~~						
Trucha	TCCACTTTTT	GAGATTGCCT	TTC				
Palometa	AAGTTATACA	AGTTANAGAA	ACATGAAAAT	NACAAACACC	ATAATTA		

V. DISCUSIÓN

V.1. PRODUCCIÓN DE INMUNOSUEROS Y DESARROLLO DE TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS (ELISA) PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SALMÓN (*Salmo salar*), TRUCHA (*Oncorhynchus mykiss*) Y PALOMETA (*Brama raii*) AHUMADOS

V.1.1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

El desarrollo de inmunoensayos requiere disponer previamente de anticuerpos con especificidad y afinidad adecuadas para el antígeno objeto de investigación. La selección de los extractos antigénicos utilizados como inmunógenos y la especie animal empleada en la obtención de los inmunosueros determinan, junto a la pauta de inmunización, las características de los anticuerpos policlonales obtenidos.

Como antígenos para la obtención de inmunosueros útiles en la identificación de especies se pueden emplear diversas fracciones proteicas. Varios investigadores (Buchmann y Pedersen, 1994; Oberst y col., 1993; Domínguez y col., 1997) han utilizado las proteínas séricas o las sarcoplásmicas como inmunógenos para identificar especies de pescado en productos no sometidos a tratamiento térmico. Para la identificación de productos tratados por el calor se han empleado otras alternativas, como las proteínas solubles extraídas de dichos productos (Taylor y col., 1994a) o proteínas termoestables especie-específicas (An y col., 1990; Oberst y col., 1996).

Dincer y col. (1987), estudiaron el efecto del ahumado en la detección inmunológica de diversas especies animales en productos cárnicos, pero no encontraron una pérdida significativa de determinantes antigénicos de las proteínas sarcoplásmicas atribuible al proceso de ahumado. Aunque es improbable que el ahumado en frío del pescado modifique la inmunogenicidad de las proteínas sarcoplásmicas, en este trabajo se ha optado por utilizar como extractos antigénicos las proteínas musculares solubles extraídas a partir de muestras de salmón (PSS), trucha (PST) y palometa (PSP) ahumadas (ver sección III.2.1.1).

En la elección de la especie animal utilizada para la producción de anticuerpos influyen factores como la distancia filogenética con la especie de que procede el antígeno, la disponibilidad de un número suficiente de animales y la facilidad de manejo. Conejo, cobaya, rata y ratón son las especies más utilizadas (Harlow y Lane, 1988), aunque la utilización de animales de mayor tamaño, como cerdos, carneros, machos cabríos o caballos, permite obtener grandes volúmenes de inmunosuero y durante períodos de tiempo más prolongados. En este trabajo se utilizaron conejos de raza Nueva Zelanda debido a su fácil manejo y mantenimiento, a que responden bien a gran variedad de antígenos (Dunbar y Schwoebel, 1990) y a que permitían obtener un volumen de suero suficiente para los objetivos del trabajo.

Los conejos se inmunizaron con los extractos antigénicos PSS, PST y PSP emulsionados con adyuvante de Freund, alternándose inoculaciones intradérmicas, intramusculares y subcutáneas (ver sección III.2.2.1). Los adyuvantes son preparaciones que aumentan la inmunogenicidad de un antígeno por mecanismos inespecíficos (Rittenburg, 1990). Las inoculaciones intradérmicas y subcutáneas permiten que la liberación del antígeno a la sangre del animal sea lenta y prolongada en el tiempo, mientras que en la inoculación intramuscular, la respuesta del sistema inmunológico del animal ante el antígeno es más rápida y menos duradera (Deshpande, 1996). Cuando el título de los inmunosueros se consideró adecuado, los conejos se sacrificaron, obteniéndose aproximadamente 400 ml de sangre por animal. Los inmunosueros resultantes se purificaron parcialmente por precipitación selectiva con sulfato amónico (ver sección III.2.2.4).

La precipitación selectiva con sulfato amónico es el método más utilizado para la separación de las proteínas en solución y, en particular, para la separación de los anticuerpos o inmunoglobulinas del inmunosuero total. La técnica se basa en añadir un tampón que contiene concentraciones elevadas de iones fuertemente cargados, como amonio o sulfato, a una solución en la que las proteínas se encuentran unidas a las moléculas de agua formando puentes de hidrógeno. Los iones de amonio y de sulfato compiten

con las moléculas proteicas por el agua, y las proteínas, al perder su unión con las moléculas de agua, disminuyen su solubilidad y precipitan.

La purificación parcial de los inmunosueros por precipitación con sulfato amónico (Harlow y Lane, 1988) presenta las siguientes ventajas:

- La molaridad de la solución saturada de sulfato amónico es suficientemente elevada como para producir la precipitación de casi todas las proteínas, a las que protege frente a la desnaturalización, previniendo además el crecimiento microbiano.
- Es un método económico, sencillo y aplicable a volúmenes grandes de suero.
- Es útil para la concentración y purificación de anticuerpos de cualquier especie.
- Minimiza las interacciones inespecíficas entre los anticuerpos y determinados metabolitos o sustancias cuya configuración molecular superficial sea semejante a la de los epítomos del antígeno a analizar.

V.1.2. VALORACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES OBTENIDOS EN CONEJOS

Los inmunosueros anti-PSS, anti-PST y anti-PSP se enfrentaron, mediante la técnica del ELISA indirecto, con los extractos liofilizados de las proteínas musculares de salmón (PSS), trucha (PST) y palometa (PSP). Los resultados obtenidos demostraron que los inmunosueros no sólo reconocen las proteínas de la especie frente a la que se obtuvieron sino también las de las especies heterólogas (Figura 15). Esta reactividad cruzada era de esperar debido a que la relación filogenética entre las especies analizadas es estrecha y muchos de los determinantes antigénicos de las proteínas musculares pueden ser comunes en todas las especies analizadas. Teniendo en cuenta que los extractos antigénicos utilizados para la inmunización contenían todas las proteínas musculares solubles extraídas de las muestras de pescado ahumado, los conejos no sólo produjeron anticuerpos frente a los epítomos especie-específicos, sino también frente a aquellos que presentan características

comunes en las distintas especies. Por tanto, antes de ser utilizados para la identificación de especies, se debían eliminar los anticuerpos inespecíficos de los inmunosueros. La eliminación de reacciones cruzadas se puede conseguir mediante técnicas de cromatografía de afinidad o mediante técnicas de inmunoabsorción (Harlow y Lane, 1998).

La cromatografía de afinidad consiste en hacer pasar los inmunosueros por columnas que contienen como ligandos de afinidad las proteínas heterólogas con las que se producen reacciones cruzadas y recoger los anticuerpos específicos en una última columna que contiene las proteínas de la especie frente a la que se obtuvo el inmunosero (Harlow y Lane, 1988). Esta técnica se ha utilizado con éxito en nuestro laboratorio para conseguir anticuerpos especie-específicos frente a proteínas cárnicas (Martín y col., 1988) y lácteas (García y col., 1991).

Como alternativa a la cromatografía de afinidad se puede recurrir a la neutralización, que consiste en mezclar los inmunosueros con los extractos antigénicos liofilizados de las especies heterólogas con el fin de bloquear por inmunoabsorción los anticuerpos que reconozcan epítomos en dichos extractos, mientras que los anticuerpos que reconocen determinantes antigénicos específicos permanecen activos (Pinto, 1966; Durand y col., 1974; Doberstein y Greuel, 1982).

Taylor y col. (1994a), utilizaron la neutralización de inmunosueros para la identificación de especies de pescado. Este procedimiento resultó eficaz para reducir las reacciones cruzadas de un suero anti-sardina. Sin embargo, no mejoró la especificidad del inmunosero utilizado para detectar la adulteración de atún (*Thunnus* sp. o *Euthynnus* sp.) con bonito (*Sarda* sp.).

Domínguez y col. (1997), consiguieron eliminar de un inmunosero frente a proteínas solubles de halibut las reacciones cruzadas con las proteínas del lenguado mediante adsorción del inmunosero anti-halibut con proteínas de lenguado inmovilizadas en glutaraldehído.

En este trabajo, la neutralización (ver sección III.2.2.5) ha resultado ser un procedimiento eficaz para eliminar las reacciones cruzadas de los

anticuerpos anti-PSS, anti-PST y anti-PSP con los antígenos de las muestras heterólogas (Figura 16). En consecuencia, no ha sido necesario utilizar columnas de purificación por cromatografía de afinidad, proceso de purificación más largo y costoso que la neutralización.

V.1.3. DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTO EN PLACAS PARA IDENTIFICAR MUESTRAS DE PESCADO AHUMADO

Una vez obtenidos los anticuerpos policlonales específicos frente a las proteínas musculares solubles de salmón (PSS), trucha (PST) y palometa (PSP), se emplearon en el desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) para identificar dichas especies de pescado ahumado. Para que el inmunoensayo sea efectivo se debe elegir un método y un formato adecuados que se ajusten a las necesidades de uso. El inmunoensayo más utilizado consiste en la unión a un soporte sólido, bien de la muestra antigénica o bien del anticuerpo que se utiliza en su detección (Rittenburg y Grothaus, 1992). Una de las ventajas del empleo de un soporte sólido es que permite separar fácilmente los antígenos y anticuerpos unidos por reacciones específicas de los que no interaccionan y, por tanto, permanecen libres en solución. Esta separación se consigue de forma sencilla con lavados intermedios de la placa, proceso que se puede automatizar para una mayor comodidad (Deshpande, 1996).

Levieux y Venien (1994), afirman que de los distintos formatos de ELISA, el indirecto es el menos preciso si se compara con el ELISA competitivo o el sandwich. La menor sensibilidad de este formato se debe a que la superficie de la placa se tapiza con muestras biológicas complejas, que además de contener el antígeno de interés incluyen un número elevado de otras moléculas. En las técnicas del ELISA sandwich y del ELISA competitivo se emplean anticuerpos o antígenos de gran pureza, lo que disminuye las interferencias que afectan a la capacidad de detección del anticuerpo, y por consiguiente, mejora la reproducibilidad y especificidad del inmunoensayo.

Sin embargo, el empleo de los anticuerpos policlonales (anti-PSS, anti-PST y anti-PSP) neutralizados, minimiza las reacciones cruzadas entre los anticuerpos y los componentes inespecíficos de las muestras, hecho que permite utilizar con éxito la técnica del ELISA indirecto para la detección de un antígeno en una muestra problema (Harlow y Lane, 1988), especialmente cuando el objetivo del ensayo no consiste en la cuantificación precisa del compuesto analizado. Además, ésta es la más sencilla y rápida de las técnicas inmunoenzimáticas en cuanto a la obtención y preparación de los reactivos utilizados y a su desarrollo, por lo que resulta muy adecuada para el objetivo de este trabajo.

En la realización de la técnica del ELISA indirecto, los pocillos de las placas de poliestireno se tapizaron con diluciones adecuadas en tampón PBS de los extractos líquidos de las muestras que contenían las proteínas musculares solubles del pescado (ver sección III.2.3.1). Experiencias preliminares permitieron conocer cuáles eran las concentraciones idóneas de las muestras para obtener una sensibilidad del ensayo óptima. A continuación se incorporaron los anticuerpos neutralizados que reaccionaron específicamente con las muestras de referencia y comerciales de la especie de pescado ahumado frente a la que se habían obtenido. La efectividad de la neutralización de los anticuerpos anti-PSS, anti-PST y anti-PSP se muestra en la Figura 16. Una vez que los anticuerpos inespecíficos fueron bloqueados con las proteínas heterólogas (sección III.2.2.5), cada inmunosuero reconoció solamente al extracto antigénico frente al cual se produjo. Los complejos antígeno-anticuerpo formados durante la neutralización no interfieren en el ensayo, ya que se eliminan junto a los anticuerpos no reaccionantes del inmunosuero durante el lavado posterior de los pocillos. Sin embargo, hay que señalar que la sensibilidad de los anticuerpos anti-PST después del bloqueo fue menor que la de los anticuerpos anti-PSS y anti-PSP (Tabla 7), probablemente debido a que el suero anti-PST contenía mayor proporción de anticuerpos inespecíficos que los otros dos inmunosueros. De hecho, la cantidad de extracto antigénico heterólogo necesario para neutralizar el inmunosuero anti-PST fue mayor que la necesaria en los inmunosueros anti-PSS y anti-PSP.

De todas las muestras comerciales de pescado ahumado analizadas, solamente una muestra no fue reconocida por ninguno de los inmunosueros obtenidos (Tabla 7). Esta muestra estaba identificada comercialmente como palometa, pero su origen específico no pudo conocerse, ya que no correspondía con ninguno de los tres inmunosueros de que disponíamos (anti-salmón, anti-trucha y anti-palometa). Evidentemente, existe un error en el etiquetado de dicho producto, que por sus características de presentación (fileteado) puede pasar desapercibido. En el resto de las muestras analizadas, el ELISA indirecto permitió una identificación clara de muestras ahumadas de salmón, trucha y palometa.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la técnica del ELISA indirecto, utilizando anticuerpos policlonales frente a las proteínas musculares solubles de pescado ahumado, es un procedimiento adecuado para el reconocimiento específico de salmón, trucha y palometa ahumados. El proceso tecnológico al que se someten estos pescados (ahumado en frío) no interfiere en la interpretación de los resultados alcanzados.

Existen métodos alternativos basados en el estudio de las proteínas sarcoplásmicas que se han empleado en la identificación de salmón y trucha. Mediante la cromatografía líquida de alta resolución, Osman y col. (1987) separaron las proteínas sarcoplásmicas de 31 especies de pescado, entre las que se encontraba la trucha arco iris. Asimismo, Armstrong y col. (1992), analizaron por HPLC otras 15 especies de pescado. La identificación de especies por cromatografía líquida se basa en la especificidad de los perfiles de separación de las proteínas sarcoplásmicas y aunque la técnica resulta adecuada para la identificación de muestras de pescado fresco o congelado, el tratamiento térmico del pescado modifica los cromatogramas e impide la identificación. La principal ventaja de este método es la rapidez del análisis, que se realiza en 1 hora aproximadamente.

De los métodos electroforéticos aplicados a la diferenciación de especies de pescado, el que ha proporcionado resultados más satisfactorios es el isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida. Laird y col. (1982), analizaron las proteínas sarcoplásmicas de 40 especies de peces por éste

método y consiguieron diferenciar especies filogenéticamente cercanas como el salmón atlántico, la trucha arco iris y la trucha común. Merchante y Ortín (1993), diferenciaron igualmente por isoelectroenfoque en *Phastsystem™* muestras de salmón y trucha ahumados. Uno de los principales inconvenientes de la técnica de isoelectroenfoque consiste en la complejidad de los perfiles electroforéticos obtenidos, lo que hace necesario reunir a sistemas informáticos de interpretación de imágenes para comparar los perfiles de muestras problema con los de muestras de referencia de identidad conocida. Asimismo, se ha comprobado que el tratamiento térmico de las muestras de pescado modifica los perfiles electroforéticos obtenidos (Laird y col., 1982; Dowdie y Biede, 1983; Abrams y col., 1984; Yowell y Flurkey, 1986; An y col., 1989a, 1989b) y puede dificultar su interpretación.

Una de las principales ventajas de la técnica inmunoenzimática desarrollada en este trabajo frente a las técnicas electroforéticas y cromatográficas aplicables a la diferenciación de especies de pescado, consiste en que los anticuerpos se obtuvieron frente a las proteínas solubles extraídas del pescado ahumado. En consecuencia, las posibles modificaciones en las proteínas causadas por el ahumado en frío del pescado no afectan a la identificación. Además, las técnicas inmunológicas son fáciles de realizar y no requieren el uso de un equipo complejo (algunos kits han sido desarrollados para identificar especies cárnicas utilizando solamente una gota de extracto muscular). No obstante, el principal inconveniente de la técnica inmunoenzimática descrita en este trabajo consiste en la utilización de anticuerpos policlonales, cuya disponibilidad está limitada por el volumen de suero obtenido de los animales de experimentación.

Los inconvenientes asociados a la utilización de anticuerpos policlonales radican en una disponibilidad limitada de los mismos y en la necesidad de purificarlos para eliminar reacciones cruzadas y que posean una especificidad adecuada. Algunos de estos inconvenientes se pueden superar mediante la utilización de la tecnología de obtención de hibridomas (Köhler y Milstein, 1975), que teóricamente permite obtener de forma continua e ilimitada anticuerpos monoclonales, cuya principal característica es la

especificidad. En el análisis de los alimentos, la utilización de anticuerpos monoclonales presenta ventajas respecto a la de los policlonales, debido fundamentalmente a su especificidad y reproducibilidad. Sin embargo, la obtención de anticuerpos monoclonales es más laboriosa y delicada que la obtención de anticuerpos policlonales y con frecuencia los anticuerpos policlonales presentan una mayor avidéz por el antígeno, por lo que la producción de anticuerpos monoclonales no está justificada en todos los casos (Harlow y Lane, 1998).

V.1.4. TÉCNICA DEL ELISA INDIRECTO EN PALETAS

La necesidad de encontrar métodos analíticos rápidos, sencillos, económicos, sensibles y de aplicación en la industria alimentaria, ha impulsado en los últimos años numerosos proyectos de investigación que persiguen el desarrollo de técnicas rápidas que cumplan con estos requerimientos. La técnica del ELISA indirecto en paletas desarrollada en este trabajo para la identificación de muestras ahumadas de salmón, trucha y palometa se basó en el protocolo experimental descrito por Skerritt y Hill (1991), para la detección de gluten en alimentos destinados a enfermos celíacos. Las principales diferencias entre la técnica de ELISA indirecto descrito en placas y la de ELISA indirecto en paletas afectan al soporte de la reacción antígeno-anticuerpo. En lugar de utilizar pocillos de placas de poliestireno, en esta técnica inmunoenzimática rápida la reacción inmunológica se desarrolla en unas paletas de poliestireno que se introducen en tubos de polipropileno y los lavados se realizan con agua del grifo en sustitución de los tampones de lavado.

Utilizando las condiciones óptimas descritas en la sección III.2.3.2, se identificaron visualmente y de forma inequívoca las muestras de salmón, trucha y palometa ahumados en menos de 2 horas (Figura 17).

La técnica de ELISA en paletas reúne las mismas características que la realizada en placas. Además, la sencillez de este procedimiento, la identificación visual de los resultados y el corto período de tiempo requerido para el análisis cualitativo de muestras de pescado ahumado, lo hacen

especialmente adecuado como prueba de campo en programas de inspección donde es posible el fraude por sustitución de especies.

V.2. DESARROLLO DE TÉCNICAS DE PCR PARA AMPLIFICAR MARCADORES GENÉTICOS UTILIZADOS EN LA IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS FRESCAS Y AHUMADAS DE SALMÓN (*Salmo salar*), TRUCHA (*Oncorhynchus mykiss*) Y PALOMETA (*Brama raii*)

El desarrollo y puesta a punto de la reacción en cadena de la polimerasa ha marcado un antes y un después en todas las áreas de investigación biomédica, ya que debido a su especificidad, sensibilidad y rapidez representa una poderosa herramienta, cada vez más utilizada en el estudio y caracterización de especies, poblaciones e individuos (Meyer y Candrian, 1996).

Las bases teóricas de la reacción de PCR se presentaron por primera vez a principios de los setenta, pero no sería hasta mitad de los ochenta cuando se conseguiría su materialización en una técnica que permitiera la amplificación del ADN correspondiente a genes individuales, a partir de una muestra de ADN total de un organismo (Saiki y col., 1988). En los últimos años, las técnicas de PCR se han utilizado en medicina forense y en el diagnóstico de muchas enfermedades (Ferre y col., 1993; Secchiero y col., 1995), en la detección de parásitos (Jinneman y col., 1998) y de microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos (Hill, 1996; Wang y col., 1997; Venkitanarayanan y col., 1997; Gutiérrez y col., 1997) y en la detección en alimentos de organismos modificados genéticamente (MacCormick y col., 1998).

La utilización de técnicas de PCR para la identificación de especies de pescado constituye una alternativa eficaz a otras técnicas basadas en el análisis de las proteínas tisulares, ya que las técnicas electroforéticas (Gallardo y col., 1995; LeBlanc y col., 1994), cromatográficas (Armstrong y col., 1992; Osman y col., 1987) e incluso inmunológicas (Taylor y col., 1994a; Verrez-Bagnis y Escriche-Roberto, 1993), presentan limitaciones en

alimentos de composición compleja o sometidos a tratamientos tecnológicos que modifiquen sus proteínas. Además, el estudio del ADN permite detectar mutaciones que no determinan cambios en la secuencia aminoacídica (Ferguson y col., 1995).

El objetivo de este trabajo de investigación consistió en la puesta a punto de técnicas de PCR que, amplificando determinados fragmentos génicos, permitieran poner de manifiesto diferencias especie-específicas entre las secuencias de salmón atlántico, trucha arco iris y palometa para identificar inequívocamente dichas especies en muestras de pescado frescas y ahumadas. Para conseguir este objetivo fue necesario, en primer lugar, poner a punto una técnica que permitiera extraer de las muestras de pescado el ADN íntegro y libre de inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa. Asimismo, se tuvieron que seleccionar fragmentos génicos con un grado de variabilidad genética intra- e interespecífica adecuado para la diferenciación de las especies objeto de análisis. La amplificación de los fragmentos seleccionados requirió en algunos casos el análisis de las secuencias disponibles y el diseño de cebadores apropiados. Finalmente, una vez estudiadas las secuencias obtenidas se pusieron a punto técnicas sencillas que permitieran poner de manifiesto diferencias especie-específicas entre los fragmentos amplificados y que pudieran utilizarse para la identificación específica de muestras de identidad desconocida.

V.2.1. EXTRACCIÓN DEL ADN

Antes de proceder al análisis de los ácidos nucleicos para identificar la especie o población de procedencia de un pescado, es preciso extraer de la muestra una cantidad suficiente de ADN de buena calidad para los estudios posteriores. Los métodos clásicos de extracción comprenden una primera fase de digestión de la muestra con detergentes y proteasas, seguida de la separación de proteínas y polisacáridos con disolventes orgánicos (fenol y cloroformo) para, finalmente, precipitar con etanol o isopropanol el ADN presente en la fase acuosa (Sambrook y col., 1989). Este método puede ser sustituido por otros que utilizan resinas comerciales que sirven para aislar el ADN de muestras complejas, o por aquellos que en presencia de elevadas

concentraciones de agentes caotrópicos, como el isotiocianato de guanidina (GuSCN), unen los ácidos nucleicos a partículas de diatomeas o de sílice (Boom y col., 1990). Cualquiera que sea el método empleado, se debe garantizar que el ADN extraído está suficientemente puro y libre de sustancias acompañantes que pudieran inhibir las reacciones enzimáticas que intervengan en los análisis posteriores.

La calidad del ADN que se extrae de una muestra está estrechamente relacionada con el tamaño molecular de los fragmentos de ADN obtenidos, expresado en pares de bases de nucleótidos. El ADN se puede degradar por diversas causas, entre las que se incluyen los tratamientos térmicos en el caso de los alimentos. Ebbehøj y Thomsen (1991a) estudiaron el efecto del almacenamiento y los tratamientos térmicos sobre la calidad del ADN extraído de muestras de carne. Mientras que el ADN extraído de carne fresca tenía una longitud de 20-50 kilobases (Kb), el almacenamiento de la carne durante varios días reducía la longitud del ADN extraído a 15-20 Kb y el calentamiento de la carne durante 10 min a 121°C limitaba el tamaño de los fragmentos obtenidos a una media de 300 pb. La fragmentación del ADN limita la eficacia de la reacción de PCR. Sin embargo, incluso a partir de muestras con ADN degradado es posible amplificar y estudiar fragmentos de ADN específicos de especie.

Aunque la técnica de PCR es extremadamente específica, su sensibilidad puede verse reducida cuando el ADN objeto de análisis se extrae directamente de los alimentos. La inhibición puede ser el resultado de una lisis insuficiente, desnaturalización de la ADN polimerasa, degradación o precipitación del ADN diana, quelación de los iones de magnesio requeridos en la reacción y de la presencia de sustancias inhibidoras de la reacción que frecuentemente se encuentran en el alimento (Wilson, 1997). Sin embargo, estos problemas se han tratado de resolver mediante tratamientos diversos que incluyen la dilución de las muestras, el aumento de concentración de los iones de magnesio, la eliminación de ciertos inhibidores por calor (Rossen y col., 1992) o proteasas (McHale y col., 1991), la separación físico-química entre los inhibidores y el ADN por cromatografía de intercambio iónico (Young y

col., 1993) y la separación inmunomagnética del ADN diana (Chen y col., 1998). Asimismo, los efectos inhibidores se reducen optimizando las condiciones de la reacción y asegurando que todos los reactivos están disponibles en la mezcla de la reacción en cantidades apropiadas.

De lo expuesto anteriormente se deduce que la aplicación de la técnica de PCR al análisis de los alimentos se extenderá con mayor o menor rapidez en función de la disponibilidad y puesta a punto de métodos sencillos y eficaces para obtener el ADN de los alimentos y para eliminar las sustancias inhibidoras presentes en ellos.

En este trabajo se valoró el potencial de varios métodos de extracción del ADN de muestras de pescado para su utilización en las técnicas de PCR (sección III.2.4.3).

De los resultados obtenidos con los distintos métodos de extracción, podemos concluir que sólo el de DeSalle y col. (1993) aportó ADN de suficiente calidad para amplificar todos los fragmentos de interés. Este método se basa, al igual que todos los métodos clásicos, en una lisis con detergentes y un tratamiento con proteasas de la muestra, seguido de la separación de las proteínas y azúcares con disolventes orgánicos y una doble precipitación del ADN con etanol. La segunda precipitación de los ácidos nucleicos parece tener importantes repercusiones en la calidad final del ADN. Una vez lisados los tejidos, la extracción del ADN celular total se realizó en dos horas y media. Este método proporcionó un elevado rendimiento, pureza e integridad del ADN (Figura 18). El ADN de las muestras de pescado ahumado estaba ligeramente más degradado que el de las muestras de pescado fresco, probablemente debido a que la manipulación producida durante su industrialización puede favorecer la actividad de las endonucleasas. Las muestras de palometa proporcionaban un ADN más degradado que las de salmón y trucha, ya que la mayoría de la palometa que se procesa es congelada y ha sufrido un mayor deterioro y manipulación que las muestras de salmón y trucha.

El método de extracción de Bartlett y Davidson (1991) es una variación del método de Chomczynski y Sacchi (1987). En este método se combinó la capacidad del isotiocianato de guanidina (GuSCN) para romper células e inactivar nucleasas, con la capacidad de extracción del fenol-cloroformo. El tiempo empleado para obtener ADN fue aproximadamente de 4 horas, superior al empleado en el método de DeSalle y col. (1993). Además, la integridad del ADN fue menor que la del ADN obtenido por el método clásico (Figura 19-A), y no permitió amplificar por PCR bandas apropiadas para su análisis posterior.

El método de Laird y col. (1991) es una simplificación de los métodos clásicos que consiste en la lisis de la muestra con un tampón que contiene detergentes (100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 5 mM EDTA; 0,2% SDS; 200 mM ClNa) y proteinasa K, seguida de la precipitación de los ácidos nucleicos con isopropanol y su disolución posterior en tampón TE. A pesar de que los investigadores citados obtuvieron buenos resultados a partir de muestras de diversos tejidos, en nuestro caso, la pureza del ADN obtenido a partir de tejido muscular de pescado era deficiente (Figura 19-B) y no permitió amplificar por PCR los fragmentos de ADN seleccionados.

Finalmente, el método de Taggart y col. (1992), que puede considerarse también un método de extracción de ADN clásico, no proporcionó ADN de suficiente calidad (Figura 19-C) para el análisis por PCR-RFLP de los marcadores genéticos elegidos. Además, es más largo y laborioso que el método de DeSalle y col. (1993).

V.2.2. ELECCIÓN DE LOS MARCADORES GENÉTICOS

A la hora de elegir los marcadores genéticos que se van a utilizar para la identificación de especies, es importante considerar varias premisas. Las regiones de ADN seleccionadas deben acumular mutaciones a una velocidad suficiente como para que especies estrechamente relacionadas tengan secuencias de nucleótidos diferentes, pero suficientemente lenta como para que esas diferencias no aparezcan dentro de la misma especie (Hall y Nawrocki, 1995; Hansen y Loechoke, 1996). La longitud del segmento

amplificado ha de ser suficiente para detectar diferencias interespecíficas y adecuada para poder secuenciar dicho fragmento en un gel de secuenciación estándar. Son preferibles regiones de ADN que codifiquen proteínas, porque los errores en la secuenciación y/o amplificación pueden detectarse comparándolos con la secuencia de aminoácidos correspondiente. Además, teniendo en cuenta que la creación de bases de datos es un proceso largo, es aconsejable trabajar con genes cuya secuencia haya sido determinada en diversos organismos (Bartlett y Davidson, 1992).

Muchos de los trabajos sobre diferenciación genética de especies de pescado se basan en el análisis del genoma mitocondrial, porque es haploide, es mucho más pequeño que el ADN nuclear (16.500 ± 500 pb), cada célula posee miles de copias y existen regiones con un nivel de variabilidad genética adecuado para la diferenciación interespecífica (Meyer, 1993). Estas características representan una ventaja frente a los marcadores de genes nucleares, especialmente cuando se analizan productos en que los tratamientos tecnológicos del pescado dificultan la obtención de ADN de elevado tamaño molecular (Quinteiro y col., 1998). Por otra parte, la amplificación de marcadores nucleares puede resultar beneficiosa porque permite analizar regiones no codificantes del genoma con un alto grado de polimorfismo (O'Reilly y Wright, 1995). Asimismo, la presencia de intrones de longitud y secuencia variable intercalados en los genes que codifican diversas proteínas, permite amplificar fragmentos génicos cuya longitud es específica de especie (Gross y col., 1996).

El nivel de polimorfismo de cada marcador genético condiciona su posible aplicación para el estudio de relaciones entre especies, poblaciones o individuos de una misma especie. Para identificar variaciones intraespecíficas es aconsejable trabajar con secuencias hipervariables de ADN, como los genes mitocondriales ND1, ND5 y ND6 (Hall y Nawrocki, 1995), o la región comprendida entre los genes ATPasa 6 – COIII (Chow y Ushima, 1995; Vitic y Strobeck, 1996); mientras que en los estudios de variación interespecífica es más útil trabajar con secuencias relativamente conservadas.

Uno de los genes que se han utilizado con más frecuencia para la diferenciación de especies es el gen mitocondrial citocromo *b*. Pero se han utilizado con el mismo fin otros fragmentos del genoma mitocondrial como los genes de los ARN ribosómicos 12S y 16S (Bouchon y col., 1994; DeSalle y Birstein, 1996), subunidades de la NADH deshidrogenasa (Cronin y col., 1991) y la región de control (Nielsen y col., 1994; Alvarado-Bremer y col., 1997).

A pesar de que la mayoría de los estudios filogenéticos y de diferenciación de especies han utilizado ADN mitocondrial, otros emplean genes nucleares, como el de la hormona de crecimiento (GH), que ha permitido determinar las relaciones filogenéticas y la clasificación de los salmónidos (Agellon y col., 1988; Johansen y col., 1989; Devlin, 1993; McKay y col., 1996).

Para el propósito de nuestro trabajo (diferenciación interespecífica) se consideró conveniente seleccionar genes con regiones conservadas entre las especies en estudio, para así poder amplificar el mismo fragmento en todas ellas. Tras realizar una exhaustiva búsqueda bibliográfica y comparar las secuencias disponibles en las bases de datos GenBank y EMBL, se eligieron los genes mitocondriales citocromo *b*, citocromo oxidasa II (COII) y 16S ARNr, y los genes nucleares 5S ARNr y *p53*, como genes adecuados para los objetivos propuestos. A continuación, se procedió a seleccionar o diseñar cebadores para su amplificación.

V.2.3. DISEÑO DE LOS CEBADORES

La identificación genética de la especie a la que pertenece un individuo depende, en gran medida, de la especificidad de los cebadores empleados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El diseño de cebadores específicos es relativamente sencillo siempre que se conozca exactamente la secuencia que se desea amplificar y se respeten unas normas básicas de diseño (Sambrook y col., 1989). Se deben elegir, dentro de lo posible, cebadores con una longitud comprendida entre 18 y 28 nucleótidos, y con un porcentaje de guanina y citosina en torno al 50% (puesto que los enlaces G-C son más

estables que los enlaces A-T) para facilitar la hibridación con sus secuencias diana a temperaturas relativamente altas que impidan las uniones inespecíficas. La temperatura de hibridación de ambos cebadores con la secuencia diana debe ser similar. Así mismo, se debe evitar que los cebadores sean complementarios entre sí, especialmente en su extremo 3' para evitar la formación y amplificación de dímeros que reducen la eficacia de la reacción. El número de bases no complementarias entre el cebador y la secuencia diana debe reducirse al máximo, sobre todo en el extremo 3' del cebador, donde comienza la elongación del ADN copia generado por la polimerasa.

Una vez diseñados los cebadores es conveniente confrontar su secuencia con las bases de datos de ácidos nucleicos (GenBank, EMBL) para identificar secuencias afines. De esta manera aumenta la especificidad de la prueba al evitar el empleo de cebadores que compartan homologías con secuencias de genes o especies distintas a la que se pretende identificar.

La comparación de las secuencias génicas de diversas especies animales puede servir para buscar regiones conservadas sobre las que diseñar cebadores universales que permitan la amplificación del mismo fragmento génico en una gran variedad de especies (Kocher y col., 1989). Alternativamente, el diseño de cebadores puede beneficiarse del conocimiento de secuencias especie-específicas para amplificar mediante la técnica de PCR múltiple fragmentos génicos de distinta longitud en cada especie de interés (Matsunaga y col., 1999).

La elección de los cebadores utilizados en esta Tesis Doctoral se realizó, en algunos casos (citocromo *b*, *p53* y 5S ARNr), a partir de la bibliografía existente sobre la amplificación de dichos genes.

La información disponible sobre el gen citocromo *b* de los peces es muy abundante, desde que en 1989 Kocher y col., diseñaron cebadores universales para la amplificación de un fragmento de 307 pb (excluyendo cebadores) en numerosas especies de vertebrados. La longitud de los cebadores universales diseñados por Kocher y col., para amplificar el gen citocromo *b* era de 36 pb y 35 pb, por lo que investigadores como Carr y

Marshall (1991), Bartlett y Davidson (1991) e Irwin y col. (1991), entre otros, han diseñado cebadores muy similares a los de Kocher y col., pero más cortos, para amplificar el mismo fragmento en varias familias de peces, como los gádidos, túnidos y salmónidos.

Para la realización de este trabajo se eligieron los cebadores diseñados por Bartlett y Davidson (1991), cuya utilidad para amplificar el gen citocromo *b* de peces ha sido avalada por trabajos posteriores (McVeigh y col., 1991; Bartlett y Davidson, 1992; Hartley y col., 1992; Quinteiro y col., 1998).

En los últimos años, la investigación sobre el cáncer ha impulsado el estudio de genes implicados en su presentación. La proteína codificada por el gen *p53* desempeña un papel importante en el control del ciclo celular porque proporciona estabilidad genética a la célula (Levine y col., 1991), mientras que las células en las que el gen supresor de tumores *p53* es afuncional son muy vulnerables a la adquisición de mutaciones y como consecuencia, a la formación de tumores. Los estudios sobre el cáncer han conducido a la secuenciación del gen *p53* en el hombre y en diversas especies animales con el fin de conocer la frecuencia e importancia de sus mutaciones y su implicación en la génesis del cáncer (Mayr y col., 1995; Bucher y col., 1996). La comparación de las secuencias disponibles pone de manifiesto que los exones que codifican la proteína son muy conservados en todas las especies, mientras que existen grandes diferencias interespecíficas en la longitud de los intrones. Kusser y col. (1994), se basaron en la semejanza de los exones para diseñar cebadores que permitieran amplificar el gen *p53* en varias especies de peces, entre las que se incluye la trucha arco iris. En consecuencia, elegimos los cebadores *p53-5* y *p53-7* diseñados por estos autores para amplificar la región del gen *p53* que comprende los exones 5 y 6 y un intrón intermedio.

En los organismos eucariotas superiores, el ADN ribosómico se organiza en dos clases distintas de genes, los ARNs ribosómicos mayores (5,8S, 18S y 28S) y un grupo de genes ribosómicos menores. El primer grupo suele estar codificado en un gen que se repite un gran número de veces consecutivas (ADNr), mientras que el segundo (5S ADNr) está formado por otra familia de genes reiterativos que codifican el ARNr 5S y que, al contrario

de lo que ocurre con el ADNr, no está involucrado en la formación de los nucleolos (Pendas y col., 1994). La estructura y secuencias del gen ADNr se conocen bien en diversos organismos superiores y la comparación de secuencias de dicho gen se ha utilizado para el estudio de la variabilidad genética intra- e interespecífica de salmónidos (Phillips y col., 1994) y clupeidos (Domanico y col., 1996). Sin embargo, el 5S ADNr de los peces apenas se había estudiado hasta que Pendas y col (1994), clonaron y secuenciaron unidades repetitivas del 5S ADNr del salmón atlántico y comprobaron su localización cromosómica en esta especie en el cromosoma 8, adyacente al gen repetitivo ADNr. En este trabajo hemos utilizado los cebadores A y B diseñados por Pendas y col. (1994), para amplificar las unidades repetitivas del 5S ADNr con el propósito de diferenciar salmón, trucha y palometa por la longitud de los fragmentos amplificados.

Como consecuencia de la comparación de las secuencias de ADNmt de salmón y trucha disponibles en las bases de datos GenBank/EMBL, nos planteamos utilizar un fragmento del gen que codifica la subunidad II de la citocromo oxidasa (COII) y otro del gen 16S ARNr para tratar de encontrar diferencias significativas entre estas especies. En este caso no se disponía de referencias bibliográficas en que se hubieran propuesto cebadores para la amplificación de los fragmentos citados, por lo que se utilizaron los criterios básicos de diseño de cebadores y programas informáticos específicos como el PRIME (GCG versión 9.0) para diseñar los cebadores CYTO-1 y CYTO-2 sobre el gen COII y los cebadores 16S-1 y 16S-2 para el gen 16S ARNr (sección III.2.4.2).

V.2.4. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

La secuenciación de los productos de PCR tiene por objetivo identificar diferencias en la cadena de nucleótidos que permitan distinguir especies filogenéticamente cercanas. La valoración de tales diferencias suele requerir la utilización de programas informáticos complejos. Algunos investigadores han optado por programas como el PAUP (Swofford, 1993) y PHYLIP (Felsenstein, 1993) que estudian las relaciones filogenéticas a partir

de las secuencias obtenidas de varias especies e introducidas en bases de datos. Sin embargo, otros investigadores consideran que la elaboración de matrices de valoración de distancias genéticas entre secuencias (Kumar y col., 1993) es más apropiada para diferenciar especies que los estudios filogenéticos (Forrest y Carnegie, 1994; Quinteiro y col., 1998).

La secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados por PCR aporta datos interesantes en la identificación de especies. Sin embargo, es una técnica cara y laboriosa que no es apropiada para el análisis rutinario de un número de muestras elevado. El análisis con enzimas de restricción de los fragmentos génicos amplificados por PCR permite detectar diferencias en la longitud de los fragmentos generados (polimorfismo) sin necesidad de recurrir a la secuenciación. Sin embargo, este sistema no detecta todas las diferencias entre las secuencias, sino solamente aquellas que afectan a los lugares de reconocimiento de las enzimas utilizadas para el análisis.

La elección de endonucleasas de restricción adecuadas puede estar basada o no en el conocimiento y comparación previos de las secuencias del fragmento analizado, pero cuando el objetivo es la diferenciación de especies se deben elegir enzimas para las que no se produzcan variaciones intraespecíficas. La eficacia de la técnica de PCR-RFLP para la identificación de especies dependerá de la secuencia elegida para la amplificación, de las endonucleasas de restricción utilizadas y de la longitud del fragmento amplificado.

Cronin y col. (1993), utilizaron la amplificación por PCR de 4 fragmentos del ADNmt de entre 1,3 y 2,4 Kb y su digestión con más de 16 enzimas de restricción para estudiar la variabilidad genética intraespecífica en dos especies de salmones del Pacífico, salmón real y salmón keta. Adams y col. (1994), también emplearon la técnica de PCR-RFLP sobre dos fragmentos del ADNmt para estudiar la variabilidad genética del salmón real. Algunos de los fragmentos amplificados por Cronin y col. (1993), se han utilizado también para conocer por PCR-RFLP la variabilidad genética intraespecífica de la trucha de río; obteniéndose los resultados más satisfactorios con un fragmento de 2 Kb que abarca desde el gen ND1 al 16S

ARNr y con otro fragmento de 2,5 Kb que incluye los genes ND5-ND6 (Hall y Nawrocki, 1995; Hansen y Loeschke, 1996). Chow y Ushima (1995), estudiaron la diversidad genética entre varias poblaciones de albacora (*Thunnus alalunga*) digiriendo con dos endonucleasas de restricción un fragmento del gen ATPasa 6 amplificado por PCR.

La aplicación de la técnica de PCR-RFLP para diferenciar especies animales cuenta con numerosos ejemplos. Chow e Inoue (1993), comprobaron que era posible diferenciar 8 especies de túnidos del género *Thunnus* mediante la amplificación de un fragmento intergénico de 940 pb del ADNmt seguido de su digestión con enzimas de restricción. Sin embargo, sólo conseguían identificar algunas especies empleando un fragmento de 355 pb del gen citocromo *b* y no encontraron variaciones ni intraespecíficas ni interespecíficas cuando utilizaron PCR-RFLP de un fragmento de 450 pb del gen 12S ARNr.

La situación era bien distinta cuando Chow y col. (1993), aplicaron las mismas técnicas a la diferenciación de especies de *Lutjanus*. En este caso las 3 especies analizadas se diferenciaban empleando el fragmento de 355 pb del citocromo *b*, pero la variabilidad intraespecífica del fragmento del gen 12S ARNr impedía la diferenciación interespecífica. Borgo y col. (1996), sin embargo, utilizaron con éxito el gen 12S ARNr para diferenciar tres especies de caracoles de tierra (*Helix pomatia*, *Helix lucorum* y *Achatina fulica*) amplificando un fragmento de 380 pb que digerían con tres endonucleasas.

El gen citocromo *b* ha sido muy utilizado para la diferenciación de especies por PCR-RFLP. Sus aplicaciones incluyen desde la identificación de especies de aves y mamíferos (Chikuni y col., 1994; Meyer y col., 1995) hasta la diferenciación de túnidos enlatados (Ram y col., 1996; Quinteiro y col., 1998). Entre los ejemplos que se pueden citar de la utilización de PCR-RFLP de genes nucleares para la identificación de especies se encuentran los trabajos de Kenchington y col. (1993) para diferenciar dos especies de vieiras (*Placopecten magellanicus* y *Chlamys islandica*) utilizando un fragmento de 1.815 pb del gen 18S ARNr y los de Gross y col. (1996) que diferenciaron

salmón atlántico, trucha de río y sus híbridos empleando un fragmento de 918 pb del gen del factor liberador de la hormona del crecimiento.

Para cumplir el objetivo propuesto en esta Tesis Doctoral, consistente en poner a punto técnicas genéticas adecuadas para la diferenciación inequívoca de salmón atlántico, trucha arco iris y palometa, se consideró que las técnicas de PCR-RFLP eran especialmente adecuadas, porque proporcionan perfiles claros y de fácil interpretación, especialmente cuando las muestras problema se analizan junto a muestras de referencia.

V.2.5. DIFERENCIACIÓN DE MUESTRAS FRESCAS Y AHUMADAS DE SALMÓN, TRUCHA Y PALOMETA MEDIANTE PCR-RFLP DE UN FRAGMENTO DEL GEN CITOCROMO *b*

La disponibilidad de cebadores universales (Kocher y col., 1989), para la amplificación del gen mitocondrial citocromo *b* ha favorecido el estudio de este gen, cuya secuencia de nucleótidos se conoce en muchos vertebrados. La secuencia aminoácidica del gen citocromo *b* está muy conservada, pero debido a la degeneración del código genético (dos ó más codones codifican un mismo aminoácido), la secuencia del gen difiere en varios nucleótidos incluso entre especies estrechamente relacionadas. Asimismo se ha comprobado que la variación dentro de una misma especie es menor que entre especies, que las transiciones son más frecuentes que las transversiones y que la mayoría de las diferencias entre secuencias se producen en la tercera posición de los codones (Meyer, 1993; Matsunaga y col., 1999).

El análisis directo de las secuencias de los productos de PCR obtenidos con los cebadores diseñados por Kocher y col. (1989), o con otros similares, se ha utilizado con éxito para la diferenciación de poblaciones de bacalao del Atlántico (Carr y Marshall, 1991; Pepin y Carr, 1993; Árnason y col., 1998) y también para la caracterización genética del fletán negro (Vis y col., 1997), la identificación de poblaciones y especies de salmónidos (McVeigh y col., 1991; Hartley y col., 1992; Lockwood y col., 1993), la clasificación del suborden *Scombroidei* (Finnerty y Block, 1995), la diferenciación de especies de túnidos (Bartlett y Davidson, 1991; Quinteiro y col., 1998), y de las

especies de caviar *Acipenser sturio* y *A. naccarii* (Ludwig y Kirschbaum, 1998). Sin embargo, el elevado coste de esta técnica y la necesidad de una detallada comparación de las secuencias individuales la hacen inapropiada para el análisis de un elevado número de muestras. Por ello, como alternativa a la secuenciación, en este trabajo hemos utilizado el análisis de restricción de fragmentos amplificados por PCR (PCR-RFLP) de una región conservada del gen mitocondrial citocromo *b* para la identificación específica del salmón atlántico, la trucha arco iris y la palometa.

Utilizando los cebadores CYTB-1 y CYTB-2 diseñados por Barlett y Davidson (1991), y las condiciones descritas en la sección III.2.4.5.1, se amplificó un fragmento de 358 pb del gen citocromo *b* a partir de todas las muestras frescas y ahumadas de salmón, trucha y palometa analizadas (Figura 20).

Las secuencias de los productos de PCR de salmón, trucha y palometa se compararon entre sí y con las secuencias de salmón (X76253 y U12146) y trucha (L29771) de la base de datos GenBank (Figura 21). Los resultados obtenidos muestran una estrecha relación genética entre las secuencias del gen citocromo *b* de salmón atlántico y trucha arco iris. La región secuenciada (307 nucleótidos, excluyendo los cebadores) mostró una homología entre salmón y trucha del 93,8%, entre salmón y palometa del 83% y entre trucha y palometa del 83,4%. Las diferencias encontradas entre las secuencias del gen citocromo *b* de salmón y trucha no implican cambios aminoacídicos de la cadena peptídica ya que, excepto en un caso, siempre afectaron al tercer nucleótido del triplete de traducción. La mayoría de las diferencias de los nucleótidos fueron transiciones ($A \leftrightarrow G$ o $C \leftrightarrow T$), características de especies que proceden de un antecesor común (Brown y col., 1982; Kocher y col., 1989; Bartlett y Davidson, 1991). Sin embargo, la secuencia de aminoácidos codificada en los productos de PCR de palometa difiere en 6 residuos con las de salmón y trucha debido a la existencia de siete transiciones y cuatro transversiones en las primeras y segundas posiciones de los codones comparadas con las de salmón y trucha.

La variación intraespecífica en las secuencias de salmón fue de 4,5%, predominando las transiciones (12) frente a las tranversiones (2). La comparación de nuestras secuencias de salmón con la de McVeigh y col. (1991), mostró pocas variaciones, que se localizaron en la tercera posición del codón, sin modificar la secuencia de aminoácidos. La única variación intraespecífica encontrada entre las secuencias de trucha fue una transición (C→T) en la tercera posición de un triplete, que no cambia el aminoácido codificado (ATT y ATC codifican isoleucina). La palometa también mostró un bajo polimorfismo intraespecífico (0,6%) que no afectó a la secuencia de aminoácidos codificada.

Kocher y col. (1989), compararon las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del gen citocromo *b* en numerosas especies de vertebrados. Identificaron determinados residuos de aminoácidos que permanecen invariables en todas las secuencias estudiadas, algunos de los cuales se consideran esenciales para la funcionalidad del citocromo *b*. Al comparar estos resultados con los obtenidos en esta Tesis Doctoral observamos cómo la secuencia de palometa coincide perfectamente con el patrón descrito por Kocher, mientras que el salmón y la trucha difieren en un aminoácido que era invariable en las especies analizadas por dichos autores (Kocher y col. 1989) aunque no esencial para la funcionalidad.

Una vez comprobada la existencia de diferencias específicas entre las secuencias de los productos de PCR de salmón, trucha y palometa se procedió a identificar endonucleasas de restricción que permitieran diferenciar estas especies sin necesidad de recurrir a la secuenciación de los productos de PCR. Para ello se compararon los mapas de restricción de las secuencias de salmón, trucha y palometa disponibles. Al menos dos endonucleasas de restricción (*Eco* RV y *Taq* I) se consideraron teóricamente apropiadas para identificar los productos de PCR de salmón y trucha, mientras que la identificación de los productos de PCR de muestras de palometa se llevó a cabo con la endonucleasa *Nsp* I. La elección de las enzimas *Eco* RV y *Taq* I se consideró adecuada porque cada una de ellas detecta simultáneamente dos posiciones diagnósticas entre salmón y trucha, mientras que no reconocen ninguna diana

de restricción en la secuencia de palometa. La diana de restricción de *Eco* RV (GAT↓ATC) no se encuentra en las secuencias de trucha y palometa, que presentan en su lugar GACAT(T/C). Paralelamente, la diana de restricción para la enzima *Taq* I (T↓CGA) presente en los productos de PCR de trucha, no aparece en la secuencia de salmón donde se sustituye por CCGT, ni en las de palometa, que presentan CCG(A/C) en su lugar. Por otro lado, la diana de restricción para la enzima *Nsp* I (PuCATG↓Py) solo se encuentra en las secuencias de palometa, y no aparece en la secuencia de salmón, donde se sustituye por TCACGC, ni en la secuencia de trucha, que presenta CCATGC (Figura 21). Los resultados obtenidos tras la digestión de los productos de PCR corroboraron los pronósticos derivados del análisis de las secuencias, sin que se pusiera de manifiesto polimorfismo intraespecífico entre las muestras analizadas (Figuras 25, 26 y 27). Los resultados fueron idénticos tanto con muestras de pescado frescas como ahumadas, a pesar que la integridad del ADN obtenido de las muestras frescas era mayor que del obtenido de muestras ahumadas. Estos resultados demuestran que la amplificación y análisis de restricción (PCR-RFLP) de la región elegida del gen citocromo *b* permite diferenciar claramente las muestras frescas y ahumadas de salmón atlántico, de trucha arco iris y de palometa.

Otros investigadores han utilizado el análisis mediante PCR-RFLP del gen citocromo *b* para la diferenciación de especies de pescado en conservas de túnidos (Ram y col., 1996; Quinteiro y col., 1998), identificación de especies de pescados planos (Céspedes y col., 1998, 1999) y para la identificación de especies animales en carnes de aves y mamíferos (Chikuni y col., 1994; Meyer y col., 1995). Para descartar perfiles de restricción semejantes entre nuestras especies y especies de peces planos (Céspedes y col., 1998), comprobamos que las enzimas *Eco* RV y *Taq* I no reconocían dianas de restricción en las secuencias disponibles del lenguado (*Solea solea*), solla (*Pleuronectes platessa*) y platija (*Platichthys flesus*).

La técnica de PCR-RFLP combina el poder de resolución con las características de sencillez, rapidez y bajo coste, por lo que constituye una alternativa interesante a las técnicas convencionales de identificación de

especies de pescado basadas en el análisis de proteínas (Armstrong y col., 1992; Gallardo y col., 1995; LeBlanc y LeBlanc, 1994; Osman y col., 1987; Taylor y col., 1994a; Verrez-Bagnis y Escriche-Roberto, 1993) y frente a las técnicas de secuenciación de los productos de PCR. La principal limitación encontrada a la técnica de PCR-RFLP está relacionada con el grado de variación intraespecífica (Ram y col., 1996). Aunque en nuestro estudio no se ha detectado variabilidad intraespecífica en las dianas de restricción utilizadas para el diagnóstico, sería preciso analizar un número muy elevado de muestras para garantizar su inexistencia y siempre sería posible encontrar algún individuo que no presentara el perfil de restricción típico de su especie debido a una mutación puntual en la secuencia diana. Este hecho, aunque es poco probable que se produzca, requeriría el análisis de otros marcadores específicos de especie.

V.2.6. DIFERENCIACIÓN DE MUESTRAS FRESCAS Y AHUMADAS DE SALMÓN, TRUCHA Y PALOMETA MEDIANTE PCR-RFLP DE UN FRAGMENTO DEL GEN COII

De los 13 genes mitocondriales que codifican proteínas, los de las subunidades de la citocromo oxidasa y el gen citocromo *b* son los más conservados entre especies. Por el contrario, los genes que presentan mayor variabilidad son los que codifican las subunidades de la ATPasa y de la NADH deshidrogenasa (Meyer, 1993). Hasta donde llega nuestra información, el gen de la subunidad II de la citocromo oxidasa (COII) no se ha empleado para la diferenciación de especies animales. Sin embargo, las bases de datos GenBank y EMBL recogen algunas secuencias de este gen pertenecientes al salmón atlántico y la trucha arco iris. La comparación de dichas secuencias (L29771 de trucha arco iris, U12145 y L04501 de salmón atlántico) mostró suficiente variabilidad interespecífica para utilizar el gen COII como marcador genético. Asimismo, las secuencias disponibles se utilizaron para diseñar los cebadores CYTO-1 y CYTO-2 (ver sección III.2.4.2.2) que acotan un fragmento de 464 pb en las especies objeto de análisis.

Utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los cebadores CYTO-1 y CYTO-2 se amplificó un único fragmento de 464 pb en todas las muestras de salmón y trucha analizadas (Figura 28), pero no se consiguió amplificar el ADN de las muestras de palometa. La ausencia de amplificación en esta especie puede corresponder a una hibridación deficiente de los cebadores o bien a la degradación del ADN encontrada en dichas muestras.

Las secuencias del gen COII obtenidas de los productos de PCR de salmón y trucha se compararon entre sí y con las secuencias de salmón (U12145 y L04501) y trucha (L29771) de la base de datos GenBank (Figura 31). La región secuenciada (428 nucleótidos, excluyendo los cebadores) presentaba una homología del 91,3% entre ambas especies. La mayoría de los cambios fueron transiciones (33), de los que sólo uno fue en posición 1 y otro en posición 2, el resto se localizaron en el tercer nucleótido del codón de traducción. Tres cambios (transversión en posición 2 y transiciones en posiciones 1 y 2) en los tripletes de la secuencia de nucleótidos se tradujeron en dos cambios de aminoácidos entre las cadenas peptídicas codificadas en ambas especies. Así, la secuencia de trucha codifica el aminoácido metionina (-ATG-) mientras que la secuencia de salmón codifica lisina (-AAG-), y el aminoácido valina (-GTG-) de la trucha cambia por treonina (-ACG-) en el salmón (Figuras 32 y 33).

La variación intraespecífica entre las secuencias de los salmones fue del 1,4% y consistió en una transición en la posición 2 de un codón y cuatro transversiones en posiciones 2 y 3. Las secuencias de trucha mostraron una variación intraespecífica ligeramente inferior a la de los salmones (1,2%) con tres transiciones en posición 2 y tres transversiones en posiciones 2 y 3.

Las diferencias existentes en las secuencias de nucleótidos de los fragmentos génicos de salmón y trucha amplificados, se pusieron de manifiesto por la comparación detallada de sus mapas de restricción (Figuras 32 y 33). Las secuencias de salmón poseen una diana de restricción para la enzima *Nci* I (CC↓CGG) que no está presente en las de trucha (CCAGG), mientras que éstas poseen dos puntos de corte para la endonucleasa *Sau* 3AI

(↓GATC) que no se encuentran en las secuencias de salmón (AATC y GACC). La digestión de los productos de PCR del gen COII con las endonucleasas seleccionadas permitió diferenciar claramente las muestras de salmón y trucha tanto frescas como ahumadas. La longitud de los fragmentos de ADN resultantes es suficiente para permitir su separación completa y su visualización mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa (Figura 34).

Teniendo en cuenta que no se ha detectado polimorfismo intraespecífico entre las muestras de salmón y trucha en las dianas de restricción analizadas en este trabajo, se puede afirmar que el análisis del gen mitocondrial citocromo oxidasa II por la técnica de PCR-RFLP constituye una herramienta sensible y fiable para la diferenciación específica de muestras crudas y ahumadas de salmón atlántico y de trucha arco iris. La técnica es aplicable para el análisis de muestras musculares así como de huevos frescos y ahumados. La interpretación inequívoca de los resultados puede apreciarse visualmente sin la necesidad de un análisis informático de los mismos.

Las ventajas y limitaciones de la utilización de este marcador genético son similares a las descritas para el gen citocromo *b*. Sin embargo, el hecho de disponer de varios marcadores genéticos equivalentes para la diferenciación de especies filogenéticamente próximas, como el salmón atlántico y la trucha arco iris, es muy recomendable y puede aportar un soporte técnico adicional ante instancias judiciales para demostrar la veracidad o incorrección del etiquetado de los productos pesqueros ofrecidos al consumidor.

V.2.7. DIFERENCIACIÓN DE MUESTRAS FRESCAS Y AHUMADAS DE SALMÓN, TRUCHA Y PALOMETA MEDIANTE PCR-RFLP DE UN FRAGMENTO DEL GEN 16S ARNr

El ADNmt de los peces posee, como ocurre en otras especies animales, dos genes que codifican subunidades de ARN ribosómico, uno de la subunidad pequeña del ribosoma (12S ARNr) y otro de la subunidad grande (16S ARNr). La variabilidad genética de estos genes se manifiesta en la presencia tanto de sustituciones como de inserciones o deleciones de

nucleótidos. Como sucede en los genes mitocondriales que codifican proteínas, las transiciones son más frecuentes que las transversiones, especialmente entre especies filogenéticamente cercanas. Sin embargo, la presencia de inserciones y deleciones es más frecuente en los genes mitocondriales que codifican ARN ribosómico que en aquellos que codifican proteínas (Meyer, 1993), siendo más marcadas las diferencias de longitud en el gen 16S ARNr que en el 12S ARNr.

El estudio de la variabilidad genética de los genes 12S ARNr y 16S ARNr se ha utilizado para valorar diferencias intraespecíficas entre poblaciones de crustáceos (Kann y Wishner, 1996) y peces (Hall y Nawrocki, 1995; McGauley y Mulligan, 1995), y para conocer la distribución geográfica y grado de hibridación de especies de mejillones (Rawson y Hilbish, 1995). Así mismo, se han desarrollado técnicas de PCR-RFLP de los genes 12S ARNr y 16S ARNr para diferenciar especies de crustáceos (Bouchon y col., 1994), moluscos (Borgo y col., 1996) y peces (Chow y col., 1993) filogenéticamente cercanas. Igualmente, DeSalle y Birnstein (1996), diseñaron cebadores especie-específicos sobre los genes 12S y 16S RNAr para diferenciar el caviar obtenido de tres especies distintas de esturión ruso (*Huso huso*, *Acipenser gueldenstaedti* y *Acipenser stellatus*) mediante la reacción de PCR.

Considerando los antecedentes citados y tomando como base las secuencias del gen 16S ARNr de salmón atlántico (U12143) y trucha arco iris (L29771) disponibles en las bases de datos, diseñamos los cebadores 16S-1 y 16S-2 que hibridan en zonas conservadas del gen mitocondrial 16S ARNr de salmón y trucha.

Los cebadores diseñados (16S-1 y 16S-2) amplificaron (ver sección III.2.4.5.3) un fragmento de 950 pb del gen 16S ARNr a partir de muestras frescas y ahumadas de salmón y trucha. Sin embargo, con las muestras de palometa no hubo amplificación (Figura 36).

Estos resultados corroboran que el proceso de ahumado en frío del salmón y la trucha no provoca una degradación del ADN que dificulte la

amplificación de fragmentos con un tamaño cercano a 1 kb. Por el contrario, la ausencia de amplificación en la palometa puede deberse a una deficiente hibridación de los cebadores en esta especie o bien a que la degradación del ADN obtenido de las muestras de palometa (Figura 18) impide la amplificación de un fragmento del tamaño citado. Un fenómeno similar ha sido descrito por otros investigadores que han comprobado cómo los ácidos nucleicos se degradan durante el proceso de esterilización del pescado. Los fragmentos de ADN obtenidos de muestras de pescado enlatado son normalmente de tamaño inferior a unos cientos de pares de bases, lo que determina que sólo sea posible amplificar fragmentos muy cortos (100-200 pb) por la reacción de PCR (Unsel y col., 1995; Ram y col., 1996; Rehbein y col., 1997).

Las secuencias del gen 16S ARNr obtenidas a partir de los productos de PCR de salmón y trucha se compararon entre sí y con las secuencias de salmón (U12143) y trucha (L29771) disponibles en la base de datos GenBank (Figura 37). El porcentaje de homología entre las secuencias de las dos especies (911 nucleótidos excluyendo los cebadores) fue de 95,2%, diferenciándose en 44 nucleótidos. La variación intraespecífica fue del 1,2% en los salmones y 0,9% entre las truchas.

La comparación de los mapas de restricción de los fragmentos del gen 16S ARNr de salmón y trucha amplificados (Figuras 38 y 39) sirvió para identificar varias endonucleasas de restricción que diferenciaban específicamente los productos de PCR de ambas especies. De ellas se seleccionaron dos (*Hpa* I y *Bst* EII) siguiendo criterios de especificidad y disponibilidad comercial.

Mediante la digestión de los productos de PCR del gen 16S ARNr de muestras frescas y ahumadas de salmón y trucha con las enzimas *Hpa* I y *Bst* EII se confirmó la idoneidad de las dianas de restricción seleccionadas para la diferenciación de estas dos especies (Figura 40) y no se detectó polimorfismo intraespecífico en las muestras analizadas. Se analizaron tanto muestras musculares como muestras de huevas frescas y ahumadas.

El tamaño de los fragmentos amplificados del gen 16S ARNr (950 pb) era muy adecuado para la identificación de especies por PCR/RFLP. Las ventajas de trabajar con productos de PCR de gran longitud en comparación con otros de menor tamaño, como el citocromo *b* (358 pb), incluye la posibilidad de identificar un elevado número de puntos de restricción específicos de especie que se detecten fácilmente por electroforesis en geles de agarosa. Además, a pesar de que el gen citocromo *b* ha sido muy utilizado en estudios de poblaciones y estudios filogenéticos de diferentes grupos de peces, para otras aplicaciones como la identificación de especies estrechamente relacionadas, puede resultar más útil trabajar con genes que evolucionan más rápidamente como el ND2 y los de la ATPasa 6 y 8 o los genes ribosomales (McGauley y Mulligan, 1995). Sin embargo, el éxito de la amplificación de fragmentos génicos grandes está condicionado por la posibilidad de extraer ADN de elevado tamaño molecular a partir de las muestras tisulares analizadas.

V.2.8. DIFERENCIACIÓN DE MUESTRAS FRESCAS Y AHUMADAS DE SALMÓN, TRUCHA Y PALOMETA MEDIANTE PCR-RFLP DE UN FRAGMENTO DEL GEN *p53*

En el estudio genético de especies y poblaciones, una de las opciones es el análisis de marcadores nucleares monocopia. Para ello se pueden elegir cebadores diseñados en exones conservados que amplifiquen uno o varios intrones de longitud variable, como por ejemplo el gen de la aldolasa o la histona H2AF (Slade y col., 1993), o bien se pueden amplificar exones hipervariables, como los que codifican el lugar de unión de los anticuerpos con los determinantes antigénicos (Lessa y Applebaun, 1993). El gen *p53* pertenece al primero de los grupos citados. Estudios filogenéticos han demostrado que la proteína supresora de tumores *p53* tiene cinco dominios muy conservados en el curso de la evolución (Mayr y col., 1995) y que determinadas mutaciones en la región central de esta proteína están relacionadas con la presentación de tumores en todas las especies estudiadas (Vogelstein y Kinzler, 1994; Bucher y col., 1996). Debido al interés que suscita este gen supresor de tumores en la génesis del cáncer, su secuencia se

ha estudiado en numerosas especies animales y se ha comprobado que está compuesto por 11 exones muy conservados en todas las especies, pero los intrones que los separan muestran una divergencia interespecífica considerable (Kusser y col., 1994).

Este hecho facilita el diseño de cebadores universales que, basados en la secuencia de nucleótidos de los exones, permiten amplificar regiones que varían en longitud según las especies. Basándonos en los cebadores diseñados por Kusser y col. (1994) para amplificar los exones 5 a 9 de la trucha arco iris, elegimos los cebadores p53-5 y p53-7 para amplificar los exones 5 y 6 en trucha, salmón y palometa con el objetivo de apreciar si existían diferencias en la longitud y en los perfiles de restricción obtenidos a partir del ADN de estas especies.

Con los cebadores p53-5 y p53-7 se amplificó un fragmento de 532 pb en todas las muestras de salmón y de 518 pb en las muestras de trucha analizadas (Figura 42). Sin embargo, no se observó amplificación con las muestras de palometa. La ausencia de amplificación en la palometa sorprende si se tiene en cuenta la estrategia utilizada para el diseño de los cebadores. Sin embargo, otros investigadores han encontrado dificultades similares al tratar de amplificar en distintas especies y con cebadores universales genes como el de la mioglobina, la histona H2AF (Slade y col., 1993) o la insulina (Lessa y Applebaun, 1993), cuyos exones son también muy conservados. Entre las explicaciones aportadas por estos investigadores destaca la posible existencia de intrones demasiado largos que pueden dificultar o incluso impedir la amplificación, especialmente si la integridad del ADN de partida no es excelente.

Aunque la longitud de los productos de PCR obtenidos de salmón y trucha difería en algunos pares de bases, su movilidad electroforética era similar y solamente apreciable en geles de agarosa cuando las condiciones de la separación electroforética eran óptimas. Por ello, se recurrió a digerir los productos de PCR de ambas especies con enzimas de restricción.

Las secuencias del gen *p53* obtenidas de los productos de PCR de salmón y trucha se compararon entre sí y con la secuencia de trucha publicada por Kusser y col. (1994) (Figura 43). La región secuenciada mostró una homología entre ambas especies del 88,1% en la región del intrón, y del 95,7% en los dos exones (excluyendo los cebadores). Las diferencias encontradas entre las secuencias del gen *p53* de salmón y trucha implicaron un único cambio aminoacídico al verse afectado el primer nucleótido del triplete de traducción. La mayoría de las diferencias interespecíficas detectadas fueron transiciones ($A \leftrightarrow G$ o $C \leftrightarrow T$). Asimismo, todas las delecciones (una en la secuencia de salmón y dieciseis en la secuencia de trucha) se localizaron en el intrón, salvo una delección en la secuencia de trucha que se encontró en el exón 6.

El análisis de restricción de los fragmentos del gen *p53* amplificados por PCR se llevó a cabo con las endonucleasas *Eco* RV, *Hinf* I y *Taq* I, elegidas tras comparar los mapas de restricción de ambas especies (Figuras 44 y 45).

Como muestran las Figuras 46 y 47, las tres enzimas utilizadas permiten discriminar los productos de PCR de las muestras de salmón y trucha. La endonucleasa *Eco* RV reconoció una diana en las secuencias de trucha originando dos fragmentos de 156 pb y 362 pb, pero no cortó los productos de PCR de salmón. Por el contrario, las enzimas *Hinf* I y *Taq* I no cortaron los productos de PCR de trucha, pero sí reconocieron una diana de restricción en los productos de PCR de salmón, originando fragmentos de 185 pb y 347 pb en el caso de *Hinf* I y dos fragmentos de 267 pb y 265 pb la enzima *Taq* I. En consecuencia, aunque la separación electroforética de los productos de PCR de salmón y trucha permite diferenciar estas especies directamente, la digestión con *Eco* RV y una de las dos enzima que cortan al salmón (*Hinf* I o *Taq* I), proporciona una confirmación adicional de la identidad del fragmento génico amplificado y facilita la identificación de especies.

V.2.9. UTILIZACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL 5S ADN_r COMO MARCADOR GENÉTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE PESCADO

Tanto los genes que codifican el 5S ARN_r, como su producto, el componente pequeño de ARN de la subunidad grande del ribosoma, han sido objeto de numerosas investigaciones para el estudio de relaciones filogenéticas (Hori y Osawa, 1987; Pavesi y col., 1997). Mientras en los organismos procariotas y en los eucariotas inferiores los genes del 5S ARN_r se localizan junto al resto de genes de ARN_r, en los organismos superiores los genes 5S ARN_r no están unidos a los demás ADN_r sino que se organizan como unidades repetitivas independientes en una o varias localizaciones del genoma.

El 5S ADN_r comprende en los eucariotas superiores una secuencia codificante muy conservada de 120 pb (5S ARN_r) y una región espaciadora que no se transcribe (NTS). Esta unidad se repite consecutivamente en forma de tándem. La longitud del espaciador NTS no supera la longitud que se puede amplificar por la reacción de PCR (hasta 2-3 Kb) y normalmente es específica de especie (Little y Braaten, 1989).

Pendas y col. (1994) diseñaron una pareja de cebadores basándose en la región conservada 5S ARN_r de trucha arco iris (Komiya y Takemura, 1979) para amplificar dos o más unidades repetitivas consecutivas del gen en salmón atlántico, trucha común y trucha arco iris. Los cebadores diseñados (5S-1 y 5S-2) corresponden a los nucleótidos 21-1 y 24-45 de la región codificante 5S ARN_r y al ser divergentes, amplifican todo el 5S ADN_r (la región codificante más el espaciador NTS) siempre que se encuentren al menos dos unidades repetidas en tándem. Estos investigadores no observaron variabilidad intraespecífica en el tamaño del fragmento amplificado cuando analizaron 24 individuos de 10 poblaciones de salmón atlántico y 20 individuos de 10 poblaciones de trucha común. Tampoco detectaron polimorfismo en las secuencias digiriendo los productos de PCR con diez enzimas de restricción distintas (*Nde* II, *Eco* RI, *Bam* HI, *Ava* II, *Xba* I, *Pal* I, *Hind* III, *Alu* I, *Taq* I, *Dra* I y *Bgl* I).

En nuestro trabajo hemos utilizado los cebadores 5S-1 y 5S-2 para amplificar el gen 5S ARNr a partir de muestras de salmón, trucha y palometa ahumadas. Los resultados obtenidos (Figura 48) a partir de muestras de salmón ahumado corroboran los descritos por Pendas y col. (1995) a partir de salmón fresco y dieron lugar a dos fragmentos de 256 pb y 525 pb aproximadamente. A partir de las muestras de trucha ahumada se amplificaron dos fragmentos de 294 pb y 350 pb aproximadamente y, finalmente, los productos de PCR de palometa ahumada contenían dos fragmentos amplificados de 450 pb y 550 pb aproximadamente. La amplificación del gen 5S ARNr en muestras de palometa ahumada utilizando los cebadores diseñados a partir de secuencias de trucha, confirma el alto grado de conservación interespecífica del citado gen. La secuenciación de los fragmentos amplificados permitió comprobar que efectivamente correspondían al gen 5S ARNr y que comprendían la mayor parte de la región codificante conservada más un espaciador de tamaño y secuencia diferente en cada una de las especies (Figura 49).

La obtención de fragmentos de ADN de distinta longitud según las especies era un resultado esperado si se consideran los resultados de otros investigadores que han estudiado el 5S ADNr en *Xenopus laevis* (Miller y Brownlee, 1978; Miller y col., 1978) crustáceos (Hendriks y col., 1986; Bagshaw y col., 1987; Pellicia y col., 1998) y peces como los salmónidos (Komiya y Takemura, 1979; Pendas y col., 1994, 1995), la tenca, *Tinca tinca* (Denis y Wegnez, 1977), la carpa (Murakami y Fujitani, 1998) y algunos coregónidos (Sajdak y col., 1998). La presencia de varias bandas de amplificación en una misma especie puede tener dos orígenes: la existencia en el individuo de unidades repetitivas del 5S ADNr con espaciadores diferentes o la amplificación de varias unidades consecutivas del 5S ADNr del mismo tamaño. En nuestro caso solo se ha secuenciado una de las obtenidas en cada especie, pero el tamaño de las bandas no se correspondería con la hipótesis de la amplificación de múltiplos de la unidad básica sino con la existencia de al menos dos espaciadores de distinta longitud en cada especie. En el caso del salmón, Pendas y col. (1994) comprobaron por técnicas de clonación, secuenciación e hibridación con sondas fluorescentes que, efectivamente, las

dos bandas contienen espaciadores distintos y que cada una de las unidades repetitivas se encuentra en una localización diferente del genoma.

El polimorfismo del gen 5S ARNr constituye, por tanto, un marcador genético nuclear específico de especie y su amplificación es un procedimiento sencillo para la identificación de especies de pescado en productos frescos y ahumados si lo comparamos con otras técnicas como el análisis de proteínas o el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de productos de PCR (PCR-RFLP). Además, el polimorfismo interespecífico observado en el 5S ADNr se considera una herramienta muy útil en estudios taxonómicos y de evolución (Pendas y col., 1995; Murakami y Fujitani, 1998; Pellicia y col., 1998).

VI. CONCLUSIONES

1. La diferenciación inmunológica de salmón atlántico (*Salmo salar*), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y palometa (*Brama raii*) se ha conseguido utilizando anticuerpos policlonales obtenidos frente a las proteínas musculares solubles de salmón ahumado (anti-PSS), trucha ahumada (anti-PST) y palometa ahumada (anti-PSP). Los anticuerpos policlonales, neutralizados con los extractos antigénicos heterólogos, se han utilizado en dos formatos de las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA), para la identificación rápida de muestras frescas y ahumadas de salmón, trucha y palometa.
2. Se han utilizado cinco marcadores genéticos (citocromo *b*, COII, 16S ARNr, *p53* y 5S ADNr) que permiten identificar específicamente el salmón atlántico y la trucha arco iris en muestras frescas y ahumadas. Con dos de los marcadores citados (citocromo *b* y 5S ADNr) se ha conseguido identificar también las muestras de palometa ahumada.

Con los genes citocromo *b*, citocromo oxidasa II, 16S ARNr y *p53* se amplificaron fragmentos génicos específicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. La restricción de los fragmentos amplificados con las endonucleasas seleccionadas en este trabajo ha permitido diferenciar e identificar específicamente muestras de salmón, trucha y palometa, tanto frescas como ahumadas, por el tamaño de las bandas electroforéticas obtenidas en geles de agarosa. Con el marcador genético nuclear 5S ADNr, la diferencia de longitud de los fragmentos amplificados por PCR permitió la identificación de las especies mencionadas, sin necesidad de recurrir a la digestión con endonucleasas de restricción.

VII. TRABAJO FUTURO

Los resultados de este trabajo indican que la utilización de anticuerpos policlonales (anti-PSS, anti-PST y anti-PSP) frente a proteínas solubles de salmón, trucha y palometa ahumados, permite la diferenciación de dichas especies mediante el desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) adecuadas. No obstante, la disponibilidad de los anticuerpos policlonales está condicionada a su obtención *in vivo* a partir de animales de experimentación. Esta limitación induce a pensar en el empleo de anticuerpos monoclonales con el mismo fin.

En los últimos años se han publicado diversos trabajos de investigación que utilizan anticuerpos monoclonales para la diferenciación de especies de pescado (Lundstrom, 1984; An y col., 1990; Huang y col., 1995). La obtención de anticuerpos monoclonales (Köhler y Milstein, 1975) permite obtener clones de células híbridas o hibridomas que producen, de forma continua e ilimitada, anticuerpos monoespecíficos de actividad biológica conocida y especificidad constante. Como inmunógenos pueden emplearse las proteínas musculares solubles de las especies de interés (Martín y col., 1988; Huang y col., 1995), aunque la utilización de inmunógenos más específicos contribuye a garantizar la obtención de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales que diferencien especies filogenéticamente próximas. En este sentido, es posible emplear proteínas musculares específicas de cada especie (Morales y col., 1993; García y col., 1994) o péptidos sintéticos específicos de especie, seleccionados mediante la comparación de las secuencias de aminoácidos de determinadas proteínas de las especies de interés (Rolland y col., 1993). Asimismo, considerando que las proteínas están codificadas genéticamente por el ADN, la comparación y búsqueda de secuencias peptídicas específicas puede basarse en el estudio de secuencias de ADN o ARN mensajero disponibles en las bases de datos especializadas como EMBL o GenBank.

De las numerosas proteínas inmunógenas que pueden presentar epítopos específicos de especie, en este proyecto se propone la utilización de la creatin-quinasa, la actina o la hormona del crecimiento.

La creatin-quinasa (CK) es una fosfagen-ATP fosfotransferasa propia de los vertebrados, cuyas funciones son equivalentes a las de otras fosfagen quinasas de los invertebrados. Estas enzimas catalizan la transferencia reversible de los grupos fosfato entre el trifosfato de adenosina (ATP) y la guanidina. Los animales vertebrados poseen únicamente fosfocreatina como fosfageno por lo que su única fosfagen-quinasa es la creatinquinasa (CK), mientras que en los animales invertebrados existen otras fosfagenquinasas: argininquinasa (AK), glicociaminquinasa (GK), taurociaminquinasa (TK) y lombricinquinasa (LK). La mayoría de las AKs son monómeros de 40 KDa, a diferencia del resto de fosfagenquinasas, CK, GK, y LK que son dímeros u octámeros. Actualmente se conocen las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos de fosfagen-quinasas procedentes de varias especies de invertebrados (Suzuki y Furukohri, 1994; France y col., 1997; Suzuki y col., 1997, 1998) y vertebrados (Kwiatkowski y col., 1984; Ordahl y col., 1984; Putney y col., 1984; West y col., 1984; Hossle y col., 1986, 1988; Perryman y col., 1986; Villarreal-Levy y col., 1987; Wothé y col., 1990). La comparación de las secuencias disponibles pone de manifiesto la existencia de fragmentos específicos, pero también de fragmentos muy conservados que resultan adecuados para el diseño de cebadores universales para amplificar por PCR cualquier fosfagen-quinasa (Suzuki y Furokohri, 1994). En consecuencia, proponemos la utilización de cebadores basados en secuencias conservadas de las fosfagen-quinasas para amplificar por PCR los genes que codifican la creatinquinasa de salmón, trucha y palometa. Posteriormente se analizarán las secuencias obtenidas y se diseñarán péptidos específicos de cada especie con el fin de utilizarlos como inmunógenos.

Otra proteína interesante en la obtención de anticuerpos monoclonales es la actina, una de las más abundantes y mejor estudiadas de los organismos eucariotas (Pollard y Cooper, 1986). Las actinas de los vertebrados se dividen en tres tipos: alfa-actinas, que se encuentran en el tejido muscular, y beta- y gamma-actinas, que constituyen el citoesqueleto de la mayor parte de las células. Las actinas musculares y no musculares de los vertebrados son proteínas muy conservadas, pero muestran diferencias características en sus secuencias de aminoácidos (Vandekerckhoe y Weber, 1984). Asimismo, se ha

comprobado que las principales diferencias entre especies se encuentran en los cinco primeros aminoácidos del extremo amino-terminal de la alfa-actina (Kabsch y col., 1990). Watabe y col. (1995) obtuvieron y compararon la secuencia de nucleótidos y aminoácidos a partir del ADNc que codifica la α -actina de la carpa, y del carpín, *Carassius auratus*, comprobando que difieren en dos aminoácidos del extremo N-terminal.

Estos resultados indican que probablemente se encontrarán péptidos específicos de especie en la región amino terminal de la alfa-actina de salmón, trucha y palometa frente a los que obtener anticuerpos monoclonales adecuados para la identificación de estas especies.

Como tercera opción proponemos utilizar como inmunógeno la hormona del crecimiento. El gen que codifica la hormona del crecimiento (GH) se ha estudiado y secuenciado en varias especies animales (Barta y col., 1981; DeNoto y col., 1981; Woychik y col., 1982; Vize y Wells, 1987, Agellon y col., 1988), observándose diferencias en la secuencia peptídica entre especies relacionadas como *Salmo* y *Oncorhynchus* (Agellon y col., 1988; Johansen y col., 1989; Devlin, 1993; McKay y col., 1996). Las diferencias apreciadas permitirán seleccionar fragmentos inmunógenos adecuados para la identificación de especies.

Los inmunógenos seleccionados como consecuencia de la comparación de las proteínas propuestas, se inocularán en ratones Balb/c, cuyo bazo hiperinmune se empleará en la obtención de hibridomas que produzcan anticuerpos monoclonales específicos para cada especie. Estos anticuerpos se emplearán en el desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas ELISA.

La utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) asociada o no a la secuenciación de los fragmentos amplificados y/o al análisis de la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) ha permitido, como ya se ha descrito en este trabajo, la diferenciación de muestras frescas y ahumadas de salmón, trucha y palometa. Además de estas técnicas, se están aplicando otros marcadores genéticos (RAPD, PCR-SSCP, secuencias repetitivas de ADN cromosómico, PCR múltiple, etc.) a la

identificación de especies próximas y poblaciones de una misma especie (Rehbein y col., 1999a, 199b). La elección del marcador "ideal" depende de las características de la especie a estudiar y su interacción con el tipo de marcador elegido (Ferguson y Danzmann, 1998). De hecho, la combinación de un marcador mitocondrial y otro nuclear parece ser lo más eficaz (Ward and Grewe, 1994).

Recientemente, en la identificación de especies y poblaciones, la atención se ha centrado en el estudio de determinadas secuencias repetitivas de ADN. Distribuidos por todo el genoma de los organismos eucariotas existen bloques de secuencia similar o idéntica, entre los que se incluyen familias multigénicas, como las que codifican las subunidades de ARN ribosómico, y también otros tipos de secuencias como satélites, minisatélites y microsatélites. El polimorfismo de estas secuencias se demostró a finales de los años 80 (Tautz, 1989; Weber y May, 1989) y se ha comprobado que muestran homogeneidad dentro de una misma especie o población y al mismo tiempo una gran variabilidad interespecífica o entre poblaciones distintas. Por ello se consideran marcadores genéticos útiles para la identificación de especies o poblaciones y para determinar las relaciones filogenéticas entre especies estrechamente relacionadas (Quinn y col., 1992; Murata y col., 1993; Wijers y col., 1993; Mizuno y col., 1995; Takasaki y col., 1996; Murakami y Fujitani, 1997a, 1997b).

El estudio del polimorfismo de mini y microsatélites en un *locus* determinado se basa en la especificidad de las secuencias de nucleótidos que bordean el *locus* y en las variaciones del número de repeticiones de la unidad básica. Es necesario conocer las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de ADN que bordean el *locus* para diseñar cebadores que permitan su amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (Jeffreys y col., 1994) y así comprobar el número de repeticiones de la unidad básica presentes en dicho *locus* en los individuos de una determinada especie o población. Precisamente la posibilidad de amplificación por PCR y la facilidad para diferenciar alelos han sido determinantes en la generalización del uso de microsatélites como marcadores genéticos.

Actualmente se dispone de cebadores para amplificar microsatélites en especies como el salmón atlántico (Bentzen y col., 1991; Slettan y col., 1993), trucha común (Estoup y col., 1993), trucha arco iris (Morris, 1993; Sakamoto y col., 1994), eglefino (Angers y col., 1995) o bacalao (Brooker y col., 1994). El nivel de heterocigosidad encontrado en los microsatélites, y en particular en las secuencias de dinucleótidos (GT)_n y (AC)_n, es muy elevado, por lo que se han utilizado en la diferenciación de poblaciones con niveles bajos de variación del ADN mitocondrial.

Conviene señalar que los cebadores empleados en una especie para amplificar determinados microsatélites pueden hibridar correctamente con el ADN de individuos pertenecientes a géneros o especies estrechamente relacionadas (Estoup y col., 1993). Esta característica de los microsatélites resulta muy útil cuando se buscan marcadores capaces de identificar especies animales. Sin embargo, el elevado polimorfismo intraespecífico de la mayoría de los microsatélites estudiados constituye un inconveniente para la *diferenciación interespecífica, donde interesan marcadores de especie y no de individuos de una población.*

Como complemento de las técnicas genéticas desarrolladas en esta tesis doctoral para la diferenciación de salmón, trucha y palometa, consideramos que el estudio y utilización de mini y microsatélites en estas especies puede tener un gran interés práctico y ser aplicable a la identificación de un mayor número de especies de interés comercial.

Aunque se han descrito microsatélites tanto en el salmón atlántico (Bentzen y col., 1993; Bentzen y Wright, 1993; McConnell y col., 1995; Tessier y col., 1995; Taggart y col., 1995; Slettan y col., 1997; Goodier y Davidson, 1998) como en la trucha arco iris (Sakamoto y col., 1994; Taylor, 1995; Morris y col., 1996; O'Connell y col., 1997), hasta donde llega nuestra información no se ha estudiado su presencia en la palometa.

VIII. RESUMEN

El procesado de los productos de la pesca en alimentos transformados, como el salmón, la trucha o la palometa ahumados, implica la pérdida de las características anatómicas de los pescados y en consecuencia dificulta la identificación de las especies empleadas como materia prima en su elaboración. La exigencia de la normativa legal vigente (Real Decreto 331/1999 de 26 de febrero, B.O.E. número 66, de 18 de marzo de 1999) en cuanto a la presencia en el etiquetado de los productos pesqueros frescos, refrigerados o cocidos, del nombre comercial y científico de la especie de que se trata, justifica el desarrollo de técnicas que permitan la identificación de especies en dichos productos de una manera eficaz, rápida, económica y con rigor científico. En este trabajo hemos utilizado dos tipos de técnicas cuya aplicación al análisis de alimentos ha experimentado un gran auge en los últimos años: técnicas inmunológicas y técnicas genéticas.

Las aplicaciones de las técnicas inmunológicas, especialmente las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA), a la diferenciación de especies de animales de abasto en carne y productos cárnicos (Patterson, 1985; Castro y col., 1990; Martín y col., 1991) y en leche y productos lácteos (García y col., 1990; Rodríguez y col., 1993; Levieux y Venien, 1994) son muy numerosas. Actualmente se dispone de kits comerciales para la identificación de especies en mezclas cárnicas y lácteas, así como para la detección de proteínas de origen cárnico o lácteo en otros productos alimenticios. Sin embargo, la aplicación de estas técnicas a la identificación de especies de pescado y marisco es escasa. Las aplicaciones disponibles con este objetivo se limitan al desarrollo de algunas técnicas inmunológicas para la identificación de sardinas enlatadas (Taylor y col., 1994a), bacalao y halibut (Domínguez y col., 1997), langostinos (An y col., 1990), y cangrejo en derivados del surimi (Verrez-Bagnis y Escruche-Roberto, 1993). Sin embargo, hasta donde llega nuestra información, en esta tesis doctoral se aborda por primera vez la obtención de anticuerpos frente a las proteínas de salmón, trucha y palometa y el desarrollo de técnicas ELISA para su diferenciación en productos de la pesca frescos y procesados. La obtención de inmunoseros frente a las

proteínas musculares solubles de salmón, trucha y palometa, de los que se han eliminado por neutralización las inmunoglobulinas responsables de la aparición de reacciones cruzadas, nos ha permitido desarrollar dos formatos de las técnicas ELISA para la identificación de las especies citadas (Carrera y col., 1996; 1997).

Las proteínas musculares solubles de pescado se pueden desnaturalizar por calor y los cambios estructurales resultantes afectan a la capacidad de los anticuerpos para reconocer las proteínas utilizadas como antígenos. Sin embargo, el ahumado en frío es un proceso en el que el pescado alcanza temperaturas inferiores a los treinta grados centígrados y los resultados alcanzados en este trabajo han permitido comprobar que la inmunorreactividad de las proteínas musculares solubles no se ve afectada por el procesado en dichas condiciones.

Debido a su sensibilidad, especificidad, rapidez y bajo coste, las técnicas ELISA que hemos desarrollado son apropiadas para su utilización como pruebas de campo. Esto hace que sean de gran interés para la inspección e identificación de especies.

Aunque las técnicas inmunológicas no se han aplicado asiduamente al análisis de pescados y mariscos, la situación es distinta en el caso de las técnicas genéticas.

En la década de los ochenta se desarrollaron técnicas muy eficaces para la amplificación y secuenciación del ADN que rápidamente se difundieron a todos los laboratorios de investigación genética. Este hecho permitió avanzar en el conocimiento de la estructura, localización y regulación de la expresión de numerosos genes. Asimismo, a principios de los noventa se impulsó el desarrollo de proyectos muy ambiciosos sobre la secuenciación de genomas completos, como el genoma humano (constituido por alrededor de 100.000 genes y 3.000 millones de pares de bases) y otros genomas menos complejos entre los que se incluyen la bacteria *Escherichia coli* (tres millones de pares de bases), la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (14 millones de pares de bases), la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (165 millones de pares

de bases) y el ratón *Mus musculus* (3.000 millones de pares de bases). A medida que aumenta el número de secuencias disponibles en diversos organismos, la comparación de genes permite establecer homologías y facilita la búsqueda, amplificación y secuenciación de genes homólogos en especies distintas.

La gran cantidad de información sobre secuencias de ADN vertidas en las bases de datos durante la última década alcanza también a varias especies de peces. La mayor parte de los estudios genéticos en peces tiene, sin embargo, objetivos diferentes de la identificación de especies y están encaminados principalmente al estudio de relaciones filogenéticas, estructura de poblaciones y migraciones de determinadas especies (Lockwood y col., 1993; Rosel y Block, 1996; Carney y col., 1997; Lu y col., 1997). No obstante, el conocimiento generado en dichos estudios y en otros realizados en especies animales alejadas de los peces, permiten seleccionar fragmentos de ADN con un grado de variabilidad intra- e interespecífica adecuada para la diferenciación de especies piscícolas filogenéticamente próximas. En este sentido, los trabajos publicados hasta el momento con el objetivo de la identificación genética de especies de pescado y marisco de interés comercial, se basan principalmente en el análisis de las secuencias de nucleótidos de fragmentos del ADN mitocondrial amplificados por PCR utilizando cebadores universales (Bartlett y Davidson, 1992). Mediante la comparación de las secuencias correspondientes a un fragmento conservado del gen mitocondrial citocromo *b* se han conseguido identificar varias especies de escómbridos frescos y enlatados (Bartlett y Davidson, 1991; Finnerty y Block, 1995; Unseld y col., 1995; Quinteiro y col., 1998) y salmónidos (Lockwood y col., 1993; Nielsen y col., 1994). Sin embargo, la secuenciación es un método de análisis laborioso y caro y se han tratado de buscar otras alternativas para detectar la variabilidad de fragmentos de ADN sin necesidad de obtener las secuencias de nucleótidos.

Una alternativa a la secuenciación consiste en el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) de los productos de la amplificación del ADN obtenidos mediante la reacción en cadena de la

polimerasa. Esta técnica, con gran capacidad discriminatoria para la identificación de especies animales, se ha utilizado para la diferenciación de especies de peces planos (Céspedes y col., 1998, 1999), túnidos (Ram y col., 1996; Quinteiro y col., 1998) y anguilas (Tagliavini y col., 1995), y es mucho más sencilla y menos costosa que la secuenciación y el análisis de la secuencia de nucleótidos. La técnica de PCR-RFLP se ha empleado en esta tesis doctoral para la diferenciación de salmón, trucha y palometa (Carrera y col., 1998, 1999a, 1999b).

La amplificación por PCR de los genes citocromo *b*, citocromo oxidasa II y 16S ARNr dio lugar a bandas electroforéticas del mismo tamaño en las diferentes especies de pescado. Sin embargo, una vez analizadas las secuencias de nucleótidos de los fragmentos amplificados en cada especie, se identificaron diferencias especie-específicas que se podían poner de manifiesto mediante la digestión con endonucleasas apropiadas. En consecuencia, la técnica de PCR-RFLP permitió obtener perfiles específicos de especie para salmón, trucha y palometa utilizando el gen citocromo *b* amplificado con cebadores universales. Asimismo, el diseño sobre secuencias de salmón y trucha de los cebadores utilizados en la amplificación de los genes citocromo oxidasa II y 16S ARNr ha resultado muy útil para la diferenciación de dichas especies por PCR-RFLP, aunque no permitieron amplificar los genes citados a partir del ADN de palometa debido a la especificidad de los cebadores o a la degradación observada en el ADN obtenido de las muestras de esta especie.

Una segunda alternativa a la secuenciación utilizada en este trabajo para diferenciar especies de pescado filogenéticamente próximas consiste en la selección de regiones del ADN cuya amplificación con un mismo par de cebadores da lugar a fragmentos de distinta longitud en cada especie. La diferenciación de especies se realiza mediante la visualización directa de dichos fragmentos en geles de agarosa, sin necesidad de digerirlos con enzimas de restricción. Es el caso de la amplificación de los genes nucleares *p53* y 5S ARNr. Sin embargo, la diferencia en el tamaño de los fragmentos amplificados con el gen *p53* fue tan pequeña entre las especies estudiadas,

que consideramos oportuno, para una mejor diferenciación, someter dichos fragmentos a una digestión con endonucleasas de restricción.

De los dos genes nucleares empleados en este trabajo, el 5S ADNr resultó útil para la diferenciación de las tres especies analizadas, salmón, trucha y palometa, mientras que el gen *p53* únicamente permitió la diferenciación de salmón y trucha. La ausencia de amplificación del gen *p53* en la palometa puede ser consecuencia de la degradación del ADN sufrida por las muestras de esta especie durante el procesado y la manipulación del pescado, aunque también podría ser consecuencia del carácter monocopia de este gen y de la longitud del intrón 5 en la palometa, cuyo tamaño se desconoce y pudiera exceder la longitud apropiada para su amplificación.

Finalmente, la pregunta que surge es si las técnicas de PCR y PCR-RFLP pueden competir con las técnicas actualmente disponibles para la diferenciación de especies de pescado. Si la demanda continúa, lo cual es previsible teniendo en cuenta las exigencias legislativas del etiquetado, pronto podremos ver métodos más rápidos para la extracción del ADN de las muestras, miniaturización del formato de PCR e incluso la posibilidad de aplicar esta técnica a nivel de campo. Por comparación podemos pensar en el desarrollo espectacular de las técnicas ELISA. Hace unos 20 años, estas técnicas se consideraron como una tecnología compleja que sólo podía desarrollarse en laboratorios de investigación muy equipados. Hoy día se han desarrollado formatos tan simples que se utilizan incluso a nivel doméstico.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- ABRAMS, R., VERBEKE, R. y VAN HOOFF, J. (1984). Fish species identification by isoelectric focusing. *Fleischwirtschaft*, **64** (5): 597-598.
- ADAMS, N.S., SPEARMAN, W.J., BURGER, C.V., CURRENS, K.P., SCHRECK, C.B. y LI, H.W. (1994). Variation in mitochondrial DNA and allozymes discriminates early and late forms of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in the Kenai and Kasilof rivers, Alaska. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **51**: 172-181.
- AGELLON, L.B., DAVIES, S.L., CHEN, T.T. y POWERS, D.A. (1988). Structure of a fish (rainbow trout) growth hormone gene and its evolutionary implications. *Proceedings of the Academy of Sciences of the United States of America*, **85**: 5136-5140.
- ALVARADO-BREMER, J.R., NASERI, I. y ELY, B. (1997). Orthodox and unorthodox phylogenetic relationships among tunas revealed by the nucleotide sequence analysis of the mitochondrial DNA control region. *Journal of Fish Biology*, **50**: 540-554.
- ALLMANN, M., CANDRIAN, U. y LÜTHY, J. (1992). Detection of wheat contamination in dietary non-wheat products by PCR. *The Lancet*, **339**: 309.
- AN, H., MARSHALL, M.R., OTWELL, W.S. y WEI, C.I. (1988). Electrophoretic identification of raw and cooked shrimp using various protein extraction systems. *Journal of Food Science*, **53**: 313-318.
- AN, H., WEI, C.I., ZHAO, J., MARSHALL, M.R. y LEE, C.M. (1989a). Electrophoretic identification of fish species used in surimi products. *Journal of Food Science*, **54** (2): 253-257.
- AN, H., MARSHALL, M.R., OTWELL, W.S. y WEI, C.I. (1989b). Species identification of raw and boiled shrimp by urea gel isoelectric focusing technique. *Journal of Food Science*, **54** (2): 233.
- AN, H., KLEIN, P.A., KAO, K.J., MARSHALL, R.R., OTWELL, W.S. y WEI, C.I. (1990). Development of monoclonal antibody for rock shrimp identification using enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **38**: 2094-2100.

- ANGERS, B., BERNATCHEZ, L., ANGERS, A. y DESGROSEILLERS, L. (1995). Specific microsatellite loci for brook charr reveal strong population subdivision on a microgeographic scale. *Journal of Fish Biology*, **47** (A): 177-185.
- ANGUITA, G., MARTÍN, R., GARCÍA, T., MORALES, P., HAZA, A., GONZÁLEZ, I., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P.E. (1995). Indirect ELISA for detection of cows' milk and goats' milks using a monoclonal antibody against bovine β -casein. *Journal of Dairy Research*, **62**: 655-659.
- ANGUITA, G., MARTÍN, R., GARCÍA, T., MORALES, P., HAZA, A.I., GONZÁLEZ, I., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P.E. (1997). A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine milk in ovine and caprine milk and cheese using a monoclonal antibody against bovine β -casein. *Journal of Food Protection*, **60** (1): 64.
- ANÓNIMO. (1997a). Acuicultura en España. *Información Veterinaria*, **Octubre**: 22-23.
- ARAYA, A., AMTHAUER, R., LEON, G. y KRAUSKOPF, M. (1984). Cloning, physical mapping and genome organization of mitochondrial DNA from *Cyprinus carpio* oocytes. *Molecular and General Genetics*, **196**: 43-52.
- ARMSTRONG, S.G., LEACH, D.N. y WYLLIE, S.G. (1992). The use of HPLC protein profiles in fish species identification. *Food Chemistry*, **44**: 147-155.
- ÁRNASON, E., PETERSEN, P.H. y PÁLSSON, S. (1998). Mitochondrial cytochrome *b* DNA sequence variation of Atlantic cod, *Gadus morhua*, from the Baltic and the White Seas. *Hereditas*, **129**: 37-43.
- BAGSHAW, J.C., SKINNER, H.B., BURN, T.C. y PERRY, B.A. (1987). Nucleotide sequence of the 5S RNA gene and flanking regions interspersed with histone genes in *Artemia*. *Nucleic Acids Research*, **15**: 3628.
- BAGSHAW, J.C. y BUCKHOLT, M.A. (1997). A novel satellite/microsatellite combination in the genome of the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. *Gene*, **184**: 211-214.

- BAKER, C.S., PERRY, A., CHAMBERS, G.K. y SMITH, P.J. (1995). Population variation in the mitochondrial cytochrome *b* gene of the orange roughy *Hoplostethus atlanticus* and the hoki *Macruronus novaezelandiae*. *Marine Biology*, **122**: 503-509.
- BARTA, A., RICHARDS, R.I., BAXTER, J.D. y SHINE, J. (1981). Primary structure and evolution of rat growth hormone gene and its evolutionary implications. *Proceedings of the Academy of Sciences of the United States of America*, **78**: 4867-4871.
- BARTLETT, S.E. y DAVIDSON, W.S. (1991). Identification of *Thunnus tuna* species by the polymerase chain reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome *b* genes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **48**: 309-319.
- BARTLETT, S.E. y DAVIDSON, W.S. (1992). FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing): a procedure for identifying the animal origin of biological specimens. *Biotechniques*, **12** (3): 408-411.
- BAUCHOT, M.L. y PRAS, A. (1993). En *Guía de los peces de mar de España y Europa*. 3ª ed., ediciones Omega, S.A., Barcelona. pp: 274-277.
- BEMBO, D.G., WEIGHTMAN, A.J., BEVERTON, R.J.H. y CRESSWELL, R.C. (1994). Mitochondrial DNA variation in river Usk brown trout, *Salmo trutta*. *Journal of Fish Biology*, **44**: 717-723.
- BENTZEN, P., HARRIS, S. y WRIGHT, M. (1991). Cloning of hypervariable minisatellite and simple sequence microsatellite repeats for DNA fingerprinting of important aquacultural species of salmonids and *Tilapia*. En *DNA Fingerprinting: Approaches and Applications*. Burke, T., Dolf, G. y Wolff, R. (eds.), Basel, Birkhauser Verlag. pp: 243-262.
- BENTZEN, P., TAYLOR, E.B. y WRIGHT, J.M. (1993). A novel synthetic probe for DNA fingerprinting salmonid fishes. *Journal of Fish Biology*, **43**: 313-316.
- BENTZEN, P. y WRIGHT, J.M. (1993). Nucleotide sequence and evolutionary conservation of a minisatellite variable number tandem repeat cloned from Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Genome*, **36**: 271-277.

- BERMINGHAM, E., FORBES, S.H., FRIEDLAND, K. y PLA, C. (1991). Discrimination between Atlantic salmon (*Salmo salar*) of north american and european origin using restriction analyses of mitochondrial DNA. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **48**: 884-893.
- BIELAWSKI, J.O. y PUMO, D.E. (1997). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of atlantic coast striped bass. *Heredity*, **78**: 32-40.
- BLANCO, M.C. (1994). Filogenia y clasificación taxonómica de la trucha arco iris. En *La Trucha, Cría industrial*. Santiago Estévez (ed.), Mundi-Prensa, Madrid. pp: 21-37.
- BLOCK, B.A., FINNERTY, J.R., STEWART, A.F.R. y KIDD, J. (1993). Evolution of endothermy in fish: mapping of physiological traits on a molecular phylogeny. *Science*, **260**: 210-214.
- BOOM, R., SOL, C.J.A., SALIMANS, M.M.M., JANSEN, C.L., WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E. y VAN DER NOORDAA, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, **Marzo**: 495-503.
- BORGO, R., SOUTY-GROSSET, C. y BOUCHON, D. (1996). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of snail meat species. *Journal of Food Science*, **61** (1): 1-4.
- BOSSIER, P. (1999). Authentication of seafood products by DNA patterns. *Journal of Food Science*, **64**: 189-193.
- BOUCHON, D., SOUTY-GROSSET, C. y RAIMOND, R. (1994). Mitochondrial DNA variation and markers of species identity in two penaeid shrimp species: *Penaeus monodon* Fabricius and *P. Japonicus* Bate. *Aquaculture*, **127**: 131-144.
- BROOKER, A.L., COOK, D., BENTZEN, P., WRIGHT, J.M. y DOYLE, R.W. (1994). Organization of microsatellites differs between mammals and cold-water teleost fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **51**: 1959-1966.

BROWN, W.M., PRAGER, E.M., WANG, A. y WILSON, A.C. (1982). Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, **18**: 225-239.

BROWN, W.M. (1985). The mitochondrial genome of animals. En *Molecular Evolutionary Genetics*. R.J. MacIntyre (ed.), Plenum Press, New York. pp: 95-130.

BUCHMANN, K. y PEDERSEN, K. (1994). A study on teleost phylogeny using specific antisera. *Journal of Fish Biology*, **45**: 901-903.

BUCHER, K., SZALAI, G., MARTI, E., GRIOT-WENK, M.E. y LAZARY, S. (1996). Tumour suppressor gene p53 in the horse: identification, cloning, sequencing and a possible role in the pathogenesis of equine sarcoid. *Research in Veterinary Science*, **61**: 114-119.

CANCALON, P.F. (1995a). Capillary electrophoresis: a useful technique for food analysis. *Food Technology*, **49** (6): 52-58.

CANCALON, P.F. (1995b). Capillary electrophoresis: a new tool in food analysis. *Journal of AOAC International*, **78**: 12-15.

CARNEGIE, P.R. (1994). Quality control in the food industries with DNA technologies. *Australasian Biotechnology*, **4** (3): 146-149.

CARNEY, B.L., GRAY, A.K. y GHARRETT, A.J. (1997). Mitochondrial DNA restriction site variation within and among five populations of Alaskan coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **54**: 940-949.

CARR, S.M. y MARSHALL, D. (1991). Detection of intra-specific DNA sequence variation in the mitochondrial cytochrome *b* gene of Atlantic cod (*Gadus morhua*) by the polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **48**: 48-52.

CARRERA, E., MARTÍN, R., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P.E. (1996). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of smoked salmon (*Salmo salar*),

trout (*Oncorhynchus mykiss*) and bream (*Brama raii*). *Journal of Food Protection*, **59** (5): 521-524.

CARRERA, E., GARCÍA, T., CÉSPEDES, A., GONZÁLEZ, I., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (1997). Immunostick colorimetric ELISA assay for the identification of smoked salmon, trout and bream. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **74**: 547-550.

CARRERA, E., GARCÍA, T., CÉSPEDES, A., GONZÁLEZ, I., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (1998). Identification of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by using polymerase chain reaction amplification and restriction analysis of the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Journal of Food Protection*, **61** (4): 482-486.

CARRERA, E., GARCÍA, T., CÉSPEDES, A., GONZÁLEZ, I., FERNÁNDEZ, A., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (1999a). PCR-RFLP of the mitochondrial cytochrome oxidase gene: A simple method for discrimination between Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). (en prensa).

CARRERA, E., GARCÍA, T., CÉSPEDES, A., GONZÁLEZ, I., FERNÁNDEZ, A., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (1999b). Salmon and trout analysis by PCR-RFLP for identity authentication. (en prensa).

CASTRO, C., GONZÁLEZ, I., GARCÍA, T., MARTÍN, R., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P.E. (1990). Detección de carne de pollo en mezclas cárnicas frescas utilizando anticuerpos monoclonales y un ELISA indirecto. *Revista Agroquímica Tecnología Alimentaria*, **30** (4): 461-468.

CÉSPEDES, A., GARCÍA, T., CARRERA, E., GONZÁLEZ, I., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (1998) Identification of flatfish species using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction analysis of the cytochrome *b* gene. *Journal of Food Science*, **63** (2): 206-209.

CÉSPEDES, A., GARCÍA, T., CARRERA, E., GONZÁLEZ, I., FERNÁNDEZ, A., ASENSIO, L.M., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (1999). Genetic discrimination among *Solea solea* and *Microchirus azevia* by

RFLP analysis of PCR amplified mitochondrial DNA fragments. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **50**.

CHEN, I.C., CHAPMAN, F.A., WEI, C.I. y O'KEEFE, S.F. (1996). Preliminary studies on SDS-PAGE and isoelectric focusing identification of sturgeon sources of caviar. *Journal of Food Science*, **61** (3): 533-535.

CHEN, J., JOHNSON, R. y GRIFFITHS, M. (1998). Detection of Verotoxigenic *Escherichia coli* by magnetic capture-hybridization PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **Jan**: 147-152.

CHIKUNI, K., OZUTSUMI, K., KOISHIKAWA, T. y KATO, S. (1990). Species identification of cooked meats by DNA hybridization assay. *Meat Science*, **27**: 119-128.

CHIKUNI, K., TABATA, T., SAITO, M. y MONMA, M. (1994). Sequencing of mitochondrial cytochrome *b* genes for the identification of meat species. *Animal Science and Technology*, **65** (6): 571-579.

CHOMCZYNSKI, P. y SACCHI, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, **162**: 156-159.

CHOW, S., CLARKE, M.E. y WALSH, P.J. (1993). PCR-RFLP analysis on thirteen western Atlantic snappers (Subfamily Lutjaninae): a simple method for species and stock identification. *Fishery Bulletin, US*, **91**: 619-627.

CHOW, S. e INOUE, S. (1993). Intra- and interspecific restriction fragment length polymorphism in mitochondrial genes of *Thunnus* tuna species. *Bulletin national of the Research Institute of Far Seas Fish*, **30**: 207-225.

CHOW, S. y USHIAMA, H. (1995). Global population structure of albacore (*Thunnus alalunga*) inferred by RFLP analysis of the mitochondrial ATPase gene. *Marine Biology*, **123**: 39-45.

COMINCINI, S., SIRONI, M., BANDI, C., GIUNTA, C., RUBINI, M. y FONTANA, F. (1996). RAPD analysis of systematic relationships among the Cervidae. *Heredity*, **76**: 215-221.

CRONIN, M.A., AMSTRUP, S.C., GARNER, G. y VYSE, E.R. (1991). Intra- and interspecific mitochondrial DNA variation in North American bears (*Ursus*). *Canadian Journal of Zoology*, **69**: 2985-2992.

CRONIN, M.A., SPEARMAN, W.J. y WILMOT, R.L. (1993). Mitochondrial DNA variation in Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and Chum salmon (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **50**: 708-715.

DAVIDSON, A.F.G. y BRIDGES, M.A. (1987). Coelic disease: a critical review of aetiology and pathogenesis. *Clinica et Chimica Acta*, **163**: 1-40.

DAVIDSON, W.S., BIRT, T.P. y GREEN, J.M. (1989). Organization of the mitochondrial genome from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Genome*, **32**: 340-342.

DENIS, H. y WEGNEZ, M. (1977). Oocytes and liver cells of the teleost fish *Tinca tinca* contain different kinds of 5S RNA. *Developmental Biology*, **59**: 228-236.

DENOTO, F.M., MOORE, D.D. y GOODMAN, H.M. (1981). Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nucleic Acids Research*, **9**: 3719-3730.

DE FROMENTEL, C.C., PAKDEL, F., CHAPUS, A., BANEY, C., MAY, P. y SOUSSI, T. (1992). Rainbow trout p53 cDNA cloning and biochemical characterization. *Gene*, **112**: 241-245.

DESALLE, R.A., WILLIAMS, A.K. y GEORGE, M. (1993). Isolation and characterization of animal mitochondrial DNA. *Methods in Enzymology*, **224**: 176-202.

DESALLE, R. y BIRSTEIN, V.J. (1996). PCR identification of black caviar. *Nature*, **381**: 197-198.

DESHPANDE, S.S. (1996). En Enzyme Immunoassays from concept to product development. Chapman and Hall (ed.), New York.

- DEVLIN, R.H. (1993). Sequence of sockeye salmon type 1 and 2 growth hormone genes and relationship of rainbow trout with Atlantic and Pacific salmon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **50**: 1738-1748.
- DINCER, B., SPEAROW, J.L., CASSENS, R.G. y GREASER, M.L. (1987). The effects of curing and cooking on the detection of species origin of meat products by competitive and indirect ELISA techniques. *Meat Science*, **20**: 253-265.
- DINESH, K.R., LIM, T.M., CHAN, W.K. y PHANG, V.P.E. (1996). Genetic variation inferred from RAPD fingerprinting in three species of tilapia. *Aquaculture International*, **4**: 19-30.
- DOBERSTEIN, K.H. y GREUEL, E. (1982). The preparation of specific antisera for the identification of meat of African antelope species in agar gel precipitation test. *Fleischwirtschaft*, **62** (8): 1011-1013.
- DOMANICO, M.J., PHILLIPS, R.B. y SCHWEIGERT, J.F. (1996). Sequence variation in ribosomal DNA of Pacific (*Clupea pallai*) and Atlantic herring (*Clupea harengus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **53**: 2418-2413.
- DOMÍNGUEZ, E., PÉREZ, M.D., PUYOL, P. y CALVO, M. (1997). Use of immunological techniques for detecting species substitution in raw and smoked fish. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **204**: 279-281.
- DOVEY, S. y TOWNER, K.J. (1989). A biotinylated DNA probe to detect bacterial cells in artificially contaminated foodstuffs. *Journal of Applied Bacteriology*, **66**: 43-47.
- DOWDIE, O.G. y BIEDE, S.L. (1983). Influence of processing temperature on the distribution of tissue and water-soluble proteins in blue crabs (*Callinectes sapidus*). *Journal of Food Science*, **50**: 1143.
- DOYELLE, A. (1997). El acuicultor y los riesgos. Como pez en el agua. *Acuicultura*, **3**: 31-33.

- DU, S.J., GONG, Z., FLETCHER, G.L., SHEARS, M.A., KING, M.J., IDLER, D.R. y HEW, C.L. (1992). Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone construct. *BioTechnology*, **10**: 176-181.
- DUNBAR, B.S y SCHWOEBEL, E.D. (1990). Preparation of polyclonal antibodies. En: *Methods in Enzimology*. Vol. 182 (49). M.P. Deustcher (ed.), Academic Press Inc., Londres. pp: 663-670.
- DURAND, M., MEUSNIER, M., DELAHAYE, J. y PRUNET, P. (1974). Détection de l'addition frauduleuse de lait de vache dans les laits de chèvre et de brebis par la méthode de l'immunodiffusion en gélose. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire*, **47**: 247-258.
- EARNSHAW, R. y GIDLEY, J. (1992). Molecular methods for typing bacterial food pathogens. *Trends in Food Science and Technology*, **2**: 39-43.
- EBBEHØF, K.F. y THOMSEN, P.D. (1991a). Species differentiation of heated meat products by DNA hybridization. *Meat Science*, **30**: 221-234.
- EBBEHØF, K.F. y THOMSEN, P.D. (1991b). Differentiation of closely related species by DNA hybridization. *Meat Science*, **30**: 359-366.
- ENGVAL, E. y PERLMANN, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, **8**: 871.
- EPPLEN, J.T., AMMER, H., EPPLEN, C., KAMMERBAUER, C., MITREITER, R., ROEWER, L., SCHWAIGER, W., STEIMLE, V., ZISCHLER, H., ALBERT, E., ANDREAS, A., BEYERMANN, B., MEYER, W., BEUTKAMP, J., NANDA, I., SCHMID, M., NÜRNBERG, P., PENA, S.D., PÖCHE, H., SPRECHER, W., SCHARTL, M., WEISING, K. y YASSOURIDIS, A. (1991). Oligonucleotide fingerprinting using simple repeat motifs: a convenient, ubiquitously applicable method to detect hypervariability for multiple purposes. En: *Fingerprinting Approaches and Applications*. Burke, T., Dolf, G., Jeffreys, A.J. y Wolff, R. (eds). DNA. Basel, Birkhäuser, pp. 50-69.

ESTOUP, A., PRESA, P., KRIEG, F., VAIMAN, D. y GUYOMARD, R. (1993). (CT)_n and (GT)_n microsatellites: A new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity*, **71**: 488-496.

F.A.O. (1998). En *Estadísticas de Pesca*. Vol. 82-83.

FELSENSTEIN, J. (1993). PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.5. Distributed by the author, Univ. Washington, Seattle, WA.

FERGUSON, A., TAGGART, J.B., PRODÖHL, P.A., McMEEL, O., THOMPSON, C., STONE, C., MCGINNITY, P. y HYNES, R.A. (1995). The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *Journal of Fish Biology*, **47 (A)**: 103-126.

FERGUSON, M.M. y DANZMANN, R.G. (1998). Role of genetic markers in fisheries and aquaculture: useful tools or stamp collecting? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **55**: 1553-1563.

FERRE, F., MARCHESE, A.L., GRIFFIN, S.L., DIAGLE, A.E., RICHIERI, S.P., JENSEN, F.C. y CARLO, D.J. (1993). Development and validation of a polymerase chain reaction method for the precise quantitation of HIV-1 DNA in blood cells from subjects undergoing a 1-year immunotherapeutic treatment. *AIDS*, **7**: S21-S27.

FINNERTY, J.R. y BLOCK, B.A. (1995). Evolution of cytochrome *b* in the *Scombroidei* (Teleostei): molecular insights into billfish (*Istiophoridae* and *Xiphiidae*) relationships. *Fishery Bulletin*, **93**: 78-96.

FORREST, A.R.R. y CARNEGIE, P.R. (1994). Identification of gourmet meat using FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing). *BioTechniques*, **17 (1)**: 24-25.

FRANCE, R.M., SELLERS, D.S. y GROSSMAN, S.H. (1997). Purification, characterization, and hydrodynamic properties of arginine kinase from Gulf shrimp (*Penaeus aztecus*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **345 (1)**: 73-78.

FUKAL, L. (1991). Modern immunoassays in meat-product analysis. *Nahrung*, **35**: 431-448.

FUNG, D.Y.C. (1995). What's needed in rapid detection of food borne pathogens. *Food Technology*, **49**: 64-67.

GACHET, E., MARTÍN, G.G., VIGNEAU, F. y MEYER, G. (1999). Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available. *Trends in Food Science & Technology*, **9**: 380-388.

GALVIN, P., SADUSKY, T., MCGREGOR, D. y CROSS, T. (1995). Population genetics of Atlantic cod using amplified single locus minisatellite VNTR analysis. *Journal of Fish Biology*, **47 (A)**: 200-208.

GALLARDO, J.M., SOTELO, C.G., PIÑEIRO, C. y PÉREZ-MARTÍN, R.I. (1995). Use of capillary zone electrophoresis for fish species identification. Differentiation of flatfish species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**: 1238-1244.

GARCÍA, T., MARTÍN, R., RODRÍGUEZ, E., MORALES, P., HERNÁNDEZ, P.E. y SANZ, B. (1990). Detection of bovine milk in ovine milk by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Dairy Science*, **73**: 1489-1493.

GARCÍA, T., MARTÍN, R., RODRÍGUEZ, E., AZCONA, J.I., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P.E. (1991). Detection of bovine milk in ovine milk by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of Food Protection*, **54**: 366-369.

GARCÍA, T., MARTÍN, R., MORALES, P., HAZA, A.I., ANGUITA, G., GONZÁLEZ, I., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P.E. (1994). Production of a horse specific monoclonal antibody and detection of horse meat in raw meat mixtures by an indirect ELISA. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,

GARRIDO-RAMOS, M.A., JAMILENA, M., LOZANO, R., CÁRDENAS, S., RUIZ REJÓN, C. y RUIZ REJÓN, M. (1995). Phylogenetic relationships

of the *Sparidae* family (*Pisces*, *Perciformes*) inferred from satellite-DNA. *Hereditas*, **122**: 1-6.

GEORGES, M., LEQUARRE, A.S., CASTELLI, M., HANSET, R. y VASSART, G. (1988). DNA fingerprinting in domestic animals using four different minisatellite probes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, **47**: 127-131.

GONZÁLEZ, I., MARTÍN, R., GARCÍA, T., MORALES, P., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P.E. (1993). A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Pseudomonas fluorescens* and related psychrotrophic bacteria in refrigerated milk. *Journal of Applied Bacteriology*, **74**: 394-401.

GONZÁLEZ, M.P., ARROYO, R y JIMÉNEZ, M. (1997). Identificación de especies de pescado por enfoque isoelectrico. En *Laboratorios del SOIVRE. Boletín Técnico Informativo nº 4 (serie verde). Parámetros de Calidad en productos de la Pesca (I)*. Ministerio de Economía y Hacienda, Madrid. pp: 35-50.

GONZÁLEZ, I., GARCÍA, T., FERNÁNDEZ, A., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (1999) Rapid enumeration of *Escherichia coli* in oysters by a quantitative PCR-ELISA. *Journal of Applied Microbiology*, **86**: 231-236.

GOODIER, J.L. y DAVIDSON, W.S. (1998). Characterization of novel minisatellite repeat loci in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and their phylogenetic distribution. *Journal of Molecular Evolution*, **46**: 245-255.

GOSLING, J.P. (1990). A decade of development in immunoassay methodology. *Clinical Chemistry*, **36** (8): 1408-1427.

GREWE, P.M., KRUEGER, C., AQUADRO, C.F., BERMINGHAM, E., KINCAID, H.L. y MAY, B. (1993). Mitochondrial DNA variation among lake trout (*Salvelinus namaycush*) strains stocked into lake Ontario. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **50**: 2397-2403.

GROSS, E. (1966). The Cyanogen Bromide Reaction. *Methods in Enzymology*, **II**: 238-255.

- GROSS, R., NILSSON, J. y SCHMITZ, M. (1996). A new species-specific nuclear DNA marker for identification of hybrids between Atlantic salmon and brown trout. *Journal of Fish Biology*, **49**: 537-540.
- GUÉNETTE, S., FORTIN, R. y RASSART, E. (1993). Mitochondrial DNA variation in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) from the St. Lawrence river and James bay Drainage Basins in Quebec, Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **50**: 659-664.
- GUTIÉRREZ, R., GONZÁLEZ, I., GARCÍA, T., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (1997) A quantitative PCR-ELISA assay for detection of psychrotrophic bacteria in refrigerated milk. *Journal of Applied Microbiology*, **83**: 518-523.
- GUTIÉRREZ, R., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (1998). Quantitative detection of meat spoilage bacteria by using the polimerase chain reaction (PCR) and an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Letters in Applied Microbiology*, **26**: 372-376.
- HALL, H.J. y NAWROCKI, L.W. (1995). A rapid method for detecting mitochondrial DNA variation in the brown trout, *Salmo trutta*. *Journal of Fish Biology*, **46**: 360-364.
- HAMILTON, W.D. (1982). Fish species identification by thin layer agarose isoelectric focusing and densitometric scanning. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **65** (1): 119-122.
- HANSEN, M.M. y LOESCHKE, V. (1996). Genetic differentiation among Danish brown trout populations, as detected by RFLP analysis of PCR amplified mitochondrial DNA segments. *Journal of Fish Biology*, **48**: 422-436.
- HANSEN, M.M. y MENSBERG, K.D. (1998). Genetic differentiation and relationship between genetic and geographical distance in Danish sea trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Heredity*, **81**: 493-504.

HARDIMAN, G.T., WOLFF, J., PEDEN, J y GANNON, F. (1994). Isolation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) cytochrome c oxidase subunit II gene (cox II). *Journal of Applied Ichthyology*, **10**: 64-68.

HARDING, G.C., KENCHINGTON, E.L., BIRD, C.J., PEZZACK, D.S. y LANDRY, D.C. (1997). Genetic relationships among subpopulations of the American lobster (*Homarus americanus*) as revealed by random amplified polymorphic DNA. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **54**: 1762-1771.

HARLOW, E. y LANE, D. (1988). En *Antibodies. A Laboratory Manual*. New York Cold Spring Harbor Laboratory. pp: 298-299.

HARLOW, E. y LANE, D. (1998). En *Using Antibodies*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

HARRIS, A.S. y WRIGHT, J.M. (1995). Nucleotide sequence and genomic organization of cichlid fish minisatellites. *Genome*, **38**: 177-184.

HARTLEY, S.E., BARTLETT, S.E. y DAVIDSON, W.S. (1992). Mitochondrial DNA analysis of Scottish populations of Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.). *Journal of Fish Biology*, **40**: 219-224.

HARTLEY, S.E. y DAVIDSON, W.S. (1994). Distribution of satellite DNA sequences isolated from Arctic Char, *Salvelinus alpinus*, in the genus *Salvelinus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **51**: 277-283.

HAZA, A.I., MORALES, P., IKKEN, Y., MARTÍNEZ, A., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P.E. (1997). Métodos inmunológicos empleados para determinar el origen específico de la leche y derivados lácteos. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, **julio/agosto**: 53-60.

HELLING, R.B., GOODMAN, H.M. y BOYER, H.W. (1974). Analysis of *Eco* RI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *Journal of Virology*, **14**: 1235.

HENDRIKS, L., HUYSMANS, A., VANDERBERGHE, A. y DE WACHTER, R. (1986). Primary structures of the 5S ribosomal RNAs of 11

arthropods and applicability of 5S RNA to the study of metazoan evolution. *Journal of Molecular Evolution*, **24**: 103-109.

HERNÁNDEZ, P.E., MARTÍN, R., GARCÍA, T., MORALES, P., ANGUITA, G., HAZA, A.I., GONZÁLEZ, I. y SANZ, B. (1994). Antibody-based analytical methods for meat species determination and detecting adulteration of milk. *Food and Agricultural Immunology*, **6**: 95-104.

HILL, W.E. (1996). The polymerase chain reaction application for detection of food-borne pathogens. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, **36**: 123-173.

HOEH, W.R., BLAKLEY, K.H. y BROWN, W.M. (1991). Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA. *Science*, **251**: 1488-1490.

HOFMANN, K. (1987). Fundamental problems in identifying the animal species of muscle meat using electrophoretic methods. *Fleischwirtschaft*, **67**: 820-826.

HORAK, I., COON, H.G. y DAVID, I.B. (1974). Interspecific recombination of mitochondrial DNA molecules in hybrid somatic cells. *Proceedings of the Academy of Science of the United States of America*, **71**: 23-24.

HORI, H. y OSAWA, S. (1987). Origin and evolution of organisms as deduced from 5S ribosomal RNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, **4**: 445-472.

HOSSLE, J.P., ROSENBERG, U.B., SCHAFER, B., EPPENBERGER, H.M. y PERRIARD, J.C. (1986). The primary structure of chicken B-creatine kinase and evidence for heterogeneity of its mRNA. *Nucleic Acids Research*, **14**: 1449-1463.

HOSSLE, J.P., SCHLEGEL, J., WEGMANN, G., WYSS, M., BOHLEN, P., EPPENBERGER, H.M., WALLIMAN, T. y PERRIARD, J.C. (1988). Distinct tissue specific mitochondrial creatine kinases from chicken brain and striated muscle with a conserved CK framework. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **151**: 408-416.

- HOTZEL, H., SACHSE, K. y PFÜTZNER, H. (1996). Rapid detection of *Mycoplasma bovis* in milk samples and nasal swabs using the polymerase chain reaction. *Journal of Applied Bacteriology*, **80**: 505-510.
- HUANG, T., MARSHALL, M.R., KAO, K., OTWELL, W.S. y WEI, C. (1995). Development of monoclonal antibodies for red snapper (*Lutjanus campechanus*) identification using enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**: 2301-2307.
- IRWIN, D.M., KOCHER, T.D. y WILSON, A.C. (1991). Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, **32**: 128-144.
- JEFFREYS, A.J., WILSON, V. y THEIN, S.L. (1985a). Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature (Lond.)*, **314**: 67-73.
- JEFFREYS, A.J., NEUMANN, R. y WILSON, V. (1990). Repeat unit sequence variation in minisatellites: A novel source of DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecule analysis. *Cell*, **60**: 473-485.
- JEFFREYS, A.J., MACLEOD, A., TAMAKI, K., NEIL, D.L. y MONCKTON, D.G. (1991). Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature*, **354**: 204-209.
- JEFFREYS, A.J., TAMAKI, K., MACLEOD, A., MONCKTON, D.G., NEIL, D.L. y ARMOUR, J.A.L. (1994). Complex gene conversion events in germline mutation at human minisatellites. *Nature Genetics*, **6**: 136-145.
- JINNEMAN, K.C., WETHERINGTON, J.H., HILL, W.E., ADAMS, A.M., JOHNSON, J.M., TENGE, B.J., DANG, N., MANGER, R.L. y WEKELL, M.M. (1998). Template preparation for PCR and RFLP of amplification products for the detection and identification of *Cyclospora* sp. and *Eimeria* spp. oocysts directly from raspberries. *Journal of Food Protection*, **61** (11): 1497-1503.
- JOHANSEN, B., JOHANSEN, O.C. y VALLA, S. (1989). The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Gene*, **77**: 317-324.

JOHANSEN, S., GUDDAL, P.H. y JOHANSEN, T. (1990). Organization of the mitochondrial genome of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Nucleic Acids Research*, **18**: 411-419.

JUÁREZ, S.J. (1997). La Pesca en España: cambios en los últimos años y perspectivas. *Papeles de Economía Española*, **71**: 2-13.

KABSCH, W., MANNHERZ, H.G., SUCK, D., PAI, E.F. y HOLMES, K.C. (1990). Atomic structure of the actin: Dnase I complex. *Nature*, **347**: 37-44.

KANN, L.M. y WISHNER, K. (1996). Genetic population structure of the copepod *Calanus finmarchicus* in the Gulf of Maine: allozyme and amplified mitochondrial DNA variation. *Marine Biology*, **125**: 65-75.

KENCHINGTON, E., NAIDU, K.S., RODDICK, D.L., COOK, D.I. y ZOUROS, E. (1993). Use of biochemical genetic markers to discriminate between adductor muscles of the sea scallop (*Placopecten magellanicus*) and the iceland scallop (*Chlamys islandica*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **50**: 1222-1228.

KOCHER, T.D., THOMAS, W.K., MEYER, A., EDWARDS, S.V., PAÄBO, S., VILLABLANCA, F.X. y WILSON, A.C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the Academy of Science of the United States of America*, **86**: 6196-6200.

KOH, M.C., LIM, C.H., CHUA, S.B., CHEW, S.T. y PHANG, S.T.W. (1998). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species. *Meat Science*, **48** (34): 275-285.

KÖHLER, G. y MILSTEIN, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**: 495-497.

KOMIYA, H. y TAKEMURA, S. (1979). Nucleotide sequence of 5S ribosomal RNA from rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) liver. *Journal of Biochemistry*, **86**: 1067-1080.

KORNFIELD, I. y KIRCHEIS, F.W. (1994). Mitochondrial DNA and conservation of an aboriginal arctic char (*Salvelinus alpinus oquassa*) from

Floods Pond, Maine. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **51**: 62-67.

KUMAR, S., TAMURA, K. y MEI, M. (1993). MEGA: molecular evolutionary genetics analysis, version 1.0. The Pennsylvania State University, University Park, Pa.

KUSSER, W.C., PARKER, R.L. y MIAO, X. (1994). Polymerase chain reaction and DNA sequence of rainbow trout tumour suppressor gene *p53* exons 5, 6 and 7 to 9. *Aquatic Living Resources*, **7**: 11-16.

KWIATKOWSKI, R.W., SCHWEINFEST, C.W. y DOTTIN, R.P. (1984). Molecular cloning and the complete nucleotide sequence of the creatine kinase-M cDNA from chicken. *Nucleic Acids Research*, **12**: 6925-6934.

LAIRD, W.M., MACKIE, I.M. y RITCHIE, A.H. (1982). Differentiation of species of fish by isoelectric focusing on agarose and polyacrylamide gels. A comparison. *Journal of the Association of Public Analysts*, **20**: 125-135.

LAIRD, P.W., ZIJDERVELD, A., LINDERS, K., RUDNICKI, M.A., JAENISCH, R. y BERNIS, A. (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Research*, **19** (15): 4293.

LARINIER, M. y DARTIGUELONGUE, J. (1989). La circulation des poissons migrateurs: Le transit a travers les turbines des installations hydroélectriques. *Bulletin Francais de la Pêche et de la Pisciculture*, **312-313**: 1-90.

LEBLANC, E.L., SINGH, S. y LEBLANC, R.J. (1994). Capillary zone electrophoresis of fish muscle sarcoplasmic proteins. *Journal of Food Science*, **59** (6): 1267-1270.

LEBLANC, E.L. y LEBLANC, R.J. (1994). Capillary zone electrophoresis of the fish muscle sarcoplasmic proteins. *Journal of Food Science*, **59**: 1267-1270.

LEIGHTON-JONES, J. (1991). DNA probes: applications in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, **2**: 28-32.

- LESSA, E. y APPLEBAUN, G. (1993). Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. *Molecular Ecology*, **2**: 121-129.
- LEVIEUX, D. y VENIEN, A. (1994). Rapid, sensitive two-site ELISA for detection of cows' milk in goats' or ewes' milk using monoclonal antibodies. *Journal of Dairy Research*, **61**: 91-99.
- LEVINE, A.J., MOMAND, J. y FINLAY, C.A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, **351**: 453-456.
- LITTLE, R.D. y BRAATEN, D.C. (1989). Genomic organization of human 5S rDNA and sequence of one tandem repeat. *Genomics*, **4**: 376-383.
- LOCKWOOD, S.F., DILLINGER Jr., R.E., BIRT, T.P., GRENN, J.M. y SNYDER, T.P. (1993) Phylogenetic relationships among members of the Coregoninae inferred from direct sequencing of PCR-amplified mitochondrial DNA. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **50**: 2112-2118.
- LU, G., LI, S. y BERNATCHEZ, L. (1997). Mitochondrial DNA diversity, population structure, and conservation genetics of four native carps within the Yangtze river, China. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **54**: 47-58.
- LUDWIG, A. y KIRSCHBAUM, F. (1998) Comparison of mitochondrial DNA sequences between the European and the Adriatic sturgeon. *Journal of Fish Biology*, **52**: 1289-1291.
- LUNDSTROM, R.C. (1984). Identification of species in cooked seafood using monoclonal antibodies. En *Proceedings of the Symposium on Meat and Fish Identification*, 9th Annual Association of Official Analytical Chemists Spring Workshop, Philadelphia, PA.
- MACKIE, I.M. y TAYLOR, T. (1972). Identification of species of heat sterilised canned fish by polyacrylamide-disc electrophoresis. *Analyst*, **97**: 609-611.
- MACKIE, I.M. (1980). En *Advances in Fish Science and Technology*. J.J Connel (ed.), Fishing News Books, UK. pp: 444-451.

MACKIE, I.M., PRYDE, S.E., GONZALES-SOTELO, C., MEDINA, I., PÉREZ-MARTÍN, R., QUINTEIRO, J., REY-MENDEZ, M. y REHBEIN, H. (1999). Challenges in the identification of species of canned fish. *Trends in Food Science & Technology*, **10**: 9-14.

MacCORMICK, C.A., GRIFFIN, H.G., UNDERWOOD, H.M. y GASSON, M.J. (1998). Common DNA sequences with potential for detection of genetically manipulated organisms in food. *Journal of Applied Microbiology*, **84**: 969-980.

MANUSU, H.P. y WRIGLEY, C.W. (1985). Identification of species of fish by gradient-gel electrophoresis. *Australian Veterinary Journal*, **62** (11): 372-376.

MARKWELL, M.A.K., HAAS, S.M., BIEBER, L.L. y TOLBERT, N.E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*, **87**: 206-210.

MARTÍN, R., AZCONA, J.I., CASAS, C., HERNÁNDEZ, P.E. y SANZ, B. (1988). Sandwich ELISA for detection of pig meat in raw beef using antisera to muscle soluble proteins. *Journal of Food Protection*, **51**: 790-794.

MARTÍN, R., WARDALE, R.J., JONES, S.J., HERNÁNDEZ, P.E. y PATTERSON, R.L.S. (1991). Monoclonal antibody sandwich ELISA for the potential detection of chicken meat in mixtures of raw beef and pork. *Meat Science*, **30**: 23-31.

MATSUNAGA, T., CHIKUNI, K., TANABE, R., MUROYA, S., SHIBATA, K., YAMADA, J. y SHINMURA, Y. (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science*, **51**: 143-148.

MAY, B., KRUEGER, C.C. y KINCAID, H.L. (1997). Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **54**: 1542-1547.

- MAYR, B., SCHAFFNER, G., KURZBAUER, R., REIFINGER, M. y SCHELLANDER, K. (1995). Sequence of an exon of tumour suppressor *p53* gene. A comparative study in domestic animals: mutation in a feline solid mammary carcinoma. *British Veterinary Journal*, **151**: 325-329.
- McCONNELL, S.K., O'REILLY, P., HAMILTON, L., WRIGHT, J.M. y BENTZEN, P. (1995). Polymorphic microsatellite loci from Atlantic salmon (*Salmo salar*): genetic differentiation of North American and European populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **52**: 1863-1872.
- McGAULEY, K. y MULLIGAN, T.J. (1995). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial rRNA genes from yellowtail rockfish. *Journal of Fish Biology*, **47**: 744-747.
- McHALE, R.H., STAPLETON, P.M. y BERGQUIST, P.L. (1991) Rapid preparation of blood and tissue samples for polymerase chain reaction. *BioTechniques*, **10**: 20-22.
- McKAY, S.J., DEVLIN, R.H. y SMITH, M.J. (1996). Phylogeny of Pacific salmon and trout based on growth hormone type-2 and mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 3 DNA sequences. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **53**: 1165-1176.
- McVEIGH, H.P., BARTLETT, S.E. y DAVIDSON, W.S. (1991). Polymerase chain reaction/Direct sequence analysis of the cytochrome *b* gene in *Salmo salar*. *Aquaculture*, **95**: 225-233.
- McVEIGH, H.P., HYNES, R.A. y FERGUSON, A. (1995). A mitochondrial DNA differentiation of sympatric populations of brown trout, *Salmo trutta* L., from Lough Melvin, Ireland. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **52**: 1617-1622.
- MERCHANTE, E. y ORTÍN, F.J. (1993). Diferenciación de especie en salmón y trucha ahumada por isoelectroenfoque (IEF) en Phastsystem. *Alimentaria*, **93**: 65-67.

- MEYER, A. (1993). Evolution of mitochondrial DNA in fishes. En *Biochemistry and molecular biology of fishes*. Hochachka and Mommsen (eds.), Elsevier, Amsterdam. pp: 1-38.
- MEYER, R., CANDRIAN, U. y LÜTHY, J. (1993). Tierartbestimmung und Sojanachweis in erhitzten Fleischprodukten mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, **84**: 112-121.
- MEYER, R. (1995). Nachweis gentechnologisch veränderter Pflanzen mittels der Polymerase Kettenreaktion (PCR) am Beispiel der FlavrSavrTM Tomate. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **201**: 583-586.
- MEYER, R., HÖFELEIN, C., LÜTHY, J. y CANDRIAN, U. (1995). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, **6**: 1542-1551.
- MEYER, R. y CANDRIAN, U. (1996). PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, **29**: 1-9.
- MILLER, J.R., CARTWRIGHT, E.M., BROWNLEE, G.G., FEDOROFF, N.V. y BROWN, D.D. (1978). The nucleotide sequence of oocyte 5S DNA in *Xenopus laevis*. II. The GC-rich region. *Cell*, **13**: 717-725.
- MIZUMO, S., TAJIMA, S., SAITOH, Y., MORI, K., ONO, H., TONE, M. y MIHIRA, T. (1995). Variation of repetitive DNA and its phylogenetic relation in Hynobiidae (Caudata). *Journal of Heredity*, **86**: 114-120.
- MJØLNERØD, B., REFSETH, U.H., KARLSEN, E., BALSTAD, T., JAKOBSEN, K.S. y HINDAR, K. (1997). Genetic differences between two wild and one farmed population of Atlantic salmon (*Salmo salar*) revealed by three classes of genetic markers. *Hereditas*, **127**: 239-248.
- MORALES, P., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., MARTÍN, R., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P.E. (1993). Monoclonal antibody detection of porcine meat. *Journal of Food Protection*, **57**: 146-149.

- MORITZ, C., DOWLING, T.E. y BROWN, W.M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**: 269-292.
- MORRIS, D.B. (1993). The isolation and characterization of microsatellites from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). M. Sc. Thesis, Dalhousie University, Halifax, NS.
- MORRIS, D.B., RICHARD, K.R. y WRIGHT, J.M. (1996). Microsatellites from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their use for genetic study of salmonids. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **53**: 120-126.
- MORROW, J.B. (1992). En *Seafood Science and Technology*. E.G. Bligh (ed.), Fishing News Books, UK. pp: 1-11.
- MURAKAMI, M. y FUJITANI, H. (1997a). Polyploid-specific repetitive DNA sequences from triploid gimbuna (Japanese silver crucian carp, *Carassius auratus langsdorfi*). *Genes and Genetic Systems*, **72**: 107-113.
- MURAKAMI, M. y FUJITANI, H. (1997b). A family of highly repetitive DNAs from "gimbuna" (*Carassius auratus langsdorfi*) genome common to *Carassius auratus* populations. *Zool Sci (Tokyo)*, **14**: 763-769.
- MURATA, S., TAKASAKI, N., SAITOH, M. y OKADA, N. (1993). Determination of the phylogenetic relationships among Pacific salmonids by using short, interspersed elements (SINEs) as temporal landmarks of evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**: 6995-6999.
- NAISH, K.A. y SKIBINSKI, D.O.F. (1998). Tetranucleotide microsatellite loci for Indian major carp. *Journal of Fish Biology*, **53**: 886-889.
- NETI, G. y REHBEIN, H. (1988). Fish species identification by fish muscle dry powder as reference material. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **46**: 81-91.
- NIELSEN, J.L., GAN, C. y THOMAS, W.K. (1994). Differences in genetic diversity for mitochondrial DNA between hatchery and wild populations of

Oncorhynchus. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **51**(Suppl.1): 290-297.

OBERST, S., ABBAN, E.K., VILLWOCK, W. Y RENWRANTZ, L. (1993). Tilapia plasma proteins and muscle parvalbumins as markers for species identification. *German Journal of Applied Zoology*, 487-501.

OBERST, S., ABBAN, E.K. y VILLWOCK, W. (1996). Biochemical and instrumental markers for the discrimination of three *Tilapia* species: *T. zillii* Gervais *T. Guineensis* Bleeker and *T. Dageti* Thys v.d. Audenaerde (Pisces: Cichlidae) from West Africa. *Aquaculture Research*, **27**: 235-244.

O'CONNELL, M., DANZMANN, R.G., CORNUET, J-M., WRIGHT, J.M. y FERGUSON, M.M. (1997). Differentiation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) populations in Lake Ontario and the evaluation of the stepwise mutation and infinite allele mutation models using microsatellite variability. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **54**: 1391-1399.

ORDHAL, C.P., EVANS, G.L., COOPER, T.A., KUNZ, G. y PERRIARD, J.C. (1984). Complete cDNA-derived amino acid sequence of chicken muscle creatine kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, **259**: 15224-15227.

O'REILLY, P. y WRIGTH, J.M. (1995). The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. *Journal of Fish Biology*, **47** (A): 29-55.

ORITA, M., IWAHANA, H., KANAZAWA, H., HAYASHI, K. y SEKIYA, T. (1989). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**: 2766-2770.

OSMAN, M.A., ASHOOR, S.H. y MARSH, P.C. (1987). Liquid Chromatographic identification of common fish species. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **70** (4): 618-625.

PAÄBO, S., GIFFORD, J.A. y WILSON, A.C. (1988). Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic Acids Research*, **20**: 9775-9787.

PAÄBO, S., HIGUCHI, R.G. y WILSON, A.C. (1989). Ancient DNA and polymerase chain reaction. The emerging field of molecular archaeology. *Journal of Biological Chemistry*, **264**: 9709-9712.

PADEGIMAS, L., SHUL'GA, O.A. y SKRYABIN, K.G. (1993). Screening of transgenic plants with polymerase chain reaction. *Molecular Biology*, **27**: 583-585.

PALVA, T.K., LEHVÄSLAIHO, H. y PALVA, T. (1989). Identification of anadromous and nonanadromous salmon stocks in Finland by mitochondrial DNA analysis. *Aquaculture*, **81**: 237-244.

PATTERSON, R.L.S. (1985). En: *Biochemical Identification of Meat Species*. Editorial Elsevier, Londres.

PATTON, J.C., GALLAWAY, B.J., FECHHELM, R.G. y CRONIN, M.A. (1997). Genetic variation of microsatellite and mitochondrial DNA markers in broad whitefish (*Coregonus nasus*) in the Colville and Sagavanirktok rivers in northern Alaska. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **54**: 1548-1556.

PAVESI, A., PERCUDANI, R. y CONTERIO, F. (1997). A novel algorithm for the search of 5S rRNA genes in DNA databases: comparison with other methods and identification of new potential 5S rRNA genes. *DNA Sequence-The Journal of Sequencing and Mapping*, **7** (3/4): 165-177.

PELLICIA, F., BARZOTTI, R., VOLPI, E.V., BUCCIARELLI, E. y ROCCHI, A. (1998). Nucleotide sequence and chromosomal mapping of the 5S rDNA repeat of the crustacean *Proasellus coxallis*. *Genome*, **41**: 129-133.

PENDAS, A.M., MORÁN, P. y GARCÍA-VÁZQUEZ, E. (1994). Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenetics and Cell Genetics*, **67**: 31-36.

PENDAS, A.M., MORÁN, P., MARTÍNEZ, J.L. y GARCÍA-VAZQUEZ, E. (1995). Applications of 5S rDNA in Atlantic salmon, brown trout, and in Atlantic salmon × brown trout hybrid identification. *Molecular Ecology*, **4**: 275-276.

PENEDO, J.C., MILLÁN, R., SALAZAR, A., CASTELO, M^a, CARDONA, A. y SAN JUAN, E. (1992). Identificación de especies en pescado fileteado fresco y congelado por técnica de isoelectroenfoque (IEF). *Alimentaria*, **Septiembre**: 55-57.

PEPIN, P. y CARR, S.M. (1993). Morphological, meristic and genetic analysis of stock structure in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the Newfoundland shelf. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **50**: 1924-1933.

PÉREZ, J., MARTÍNEZ, J.L., MORÁN, P., BEALL, E. y GARCÍA-VÁZQUEZ, E. (1999). Identification of Atlantic salmon × brown trout hybrids with a nuclear marker useful for evolutionary studies. *Journal of Fish Biology*, **54**: 460-464.

PERRYMAN, M.B., KERNER, S., BOHLMER, T.J. y ROBERTS, R. (1986). Isolation and sequence analysis of a full length cDNA for human M creatine kinase. *Biochemical and Biophysical research communication*, **140**: 981-989.

PHILLIPS, R.B., MANLEY, S.A. y DANIELS, T.J. (1994). Systematics of the salmonid genus *Salvelinus* inferred from ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **51** (1): 198-204.

PINTO, F.C. (1966). Serological differentiation of cow's, buffalo's, goat's and sheep's milks. *Journal of Dairy Research*, **33**: 129.

POLLARD, T.D. y COOPER, J.A. (1986). Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annual Review of Biochemistry*, **55**: 987-1035.

PUTNEY, S., HERLIHY, W., ROYAL, N., PANG, P., APOSHIAN, H.V., PICKERING, L., BELAGAJE, R., BIEMANN, K., PAGE, D., KUBY, S. y SCHIMMEL, P. (1984). Rabbit muscle creatine phosphokinase. cDNA cloning, primary structure and detection of human homologues. *The Journal of Biological Chemistry*, **259**: 14317-14320.

QUINN, J.S., GUGLICH, E., SEUTIN, G., LAU, R., MARSOLAIS, J., PARNA, L., BOAG, P.T. y WHITE, B.N. (1992). Characterization and

assessment of an avian repetitive DNA sequence as an icterid phylogenetic marker. *Genome*, **35**: 155-162.

QUINTEIRO, J., SOTELO, C.G., REHBEIN, H., PRYDE, S.E., MEDINA, I., PÉREZ-MARTÍN, R.I., REY-MÉNDEZ, M. y MACKIE, I.M. (1998). Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**: 1662-1669.

RAM, J.L., RAM, M.L. y BAIDOUN, F.F. (1996). Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**: 2460-2467.

RAWSON, P.D. y HILBISH, T.J. (1995). Distribution of male and female mtDNA lineages in populations of blue mussels, *Mytilus trossulus* and *M. galloprovincialis*, along the Pacific coast of North America. *Marine Biology*, **124**: 245-250.

REA, S., CHIKUNI, K. y AVELLINI, P. (1996). Possibility of using single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis for discriminating european pig and wild boar meat samples. *Italian Journal of Food Science*, **3**: 211-220.

REAL DECRETO 331/1999, del Ministerio de Relaciones con las Cortes y de la Secretaría del Gobierno, de 26 de febrero, de normalización y tipificación de los productos de la pesca, frescos, refrigerados o cocidos. B.O.E. número 66, de 18 de marzo de 1999.

REAL DECRETO 1.437/1992, del Ministerio de Relaciones con las Cortes y de la Secretaría del Gobierno, de 27 de noviembre, por el que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de los productos pesqueros y de la acuicultura. B.O.E. número 11, de 13 de enero de 1993.

REAL DECRETO 1.334/1999, del Ministerio de Relaciones con las Cortes y de la Secretaría del Gobierno, de 31 de julio, por el que se aprueba la Norma

General de Etiquetado, Presentación y Publicidad de los Productos Alimenticios. B.O.E. número 20, de 24 de agosto de 1999.

REAL DECRETO 1.882/1994, del Ministerio de Relaciones con las Cortes y de la Secretaría del Gobierno, de 16 de septiembre, por el que se establecen las condiciones de sanidad animal aplicables a la puesta en el mercado de animales y productos de la acuicultura. B.O.E. número 249, de 18 de octubre de 1994.

REHBEIN, H., MACKIE, I.M., PRYDE, S., GONZALES-SOTELO, C., PÉREZ-MARTÍN, R., QUINTEIRO, J. y REY-MÉNDEZ, R. (1995). Fish species identification in canned tuna by DNA analysis (PCR-SSCP). *Informationen für die Fischwirtschaft*, **42** (4): 209-212.

REHBEIN, H., KRESS, G. y SCHMIDT, T. (1997). Application of PCR-SSCP to species identification of fishery products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **74**: 35-41.

REHBEIN, H., MACKIE, I.M., PRYDE, S., GONZALES-SOTELO, C., MEDINA, I., PÉREZ-MARTÍN, R., QUINTEIRO, J. y REY-MÉNDEZ, M. (1999a). Fish species identification in canned tuna by PCR-SSCP: validation by a collaborative study and investigation of intra-species variability of the DNA-patterns. *Food Chemistry*, **64**: 263-268.

REHBEIN, H., GONZALES-SOTELO, C., PÉREZ-MARTÍN, R., QUINTEIRO, J., REY-MÉNDEZ, M., PRYDE, S., MACKIE, I.M. y SANTOS, A.T. (1999b). Differentiation of sturgeon caviar by single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **50**: 1-24.

RITTENBURG, J.H. (1990). Fundamentals of Immunoassay. En: Development and Application of Immunoassays for Food Analysis. J.H. Rittenburg (ed.), Elsevier Applied Science, Londres-Nueva York. pp: 29-57.

RITTENBURG, J.H. y GROTHAUS, G.D. (1992). Immunoassays: formats and applications. En: Food Safety and Quality Assurance: Applications of Immunoassay systems. M.R.A. Morgan, C.J. Smith y P.A. Williams (eds.), Elsevier Applied Science Publishers, London. pp: 3-10.

- RODRÍGUEZ, E., MARTÍN, R., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., MORALES, P., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P.E. (1993). Detection of cows' milk in ewes' milk and cheese by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **61**: 175-180.
- ROLLAND, M.P., BITRI, L. y BESAÇON, P. (1993). Polyclonal antibodies with predetermined specificity against bovine α_{s1} -casein: application to the detection of bovine milk in ovine milk and cheese. *Journal of Dairy Research*, **60**: 413-420.
- ROSEL, P.E. y BLOCK, B.A. (1996). Mitochondrial control region variability and global population structure in the swordfish, *Xiphias gladius*. *Marine Biology*, **125**: 11-22.
- ROSSEN, L., NORSKOV, P., HOLMSTROM, K. y RASMUSSEN, O.F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*, **17**: 37-45.
- SAIKI, R.K., SCARF, S. y FALOONE, F. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anaemia. *Science*, **230**: 1350-1353.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. y ERLICH, H.A. (1988). Primed-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 487-491.
- SAJDAK, S.L., REED, K.M. y PHILLIPS, R.B. (1998). Intraindividual and interspecies variation in the 5S rDNA of coregonid fish. *Journal of Molecular Evolution*, **46**: 680-688.
- SAKAMOTO, T., OKAMOTO, N., IKEDA, Y., NAKAMURA, Y. y SATO, T. (1994). Dinucleotide-repeat polymorphism in DNA of rainbow trout and its application in fisheries science. *Journal of Fish Biology*, **44**: 1093-1096.
- SAMARAJEEWA, U., WEI, C.I., HUANG, T.S. y MARSHALL, M.R. (1991). Application of immunoassay in the food industry. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, **29**: 403-434.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. y MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.

SECCHIERO, P., ZELLA, D., CROWLEY, R.W., GALLO, R.C. y LUSSO, P. (1995). Quantitative PCR for human Herpesviruses 6 and 7. *Clinical Microbiology*, **33**: 2124-2130.

SHARPE, A.N. (1994). Developments in rapid methods for detection of agents of foodborne disease. *Food Research International*, **27**: 237-243.

SIMON, M.C., GRAY, D.I. y COOK, N. (1996). DNA extraction and PCR methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon. *Applied Environmental Microbiology*, **Mar**: 822-824.

SIKORSKI, Z.E. (1994). Recursos: Disponibilidades. Valor nutritivo. Ahumado. En *Tecnología de los Productos del Mar*. Editorial Acribia, Zaragoza.

SKERRITT, J.H. y HILL, A.S. (1991). Self-management of dietary compliance in coeliac disease by means of ELISA "home test" to detect gluten. *The Lancet*, **337**: 379-382.

SLADE, R.W., MORITZ, C., HEIDEMAN, A. y HALE, T. (1993). Rapid assessment of single-copy nuclear DNA variation in diverse species. *Molecular Ecology*, **2**: 359-373.

SLATTERY, W.W. y SINCLAIR, A.J. (1983). Differentiation of meat according to species by the electrophoretic separation of muscle lactate dehydrogenase and sterase isoenzymes and isoelectric focusing of soluble muscle proteins. *Australian Veterinary Journal*, **60**: 47-51.

SLETTAN, A.I., OLSAKER, I. y LIC, O. (1993). Isolation and characterization of (GT)_n repetitive sequences from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Animal Genetics*, **24**: 195-197.

SLETTAN, A., OLSAKER, I. y LIE, Ø. (1995a). Atlantic salmon, microsatellites at the SSOSL25, SSOSL85, SSOSL311, SSOSL417 loci. *Animal Genetics*, **26**: 281-282.

- SLETTAN, A., OLSAKER, I. y LIE, Ø. (1995b). A polymorphic dinucleotide repeat microsatellite in Atlantic salmon, *Salmo salar* (SSOSL436). *Animal Genetics*, **26**: 368.
- SLETTAN, A., OLSAKER, I. y LIE, Ø. (1996). Polymorphic Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) microsatellites at the SSOSL438, SSOSL439 and SSOSL444 loci. *Animal Genetics*, **27**: 57-58.
- SLETTAN, A., OLSAKER, I. y LIE, Ø. (1997). Segregation studies and linkage analysis of Atlantic salmon microsatellites using haploid genetics. *Heredity*, **78**: 620-627.
- SOTELO, C.G., PIÑEIRO, C., GALLARDO, J.M. y PÉREZ-MARTÍN, R.I. (1993). Fish species identification in seafood products. *Trends in Food and Technology*, **4**: 395-401.
- SURÍS, J.C. y OTERO, M.S. (1997). Tendencias comerciales en la actividad pesquera. *Papeles de Economía Española*, **71**: 264-266.
- SUZUKI, T. y FURUKOHRI, T. (1994). Evolution of phosphagen kinase. Primary structure of glycocyamine kinase and arginine kinase from invertebrates. *Journal of Molecular Biology*, **237**: 353-357.
- SUZUKI, T., BAN, T. y FURUKOHRI, T. (1997). Evolution of phosphagen kinase V. cDNA-derived amino acid sequences of two molluscan arginine kinases from the chiton *Liolophura japonica* and the turbanshell *Battillus cornutus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1340**: 1-6.
- SUZUKI, T., KAWASAKI, Y., UNEMI, Y., NISHIMURA, Y., SOGA, T., KAMIDOCHI, M., YAZAWA, Y. y FURUKOHRI, T. (1998). *Biochimica et Biophysica Acta*, **1388**: 253-259.
- SWOFFORD, D.L. (1993). PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, version 3.1.1 edition. Illinois Natural History Survey, Champaign.
- TAGGART, J.B., HYNES, R.A., PRODÖHL, P.A. y FERGUSON, A. (1992). A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *Journal of Fish Biology*, **40**: 963-965.

- TAGGART, J.B., VERSPOOR, E., GALVIN, P.T., MORÁN, P. y FERGUSON, A. (1995). A minisatellite DNA marker for discriminating between European and North American Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **52**: 2305-2311.
- TAGLIAVINI, J., HARRISON, I.J. y GANDOLFI, G. (1995). Discrimination between *Anguilla anguilla* and *A. rostrata* by the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Fish Biology*, **47**: 741-743.
- TAKAGI, M. y TANIGUCHI, N. (1995). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of three species of *Anguilla*, *A. japonica*, *A. australis* and *A. bicolor*. *Fish Science*, **61**: 884-885.
- TAYLOR, W.J., PATEL, N.P. y JONES, J.L. (1994a). Antibody-based methods for assessing seafood authenticity. *Food and Agricultural Immunology*, **6**: 305-314.
- TAYLOR, E.B., BEACHAM, T.D. y KAERIYAMA, M. (1994b). Population structure and identification of North Pacific Ocean chum salmon (*Oncorhynchus keta*) revealed by an analysis of minisatellite DNA variation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **51**: 1430-1442.
- TAYLOR, E.B. (1995). Genetic variation at minisatellite DNA loci among North Pacific populations of steelhead and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Heredity*, **86**: 354-363.
- TENNYSON, J.M. (1996). Seaffods. *Journal of AOAC International*, **79**: 232-238.
- TENOVER, F.C. (1988). Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. *Clinical Microbiological Reviews*, **1**: 82-101.
- TESSIER, N., BERNATCHEZ, L., PRESA, P. y ANGERS, B. (1995). Gene diversity analysis of mitochondrial DNA, microsatellites and allozymes in landlocked Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, **47** (A): 156-163.

THOMAS, W.K. y BECKENBACH, A.T. (1989). Variation in salmonid mitochondrial DNA: Evolutionary constraints and mechanisms of substitution. *Journal of Molecular Evolution*, **24**: 218-227.

UNSELD, M., BEYERMANN, B., BRANDT, P. y HIESEL, R. (1995). Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. *PCR Methods and Applications*, **4**: 241-243.

VANDEKERCKHOE, J. y WEBER, K. (1984). Chordate muscle actins differ distinctly from invertebrate muscle actins. *Journal of Molecular Biology*, **179**: 391-413.

VENKITANARAYANAN, K.S., FAUSTMAN, C., CRIVELLO, J.F., KHAN, M.I., HOAGLAND, T.A. y BERRY, B.W. (1997). Rapid estimation of spoilage bacterial load in aerobically stored meat by a quantitative polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*, **82**: 359-364.

VERREZ-BAGNIS, V. y ESCRICHE-ROBERTO, I. (1993). The performance of ELISA and Dot-Blot methods for the detection of crab flesh in heated and sterilized surimi-based products. *Journal of Science and Food Agriculture*, **63**: 445-449.

VIEITES, J. (1994). Oportunidades de crecimiento en el mercado español: los productos de la pesca conservados. En *Anuario Pesquero 94*, Publicaciones Técnicas Alimentarias, S.A. Productos del Mar, Madrid. pp: 29-35.

VILLARREAL-LEVY, G., MA, T.S., KERNER, S.A., ROBERTS, R. y PERRYMAN, B. (1987). Human creatine kinase: isolation and sequence analysis of cDNA clones for the B subunit, development of subunit specific probes and determination of gene copy number. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **144**: 1116-1127.

VIS, M.L., CARR, S.M., BOWERING, W.R. y DAVIDSON W.S. (1997). Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) in the North Atlantic are genetically homogeneous. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **54**: 1813-1821.

VITIC, R. y STROBECK, C. (1996). Mitochondrial DNA analysis of populations of lake trout (*Salvelinus namaycush*) in west-central Canada:

implications for stock identification. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **53**: 1038-1047.

VIZE, P.D. y WELLS, J.R.E. (1987). Isolation and characterization of the porcine growth hormone gene. *Gene*, **55**: 339-344.

VOLGESTEIN, B y KINZLER, K. (1994). X-rays strike p53 again. *Nature*, **370**: 174-175.

VOURINEN, J.A., BOSALY, R.A., REIST, J.D., BERNATCHEZ, L. y DODSON, J.J. (1993). Genetic and morphological differentiation between dwarf and normal size forms of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) in Como lake, Ontario. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **50**: 210-216.

WANG, R.F., CAO, W.W. y CERNIGLIA, C.E. (1997). A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in food. *Journal of Applied Microbiology*, **83**: 727-736.

WARD, R.D. y GREWE, P.M. (1994). Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **4**: 300-325.

WATABE, S., HIRAYAMA, Y., IMAI, J., KIKUCHI, K. y YAMASHITA, M. (1995). Sequences of cDNA clones encoding α -actin of carp and goldfish skeletal muscles. *Fisheries Science*, **61** (6): 998-1003.

WEBER, J.L. y MAY, P.E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, **44**: 388-396.

WELSH, J. y McCLELLAND, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, **18** (24): 7213-7218.

WEST, B.L., BABBITT, P.C., MENDEZ, B. y BAXTER, J.D. (1984). Creatine kinase protein sequence encoded by a cDNA made from *Torpedo californica* electric organ mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **81**: 7007-7011.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. y TINGEY, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18** (22): 6531-6535.

WILSON, I.G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, **63** (10): 3741-3751.

WINTER ϕ , A.K., THOMSEN, P.D. y DAVIES, W. (1990). A comparison of DNA-hybridization, immunodiffusion, countercurrent immunoelectrophoresis and isoelectric focusing for detecting the admixture of pork to beef. *Meat Science*, **27**: 75-85.

WIRGIN, I.I., ONG, T., MACEDA, L., WALDMAN, J.R., MOORE, D. y COURTENAY, S. (1993). Mitochondrial DNA variation in striped bass (*Morone saxatilis*) from canadian rivers. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **50**: 80-87.

WOLCOTT, M.J. (1991). DNA-based rapid methods for the detection of foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, **54**: 387-407.

WOLF, C., RENTSCH, J. y HÜBNER, P. (1999). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**: 1350-1355.

WOTHE, D.D., CHARBONNEAU, H. y SHAPIRO, B.M. (1990). The phosphocreatine shuttle of sea urchin sperm: flagellar creatine kinase resulted from gene triplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**: 5203-5207.

WOYCHIK, R.P., CAMPER, S.A., LYONS, R.H., HOROWITZ, S., GOODWIN, E.C. y ROTTMAN, F.M. (1982). Cloning and nucleotide sequencing of the bovine growth hormone gene. *Nucleic Acids Research*, **10**: 7197-7210.

WRIGHT, J.M. (1993). DNA fingerprinting of fishes. En *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. P.W. Hochachka y T. Mommsen (eds.), Elsevier, Amsterdam. pp: 58-91.

YOUNG, C., BURGHOFF, R.L., KEIM, L.G., MINAK-BERNERO, V., LUTE, J.R. y HINTON, S.M. (1993). Polyvinylpyrrolidone-agarose gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction-amplifiable DNA from soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**: 1972-1974.

YOWELL, K y FLURKEY, W. (1986). Effect of freezing and microwave heating on proteins from codfish fillets: Analysis by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Food Science*, **51**: 508.