

Olive oil DNA extraction and its use in the identification of fraud in monovarietal oil

Òscar Mompó Rosselló, Noelia Puertes Espadas, Elisabet Salcedo, Ernesto Francisco Simó Alfonso
Departamento de química analítica, Universidad de Valencia, 46100-Burjassot, Valencia, Spain Ernesto.Simo@uv.es

RESUMEN:

El ADN es una biomolécula que contiene la información genética usada en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos. Contiene la información necesaria para construir otros componentes de las células como proteínas o RNA. El estudio desarrollado está basado en la extracción de ADN de distintas variedades genéticas de olivas, a partir de la secuencia de la cadena obtenida y utilizando la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), se amplifica un fragmento específico de ésta, con la ayuda de dos cebadores. En un primer paso se han estudiado los fragmentos obtenidos al emplear diferentes cebadores y su posibilidad de utilizarlos como discriminantes de la variedad genética. Posteriormente, se ha estudiado la posibilidad de utilizar mezclas de cebadores para aumentar la discriminación entre variedades genéticas. La identificación de los fragmentos obtenidos se realiza en placa de electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, con el fin de poder cuantificar las mezclas de aceite, este estudio se ha transferido a electroforesis capilar en gel. La ventaja de la electroforesis en placa radica en la posibilidad de realizar un gran número de análisis simultáneamente, pero, tiene la limitación que este estudio se realiza de forma cualitativa.

Palabras clave: Aceite, ADN, Electroforesis, Oliva, PCR, Variedad genética

ABSTRACT:

DNA is a biomolecule containing the genetic instructions used in the development and functioning of all known living organisms. It contains the necessary instructions to build other components of cells such as proteins and RNA molecules. From the chemical point of view, DNA is constituted of series of nucleotides. The study developed is based on the extraction of the DNA of different cultivars of olives. From the sequence of the chain obtained and using PCR (polymerase chain reaction) technique, a specific fragment of the chain is amplified, with the help of two primers. In a first step the fragments obtained when using different primers have been studied, and their possibility to be used as discriminants of the genetic variety. Subsequently, the possibility of using primer mixtures has been studied in order to increase discrimination between genetic varieties. Identification of the fragments obtained is performed on agarose gel plate electrophoresis. Subsequently, in order to be able to quantify oil mixtures, this study has been transferred to gel capillary electrophoresis. The advantage of plate electrophoresis lies in the possibility of performing a large number of analyzes simultaneously, however, it has the limitation that this study is performed in a qualitative way.

Keywords: DNA, Electrophoresis, Genetic Variety, Olive, Oil, PCR.

INTRODUCCIÓN

El aceite de oliva ha sido siempre apreciado por su sabor y sus efectos beneficiosos sobre la salud, siendo un componente principal de la conocida como dieta mediterránea. De entre todas las formas en las que se comercializa, el aceite de oliva es virgen extra el de mayor calidad y por tanto el más caro. Por ello, y con el fin de incrementar beneficios comerciales, puede sufrir adulteraciones con aceites de calidad inferior, o bien los denominados aceites mono varietales pueden ser adulterados conscientemente con aceites de otras variedades genéticas o de forma inconsciente en las almazaras.

Esta adulteraciones, además de un fraude económico, suponen un riesgo para la seguridad alimentaria porque existen aceites de materias primas, como la soja o el sésamo, que tienen un conocido potencial alergénico.

El objetivo de este estudio es el de detectar adulteraciones en aceites de oliva monovarietales mediante el análisis de su ADN. Los resultados del análisis electroforético de los fragmentos obtenidos como resultado de someter el DNA extraído a la técnica PCR, se utilizarán como variables predictoras para el desarrollo de un método discriminatorio que nos permita predecir las variedades genéticas presentes en aceites de consumo. Se ha observado que el uso de diferentes cebadores en una misma muestra así como el uso de un mismo cebador en distintas muestras, nos generan fragmentos distintos, de diferente tamaño.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos, muestras y equipos

Las muestras de olivas y aceites monovarietales fueron donadas por diferentes almazaras y cooperativas, un total de 45 muestras distintas, de diferentes localizaciones de la geografía española y de 19 variedades genéticas diferentes fueron analizadas (**Tabla I**).

El bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), los reactivos de PCR (N555-KIT), la agarosa y el bromuro de etidio fueron comprados en VWR Chemicals (Radnor, PA, USA), los marcadores de pares de bases Marker V y XIV fueron comprados en Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA).

El termociclador utilizado fue un modelo EdvoCycler, de Edvotek, suministrado por VWR Chemicals (Radnor, PA, USA), el equipo de electroforesis capilar fue un Agilent 7100 CE System, de Agilent (Santa Clara, CA, USA), las placas para la electroforesis en gel de agarosa utilizadas han sido el modelo *Wide Mini-Sub Cell GT Cell*, de Bio-Rad (Hércules, CA, USA) y la fuente de alimentación utilizada para aplicar la diferencia de potencial fue un modelo PS3000B de Hoefer (Holliston, MA)

Métodos

Como muestras, se escogieron olivas sin abrasiones o lesiones cutáneas con el fin de evitar posibles ataques de bacterias o de insectos y se trituraron en presencia de nitrógeno líquido. A partir de este polvo de oliva y mediante una serie de extracciones/precipitaciones siguiendo la metodología descrita por Raieta y col. [1] se obtuvieron extractos de ADN concentrado. Éstos extractos fueron sometidos a la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para generar y amplificar fragmentos de ADN característicos de cada variedad y cebador. Las condiciones de PCR seleccionadas fueron 35 ciclos de: 45'' 94°C para la desnaturalización, 54'' 45°C para la alineación y 45'' 72°C para la elongación, finalmente se añadió una etapa de 32' 72°C para que todas las hebras de ADN se unieran a su complementaria.

Todos las disoluciones resultantes de una PCR fueron caracterizadas mediante electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, y con la intención de poder cuantificar los resultados, las muestras amplificadas fueron sometidas a electroforesis capilar, las condiciones de separación se basaron en los estudios de García-Cañas y col. [2], aunque éstas fueron optimizadas mediante el uso de un marcador de pares de bases, siendo las escogidas: inyección hidrodinámica 50 mbar durante 30 s y separación a -14 kV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados PCR y caracterización

Mediante el uso de la técnica PCR se obtuvieron una serie de fragmentos de tamaño determinado, dependiendo de la variedad genética y cebador utilizado, observándose mediante geles en placa de agarosa (**Fig. 1**) la intensidad y distribución de las bandas varía de una muestra a otra, lo que nos permite, mediante esta técnica, conocer de forma semicuantitativa los fragmentos formados, así como la abundancia relativa entre ellos.

Además, se realizó el análisis por electroforesis capilar. Con el fin de conocer el tamaño de los fragmentos obtenidos, el marcador de pares de bases fue inyectado bajo las mismas condiciones de separación que las muestras (**Fig. 2**), con los datos de tiempo de migración obtenidos, se construyó un diagrama de Ferguson (**Fig. 3**). Posteriormente, las muestras fueron inyectadas en el equipo, habiéndose realizado la PCR con distintos cebadores y variedades genéticas, se observó también una distribución de picos distinta en función de cada muestra y cebador usado. Estos electroferogramas (**Fig. 4**) fueron integrados y los fragmentos caracterizados, tanto por su tamaño como por la intensidad de señal analítica generada. Los datos obtenidos permitirán obtener las suficientes variables discriminatorias para construir un método multivariante que nos permita identificar la variedad o variedades genéticas presente en los aceites de uso alimenticio a analizar.

Tablas y figuras

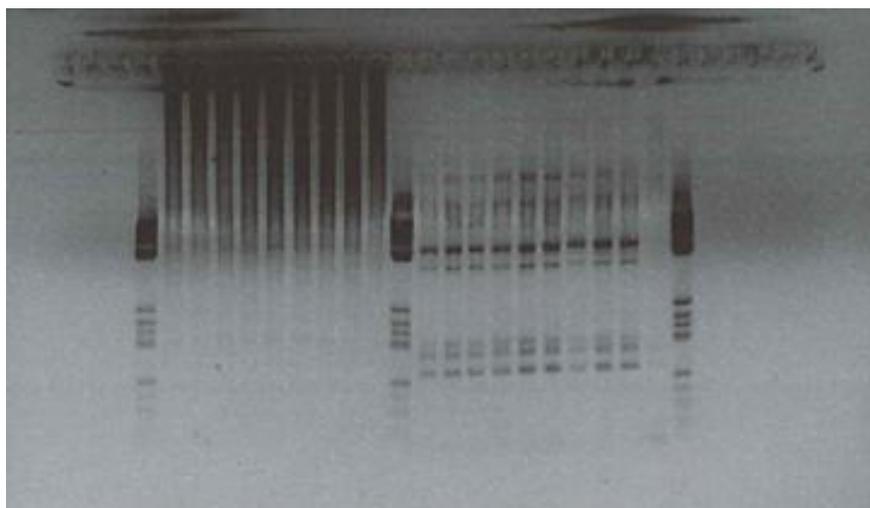


Fig. 1 Gel en placa de agarosa, se puede observar en el carril 1, 10 y 21 el Marker V de Sigma, en los carriles 2-9, resultado de PCR de una muestra sin la secuencia de nucleótidos característica del cebador, en los carriles 11-19, resultados de PCR de una muestra que si contenía la secuencia, en el carril 20 se sembró un blanco de PCR

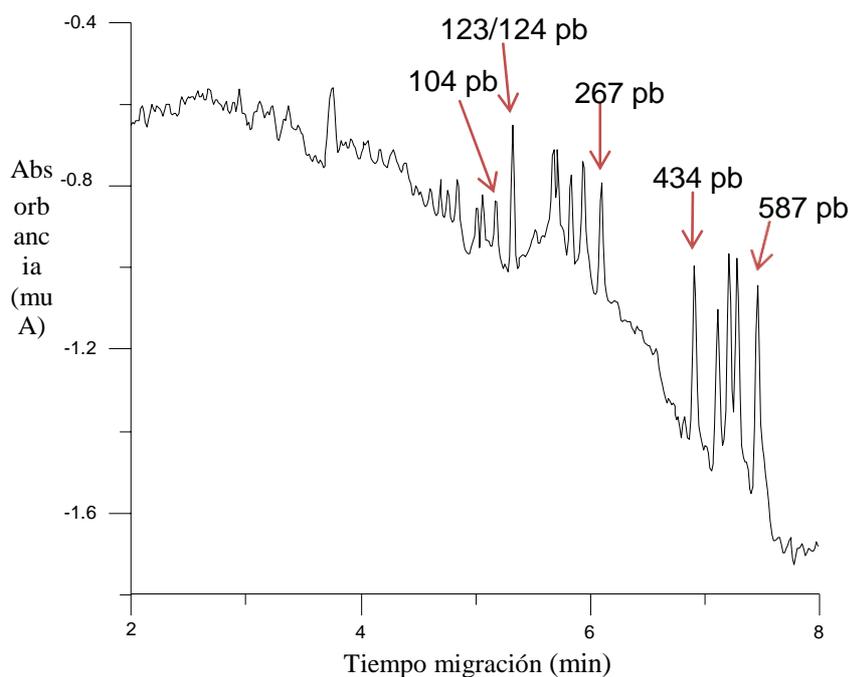


Fig. 2 Electroferograma correspondiente al Marker V de Sigma, inyección hidrodinámica 50 mbar 30s, potencial de separación -14 kV, buffer de separación TBE (89 mM Tris/HCl pH 7.3, 400 mM H₃BO₃, 2 mM EDTA, 4 % HEC).

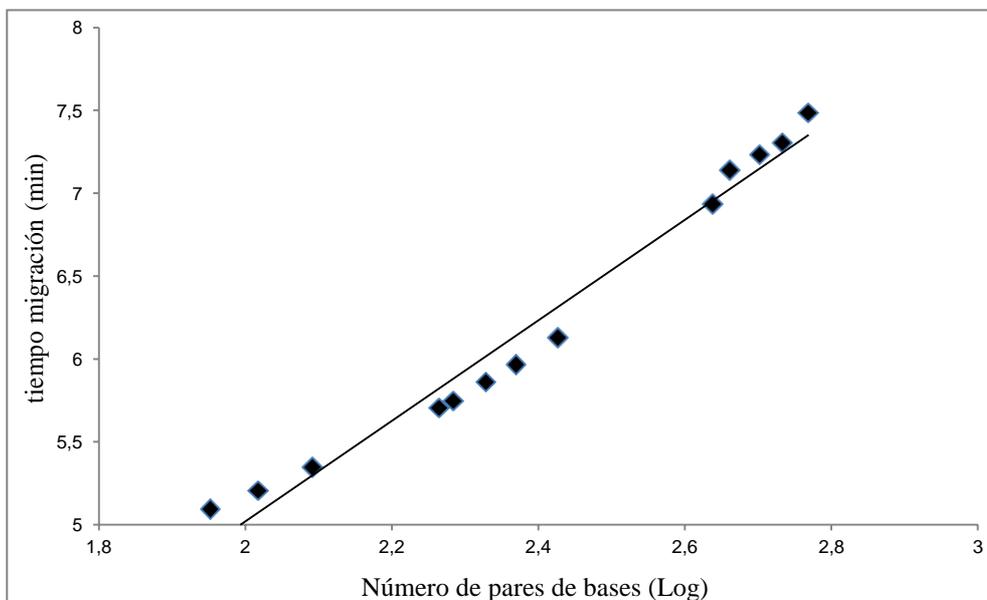


Fig. 3 Diagrama de Ferguson, representación del Log (pb) enfrente del tiempo de migración del patrón de pares de bases nº V de Sigma

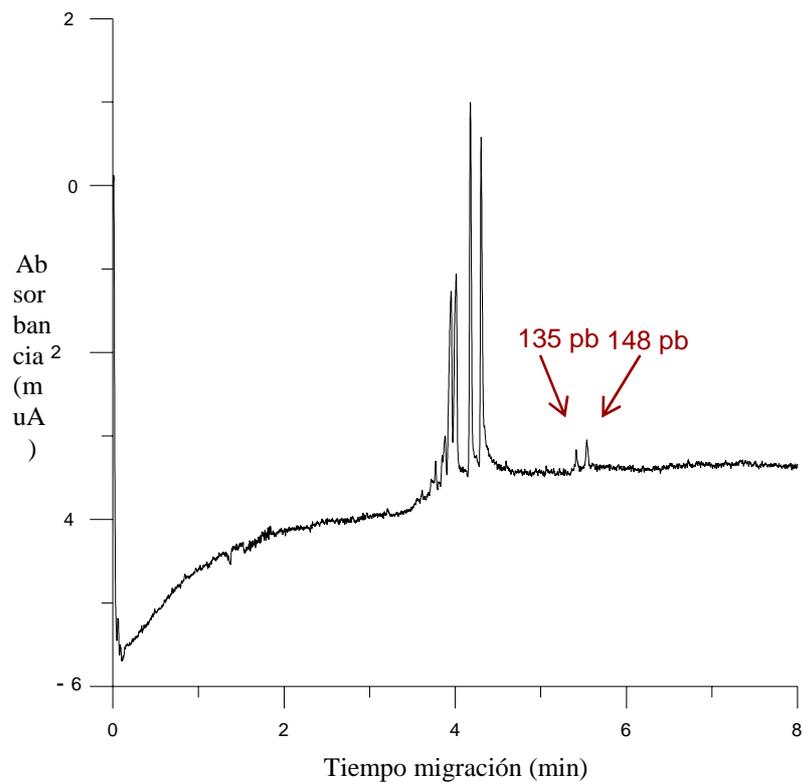


Fig.4 Electrochromatograma perteneciente al producto de PCR de la M7 (Blanqueta) con el cebador UDO 99-035 F/R. Inyección hidrodinámica 50 mbar 30 s, separación -14 kV, buffer de separación TBE (89 mM Tris/HCl pH 7.3, 400 mM H₃BO₃, 2 mM EDTA, 4 % HEC). Tamaño de fragmentos obtenidos por interpolación en el diagrama de Ferguson, los dos primeros dobletes de picos pertenecen a los oligonucleótidos que quedan sin reaccionar en el PCR.

Tabla I. Variedades de oliva analizadas, así como su procedencia.

Nº Muestra	Variedad	Procedencia	Nº Muestra	Variedad	Procedencia	Nº muestra	Variedad	Procedencia
1	Alfalarera	Castellón	16	Cuquello	Cocentaina (Alicante)	31	Picual	Requena (Valencia)
2	Arbequina	Cordoba (Puente Genil)	17	Frantoio	Cordoba (Puente Genil)	32	Picual	Villapalacios (Albacete)
3	Arbequina	Olimendros (Murcia)	18	Gordal	Castellón	33	Picual	Daimiel (Ciudad Real)
4	Arbequina	Cocentaina (Alicante)	19	Grosol	Pobla del duc (Alicante)	34	Picual	Castellón
5	Arbequina	Altura (Castellón)	20	Hojiblanca	Cordoba (Puente Genil)	35	Serrana	Castellón
6	Blanqueta	Pobla del duc (Alicante)	21	Hojiblanca	Aguilar de la Frontera (Cordoba)	36	Serrana	Espadán (Valencia)
7	Blanqueta	Cocentaina (Alicante)	22	Hojiblanca	Olimendros (Murcia)	37	Serrana	Calles (Valencia)
8	Carrasqueña	Castellón	23	Llorona	Castellón	38	Serrana	Requena
9	Cornicabra	Castellón	24	Manzanilla	Castellón	39	Sola	Castellón
10	Cornicabra	Olimendros (Murcia)	25	Manzanilla	Cordoba (Puente Genil)	40	Sikitita	Jaén
11	Cornicabra	Requena (Valencia)	26	Manzanilla	Ahigal (Cáceres)	41	Villalonga	Castellón
12	Cornicabra	Villapalacios (Albacete)	27	Morruda-Regués	Castellón	42	Villalonga	Requena (Valencia)
13	Cornicabra	Daimiel (Ciudad Real)	28	Nana	Castellón	43	Villalonga	Cocentaina (Alicante)
14	Cornicabra	Cocentaina (Alicante)	29	Picual	Puente Genil (Córdoba)	44	Villalonga	Calles (Valencia)
15	Cuquello	Olimendros (Murcia)	30	Picual	Olimendros (Murcia)	45	Villalonga	Pobla del duc (Alicante)

BIBLIOGRAFÍA

- [1] K. Raieta, L. Muccillo & V. Colantuoni. 2015. A novel reliable method of DNA extraction from olive oil suitable for molecular traceability, *Food Chem.* 172, 596-602.
- [2] V. García-Cañas, R. González, A. Cifuentes. 2002. Highly reproducible capillary gel electrophoresis (CGE) of DNA fragments using uncoated columns. Detection of genetically modified maize by PCR-cGE, *J. Sep. Sci.* 25, 577-583