

Licenciatura en Bioquímica



IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES VEGETALES EN EL DULCE
DE MEMBRILLO MEDIANTE ANÁLISIS MOLECULAR

Mailen Arleo

Orientador de tesis: Dr. Claudio Martínez Debat

Sección Bioquímica – Facultad de Ciencias

Junio 2011

Índice

1. Introducción	
1.1 Derecho del consumidor	1
1.1.1 Situación local	2
1.2 Trazabilidad Alimentaria	3
1.2.1 Trazabilidad basada en el ADN	4
1.3 Industrialización del membrillo	5
1.3.1 El membrillo	5
1.3.2 Productos derivados del membrillo	5
1.3.3 El proceso productivo	6
1.4 Detección de especies vegetales en dulce de membrillo	9
1.4.1 Antecedentes	9
1.4.2 Estrategia experimental	9
2. Objetivos Generales	11
3. Objetivos Específicos	11
4. Materiales y Métodos	
4.1 Material de partida	12
4.1.1 Filtrado del dulce	12
4.2 Protocolo de extracción de ADN	13
4.2.1 Método basado en PTB	13
4.2.2 Modificación del método basado en PTB (PTB/macerozima)	13
4.2.3 Método basado en CTAB	14
4.2.4 Modificación del método basado en CTAB (CTAB/PTB)	14
4.2.5 Extracción con kits comerciales	14
4.3 Purificación del ADN	15
4.3.1 Purificación mediante Kits	15
4.3.2 Purificación mediante re-extracción de ADN	15
4.4 Cuantificación del ADN	16
4.5 Diseño de cebadores y amplificación por PCR	16
4.5.1 Ensayo de inhibición	16
4.5.2 Diseño de cebadores y amplificación de una región del gen de la <i>polifenol oxidasa</i>	17
4.5.3 Diseño de cebadores y amplificación de una región del gen de la <i>maturasa-k</i>	17
4.6 Digestión con enzimas de restricción	18
4.6.1 Restricción con <i>ApoI</i>	19
4.6.2 Restricción con <i>EcoRI</i>	19
4.6.3 Restricción con <i>MboI</i>	19
4.7 Clonado, secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas	19
4.7.1 Clonado y secuenciado del producto de PCR con cebadores A1F-A3R	20
4.7.2 Secuenciado del producto de PCR con cebadores C1F-C3R	21
5. Resultados y discusión	
5.1 Extracción, purificación y cuantificación del ADN	21
5.2 Amplificación por PCR y digestión con enzimas de restricción	25
5.2.1 Ensayo de inhibición	25
5.2.2 Diseño de cebadores para la amplificación de una región del gen nuclear <i>ppo</i>	27
5.2.3 Amplificación de una región del gen <i>ppo</i> y digestión con <i>ApoI</i>	29
5.2.4 Diseño de cebadores para la amplificación de tres regiones del gen cloroplástico <i>mat-k</i>	31
5.2.5 Amplificación de una región del gen <i>mat-k</i> y digestión con <i>EcoRI</i>	33
5.2.6 Amplificación de una región del gen <i>mat-k</i> y digestión con <i>MboI</i>	35
5.3 Clonado, secuenciado y análisis de las secuencias obtenidas	37
5.3.1 Clonado del producto de PCR con cebadores A1F-A3R	37
5.3.2 Secuenciado del producto de clonación	39
5.3.3 Secuenciado del producto de PCR con cebadores C1F-C3R	40
5.4 Tabla de resultados	41
6. Conclusiones y Perspectivas	44
7. Referencias bibliográficas	46
8. Anexos	50

1. Introducción

1.1 Derecho del consumidor

Hoy en día, hablar de adulteración o sustitución fraudulenta de los alimentos, es hablar de un problema que ha acompañado a la industrialización de los mismos desde tiempos ancestrales. Garantizar la calidad de un producto es actualmente un requisito importante para el consumidor, que exige autentificar el origen y la calidad del alimento. Se trata de una problemática que no sólo afecta a los consumidores, sino también al sector productivo. La identificación de especies animales o vegetales en los alimentos, por medio de la observación de las características exteriores tales como la forma, tamaño o apariencia, resulta difícil y poco fiable. Más aún, si en su mayoría se encuentran en pequeñas cantidades o procesados. En los alimentos procesados, la sustitución de especies se puede realizar sencillamente, dado que el tejido de especies diferentes puede llegar a ser similar en apariencia, y una vez incorporado a un producto procesado, las pequeñas diferencias se pierden casi por completo. Esta situación hace necesario recurrir al uso de análisis a nivel molecular: Identificación de proteínas o ADN (López *et al.*, 2003).

La identificación de especies animales y vegetales, así como la detección y cuantificación de transgénicos son áreas que han sido definidas como fundamentales para el sector alimentario en la actualidad. Los productos susceptibles de fraudes y que son sometidos frecuentemente a análisis de autenticidad incluyen: identificación de especies de peces en alimentos de pescado procesado (Botti & Giuffra, 2010); identificación de especies animales en productos cárnicos (Kocher *et al.*, 1989; Matsunaga *et al.*, 1999); identificación de especies vegetales en jaleas y yogurts (Ortola Vidal *et al.*, 2007); identificación de especies genéticamente modificadas en alimentos (Luthy, 1999), derivados del maíz (Piñeyro-Nelson *et al.*, 2008), carnes (Germini *et al.*, 2009), cultivos (Pua & Davey, 2007), entre otros.

1.1.1 Situación local

A nivel local, los fraudes alimentarios también son frecuentes. La situación actual manifiesta la existencia de distintas áreas donde sería importante desarrollar estrategias de identificación de especies. Gracias a los contactos con organismos nacionales de contralor (DIGEGRA, DILAVE, INAC, Laboratorio de Bromatología de la IMM, etc) se ha sabido de adulteraciones de dulces de membrillo con manzana, y la de especias con otros vegetales de menor valor, entre otras.

Siguiendo la línea de investigación de la Sección Bioquímica de la Facultad de Ciencias: *“Desarrollo e implementación de herramientas moleculares en el área de la seguridad alimentaria”*, el laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria (LaTraMA) de la Sección, junto a la cooperación del Laboratorio de Bromatología de la Intendencia Municipal de Montevideo (LB-IMM), ha logrado desarrollar estrategias fiables que indican que la mayoría de los alimentos manufacturados a partir de maíz presentan componentes transgénicos, y que muchos chacinados no cumplen con la reglamentación bromatológica. En cuanto a las “especias”, se están aplicando las normas ISO para analizar un extenso número. Los análisis de rutina incluyen humedad, cenizas totales e insolubles en HCl, extracto etéreo fijo y análisis microbiológicos. Existen algunas pautas bioquímicas (cromatografía de gases), así como morfológicas para la identificación de especies en las especias, pero aún así es sumamente difícil, si no imposible, poder identificar una adulteración sobre todo en las presentaciones de producto “molido”. En particular, es preocupante -según lo planteado por parte de las autoridades de contralor locales- las situaciones del orégano, perejil y estragón. (Martinez Debat, 2008).

Es de interés de LaTraMA, afianzar la colaboración ya existente con el LB-IMM. Dicha colaboración está dirigida a ampliar y fortalecer los requerimientos analíticos orientados a proteger y garantizar el consumo de alimentos genuinos e inocuos, verificando así el cumplimiento de los requisitos y especificaciones establecidas en la legislación vigente. Asimismo, estas acciones plantean la posibilidad de generar información para la gestión o el desarrollo de nuevas normativas. Estrechar los vínculos entre un laboratorio de contralor oficial (LB-IMM) y el ámbito académico, permitirá implementar un servicio de certificación de producto a las empresas manufactureras del rubro alimentación e interesadas en la excelencia. Mediante el

papel multiplicador (como Laboratorio de referencia) del LB-IMM hacia la Red de Laboratorios nacionales, los resultados obtenidos beneficiarán a los integrantes de dicha red y a toda la población del país, a través de otros Servicios gubernamentales o privados dedicados al control de alimentos, y a ONGs o grupos de consumidores preocupados en temas de Inocuidad y Seguridad Alimentarias.

1.2 Trazabilidad Alimentaria

La Trazabilidad alimentaria se define como la capacidad de rastrear un alimento desde su origen hasta el consumidor, dando lugar a una identificación fiable de sus ingredientes, un control sanitario, y un seguimiento del alimento durante toda la cadena de producción. La trazabilidad es por tanto una herramienta fundamental al servicio de la calidad alimentaria. Todos aquellos compuestos que forman parte de un alimento serán en consecuencia, susceptibles de ser sometidos a un proceso de trazabilidad mediante diversas técnicas (López *et al.*, 2003).

Se han desarrollado distintas técnicas analíticas y moleculares, para la identificación de los componentes de diversas matrices alimentarias. Las técnicas analíticas más utilizadas incluyen: cromatografías (HPLC; GC, GC-MS, GC-FTIR); espectroscopias (UV, IR), resonancia magnética nuclear (NMR), absorción atómica (AAS/AES, ICP-AES, ICP-MS) y espectrometría de masas (IRMS, GC-IRMS, GC-C-IRMS), entre otras. (Cordella *et al.*, 2002). Sin embargo, muchas de ellas no son aplicables a productos alimentarios procesados. En contraste, las técnicas moleculares basadas en el estudio de ADN y proteínas parecen ser más versátiles, permitiendo la identificación de especies en distintas matrices alimentarias, que incluyen productos crudos, congelados y procesados. Originalmente estos métodos se basaban en el análisis de las proteínas presentes (Marmioli *et al.*, 2003) mediante técnicas electroforéticas y/o inmunológicas (ELISA, *western blot*, entre otros). Sin embargo, éstas resultan difíciles de aplicar para alimentos procesados, debido a que las proteínas mediante los procesos de manufactura tales como la cocción, pueden desnaturalizarse y degradarse, dando lugar a resultados del tipo “falso positivo”.

1.2.1 Trazabilidad basada en el ADN

Actualmente, se han desarrollado ensayos de identificación basados en el ADN, que permiten la identificación y discriminación de especies a nivel específico en una variada gama de alimentos. Estos ensayos presentan varias ventajas con respecto a aquellos basados en la identificación de proteínas. El ADN puede extraerse de la casi totalidad de los tejidos y permanece prácticamente inalterado a través de todo el proceso de manufactura, desde el organismo vivo a la porción de producto que se consume. Aunque el ADN también se degrada durante la esterilización por calor, como en el proceso de enlatado de alimentos, todavía es posible obtener pequeños fragmentos para hacer posible la diferenciación entre especies cercanas.

Por lo anteriormente mencionado, la identificación basada en el ADN constituye la herramienta de elección para realizar la identificación de especies en alimentos. Para la detección de ADN se utilizan técnicas como *Southern Blot* (discontinuada debido a la gran cantidad de ADN necesaria) y PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Esta, es una técnica muy extendida y utilizada en la identificación de especies, tanto animales como vegetales (Lockley & Bardsley, 2000). Permite obtener cantidades suficientes de ADN para el análisis a partir de trazas. Los métodos más modernos analizan ADN de alto número de copias, en particular provenientes de mitocondrias y cloroplastos (animales y vegetales respectivamente). Ambos tipos de secuencias cumplen con las características necesarias para ser utilizados como indicativos de especie, al estar presentes en todas las especies y presentar una gran variabilidad entre las mismas. En la actualidad, se han desarrollado diversos métodos para la identificación de especies animales en alimentos manufacturados derivados de carnes (Partis *et al.*, 2000; Kingombe *et al.*, 2001; Bravi *et al.*, 2004; Mafra *et al.*, 2008). Dichos métodos son rápidos y sensibles y logran determinar de manera específica las especies presentes. A su vez, se ha logrado desarrollar métodos que permiten discriminar entre sustituciones accidentales y fraudulentas. No obstante, existen escasos métodos desarrollados para confirmar la identidad de especies vegetales contenidas en productos procesados y un número menor de métodos para la determinación de sustituciones accidentales o adulteración en los mismos (Di Bernardo *et al.*, 2005; Turci *et al.*, 2010).

La PCR es una técnica rápida, que permite obtener cantidades suficientes de ADN para su posterior análisis a partir de cantidades mínimas del mismo. Sin embargo, es una técnica costosa en infraestructura de partida por el equipamiento y los reactivos que se utilizan. Dada su gran sensibilidad requiere un lugar de trabajo debidamente diseñado para evitar la contaminación por productos previamente amplificados, ya que esto puede provocar la aparición de “falsos positivos” en el resultado final. Entre las medidas a tomar se incluye: tener áreas de trabajo separadas para la manipulación de la pre-PCR y controlar que el ADN de partida esté libre de contaminantes que puedan inhibir la reacción.

Existen tres factores esenciales que determinan el éxito del método de detección de especies mediante PCR. Estos son la *cantidad* de ADN extraído, la *calidad* (la cual se relaciona con el daño que ha sufrido el ADN durante los pasos de procesamiento del alimento) y la *pureza* (la cual refleja la cantidad de contaminantes co-purificados con el ADN) (Griffiths *et al.*, 2002).

1.3 Industrialización del membrillo

1.3.1 El membrillo

El membrillo (*Cydonia oblonga*), pertenece a la familia de las Rosaceas, sub-familia Maloideae, al igual que la pera (*Pyrus spp.*) y la manzana (*Malus spp.*). Es nativo del sur de Europa y Asia y por ser un fruto duro, astringente y agrio, se utiliza para hacer mermelada, dulces o vinos (Laureiro *et al.*, 2009).

Hasta los años 1990, se habían documentado un gran número de variedades de membrillo a través de estudios botánicos y químicos, sin embargo no fue hasta el año 2004, que dichas variedades se clasificaron desde la genética. (Yamamoto *et al.*, 2004).

1.3.2 Productos derivados del membrillo

En nuestro país, a partir del membrillo se produce básicamente: pasta, jalea, mermelada y dulce de corte (*Figura 1*). La *pasta de fruta*, contiene menos azúcar que una mermelada y a su vez mayor contenido de frutas. La *jalea*, es un producto elaborado con el jugo de la fruta cocida y azúcar. La *mermelada*, es obtenida por la cocción y concentración del membrillo al que se adiciona azúcar o edulcorante hasta

obtener una consistencia pastosa. El *dulce de corte*, se obtiene de la cocción de la pasta a la que se le agrega azúcar o edulcorante. Para preparar dulce, mermelada, pasta y jalea de membrillo es necesario: membrillos, azúcar y aditivos.



Figura 1: Productos comerciales derivados del dulce de membrillo. De izquierda a derecha se ilustran las imágenes de la pasta, jalea, mermelada y dulce de corte obtenidos a partir del fruto.

1.3.3 El proceso productivo

El proceso de elaboración del dulce (*Figura 2*) comienza con la recepción, el lavado y la selección de la fruta. Los membrillos frescos se vuelcan en una lavadora que funciona con aspersores de agua a presión y utiliza para el lavado jabones germicidas, o sólo agua. La fruta lavada ingresa a una cinta clasificadora donde es seleccionada para continuar con el proceso productivo. La fruta que no cuenta con la calidad adecuada se desecha, mientras que aquella que sí la tiene, ingresa en un cocinador continuo que funciona a vapor y alcanza una temperatura de 100°C. Luego que el membrillo está cocido, ingresa a una tamizadora que se encarga de separar las semillas y las durezas de la pulpa. El resultado de esta primera parte constituye lo que se denomina pasta de membrillo. La pasta puede tener tres posibles destinos: continuar con el proceso productivo, ser comercializada como pasta, o almacenarse para su utilización posterior. En los últimos dos casos, es necesario el agregado de conservantes (anhídrido sulfuroso o benzoato). Si el proceso continúa para obtener dulce, la pulpa es llevada a una mezcladora donde se agregan los insumos (azúcar, fructosa, conservantes) necesarios de acuerdo a la fórmula de cada industrial. En caso de que vaya a ser almacenada, la pulpa se pasa a una paila de enfriamiento. Cuando la pasta alcanza una temperatura de 40°C, pasa a un sulfitador donde se agrega anhídrido sulfuroso en forma de gas, para su posterior almacenado en silos. Las

empresas pequeñas en general no cuentan con silos, sino que almacenan la producción en tarrinas. En estos casos, el conservante utilizado es el benzoato porque el anhídrido sulfuroso se evapora. Desde los silos, la pulpa es llevada a una mezcladora en donde se determina la cantidad de azúcar a agregar. Lo primero que ingresa a la mezcladora es la pulpa, la cual se calienta durante 10 o 15 minutos a unos 70-80°C para evaporar el anhídrido sulfuroso. Luego del agregado de azúcar, la pasta se cocina a una temperatura de 60-70°C. La cocción en pailas dura aproximadamente 50 minutos lo que es variable en función de la empresa y la tecnología utilizada.

La fórmula para confeccionar el dulce puede ser variable, dependiendo de lo que se quiera lograr con el producto y la rentabilidad económica. El insumo más caro es el azúcar, pero en los valores totales puede ser el membrillo y su procesamiento lo que implique un mayor costo.

En el caso de que el producto sea dietético el azúcar se sustituye por fructosa. El dulce de membrillo es el único que por propiedades naturales se conserva solo cuando tiene más de cierto contenido de azúcar (65°Brix), por lo que las empresas que trabajan por encima de este nivel podrían no agregarle conservantes al dulce.

Una vez confeccionado el dulce, se prosigue con el envasado y etiquetado. Para envasar el dulce se puede utilizar bandejas de plástico, vidrio, lata o poliéster con polietileno. Lo más económico es el poliéster con polietileno que tiene barrera de oxígeno. Como último paso, el dulce ya etiquetado es testeado a través del control de calidad. (Laureiro *et al.*, 2009).

1.4 Detección de especies vegetales en el dulce de membrillo

1.4.1 Antecedentes

Hasta la fecha, no existen a nivel mundial, estudios moleculares de detección de especies vegetales en productos derivados del membrillo. No obstante, se han realizado trabajos de determinación de adulteración en dichos productos, mediante técnicas analíticas como HPLC, HPLC-DAD, HPLC-MS, entre otras. (Andrade *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2000; Nollet, 2004). En estos, se estudian los perfiles característicos de los compuestos fenólicos de las frutas y se comparan con los encontrados en la matriz problema.

En Uruguay, las metodologías moleculares utilizadas para la detección de especies vegetales en el dulce de membrillo, comenzaron a desarrollarse en el año 2008 a raíz del proyecto titulado: *“Donde hubo vida ADN quedan: Desarrollo de un método molecular capaz de detectar otras materias primas en la elaboración del Dulce de Membrillo”*, presentado por el Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria, ante la Comisión Sectorial de Investigación Científica (Proyecto CSIC, 2008). A partir de ese año, el Laboratorio ha ido profundizando en el desarrollo de estas metodologías y ha logrado poner a punto varias de las estrategias diseñadas.

1.4.2 Estrategia experimental

La estrategia experimental en la que se basan los actuales estudios de identificación de especies, se divide en tres etapas fundamentales:

1. En primer lugar, se realiza un trabajo previo al experimental de laboratorio, que implica el *abordaje bio-informático* del problema de Trazabilidad Molecular a resolver, de manera de obtener datos para la realización de un protocolo experimental adecuado. En particular, se analizan las bases de datos del NCBI (*PubMed*, *GenBank*), *scholar.google*, *freepatents online*, entre otras. Cuando el estudio se basa en la identificación de especies determinadas dentro de una matriz alimentaria compleja, pueden darse por lo menos dos escenarios. El primero, es aquel en que se cuenta con antecedentes previos reflejados en artículos científicos y/o patentes publicadas. En este caso, las metodologías publicadas se tratan de adaptar al problema analítico, mediante la infraestructura disponible. El segundo, y que implica un desafío aún

mayor, es aquel en el que no se disponen de antecedentes directos. En este caso, se impone un análisis bioinformático de las secuencias de ADN disponibles en las bases de datos globales, seguido de un trabajo bioinformático de análisis de secuencias, mediante algoritmos de alineamiento (ej. BLAST, Clustal, etc), detección de zonas en el ADN adecuadas para ser amplificadas y el diseño de cebadores.

2. En segundo lugar, se busca *optimizar la extracción de ADN* para cada matriz alimentaria. Este es un paso crucial, pues es sabido de la presencia de inhibidores de la PCR en muchas matrices (Lauri *et al.*, 2008); que el ADN puede encontrarse degradado debido al tratamiento de manufactura del alimento; y que incluso puede estar modificado químicamente, por ejemplo a partir de variantes de la reacción de Maillard (Harrison & Dake, 2005). Este último punto, puede contrarrestarse con la utilización de reactivos específicos tales como el PTB (bromuro de N-fenaciltiazolio) (Di Pinto *et al.*, 2007). Asimismo, en las matrices complejas pueden estar presentes compuestos que interfieran con la purificación del ADN, tales como: grasas, aceites, polisacáridos, etc. Dichos compuestos pueden ser eliminados mediante el tratamiento previo físico o bioquímico de la muestra, utilizando reactivos como el CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) (Doyle & Doyle, 1987).

3. En tercer lugar, se busca optimizar la PCR, RFLP, o cualquier otra estrategia destinada a la *identificación y/o cuantificación de las especies* en estudio dentro de las matrices problema. Actualmente el laboratorio cuenta con un equipo de PCR de punto final con gradientes de temperaturas que permite determinar las condiciones óptimas para cada ensayo en un tiempo mucho más corto que con un aparato de PCR normal, y con un sensible ahorro de insumos y reactivos.

Para el caso concreto de identificación de especies en el dulce de membrillo, no se cuenta con antecedentes de estudios moleculares publicados en artículos científicos, ni se conocen datos completos de las secuencias del ADN del membrillo. Por lo tanto, el análisis bio-informático para este caso, debe consistir en el análisis de las secuencias de ADN disponibles, detección de regiones a ser amplificadas, diseño de cebadores específicos y/o arbitrarios y la elaboración de estrategias de identificación por RFLP (polimorfismos en los fragmentos de restricción). La elección de los cebadores y del tamaño del fragmento amplificado es de gran importancia para el resultado final. El

tamaño del fragmento amplificado debe estar en el rango de 80 a 150 pares de bases de ADN por tratarse de un alimento procesado. El tipo de cebador que se utilice en la PCR dependerá del tipo de identificación que se requiera. Para la identificación de especies muy relacionadas, se deberán utilizar cebadores específicos o cebadores arbitrarios que discriminarán entre las especies tras técnicas de RFLP y/o secuenciación. (López *et al.*, 2003).

Al igual que el diseño de las estrategias de identificación, el protocolo de extracción de ADN a implementar, debe ser bien estudiado ya que es uno de los puntos críticos del análisis. El dulce de membrillo corresponde a una matriz con alto contenido de polisacáridos y que pasó por un complejo proceso de manufactura, por lo que puede contener un ADN muy degradado y/o modificado químicamente y a su vez puede tener compuestos que inhiban la PCR (Weising *et al.*, 2005). Por lo mencionado, el método de extracción de ADN debe incluir la utilización de reactivos capaces de resolver los aspectos mencionados.

2. Objetivos Generales

Como objetivo general, se plantea desarrollar un método de trazabilidad molecular alimentaria basado en el estudio del ADN, que permita la determinación e identificación de las materias primas (y/o fraudes), en un alimento procesado como lo es el dulce de membrillo.

Asimismo, se apunta a resolver problemas que afectan la competitividad de productores nacionales debido a una competencia desleal, y a dotar de herramientas analíticas a los organismos de contralor correspondientes.

3. Objetivos específicos

Se buscará optimizar los métodos de extracción de ADN para este tipo de matriz alimentaria compleja, desarrollar, optimizar y validar los métodos basados en la PCR, PCR-RFLP, o métodos derivados de éstos, destinados a la identificación de las especies en estudio dentro del dulce de membrillo.

4. Materiales y métodos

El método utilizado para la detección e identificación de especies vegetales en el dulce de membrillo, se basa en la extracción de ADN a partir de una muestra problema, su posterior análisis mediante técnicas de PCR, digestión con enzimas de restricción y electroforesis en geles de poliacrilamida. En algunos casos se recurrirá a la utilización de técnicas de clonación y secuenciación. Los perfiles obtenidos para las muestras se comparan con controles positivos de manzana y membrillo.

4.1 Material de partida

Las muestras empleadas para la realización de los estudios, se obtuvieron a partir de dulces de membrillo provenientes del mercado uruguayo (cinco “dulces problema”) y dulces de membrillo proporcionados por la empresa Limay SRL. Dentro de estos últimos, se contó con dulces elaborados exclusivamente con pulpa de membrillo (100% membrillo) y dulces fabricados con pulpa de membrillo y pulpa de manzana (50% membrillo-50% manzana). Para los controles positivos se utilizaron hojas frescas de membrillo y manzana cedidas por DIGEGRA.

4.1.1 Filtrado del dulce

Previamente a la extracción de ADN, los dulces fueron lavados y filtrados en solución, con el fin de eliminar los excedentes de azúcar y obtener una consistencia adecuada para el posterior manejo de la muestra. Para ello, 10 gramos de cada dulce se diluyeron en 40ml de una solución TEN (ver Anexo II), previamente calentada a 60°C. El homogeneizado resultante, se filtró a través de filtro de malla de plástico tipo *Blutex* mediante bomba de vacío.

4.2 Protocolo de extracción de ADN

Las extracciones de ADN de los dulces fueron realizadas, partiendo de 100-200 miligramos del material filtrado, utilizando distintos métodos adaptados a tejidos vegetales. Las hojas frescas de manzana y membrillo utilizadas como controles

positivos, previamente a la extracción de ADN, fueron homogeneizadas con nitrógeno líquido en morteros de cerámica.

Las mesadas, morteros y pipetas utilizadas para la extracción, fueron descontaminadas previamente según el siguiente protocolo: 5 minutos en Hipoclorito de Sodio 10%, 5 minutos en alcohol 70% y un lavado posterior con H₂O miliRO.

4.2.1 Método basado en PTB

En este método descrito por Asif & Cannon en 2005, se utiliza una solución de PTB (bromuro de *N*-fenaciltiazolio) para liberar el ADN de productos derivados de la condensación de azúcares y proteínas como los productos de Maillard.

En el mismo, 100 mg de filtrado del dulce se homogenizan mecánicamente con nitrógeno líquido y se transfieren a un tubo conteniendo EDTA 0,3 M. Luego se agrega Tris-Base 100 mM, pH=8.0 y una solución de PTB 0,1 M (ver Anexo II). A continuación se realiza un paso de desproteización con proteinasa K (3 mg/ml) y se incuba a 65°C durante toda la noche. Posteriormente se agrega un volumen igual de cloroformo-isoamílico (24:1), se invierte el tubo unas 100 veces y se centrifuga a 12000 rpm por 5 minutos. Luego se toman 500 µl aproximados del sobrenadante y se les agrega 2 volúmenes de EtOH absoluto frío más acetato de amonio 2,5 M. Se deja precipitar el ADN por 24 horas a -20°C y a continuación se centrifuga durante 30 minutos a velocidad máxima. Se realiza un lavado con EtOH 70%, se seca a temperatura ambiente y se resuspende en 20 µl de agua miliQ (previamente calentada a 60°C).

4.2.2 Modificación del protocolo PTB (PTB/macerozima)

Este protocolo es similar al de PTB descrito en el apartado 4.2.1, pero con un aporte descrito por Rogstad *et al*, en el año 2001. En este, se hace uso de una pectinasa para separar el ADN de contaminantes polisacáridos remanentes, luego del paso de precipitación del ADN. Con ese fin, seguido al agregado de la solución tampón de lisis y antes de realizar el paso de desproteización, se agrega Macerozima 15% (Yakult pharmaceutical LTD, Japón), y se incuba la mezcla durante 3 horas a 65°C. El protocolo continúa de forma idéntica al detallado en el apartado anterior.

4.2.3 Método basado en CTAB

El método de CTAB descrito por Doyle & Doyle en el año 1987, es el más utilizado cuando se trata de extracciones de ADN de compuestos vegetales con altos contenidos de polisacáridos. Este protocolo, que no se detalla aquí, utiliza dentro de la solución de lisis, el detergente CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) para destruir membranas, desnaturalizar proteínas, y ayudar a disociarlas del ADN.

4.2.4 Modificación del método basado en CTAB (CTAB/PTB)

El método descrito a continuación, corresponde a una modificación del protocolo original de Doyle and Doyle (1987), y fue el que se utilizó para realizar la mayoría de las extracciones del filtrado del dulce de membrillo. Las modificaciones se realizaron en base a lo descrito en el protocolos de Di Bernardo, *et al.*, 2005 y Asif & Cannon, 2005. En ellos se introducen dentro de la solución de lisis, reactivos como el PTB y PVP (polivinil pirrolidona). La PVP generalmente es utilizada para impedir la oxidación del ADN por quinonas generadas a partir de fenoles y polifenoles (Weising *et al.*, 2005).

A 100 mg de filtrado del dulce, se le agrega 1 ml de solución de extracción CTAB/PTB previamente calentado a 65°C (ver Anexo II). Se mezcla y se incuba a 65°C durante 1 hora, agitando cada 10 minutos. Posteriormente se agrega 1 ml de cloroformo-isoamílico (24:1), se invierte el tubo unas 100 veces y se centrifuga a 12000 rpm por 10 minutos. Luego, se toman 500 µl aproximados del sobrenadante, a los cuales se le incorporan 2 volúmenes de EtOH absoluto. La mezcla se invierte y se deja precipitar el ADN a temperatura ambiente por 15 minutos. Seguidamente, se centrifuga a máxima velocidad por 5 minutos, luego se descarta el sobrenadante y se agregan 500 µl de etanol 70% para centrifugar una vez más por 1 minuto a 12000 rpm. Por último, se descarta el sobrenadante, se seca el precipitado, se resuspende en 100 µl de agua miliQ (previamente calentada a 60°C) y se guarda en freezer a -20°C para su posterior utilización.

4.2.5 Extracción con Kits comerciales

Se utilizaron diferentes kits de extracción de ADN especialmente desarrollados para eliminar inhibidores de la PCR presentes en las matrices alimentarias. Algunos de los Kits utilizados fueron:

- *QIAamp DNA Stool Minikit* (QIAGEN, Milano, Italy)

En este protocolo, 200 mg. de muestra son lisados químicamente con una solución tampón proporcionada por el Kit. Los presuntos inhibidores de la PCR son eliminados en un paso posterior mediante el agregado de una pastilla denominada *InhibitEX*. Luego de incubar la mezcla y centrifugarla a máxima velocidad, se procede a un paso de desproteinización del sobrenadante con Proteinasa K. Posteriormente, se agrega otra solución tampón proporcionada por el kit, se incuba, centrifuga y se hace pasar el sobrenadante por una columna tipo filtro (*QIAshredder*). Esta columna fija selectivamente el ADN dejando pasar el resto de los contaminantes. Los contaminantes que quedan fijados débilmente a la columna son eliminados mediante dos pasos de lavado. El ADN es eluído de la columna con agua o buffer salino.

- *Power Soil DNA Isolation Kit Sample* (MO BIO Laboratories)

Este tipo de Kit es utilizado para muestras de suelo con grandes cantidades de ácido húmico, un gran inhibidor de la PCR (no se detalla, más información en www.mobio.com)

4.3 Purificación del ADN

El ADN de algunas de las muestras, extraído a partir de la utilización del protocolo modificado de CTAB (CTAB/PTB), fue posteriormente purificado mediante Kits específicos y mediante una re-extracción con cloroformo-isoamílico, con el fin de obtener una mayor calidad del ADN.

4.3.1 Purificación mediante Kits

Los kits utilizados para la purificación de las muestras fueron los siguientes:

- *Power Clean™ DNA Clean-Up Kit* (MO BIO Laboratories)
- *MinElute Reaction CleanUp Kit* (QIAGEN)

4.3.2 Purificación mediante re- extracción de ADN

La purificación mediante re-extracción, comenzó con el agregado de acetato de amonio (2.5 M) a 100 µl de cada muestra resultante de la extracción de ADN con el

protocolo de CTAB/PTB. Luego de dejar reposar 10 minutos en hielo, se agregó 1 volumen de cloroformo-isoamílico (24:1) y se dejó reposar por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó una centrifugación a velocidad máxima por 20 minutos y se agregó al sobrenadante 2 volúmenes de EtOH 100%. Se dejó precipitar en hielo durante 15 minutos y luego se centrifugó por 5 minutos a velocidad máxima. Se prosiguió a lavar el pellet con EtOH 70%, a secar en secador vacuo-rotatorio (*speed vac*) y a resuspender en 100 µl de H₂O miliQ (previamente calentada a 60°C).

4.4 Cuantificación del ADN

La concentración de ADN extraído de las muestras se realizó mediante lecturas de absorbancia a 260nm específica para ADN, en NANODROP del *Institut Pasteur de Montevideo*. La pureza del ácido nucleico se estimó a partir de la relación de absorbancia a 260nm/280nm.

4.5 Diseño de cebadores y amplificación por PCR

Se elaboraron dos estrategias para la identificación y diferenciación de manzana (*Malus doméstica* y/o *Malus trilobata*), y membrillo (*Cydonia oblonga*), en los dulces en estudio. Ambas estuvieron basadas en la amplificación por PCR de regiones conservadas del ADN de estas especies. Se utilizaron cebadores específicos para distintas regiones del gen de la *polifenol oxidasa* (nuclear) y del gen de la *maturasa k* (cloroplástico). Todas las amplificaciones fueron realizadas por PCR en punto final y todos los cebadores fueron diseñados por nosotros.

Asimismo, se realizaron ensayos previos de inhibición para cada una de las muestras, con el fin de descartar resultados “falsos negativos” producidos por inhibición de la PCR.

4.5.1 Ensayo de inhibición

Para revelar la presencia de inhibidores de la PCR en las muestras a analizar, se monitoreó la amplificación de un Control Interno Positivo (CIP) junto con estas. Como

la amplificación de cualquier molde endógeno puede distorsionar los resultados, se utilizó como CIP un ADN exógeno, que no está presente en la muestra y que amplifica satisfactoriamente utilizando el par de cebadores adecuados. La amplificación del CIP demuestra la ausencia de inhibidores de la PCR en la muestra estudiada (King *et al.*, 2009).

Para este ensayo se seleccionó como CIP una región del gen mitocondrial *citocromo b* de vaca. El ADN exógeno del cual deriva el CIP fue proporcionado por el Dr. Claudio Martínez Debat y corresponde a un ADN genómico extraído de sangre de vaca. Los cebadores utilizados en el ensayo, SIM (5'-GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATC TTGATGAAA-3') y primer B (5'-CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG-3'), amplifican un fragmento de 274 pares de bases en dicha especie. (Matsunaga *et al.*, 1999).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 25 µl, cada tubo conteniendo: 1 U Top Taq ADN polimerasa (Bioron), 2.5 µl Buffer Complete (10x), 0.25 µl dNTPs [25 mM], 1 µl de cada cebador [10 µM], y 100 ng de ADN genómico. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador *Gene Amp 2400 PCR System*. El termociclador fue programado para realizar: 4 minutos de la desnaturalización inicial a 94°C, seguida de 33 ciclos: 30 segundos a 94°C; 30 segundos a 62°C y 30 segundos a 72°C. La extensión final fue realizada a 72°C por 7 minutos.

La visualización de los productos de PCR, se realizó en geles de poliacrilamida 6%, utilizando la técnica de tinción en plata para su revelado (Sanguinetti *et al.*, 1994).

4.5.2 Diseño de cebadores y amplificación de una región del gen de la *polifenol oxidasa*.

Se diseñaron y utilizaron distintos cebadores para amplificar una región del gen de la polifenol oxidasa nuclear en las especies de manzana y membrillo. (Figura 4), (Tabla 4). El diseño de los cebadores se llevó a cabo con el programa *Primer 3 Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). El tamaño de los amplicones y la especie vegetal a amplificar varía según el par de cebadores utilizados. (Tabla 5).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 25 µl, cada tubo conteniendo, 2-5 µl de ADN molde, 1 µl de los cebadores [10 µM], 0.25 µL Top Taq polimerasa (Bioron, equivalente a 1 U), 0.25 µl de solución dNTP's [25 mM], 2.5 µl Buffer Complete (10x). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador

Maxygen Terminal Cycler T1000 (Axygen EE.UU.) El termociclador fue programado para realizar 2 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, seguida de 34 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 1 minuto a 72°C. Por último un ciclo de 10 minutos a 72°C.

La visualización de los productos de PCR, se realizó en geles de poliacrilamida 12%, utilizando la técnica de tinción en plata para su revelado (Sanguinetti *et al.*, 1994).

4.5.3 Diseño de cebadores y amplificación de una región del gen de la *maturasa k*

Se diseñaron y utilizaron distintos cebadores para amplificar tres regiones distintas del gen de la *maturasa k* en las especies de manzana y membrillo (Figuras 6, 7 y 8), (Tabla 6). El diseño de los cebadores se llevó a cabo con el programa *Primer 3 Plus*. El tamaño de los amplicones y la especie vegetal a amplificar varía según el par de cebadores utilizados. (Tabla 7).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 25 µl, cada tubo conteniendo, 2-5 µl de ADN molde, 1 µl de los cebadores [10 µM], 0.25 µl Top Taq polimerasa (Bioron, equivalente a 1 U), 0.25 µl de solución dNTP's [25 mM] y 2.5 µl Buffer Complete (10x) Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador *Maxygen Terminal Cycler T1000* (Axygen EE.UU.) El termociclador fue programado para realizar 2 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, seguida de 34 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C y 1 minuto a 72°C. Por último un ciclo de 10 minutos a 72°C. La visualización de los productos de PCR, se realizó en geles de poliacrilamida 12%, utilizando la técnica de tinción en plata para su revelado (Sanguinetti *et al.*, 1994).

4.6 Digestión con enzimas de restricción

Los productos de PCR resultantes de la amplificación de los fragmentos del gen *ppo* y del gen *mat-k*, fueron digeridos con enzimas de restricción, y los fragmentos fueron resueltos y visualizados por electroforesis en geles de poliacrilamida 12%. En todos los casos, las enzimas de restricción fueron elegidas para digerir únicamente manzana (*Malus domestica* y/o *Malus trilobata*), permitiendo su diferenciación del membrillo (*Cydonia oblonga*).

4.6.1 Restricción con *ApoI*

Los fragmentos resultantes de la amplificación de la región del gen *ppo*, mediante la utilización de los cebadores 1F-4R (176pb), fueron digeridos con la enzima de restricción *ApoI*. Para ello, 10 µl del producto de PCR fueron digeridos utilizando 1 U de *ApoI* (Fermentas), Buffer Tango (10x) (Fermentas), en un volumen final de reacción de 30 µl. La reacción se incubó durante una hora a 37°C.

Tras la digestión del producto de amplificación, se obtienen dos fragmentos de 101 y 75 pares de bases.

4.6.2 Restricción con *EcoRI*

Los fragmentos resultantes de la amplificación de la región A del gen *mat-k*, mediante la utilización de los cebadores A1F-A3R (98pb para manzana y 87pb para membrillo), fueron digeridos con la enzimas de restricción *EcoRI*. Se digirieron 10 µl del producto de PCR utilizando 1 U de *EcoRI* (Fermentas), Buffer *EcoRI* (10x) (Fermentas), en un volumen final de reacción de 20 µl. La reacción se incubó a 37 °C durante una hora.

Tras la digestión del producto de amplificación con la enzima *EcoRI*, se obtienen dos fragmentos de 39 y 58 pares de bases.

4.6.3 Restricción con *MboI*

Los fragmentos resultantes de la amplificación de la región B del gen *mat-k*, mediante la utilización de los cebadores BF-BR (129 pb), fueron digeridos con la enzima de restricción *MboI*. Para ello, 15 µl del producto de PCR fueron digeridos utilizando 1 U de *MboI* (Fermentas), Buffer *MboI* (10x), en un volumen final de reacción de 20 µl. La reacción se incubó durante dos horas a 37°C.

Tras la digestión del producto de amplificación con la enzima *MboI*, se obtienen dos fragmentos de 61 y 68 pares de bases.

4.7 Clonado, secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas

Con el fin de confirmar la identidad de las especies encontradas en los dulces de membrillo tras la utilización de las estrategias diseñadas, se recurrió al uso de técnicas

de clonación y secuenciación. Asimismo, se secuenciaron los productos de PCR de los controles positivos de manzana y membrillo, para probar la correspondencia de las secuencias obtenidas tras el análisis, con las secuencias teóricas encontradas en el NCBI utilizadas para el diseño de las estrategias de identificación de las especies.

4.7.1 Clonado y secuenciado del producto de PCR con cebadores A1F-A3R

Se realizó el clonado de los fragmentos de ADN obtenidos tras la amplificación de la región A del gen *mat-k*, para dos muestras de dulces distintas. Dichas muestras se obtuvieron de la extracción de ADN mediante el protocolo de CTAB/PTB, de un dulce de composición conocida 100% membrillo, y uno problema proveniente del mercado (dulce problema II).

Para realizar el clonado de los fragmentos de ADN obtenidos por PCR, se siguió el protocolo *GeneJetTM PCR cloning Kit* (Fermentas). Los productos de PCR obtenidos mediante la amplificación con los cebadores A1F-A3R, fueron purificados mediante el kit *AXYPrep PCR Clean-Up Kit* AXYGEM (Spin Protocol) y ligados a un vector *pJet1/Blent Cloning vector* (50 ng/ μ l) (Fermentas). La reacción de ligación se realizó utilizando 1-2 μ l de producto de PCR purificado, en un volumen total de 20 μ l.

La transformación de bacterias competentes se realizó mediante shock térmico utilizando 20 μ l de reacción de ligación. Posteriormente, las colonias sembradas y crecidas en placa se picaron y dejaron crecer en un medio de cultivo LB conteniendo ampicilina (100 μ g/ml), durante toda la noche. El ADN plasmídico de las colonias conseguidas, fue obtenido por la técnica de minipreparación plasmídica (las soluciones empleadas se detallan en el Anexo II).

Se realizó un rastreo por PCR, para detectar la presencia del inserto, utilizando los cebadores A1F-A3R y los respectivos al vector pJet (pJetF-pJetR). La visualización de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 12%. A continuación, se eligieron aquellas colonias conteniendo el tamaño adecuado del inserto (181 pares de bases para manzana y 172 pares de bases para membrillo), para ser enviadas al servicio de secuenciación del *Institut Pasteur de Montevideo*.

Las secuencias obtenidas fueron sometidas a un análisis de BLAST en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), restringiendo la búsqueda a especies de plantas con flor.

4.7.2 Secuenciado del producto de PCR con cebadores C1F-C3R

Los productos de PCR obtenidos tras la amplificación de la región C del gen *mat-k* con los cebadores C1F-C3R, sobre los controles positivos de manzana y membrillo, se purificaron y se enviaron a secuenciar al *Institut Pasteur de Montevideo*. La purificación se realizó utilizando el protocolo *PCR Clean-Up Spin Protocol*, del kit *AXYPrep PCR Clean-Up kit* (AXYGEN).

Al igual que para el caso anterior, las secuencias obtenidas fueron sometidas a un análisis de BLAST restringiendo la búsqueda a especies de plantas con flor.

5. Resultados y Discusión

5.1 Extracción, purificación y cuantificación del ADN

Se compararon distintas estrategias de extracción de ADN, todas ellas comúnmente utilizadas para extraer ADN de muestras vegetales; el método de PTB (Asif & Cannon en 2005), una modificación del método basado en PTB, (Rogstad *et al.*, 2001), el método de CTAB (Doyle and Doyle en 1987), una modificación del método basado en CTAB (Di Bernardo, *et al.*, 2005), y dos kits comerciales: *QIAamp DNA Stool Minikit* (QIAGEN, Milano, Italy), y *Power Soil DNA Isolation Kit Sample* (MO BIO Laboratories, Inc). Estos últimos generalmente utilizados para extraer ADN de muestras con altos contenidos de inhibidores de la PCR. A su vez, las cantidades y calidades de los ADN obtenidos mediante las extracciones, fueron comparadas con las conseguidas tras las purificaciones.

En las *Tablas 1, 2 y 3* de este apartado, se presentan los datos de concentración y pureza del ADN de las muestras de dulces y hojas frescas (controles positivos), obtenidos mediante la utilización de los distintos protocolos.

Tabla 1: Datos de cuantificación y pureza de ADN obtenidas mediante espectrofotometría de las extracciones de ADN con los métodos de PTB, PTB/macerozima y el Kit Power Soil (MO BIO Lab.)

METODO									
MUESTRA	PTB			PTB/macerozima			Kit Power Soil DNA isolation		
	Abs260nm	[ADN]ng/μl	Abs 260/280	Abs260nm	[ADN]ng/μl	Abs 260/280	Abs260nm	[ADN]ng/μl	Abs 260/280
D. membrillo comp. conocida	1.469	73.4	6.39	1.272	63.5	7.9	0.288	14.39	0.82
D. membrillo problema	1.314	65.7	4.13	1.102	55.1	7.9	0.247	12.37	0.97
Hojas de manzana (C+Mz)	2.752	137.5	3.38	2.399	119.9	4.01	-	-	-
Hojas de membrillo (C+Mb)	1.775	88.7	5.35	1.55	77.9	3.82	-	-	-

En la *Tabla 1* se establece una comparación entre los tres métodos inicialmente utilizados para la extracción de ADN. Para las muestras de dulces extraídas mediante los protocolos de PTB y PTB/macerozima, se obtuvieron valores de concentración de ADN de 60-70 ng/μl, mientras que para aquellas extraídas mediante el kit comercial *Power Soil DNA Isolation Kit Sample*, se obtuvieron concentraciones del orden de 12-15 ng/μl. A su vez, independientemente del protocolo utilizado, los valores de concentración de ADN obtenidos para los controles positivos fueron mayores a los obtenidos para los dulces; siendo del orden de 80-90 ng/μl para el control de membrillo y 120-140 ng/μl para el control de manzana. Asimismo, se observaron diferencias en los valores de relación Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ nm dependiendo del protocolo utilizado, consiguiéndose valores de relación de 3-7 para los métodos que utilizan PTB y de 0.8-0.9 para el ADN obtenido mediante el kit comercial.

Tabla 2: Datos de cuantificación y pureza de ADN obtenidas mediante espectrofotometría de las extracciones de ADN con los métodos de CTAB, CTAB/PTB y el Kit Stool (QIAGEN).

METODO									
MUESTRA	CTAB			CTAB/PTB			Stool Minikit		
	Abs260nm	[ADN]ng/μl	Abs 260/280	Abs260nm	[ADN]ng/μl	Abs 260/280	Abs260nm	[ADN]ng/μl	Abs 260/280
D. membrillo comp. conocida	0.288	14.39	0.82	0.889	44.4	2.0	0.609	30.47	1.06
D. membrillo problema	0.247	12.37	0.97	1.066	53.3	1.54	1.097	54.8	1.45
Hojas de manzana (C+Mz)	1.448	72.3	1.5	3.412	170.5	2.0	2.099	105	1.32
Hojas de membrillo (C+Mb)	1.616	80.8	1.1	2.406	120.2	1.95	0.874	43.6	1.2

En la *Tabla 2* se comparan los protocolos de extracción que utilizan CTAB con el método de kit comercial *QIAamp DNA Stool Minikit*. En este caso, se observa que mediante el método de extracción de CTAB/PTB y el de kit comercial, se obtuvieron valores de concentración final de ADN mayores a las obtenidas mediante el método de CTAB original de Doyle & Doyle, 1987. Para los dulces analizados, los valores de concentración fueron de alrededor de 12-14 ng/μl para el método original de CTAB, mientras que para los métodos de CTAB/PTB y el *kit Stool* (QIAGEN), los valores resultantes fueron del orden de 30-50 ng/μl. Para los controles positivos, también se obtuvieron valores de concentración de ADN diferentes según el protocolo utilizado. Mediante el protocolo de CTAB original se obtuvieron concentraciones de ADN de 72 ng/μl para el control de manzana y de 80 ng/μl para el control de membrillo; para el protocolo modificado de CTAB (CTAB/PTB), 170 ng/μl para el control de manzana y 120 ng/μl para el de membrillo; y para las extracciones realizadas con el *Kit Stool* (QIAGEN) 105 ng/μl para el control de manzana y 40 ng/μl para el de membrillo.

Las relaciones Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ nm obtenidas mediante los protocolos comparados en este caso, también fueron variadas, observándose valores menores a 1 para el ADN de los dulces obtenidos mediante el protocolo de CTAB, y valores de entre 1 y 2 para el ADN obtenido mediante el protocolo modificado de CTAB/PTB y el kit comercial. En tanto, para los controles positivos, las relaciones difirieron de manera menos significativa, ubicándose entre valores de relación de 1-2 para los tres protocolos.

Tabla 3: Datos de cuantificación y pureza de ADN obtenidas mediante espectrofotometría, de las purificaciones realizadas sobre muestras extraídas con el protocolo de CTAB/PTB.

MUESTRA	METODO								
	Kit Power Clean			Kit MinElute			Re-extracción		
	Abs ₂₆₀ nm	[ADN]ng/μl	Abs _{260/280}	Abs ₂₆₀ nm	[ADN]ng/μl	Abs _{260/280}	Abs ₂₆₀ nm	[ADN]ng/μl	Abs _{260/280}
D. membrillo comp. conocida	0.361	18	1.4	0.149	7.45	1.42	0.859	43	1.6
D. membrillo problema	0.341	17	1.62	0.271	13.56	1.44	0.969	48.3	1.8
Hojas de manzana (C+Mz)	-	-	-	-	-	-	2.468	123.3	2.0
Hojas de membrillo (C+Mb)	-	-	-	-	-	-	2.153	107.6	1.87

En la *Tabla 3* se comparan los tres métodos de purificación de ADN utilizados sobre las muestras de ADN obtenidas a partir del protocolo de extracción de CTAB/PTB.

Para el caso de los dulces analizados, los valores de concentración de ADN obtenidos mediante las purificaciones con los kits comerciales, oscilaron entre 10-20 ng/ μ l, mientras que para la re-extracción con cloroformo los valores obtenidos fueron de 40-50 ng/ μ l. La relación Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ nm, fue similar para los tres métodos de purificación, obteniéndose valores de relación de 1.4-2.

A partir de los resultados obtenidos, se observa que la cantidad y calidad del ADN conseguido difiere según el protocolo y el material de partida utilizado para la extracción. La cantidad varía desde 10 μ g a más de 150 μ g de ADN por gramo de tejido analizado, y en general la calidad se aparta del valor óptimo de pureza para el ADN (relación Abs_{260nm}/Abs_{280nm} de 1.8) (Gallagher & Desjardins, 2001). Estos valores pueden ser explicados debido a algunos procesos que surgen durante el aislamiento y la purificación del ADN: i) degradación parcial o total del ADN por endonucleasas, ii) coprecipitación con polisacáridos viscosos, iii) coaislamiento con ácidos orgánicos solubles, polifenoles, u otros compuestos secundarios. Todos ellos hacen difícil el manejo de la muestra, interfieren con las medidas y pueden inhibir reacciones enzimáticas posteriores. (Turci *et al.*, 2010).

Las diferencias entre los valores obtenidos para cada método descrito, se explican por las diferencias en los pasos de disrupción del tejido, la composición de la solución de lisis y la manera en que el ADN es purificado de los componentes de las células como proteínas, ARN, membranas, polisacáridos y polifenoles. Precisamente, las modificaciones introducidas en el protocolo de CTAB/PTB ayudaron a incrementar la cantidad y la calidad del ADN y a conseguir la amplificabilidad del ADN a través de la reducción de la cantidad de compuestos secundarios inhibidores de la PCR (ver en el apartado siguiente). Entre estas modificaciones se encuentran: un mayor contenido de sales que ayudan a disociar proteínas del ADN y a mantener los polisacáridos en solución durante la precipitación del ADN con etanol; la inclusión de PVP que inhibe las oxidasas intrínsecas que generan compuestos secundarios a partir de fenoles y polifenoles que oxidan el ADN; el aumento del contenido de EDTA para capturar los iones metálicos divalentes necesarios para el funcionamiento de ADNsas (Weising

et al., 2005); y la inclusión de PTB que cliva los enlaces entre las proteínas y los polisacáridos ayudando a liberarlos del ADN (Asif & Cannon, 2005). Estos cambios en la solución de lisis, contribuyeron a elegir a dicho protocolo como el más apropiado para extraer ADN de esta matriz compleja.

La extracción por Kits, en especial por el Kit Stool (QIAGEN), también conlleva buenos resultados y puede ser una buena alternativa para este tipo de matriz complicada, pero tiene la desventaja de ser más costoso.

Las purificaciones realizadas sobre las muestras extraídas con el protocolo de CTAB/PTB, mostraron una disminución en la cantidad de ADN en relación a las extracciones de partida, pero un aumento en su calidad. El protocolo de purificación con mayor relación calidad-cantidad de ADN, corresponde al método de re-extracción con cloroformo-isoamílico.

5.2 Amplificación por PCR y digestión con enzimas de restricción

5.2.1 Ensayo de Inhibición

Luego de realizadas las extracciones de ADN de los dulces mediante los distintos protocolos descritos en el apartado 5.1, se pasó a detectar la inhibición de las muestras sobre la PCR.

La *Figura 3*, corresponde al ensayo de inhibición realizado sobre muestras de siete dulces distintos, extraídas mediante el protocolo de CTAB/PTB y el *Kit Stool* (QIAGEN). Las bandas observadas de aproximadamente 270 pares de bases, corresponden a un fragmento de la región del gen *cytb* de vaca amplificado mediante los cebadores de Matsunaga, *et al*, 1999, que se utilizó como Control Interno Positivo (CIP).

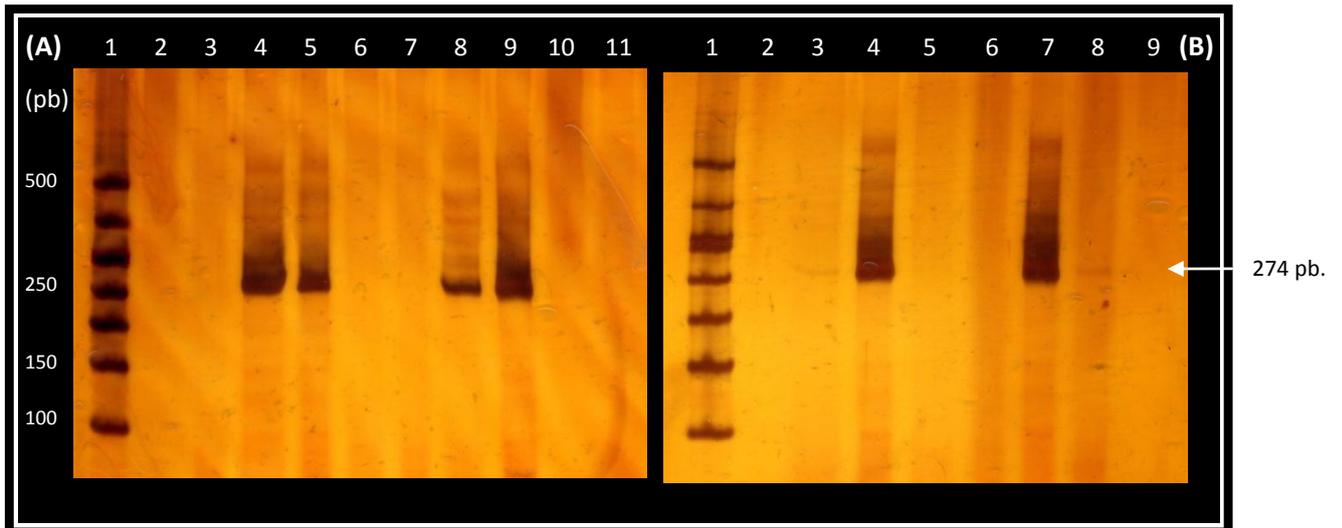


Figura 3: Geles de poliacrilamida 6% de los productos de PCR correspondientes al ensayo de inhibición sobre muestras de dulce extraídas mediante el protocolo CTAB/PTB (gel izquierdo) y el Kit Stool, QIAGEN (gel derecho). **Gel A:** 1-Marcador de peso molecular 100pb (50pb DNA Ladder sbs) 2- (-), 3- Dulce de membrillo de composición conocida (100% membrillo), 4- Dulce de membrillo problema (I), 5- Dulce de membrillo de composición conocida (50% membrillo-50%manzana), 6- Dulce de membrillo problema (II), 7- Dulce de membrillo problema (III), 8- Dulce de membrillo problema (IV), 9- Control positivo (C+), 10- (-), 11- control negativo de PCR. **Gel B:** 1- Marcador de peso molecular 100pb (50pb DNA Ladder sbs) 2- Dulce de membrillo de composición conocida (100% membrillo), 3- Dulce de membrillo problema (I), 4- Dulce de membrillo de composición conocida (50%membrillo-50%manzana) 5- Dulce de membrillo problema (II), 6- Dulce de membrillo problema (III), 7- Control positivo (C+), 8- Dulce de membrillo problema (IV), 9 - control negativo de PCR.

En el gel A se observa, que sólo tres de las seis muestras extraídas a partir del protocolo de CTAB/PTB, permitieron la amplificación del CIP. Dichas muestras corresponden al dulce de composición conocida 50% membrillo-50% manzana y a los dulces problema I y IV. Las restantes no amplificaron el Control Interno Positivo.

Para las muestras extraídas con el *Kit Stool* (QIAGEN), se observa el mismo patrón. Aquellas que permitieron la amplificación del control interno, corresponden al dulce de composición conocida 50% membrillo- 50% manzana y a los dulces problemas I y IV. Sin embargo, los últimos dos permitieron una amplificaron del CIP menos efectiva, revelando una banda tenue en el gel (carril 3 y 8 del gel B).

Paralelamente, se realizaron ensayos de inhibición sobre las muestras extraídas con los demás protocolos descritos y sobre las purificaciones de las muestras extraídas por el método de CTAB/PTB. Ninguna de las muestras extraídas con estos protocolos, lograron amplificar el fragmento del tamaño del CIP (los datos no se muestran).

Del mismo modo, los kits utilizados para las purificaciones (*Power Clean™ DNA Clean-Up Kit*, MO BIO Laboratories; *MinElute Reaction CleanUp Kit* QIAGEN), no lograron mejorar los resultados de inhibición. Ninguna de las muestras purificadas mediante los kits mencionados, lograron amplificar el CIP. No obstante, el método de purificación basado en la re-extracción con cloroformo-isoamílico, logró aumentar el rendimiento en aquellas muestras que amplificaban de manera poco eficaz el CIP y permitió su amplificación en aquellas que no lo hacían (los datos no se muestran).

A partir del ensayo de inhibición fue posible evidenciar la ineficiencia en la amplificabilidad del ADN obtenido mediante los distintos protocolos. Esta ineficiencia hace referencia a la baja integridad del ADN, debido al tratamiento de manufactura del dulce y a la presencia de compuestos secundarios (tales como grasas, aceites, polisacáridos, etc) que inhiben las reacciones enzimáticas (Di Bernardo *et al*, 2005; Turci *et al*, 2010). A pesar de ello, fue posible amplificar en mayor o menor grado, las muestras obtenidas mediante los protocolos de CTAB/PTB y el *Kit Stool* (QIAGEN). Por lo visto, dichos métodos parecen ser los más aptos para extraer ADN libre de impurezas de dulces de membrillo, lo que su vez se apoya en los resultados de concentración y pureza de ADN obtenidos para ambos casos.

Las muestras que obtuvieron un resultado negativo para este ensayo, es decir, que no inhibieron la PCR, continuaron analizándose por PCR y digestión con enzimas de restricción. Para ello se siguió con la estrategia experimental diseñada y detallada en los apartados 4.5 y 4.6.

5.2.2 Diseño de cebadores para la amplificación de una región del gen nuclear *ppo*.

Datos disponibles de las secuencias del gen nuclear de la polifenol oxidasa, para las especies de *Malus domestica* (manzana) y *Cidonya oblonga* (membrillo), fueron obtenidas en las bases de datos del NCBI y alineadas mediante el software *ClustalX*. A partir de este análisis, se pudieron identificar diferencias entre nucleótidos para las dos especies en una región conservada del gen (*Figura 4*). El polimorfismo encontrado para las especies, permitió el diseño de cebadores específicos para el análisis de identificación por PCR y el diseño de estrategias de RFLP con el mismo fin.

Los cebadores diseñados se muestran en la *Tabla 4* y los fragmentos teóricos resultantes de la amplificación, en la *Tabla 5*.

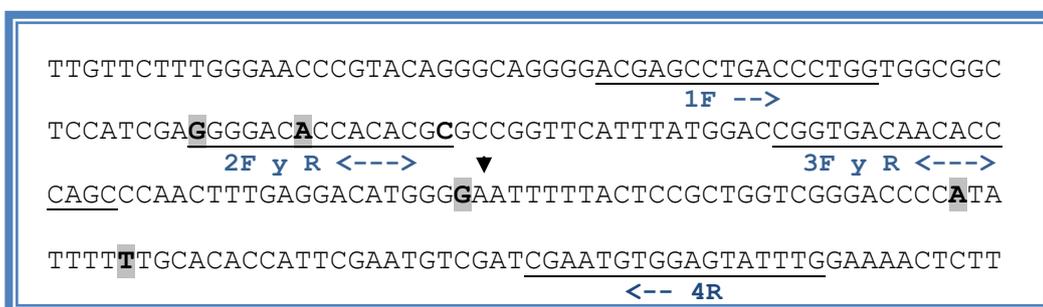


Figura 4: Esquema de la región del gen de la *polifenol oxidasa* de *Malus domestica* (5' - 3'). Se presentan los cebadores diseñados para la amplificación y el sitio de restricción para la enzima Apol. La secuencia de *Cydonia oblonga* (membrillo) para esta región del gen, se diferencia de la de manzana en las bases coloreadas de la figura.

Tabla 4: Cebadores utilizados para las reacciones de PCR de identificación de especies mediante la estrategia *ppo*.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Tm (°C)
PPO 1F	ACGAGCCTGACCCTGG	61.84
PPO 2F	GGGGACACCACACGC	61.63
PPO 2R	GCGTGTGGTGTCCCC	61.63
PPO 3F	CGGTGACAACCCAGC	62.02
PPO 3R	GCTGGGTGTTGTCACCG	62.02
PPO 4R	CCACAATACTCCACATTCG	58

Tabla 5: Tamaño en pares de bases de los fragmentos amplificados en cada especie, según el juego de cebadores utilizado.

Cebadores	Fragmento amplificado (pb)	
	Manzana	Membrillo
1F - 2R	46	-
1F - 3R	81	81
1F - 4R	176	176
2F - 3R	46	-
2F - 4R	145	-
3F - 4R	112	112

Se han realizado diversos trabajos que apuntan al estudio filogenéticos de especies vegetales, mediante la utilización de marcadores moleculares. (Yamamoto *et al.*, 2004; Chase *et al.*, 2005; Potter *et al.*, 2007). Los genes más comúnmente utilizados como marcadores son: *rbcL*, *atpB*, *ndhF*, *trnL*, *trn-F* de origen cloroplástico y *18S*, *ITS*, *pgip*, *ppo* de origen nuclear, entre otros. No obstante, muchos de estos genes no pueden ser incluidos en los estudios de identificación de especies, debido a que sus secuencias se encuentran muy conservadas, haciendo difícil la determinación de polimorfismos entre las especies a estudiar.

Como se comentó anteriormente, en nuestro caso fue posible la identificación de polimorfismos entre las especies de manzana y membrillo para el gen de la *polifenol oxidasa* nuclear, lo que permitió el diseño de distintas estrategias de identificación para la matriz problema.

5.2.3 Amplificación de una región del gen *ppo* y digestión con *ApoI*

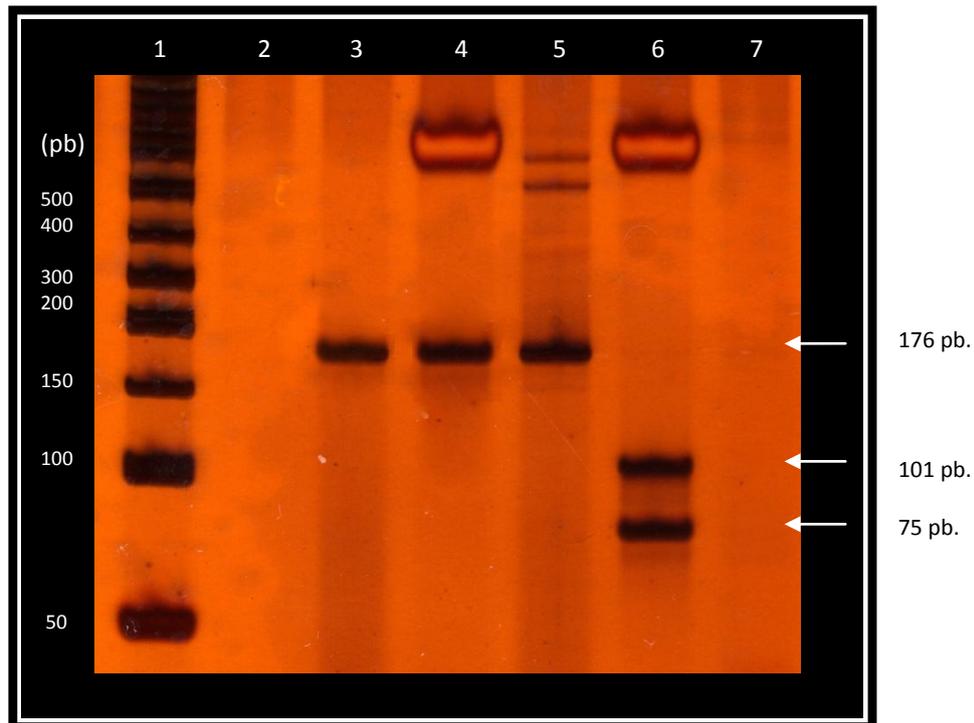


Figura 5: Gel de poliácridamida 12% correspondiente al producto de PCR y digestión con *ApoI* de los fragmentos amplificados con los cebadores *ppo 1F-4R* de los controles positivos de membrillo y manzana. El fragmento amplificado en membrillo posee el mismo tamaño que el amplificado en manzana: 176pb. La digestión con *ApoI* es específica para manzana y genera dos productos de corte de 101 y 75pb. **Carriles:** 1-Marcador de peso molecular 50pb, 2- (-), 3- Control de membrillo sin digerir, 4- Control de membrillo digerido, 5- Control de manzana sin digerir, 6- Control de manzana digerido, 7- Control negativo de PCR.

La *Figura 5* muestra los productos de PCR obtenidos para los controles positivos de membrillo y manzana tras la amplificación de la región del gen nuclear de la *polifenol oxidasa* con los cebadores 1F-4R. De la misma forma, se muestra la digestión de dichos fragmentos amplificados, con la enzima de restricción *ApoI*.

A partir de la figura, se observa que tanto el control positivo de membrillo como el de manzana, amplificaron el fragmento esperado de 176 pares de bases (carriles 3 y 5 respectivamente). En el carril 4, se sembró la digestión del producto de amplificación para el control de membrillo. Para este caso, se observa una banda de igual peso molecular a la sembrada en el carril 3, correspondiente al producto de amplificación de dicho control. El carril 5 muestra el producto de amplificación para el control positivo de manzana. Se observa que desaparece la banda de mayor peso molecular de 176 pares de bases (correspondiente al producto de amplificación), pero aparecen dos de menor tamaño, que concuerdan con el producto de la digestión para la especie de manzana: 101 y 75 pares de bases.

Paralelamente a la amplificación de los controles con el juego de cebadores 1F-4R, se realizaron las amplificaciones de los controles, con los restantes juegos de cebadores diseñados (1F-2R, 1F-3R, 2F-3R, 2F-4R y 3F-4R). En todos los casos, los resultados fueron los esperados. Los cebadores 1F-2R, 2F-3R y 2F-4R, diseñados para amplificar específicamente manzana, lograron levantar únicamente la banda correspondiente en el control positivo de manzana. El juego de cebadores 3F-4R, al igual que el 1F-4R que se muestra aquí, logró amplificar un fragmento de igual tamaño en los controles de manzana y membrillo, que se diferenciaron a continuación tras el corte con la enzima *ApoI*, específica para manzana (estos datos no se muestran).

A partir de los datos obtenidos, se puede señalar que la estrategia de identificación de especies utilizando como marcador el gen de la *polifenol oxidasa*, funciona correctamente para los controles positivos. Sin embargo, resultó imposible la amplificación de cualquiera de los fragmentos correspondientes, sobre los dulces analizados (estos datos no se muestran). Esto podría deberse a la baja cantidad de ADN disponible para amplificar, probablemente relacionada con la degradación del ADN y la modificación química del mismo, como resultado del proceso industrial y/o como resultado de la oxidación mediante compuestos secundarios presentes en la

muestra (Di Bernardo *et al.*, 2005). Del mismo modo, la escasa cantidad de ADN disponible para amplificar surge del bajo número de copias obtenido tras la extracción de ADN, por tratarse de un gen nuclear con una sola copia por célula.

5.2.4 Diseño de cebadores para la amplificación de tres regiones del gen cloroplástico *mat-k*.

Al igual que para el gen de la *polifenol oxidasa*, se encontraron secuencias del gen cloroplástico de la *maturasa-K*, para las especies de *Malus domestica* y *trilobata* (manzana) y *Cydonia oblonga* (membrillo), en las bases de datos del NCBI. Dichas secuencias fueron alineadas mediante el software *ClustalX*, identificándose tres regiones conservadas con polimorfismos para las dos especies (*Figuras 6, 7 y 8*). El polimorfismo encontrado para las especies, permitió el diseño de cebadores específicos para el análisis de identificación por PCR y el diseño de estrategias de RFLP con el mismo fin. Los cebadores diseñados se muestran en la *Tabla 6* y los fragmentos teóricos resultantes de la amplificación para cada caso, en la *Tabla 7*.



Figura 6: Esquema de la región A del gen de la *maturasa-k* de *Malus trilobata* (5' – 3'). Se presentan los cebadores diseñados para la amplificación y el sitio de restricción para la enzima *EcoRI*. La secuencia de *Cydonia oblonga* para esta región del gen, se diferencia de la de manzana por un *gap* de 9 pares de bases señalado en color en la figura.

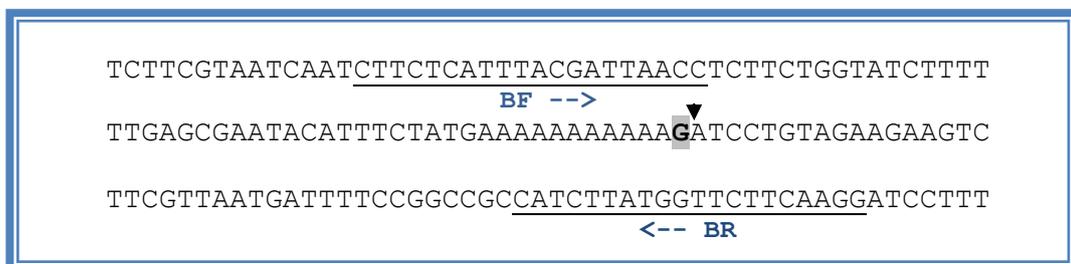


Figura 7: Esquema de la región B del gen de la *maturasa-k* de *Malus domestica* (5' - 3'). Se presentan los cebadores diseñados para la amplificación y el sitio de restricción para la enzima *MboI*. La secuencia de *Cydonia oblonga* para esta región del gen, se diferencia de la de manzana por una base en el sitio de corte de la enzima, especificada en color en la figura.

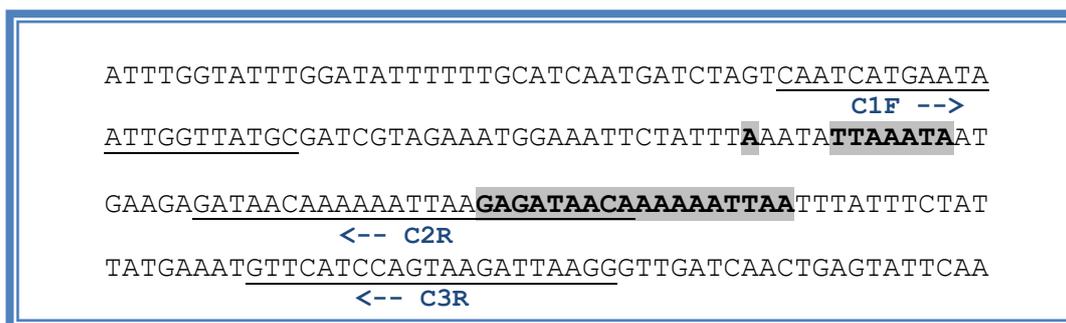


Figura 8: Esquema de la región C del gen de la *maturasa-k* de *Malus domestica* (5' - 3'). Se presentan los distintos cebadores diseñados para la amplificación. La secuencia de *Cydonia oblonga* para esta región del gen, se diferencia de la de manzana por dos *gaps* de 7 y 18 pares de bases, coloreados en la figura.

Tabla 6: Cebadores utilizados para las reacciones de PCR de identificación de especies mediante la estrategia de Mat-k

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Tm (°C)
Mat-KA 1F	TCTTACCGAATAGGTCCAAAAC	56.5
Mat-KA 2F	ATTGTTTGAATCCTTGTCGTGTA	53.5
Mat-KA 3R	GGCTCTACCCATTTATCACTC	58.4
Mat-KB F	CTTCTATTTACGATTAACC	51.2
Mat-KB R	CCTTGAAGAACCATAAGATG	53.2
Mat-KC 1F	CAATCATGAATAATTGGTTATGC	53.5
Mat-KC 2R	TGTTATCTCTTAATTTTTTGTATC	51.5
Mat-KC 3R	CCTAATCTTACTGGATGAAC	54.0

Tabla 7: Tamaño en pares de bases de los fragmentos amplificados en cada especie, según el juego de cebadores utilizado

Cebadores	Fragmento amplificado (pb)	
	Manzana	Membrillo
A1F - A3R	97	88
A2F - A3R	66	-
BF - BR	129	129
C1F - C2R	92	-
C1F- C3R	147	115

5.2.5 Amplificación de una región del gen *mat-k* y digestión con *EcoRI*.

La *Figura 9*, ilustra el resultado de la PCR obtenidas a partir de la amplificación de la región A del gen *mat-k* con los cebadores A1F-A3R y la respectiva digestión con *EcoRI*. En los carriles 9 y 11 se sembraron los productos de amplificación de los controles positivos de manzana y de membrillo. Para ambos controles se observa el fragmento amplificado del tamaño esperado: 97 pares de bases para manzana y 88 pares de bases para membrillo. El carril 8 corresponde a la digestión del control de manzana con la enzima *EcoRI*. En este caso, se observan dos bandas de tamaño inferior a 97 pares de bases, que se corresponden con los fragmentos producidos tras la digestión: 39 y 58 pares de bases.

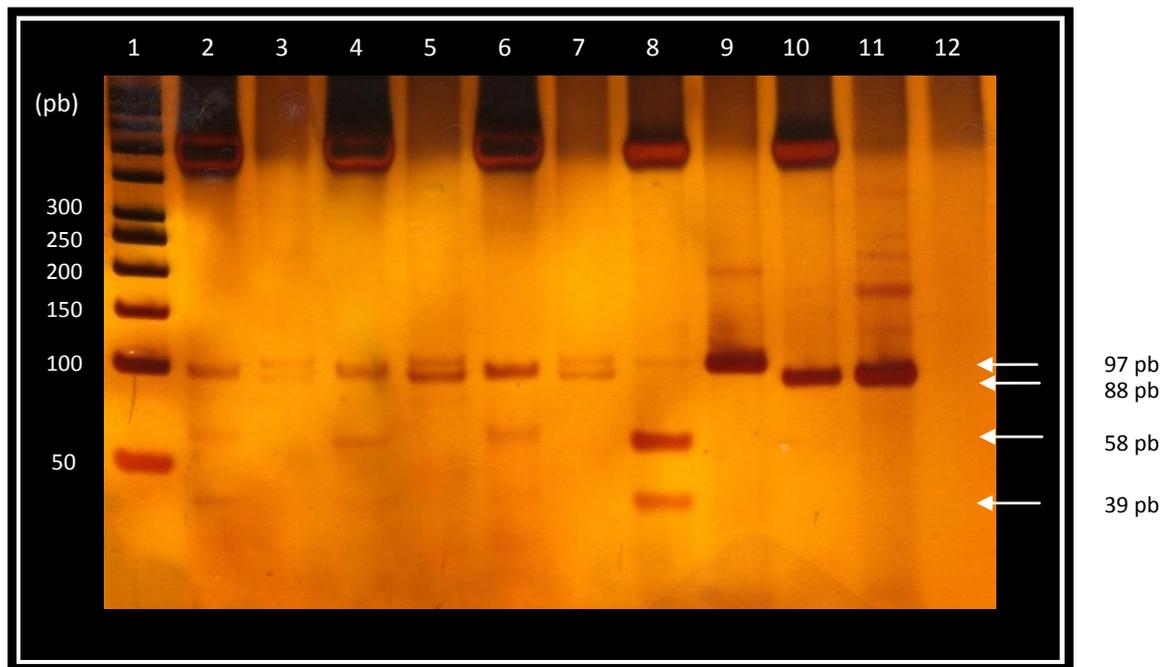


Figura 9: Gel de poliacrilamida 12% correspondiente al producto de PCR y digestión con *EcoRI* de los fragmentos amplificados con los cebadores *matk* A1F-A3R. El fragmento amplificado en membrillo posee 88pb, mientras que el amplificado en manzana posee 97pb. La digestión con *EcoRI* es específica para manzana y genera dos productos de corte de 58 y 39pb. **Carriles:** 1-Marcador de peso molecular 50pb, 2- Dulce de membrillo de composición conocida (50% Mb-50% Mz) digerido, 3-D. de membrillo (50% Mb-50% Mz) sin digerir, 4- D. de membrillo problema (I) digerido, 5- D. de membrillo problema (I) sin digerir, 6- D. de membrillo problema (IV) digerido, 7- D. de membrillo problema (IV) sin digerir, 8- Control+ de manzana digerido, 9- Control+ de manzana sin digerir, 10- Control+ de membrillo digerido, 11- Control+ de membrillo sin digerir, 12- Control negativo de PCR sin digerir.

En el carril 10 donde se sembró la digestión del control de membrillo, se observa la presencia de una banda de igual tamaño a la resultante de la amplificación (aproximadamente 88 pares de bases). Para este caso no se observaron productos de digestión. Esto era de esperarse ya que existe un *gap* en la secuencia de membrillo para la región del gen amplificada, en donde se encuentra el sitio de corte para la enzima *EcoRI* (ver figura 6 del apartado 5.2.4)

En los carriles 3, 5 y 7, se sembraron los productos de amplificación del ADN de tres muestras de dulce distintas, correspondientes a: dulce de membrillo de composición conocida (50% membrillo-50% manzana) y dulces de membrillo problema I y IV. En los tres casos fue posible apreciar la presencia de dos bandas de alrededor de 100 y 90 pares de bases. Dichas bandas parecen tener el mismo tamaño que las obtenidas para los controles positivos de manzana y membrillo. En los carriles 2, 4 y 6, se sembraron los productos de digestión de los fragmentos amplificados para estos dulces. Para las tres digestiones se observa la presencia de tres bandas de distinto tamaño e intensidad. La banda de mayor tamaño e intensidad, corresponde al fragmento de menor tamaño observado en las amplificaciones (88 pares de bases). Puede apreciarse que la banda de mayor tamaño presente en las amplificaciones (97 pares de bases), no se observa luego de la digestión. Sin embargo, aparecen dos nuevas bandas de menor tamaño e intensidad, que se corresponderían con las observadas para el producto de digestión del control de manzana (58 y 39 pares de bases).

De la figura se desprende, que los fragmentos obtenidos tras la amplificación y digestión de las muestras analizadas, se corresponden con los de los controles positivos de membrillo y manzana, indicando que ambas especies podrían estar presentes en los dulces. Asimismo, en la figura es posible apreciar una diferencia entre las intensidades de las bandas para las amplificaciones de los controles positivos y las muestras de dulce, aunque para todos los casos se sembró la misma cantidad del producto de PCR (5 μ l). La menor intensidad de las bandas para los dulces, podría explicarse por la escasa cantidad y calidad del molde de ADN utilizado para la realización de la PCR.

A diferencia de los que resultó para la estrategia de la amplificación del gen de la *polifenol oxidasa*, en este caso fue posible la amplificación del ADN de las muestras de los dulces. Esta diferencia parece residir en la naturaleza del ADN a ser amplificado. Es decir, para este tipo de análisis, las estrategias apuntadas a la amplificación de genes cloroplásticos, parecen conferir ventajas sobre aquellas apuntadas a amplificar genes nucleares (López *et al.*, 2003). El ADN de los cloroplastos es más abundante en las preparaciones de ADN en comparación con el ADN nuclear, tiene un tamaño pequeño lo que lo hace menos susceptible a degradación, y existe en mayor cantidad de copias por célula.

Para poder confirmar las especies en cuestión se prosiguió con el clonado y secuenciación de estos dulces, como se describe en el apartado 5.3.

5.2.6 Amplificación de una región del gen *mat-k* y digestión con *Mbol*

La *Figura 10*, corresponde al gel de electroforesis en poliacrilamida 12%, de los productos de PCR obtenidos a partir de la amplificación de la región B del gen *mat-k* con los cebadores BF-BR y la respectiva digestión con *Mbol*.

En los carriles 12 y 14 se sembraron los productos de amplificación de los controles positivos de manzana y membrillo respectivamente. En ambos casos se observa la banda esperada de 129 pares de bases para ambas especies. El carril 15 corresponde al producto de digestión del ADN amplificado para el control positivo de manzana. Para este caso, se observa la presencia de dos bandas de bajo peso molecular que surgen de la digestión del fragmento de 129 pares de bases. Dichos fragmentos corresponden a los productos de digestión esperados de 61 y 68 pares de bases para la especie de manzana. Para el caso del control positivo de membrillo, no se observan productos de digestión ya que el fragmento amplificado no posee un sitio de restricción para la enzima *Mbol*. Se observa entonces, la misma banda de 129 pares de bases correspondientes al fragmento amplificado con los cebadores BF-BR.

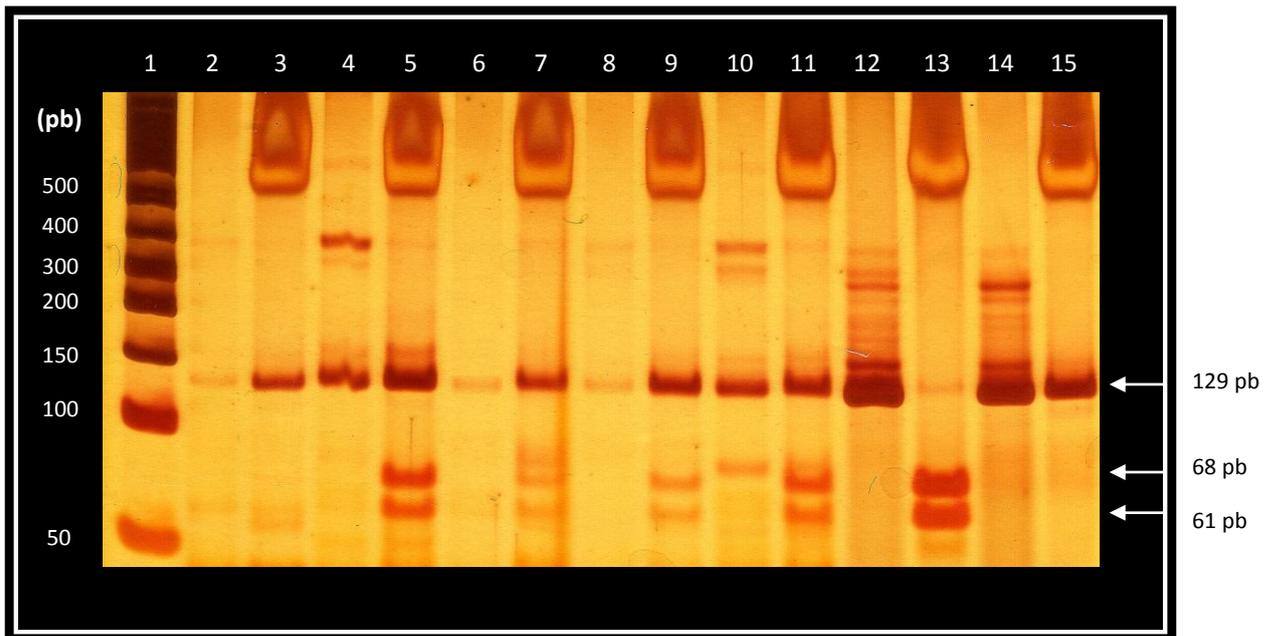


Figura 10: Resultado de PCR y digestión con *Mbol* del fragmento amplificado con los cebadores *mat-k* BF-BR. Tanto para membrillo como para manzana el fragmento amplificado corresponde a 129pb. La digestión con *Mbol* es específica para manzana y genera dos productos de corte de 61 y 68pb. **Carriles:** 1-Marcador de peso molecular 50pb, 2- Dulce de membrillo de composición conocida 100%, 3- Dulce de membrillo de composición conocida 100% digerido, 4- D. de membrillo (50%-50%) sin digerir, 5- D. de membrillo (50%-50%) digerido, 6- D. de membrillo problema (I) sin digerir, 7- D. de membrillo problema (I) digerido, 8- D. de membrillo problema (IV) sin digerir, 9- D. de membrillo problema (IV) digerido, 10- D. de membrillo problema (V) sin digerir, 11- D. de membrillo problema (V) digerido, 12- Control+ de manzana sin digerir, 13- Control+ de manzana digerido, 14- Control+ de membrillo sin digerir, 15- Control+ de membrillo digerido.

En los carriles 2-11 se sembraron los productos de amplificación del ADN de las muestras de dulce de membrillo y las respectivas digestiones con *Mbol*. Para este ensayo se incluyó otra muestra problema (dulce de membrillo problema V), también obtenida mediante el protocolo de CTAB/PTB y con un resultado negativo de inhibición de la PCR. En todas las amplificaciones se observa una única banda de alrededor de 129 pares de bases (igual a la resultante para los controles positivos). Sin embargo, no en todos los carriles correspondientes a las digestiones se observan bandas de menor tamaño molecular, producto del corte con la enzima. En el carril 1, en donde se sembró la digestión del fragmento amplificado para un dulce de membrillo de composición conocida 100% membrillo, se observa solamente la banda de 129 pb. En cambio, en los carriles que corresponden a la digestión de los dulces problemas (I, IV y V), al igual que en el de composición conocida 50%membrillo-50%manzana, se observa

la banda de 129 pb y además dos bandas de menor peso molecular, que corresponderían al producto de digestión del fragmento amplificado para la especie de manzana. Esto puede sugerirse debido a que ambos fragmentos tienen tamaños similares al de los productos de digestión para el control positivo de manzana (61 y 68 pares de bases).

Al igual que para la estrategia detallada en el apartado anterior, en este caso también fue posible la amplificación del ADN de las muestras de dulces por PCR y la restricción específica por la enzima de digestión.

5.3 Clonado, secuenciado y análisis de las secuencias obtenidas

5.3.1 Clonado del producto de PCR con cebadores A1F-A3R

Si bien fue posible amplificar y diferenciar dos especies distintas utilizando la estrategia de *mat-k* con los cebadores A1F-A3R, es necesario confirmar mediante secuenciación si estas corresponden a las especies *Malus domestica* (ó *trilobata*) y *Cydonia oblonga*. Sin embargo, la técnica de secuenciación directa del producto de PCR no es capaz de analizar claramente los fragmentos pequeños producidos. Por tanto, se optó por emplear la técnica de clonación, con el fin de obtener plásmidos recombinantes y así lograr un análisis claro de las secuencias correspondientes a las especies en cuestión.

Empleando la metodología descrita en el apartado 4.7.1, se lograron obtener diez colonias conteniendo plásmido recombinante; 4 de ellas correspondientes al dulce de composición conocida (100% membrillo) y 6 correspondientes al dulce de membrillo problema I. El rastreo por PCR para detectar la presencia del inserto, se realizó utilizando los cebadores A1F-A3R (no se muestra) y los respectivos al vector pJet (pJetF-pJetR) (*Figura 11*).

A partir de la *Figura 11* puede observarse que todos los ADN plasmídicos amplificados contienen una banda que corresponde con alguno de los dos resultados esperados, salvo la del carril 8 que presenta una banda de menor peso molecular. Los carriles 2-5 corresponden a colonias provenientes del dulce 100% membrillo. De las 4

colonias analizadas para este dulce, parecería que tres incorporaron el inserto de menor tamaño de secuencia producto de la amplificación con los cebadores A1F-A3R (172 pares de bases) y tan sólo una, el de mayor longitud (181pares de bases).

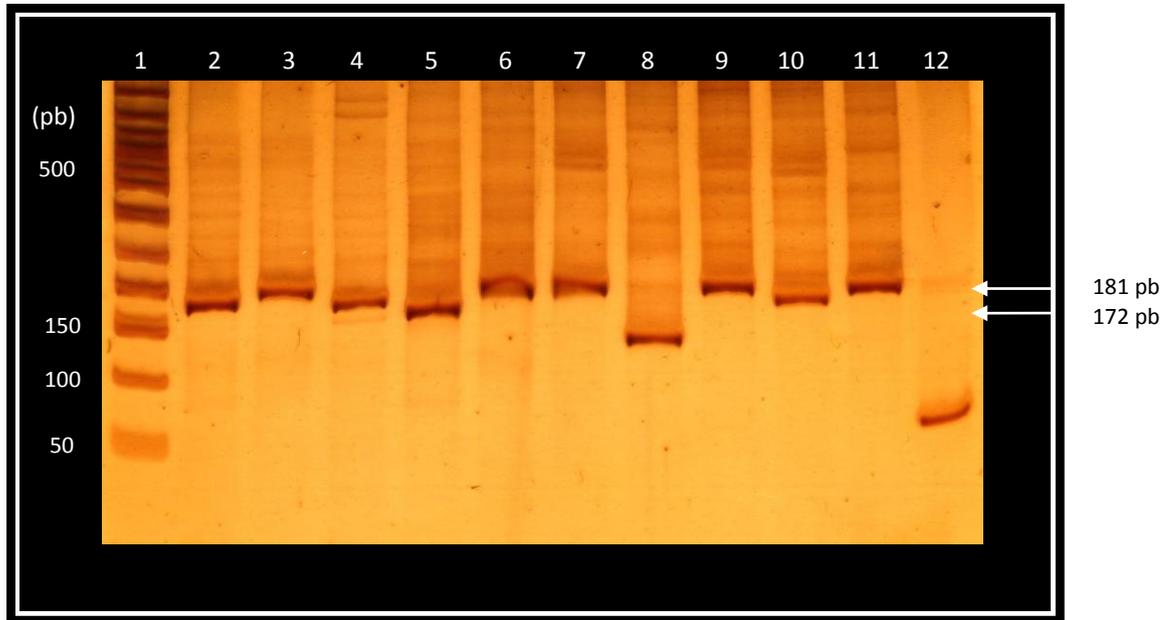


Figura 11: Rastreo de diez colonias por PCR, utilizando los cebadores del vector *Pjet*. Aquellas colonias cuyo inserto fue de aproximadamente 170-180 pares de bases, fueron seleccionadas para su posterior secuenciado. **Carriles:** 1-Marcador de peso molecular 50pb, 2- Colonia 1 (D. de membrillo de composición conocida 100%), 3- Colonia 2 (Dulce de membrillo de composición conocida 100%), 4- Colonia 3 (D. de membrillo de composición conocida 100%), 5- Colonia 6 (D. de membrillo de composición conocida 100%), 6- Colonia 1 (D. de membrillo problema), 7- Colonia 2 (D. de membrillo problema), 8- Colonia 3 (D. de membrillo problema), 9- Colonia 4 (D. de membrillo problema), 10- Colonia 5 (D. de membrillo problema), 11- Colonia 6 (D. de membrillo problema), 12- Control negativo de PCR.

En los carriles 6-11 se sembraron los productos de PCR de las colonias provenientes de un dulce problema. Para este caso, se observa una colonia con el inserto de menor longitud (carril 10) y cuatro que parecerían haber incorporado el de mayor tamaño (6, 7, 9 y 11).

En el caso de que los insertos incorporados, efectivamente correspondieran al producto de amplificación para la región del gen *mat-k*, se podría señalar que aquellas colonias que muestran bandas de mayor peso molecular contendrían la especie *Malus domestica* (ó *trilobata*) (manzana) y aquellas de menor peso molecular, la especie *Cydonia oblonga* (membrillo). Para poder comprobar que dichos insertos

corresponden a las especies en cuestión, se seleccionaron para secuenciar, dos colonias para el dulce de composición conocida (colonias 1 y 2) y tres para el problema (colonias 4, 5 y 6).

Cabe destacar que, el hecho de que existan dos tamaños distintos de productos de PCR para las colonias de dulce 100% membrillo, es contradictorio a lo esperado. Para este caso, únicamente deberían encontrarse productos de PCR de menor peso molecular, correspondientes a membrillo. Esto podría estar indicando una contaminación en alguno de los pasos de clonado o PCR. No obstante, la técnica de secuenciación evidenciará si efectivamente se trata de un contaminante, y de ser el caso, si se trata de un contaminante exógeno a la muestra, o de las especies estudiadas (para este caso manzana).

5.3.2 Secuenciado del producto de clonación

Los resultados revelaron que fue posible clonar en plásmidos, los productos de PCR obtenidos mediante la utilización de los cebadores A1F-A3R. De esta manera, se pudo obtener las secuencias de los insertos en cuestión (*Tabla 8*) e identificar las especies correspondientes.

Tabla 8: Resultado del análisis por BLAST del producto de amplificación por PCR, para tres colonias obtenidas a partir de un dulce problema. Se especifica la máxima identidad de secuencia obtenida para dicho análisis.

COLONIA	RESULTADO DEL BLAST	MAXIMA IDENTIDAD	RESULTADO
4	Malus trilobata tRNA-Lys (trnK) gene, intron sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast	98%	Manzana
5	Cydonia oblonga tRNA-Lys (trnK) gene, intron sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast	98%	Membrillo
6	Malus trilobata tRNA-Lys (trnK) gene, intron sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast	98%	Manzana

Se encontró que dos de las tres colonias analizadas para el dulce problema, adquirieron un inserto correspondiente a manzana (colonias 4 y 6) y que la restante (colonia 5), adquirió un inserto correspondiente a la especie de membrillo. No obstante, no fue posible identificar las secuencias de los insertos correspondientes a las colonias obtenidas para el dulce de composición conocida (100% membrillo),

debido a que prácticamente no dieron señal en el secuenciador. Esto pudo deberse a la baja concentración de ADN conseguida tras la purificación para dichas colonias.

5.3.3 Secuenciado del producto de PCR con cebadores C1F-C3R

Como se comentó anteriormente en el apartado 4.7.2, se enviaron a secuenciar los productos de PCR obtenidos de los controles positivos (manzana y membrillo) amplificados con los cebadores C1F-C3R, para poder comparar las secuencias obtenidas, con las encontradas en las bases de datos. Las secuencias obtenidas para dichos controles, ciertamente corresponden a las especies *Malus domestica* y *Cydonia oblonga*. Sin embargo, la secuencia obtenida para *Cydonia oblonga* no corresponde en su totalidad a la especificada en la base de datos del NCBI. Precisamente, pudo comprobarse la presencia del *gap* de 7 pares de bases especificado en gris en la *Figura 12*, pero no pudo comprobarse la presencia del *gap* de 18 pares de bases especificado en verde.

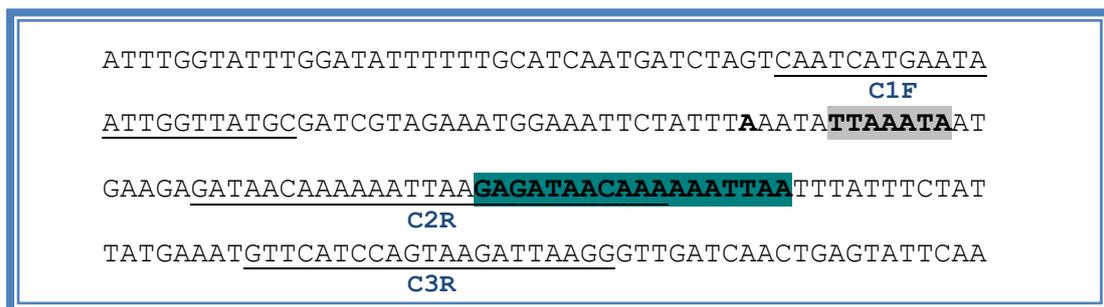


Figura 12: Esquema de la región C del gen de la *maturasa-k* de *Malus domestica* (5'-3'). La secuencia de *Cydonia oblonga* para esta región del gen, se diferencia de la de manzana por dos *gaps* de 7 y 18 pares de bases, coloreados en la figura. C1F, C2R, C3R corresponden a los cebadores diseñados para amplificar esta región del gen.

La ausencia de este *gap* en *Cydonia oblonga*, explica la proximidad de las bandas observadas en los geles en donde se sembraron los productos de PCR con los cebadores C1F-C3R de ambas especies (no se muestra). En vez de observarse una separación de 25 pares de bases entre las bandas obtenidas para las dos especies, se observa solamente una separación de aproximadamente 7 pares de bases.

Debido a que este *gap* de 18 pares de bases teórico sirvió para diseñar uno de los cebadores específicos para *Malus domestica*, fue imposible amplificar exclusiva y selectivamente dicha especie. Como consecuencia, mediante la utilización del juego de cebadores C1F-C2R, ambas especies amplificaron un fragmento. Sin embargo, debido a la existencia del *gap* de 7 pares de bases hacia el extremo 5' en la secuencia, igualmente fue posible la diferenciación de especies por electroforesis de los productos de PCR obtenidos mediante la amplificación con los cebadores C1F-C3R (no se muestra).

Cabe destacar que el diseño del cebador C2R no fue el más adecuado para lograr la amplificación selectiva de manzana, ya que este cebador podría igualmente aparearse con la secuencia de membrillo, independientemente de la existencia o no del *gap* de 18 pares de bases en la misma.

5.4 Tabla de resultados

La *Tabla 9*, resume los datos obtenidos para cada uno de los dulces analizados mediante las técnicas descritas. Para realizar la tabla, se tomó en cuenta el método de extracción que obtuvo mayor concentración y calidad de ADN para cada muestra extraída.

Todas las muestras fueron sometidas al ensayo de inhibición. Este mostró que, tanto el dulce de membrillo 100% membrillo, como los dulces problema II y III, inhibían la PCR. Para subsanar este problema, se prosiguió a extraer nuevamente el ADN de estos dulces utilizando otro tipo de método de extracción. Las muestras que no mostraron inhibición, se analizaron por PCR utilizando los cebadores A1F-A3R y luego se digirieron con la enzima *EcoRI*.

Tabla 9: Integración de los resultados obtenidos para los siete dulces de membrillo analizados

Dulce de Membrillo	Declaración de especies	Método de extracción	Concentración ADN (µg/µl)	Inhibición	Amplificación A1F-A3R	Digestión EcoRI	Amplificación BF-BR	Digestión Mbol	Secuenciación	Especies encontradas	Resultado
100% membrillo	Membrillo	Kit Stool	30.5	Si	No	No	Si	No	Si	<i>Cydonia oblonga</i>	Membrillo Manzana
50% membrillo 50% manzana	Membrillo Manzana	CTAB/PTB	44.4	No	Si	Si	Si	Si	No	<i>Cydonia oblonga</i> <i>Malus trilobata</i>	Membrillo Manzana
Problema I	Membrillo	CTAB/PTB	53.3	No	Si	Si	Si	Si	No	-	-
Problema II	Membrillo	Kit Stool	35.5	Si	No	No	No	No	No	-	-
Problema III	Membrillo	Kit Stool	54.8	Si	No	No	No	No	No	<i>Cydonia oblonga</i> <i>Malus trilobata</i>	Membrillo Manzana
Problema IV	Membrillo	CTAB/PTB	43.6	No	Si	Si	Si	Si	Si	<i>Cydonia oblonga</i> <i>Malus trilobata</i>	Membrillo Manzana
Problema V	Membrillo	CTAB/PTB	30.3	No	Si	Si	Si	Si	No	<i>Cydonia oblonga</i> <i>Malus trilobata</i>	Membrillo Manzana

Ninguno de los dulces que mostró inhibición en el primer análisis, logró amplificar la región A del gen *mat-k*. Las demás muestras sí amplificaron el fragmento correspondiente a dicha región. La restricción con *EcoRI* sobre el fragmento amplificado de todos los dulces, mostró dos productos de menor peso molecular que se correspondieron con los esperados para la especie manzana

Paralelamente se realizó el análisis por PCR utilizando los cebadores BF-BR. Las muestras correspondientes a los dulces problema II y III tampoco lograron amplificar la región B del gen. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurrió en el análisis anterior, la muestra correspondiente al dulce 100% membrillo sí logró la amplificación del fragmento esperado. Las demás muestras también lograron amplificar el fragmento correspondiente. Todos los fragmentos amplificados fueron digeridos con la enzima *Mbol* y todas las muestras, a excepción de la correspondiente al dulce 100% membrillo, mostraron los dos productos de bajo peso molecular esperados para la especie de manzana. Esto podría estar dando indicios de que todos los dulces problemas que lograron ser analizados por PCR, contienen las dos especies: membrillo y manzana.

Para comprobar la identidad de dichas especies, se escogieron para secuenciar, los productos de PCR amplificadas con los cebadores A1F-A3R, de dos muestras distintas de dulces (un dulce problema y el 100% membrillo). La secuenciación correspondiente al dulce problema evidenció la presencia de las especies: *Cydonia oblonga* y *Malus trilobata*. Sin embargo, como se comentó en el apartado 5.3.2, no se pudo obtener un resultado claro de la secuencia analizada del dulce 100% membrillo. A pesar de ello, a partir de los datos obtenidos por PCR se pudo inferir que este dulce efectivamente contiene sólo membrillo.

6. Conclusiones y perspectivas

Los resultados obtenidos en el presente estudio, representan un avance en las metodologías para la detección de posibles fraudes y/o contaminaciones en matrices alimentarias complejas. Asimismo constituyen un primer intento para la determinación e identificación de especies vegetales en el dulce de membrillo.

Como se comentó anteriormente, existen tres factores esenciales que determinan el éxito del método de detección de especies mediante PCR. Estos son la cantidad, calidad, y la pureza del ADN extraído. Dichas propiedades dependen directamente del método de extracción del ADN. Mediante este trabajo, se pudo constatar que los métodos convencionales utilizados para la extracción de ADN de matrices vegetales, no resultan de utilidad para este tipo de matriz compleja que conlleva complejos procesos de elaboración. No obstante, se logró desarrollar un método de extracción de ADN, adecuado para este tipo de matriz alimentaria. Este método que utiliza reactivos como el PTB (bromuro de N-fenaciltiazolio) y CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio), minimiza la cantidad de contaminantes que co-precipitan con el ADN y reduce la capacidad de inhibición de la PCR. Este último punto es crítico, debido a que es a partir de esta técnica que se logra la detección, discriminación e identificación de las especies vegetales contenidas en el dulce de membrillo.

Para la determinación de especies, se diseñaron diversas estrategias que combinan análisis por PCR y RFLP. Sin embargo, sólo se lograron poner a punto algunas de ellas. Se observó, que para los casos en los que no se obtiene una alta concentración de ADN, la mejor estrategia a utilizar es aquella que tiene como objetivo la amplificación de ADN de origen cloroplástico y no de origen nuclear. De esta manera, se eligió desarrollar y ajustar aquellas estrategias que involucran al gen de la maturasa k. A partir de la utilización de los cebadores A1F-A3R y mediante la simple visualización de los productos en un gel de poliacrilamida 12%, fue posible detectar la presencia de dos especies distintas en los dulces. Para un análisis más completo, se implementó la digestión con la enzima *EcoRI* que contiene un sitio de corte específico para una de las

especies en cuestión. La confirmación de las especies se llevó a cabo por secuenciación. Todos los dulces de membrillo analizados mediante esta estrategia manifestaron la presencia de dos especies: *Cydonia oblonga* (membrillo) y *Malus trilobata* (manzana).

Un resultado similar se obtuvo mediante el análisis de PCR y RFLP utilizando los cebadores BF-BR y la enzima de restricción *MboI*. No obstante, debido a que mediante esta estrategia ambas especies amplifican un fragmento de igual tamaño tras la PCR, no es posible discriminar de manera precisa las dos especies presentes. Sin embargo, sí es posible detectar una adulteración ó contaminación con manzana, tras la utilización de la enzima de restricción.

Cabe destacar que, si bien el análisis de secuenciación de los productos de PCR permite la confirmación de las especies presentes en la muestra, la utilización de las estrategias de PCR y RFLP descritas en este trabajo, resultan suficientes para la discriminación de las especies en el dulce de membrillo.

Todas las estrategias desarrolladas, implican un análisis cualitativo de las especies presentes en las matrices alimentarias. No obstante, no escapa a nuestra atención que, a nivel analítico, la etapa siguiente en el desarrollo e implementación de estas metodologías de trazabilidad molecular es la aplicación de métodos cuantitativos a través de por ejemplo, la utilización de metodologías de PCR en tiempo real.

7. Referencias bibliográficas

Andrade P. B., Carvalho A. R. F., Seabra R. M., & Ferreira M. A. (1998). A previous study of phenolic profiles of quince, pear, and apple purees by HPLC diode array detection for the evaluation of quince puree genuineness. *J. Agric. Food Chem.* 46, 968–972.

Asif M.J. & Cannon Charles H. (June 2005). DNA Extraction From Processed Wood: A Case Study for the Identification of an Endangered Timber Species (*Gonystylus bancanus*). *Plant Molecular Biology Reporter* 23: 185–192.

Botti & Giuffra (2010). Oligonucleotide indexing of DNA barcodes: identification of tuna and other scombrid species in food product. *BMC Biotechnology*.

Bravi Claudio M., Lirón Juan P., Mirol Patricia M., Ripoli María V, Peral-García Pilar, Giovambattista Guillermo (2004). A simple method for domestic animal identification in Argentina using PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene. *Legal Medicine* 6: 246–251.

Chase Mark W., Salamin Nicolas, Wilkinson Mike, Dunwell James M., Kesanakurthi Rao Prasad, Haidar Nadia & Savolainen Vincent (2005). Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical transactions of the Royal society*.

Cordella Christophe, Moussa Issam, Martel Anne-Claire, Sbirrazzuoli Nicolas, & Lizzani-Cuvelier Louise (2002). Recent Developments in Food Characterization and Adulteration Detection: Technique-Oriented Perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1751-1764.

Di Bernardo G., Galderisi U., Cipollaro M., and Cascino A. (2005). Recent Developments in Food Characterization and Adulteration Detection: Technique-Oriented Perspectives. Methods To Improve the Yield and Quality of DNA from Dried and Processed Figs. *Biotechnol. Prog.* 21: 546-549.

Di Pinto A, Forte V.T., Guastadisegni M.C., Martino C., Schena F.P. & Tantillo G. (2007). A comparison of DNA extraction methods for food analysis. *Food Control* 18:76–80.

Doyle J. J., Doyle J. L (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11–15.

Gallagher, S. R., & Desjardins, P. R. (2001). Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy. *John Wiley & Sons, Inc.*

Germini Andrea, Tonelli Alessandro, & Rossi Stefano (2009). Handbook of Muscle Foods analysis. *Detection of Genetically Modified Organisms: 713-739.*

Griffiths, K., Partis, L., Croan, D., Wang, N., & Emslie, K. R. (2002). Review of technologies for detecting genetically modified materials in commodities and food. *Australian Government Department of Agriculture Fisheries & Forestry*.

Harrison J. & Dake R. (2005). An Expeditious, Hight-Yielding Construction of the Food Aroma Compounds 6-Acetyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine and 2-Acetyl-1pyrroline. *J. Org. Chem*, 70 (26), 10872-10874.

Ortola-Vidal Ana, Schnerr Helge, Rojmyr Maria, Lysholm Frida, Knight Angus (2007). Quantitative identification of plant genera in food products using PCR and Pyrosequencing technology. *Food Control* 18: 921–927.

Lauri Andrea & Mariani Paola O. (2008). Potentials and limitations of molecular diagnostic methods in food safety. *Genes Nutr.* 4:1–12,

Silva B. M., Andrade P. B., Mendes G. C., Valentão P., Seabra R. M., & Ferreira M. A. (2000). Analysis of Phenolic Compounds in the Evaluation of Commercial Quince Jam Authenticity. *J. Agric. Food Chem.*, 48 (7), pp 2853–2857.

King Christine E., Debruyne Régis, Kuch Melanie, Schwarz Carsten, & Hendrik N. Poinar (2009). A quantitative approach to detect and overcome PCR inhibition in ancient DNA extracts. *BioTechniques* 47:941-949.

Kingombe CIB, Luthi E., Schlosser H., Howald D., Kuhn M. & Jemmi T. (2001). A PCR-based test for species-specific determination of heat treatment conditions of animal meals as an effective prophylactic method for bovine spongiform encephalopathy. *Meat-Science* 57: 35-41.

Kocher T. D., Thomas W. K., Meyer A., Edwards S. V., Paabo S., Villablanca F. X., & Wilson A. C. (1989). Evolution Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals. Amplification and sequencing with conserved primers (cytochrome b/12S ribosomal DNA/control region/evolutionary genetics/molecular phylogenies). *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.* 86, pp. 6196-6200.

Laureiro Lucia, Giménez Jimena, Balatti Alejandra (2009). Estado actual y perspectivas de la producción e industrialización del membrillo en Uruguay. *Monografía para la obtención del Título de Contador Público*. Universidad de la República, Facultad de Ciencias Economicas y Administración.

Lockley, A. K., & Bardsley, R. G. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science and Technology*, 11(2): 67–77.

López M., Mallorquín P. & Vega M. (Abril 2003). Informe de vigilancia Tecnológica. Tecnologías Moleculares de Trazabilidad Alimentaria. *Genoma España*.

Luthy Jurg, (1999). Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods. *Food Control* 10: 359±361.

Mafra Isabel, Ferreira Isabel M. P. L. V. O., Oliveira M. Beatriz P. P.. (2008). Food authentication by PCR-based methods. *Eur Food Res Technol* 227:649–665.

Marmiroli N., Peano C. and Maestri E. (2003). Advanced PCR techniques in identifying food components. *Food authenticity and traceability*. Lees, M. (Ed) pp 3-33.

Martinez Debat (Llamado 2008). Proyectos de Vinculación Universidad – Sector Productivo, Modalidad 2. *Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC)*.

Matsunaga, Chikuni , Tanabeb, Muroyab, Shibata, Yamada, Shinmura (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay, *Meat Science* 51: 143±148.

Nollet Leo (2004). Food authentication by HPLC. *Food Testing*.

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

Piñeyro-Nelson, Van heerwaarden, Perales, Serratoshernández, Rangel, Hufford, Gepts, Garay-Arroyo, Riverabustamante & Alvarez-buylla (2008). Transgenes in Mexican maize: molecular evidence and methodological considerations for GMO detection in landrace populations. *Molecular Ecology*.

Potter D., Eriksson T., Evans R. C., Oh S., Smedmark J. E. E., Morgan D. R., Kerr M., Robertson K. R., Arsenault M., Dickinson T. A., & Campbell C. S. (2007). Phylogeny and classification of Rosaceae. *Pl. Syst. Evol.* 266: 5–43.

Pua E.C. & Davey M.R. (2007). Transgenic Crops V. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*.

Rogstad Steven H., Keane Brian, Keiffer Carolyn Howes, Hebard Fred, & Sisco Paul (2001). DNA Extraction From Plants: The use of Pectinase. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 353–359.

Sanguinetti, C. J., Días Neto, E., & Simpson, A. J. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17, 914-921.

Turci Manuela, Savo Sardaro Maria Luisa, Visioli Giovanna, Maestri Elena, Marmiroli Marta, Marmiroli Nelson (2010). Evaluation of DNA extraction procedures for traceability of various tomato products. *Food Control* 21: 143–149.

Weising Kurt, Nybon Hilde, Wolff Kirsten, Kahl Gunter (2005). DNA fingerprinting in plants: Principles, Methods, and Applications, *Second Edition*, 81-107.

Yamamoto Toshiya, Kimura Tetsuya, Soejima Junichi, Sanada Tetsuro, Ban Yoshiyuki & Hayashi Tateki (2004). Identification of Quince varieties using SSR markers developed from Pear and Apple. *Breeding Science* 54:239-244.

8. Anexos

8.1 Anexo I - Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AAS: Espectroscopía de Absorción Atómica.

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*.

CSIC: Comisión Sectorial de Investigación Científica.

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetil amonio.

DIGEGRA: Dirección Nacional de la Granja.

DILAVE: Dirección Laboratorios Veterinarios.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

GC: Cromatografía de gases.

GC-FTIR: Cromatografía de gases asociada a espectrometría de Infrarroja por Transformada de Fourier.

GC-IRMS: Cromatografía de Gases asociada a espectrometría de masas de razones isotópicas.

GC-C-IRMS: Cromatografía de gases con celda de combustión y espectrometría de masas de relaciones isotópicas.

GC-MS: Cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas.

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia.

HPLC-DAD: Cromatografía de gases asociada a detector de diodos.

ICP-AES: Espectrometría de Plasma acoplada a espectroscopía de emisión.

ICP-MS: Espectrometría de Plasma acoplada a espectrometría de masa.

IMM: Intendencia Municipal de Montevideo.

INAC: Instituto Nacional de Carnes.

IR: Infra rojo.

IRMS: Espectrometría de masas de razones isotópicas.

ISO: Organización Internacional de Normalización (*International Organization for Standardization*).

LaTraMA: Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria.

LB: Medio de cultivo Luria Bertani que contiene NaCl, pepsina y levadura.

LB-IMM: Laboratorio de Bromatología de la Intendencia Municipal de Montevideo.

MPM: Marcador de Peso Molecular.

NCBI: *National Center for Biotechnology Information.*

NMR: Resonancia magnética Nuclear.

OGM: Organismo Genéticamente Modificado.

ONG: Organización No Gubernamental.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).

PEDECIBA: Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas.

PTB: Bromuro de *N*-fenacil tiazolio.

PVP: Polivinil pirrolidona.

RFLP: Polimorfismo en los largos de fragmentos de restricción.

RT-PCR: Real Time PCR.

TEN: Buffer compuesto por Tris 10mM, EDTA 10mM y NaCl 0.1M.

UV: Ultra violeta.

8.2 Anexo II - Soluciones

- Solución TEN: Tris-HCl 10 mM, pH 8.0
EDTA 10 mM
NaCl 0.1 M
- Solución de PTB: PTB - 0.142 gs.
Solución fosfato 10mM- 5ml
- Solución de extracción CTAB/PTB: Tris-HCl 100mM, pH 8.0
EDTA 50mM, pH 8.0
NaCl 1,5M
CTAB 3% (m/v)
PVP 1% (m/v)
 β -mercaptoetanol 0.2% (m/v)
PTB 10% (m/v)
- Medio LB (líquido): NaCl - 10 g/l
Peptina - 10g/l
Levadura - 5g/l

- Soluciones de minipreparación plasmídica:

Solución I.

Tris-HCl pH: 8.0, 50 mM

EDTA pH: 8.0, 10 mM

Solución II.

NaOH 0,2 M

SDS 1%

Solución III.

AcOK pH: 4.8 3M

Agradecimientos

A mi familia, a mis padres y mis hermanos, por la compañía, el apoyo y el interés de siempre.

A mis amigos, los viejos y los nuevos, por el aguante y las horas compartidas.

A mis compañeros de laboratorio, por su paciencia, por siempre motivarme y escucharme.

A Claudio, por darme un lugarcito en el laboratorio, por haber confiado en mí para este emprendimiento y para los futuros.