

## COMUNICACIÓN CORTA

# CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE DOS ACCESIONES DE *Cydonia oblonga*<sup>1</sup>

Luis Alvarado-Marchena<sup>2</sup>, Dora Flores-Mora<sup>2</sup>, Randall Chacón-Cerdas<sup>2</sup>,  
Alexander Schmidt-Durán<sup>2</sup>, Carlos Alvarado-Ulloa<sup>2</sup>

### RESUMEN

**Caracterización molecular de dos accesiones de *Cydonia oblonga*.** El objetivo de la presente investigación fue evaluar el uso del espaciador plástido *trnH-psbA* y la secuencia codificante *matK* como posibles marcadores para la caracterización molecular de dos accesiones de membrillo (*C. oblonga*). Estas provinieron de Argentina y de Costa Rica. El trabajo se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), durante el año 2014. Los productos amplificados fueron analizados con el software MEGA v6.0 para calcular las distancias genéticas mediante el modelo de Tamura-Nei. Se determinó que la secuencia *matK* fue la que presentó el mayor porcentaje de sitios variables y distancia intraespecífica, indicando la presencia de polimorfismos entre las accesiones. Por otro lado, la utilización del espaciador *trnH-psbA* para membrillo, tuvo poca capacidad de discriminación debido a que a nivel intraespecífico este locus presentó menos divergencias.

**Palabras clave:** membrillo, marcadores moleculares, análisis filogenéticos.

### ABSTRACT

**Molecular characterization of two accessions of *Cydonia oblonga*.** The purpose of this research was to evaluate the plastid *trnH-psbA* spacer and the *matK* coding sequence as possible markers for the molecular characterization in two accessions of quince (*C. oblonga*), one from Argentina and the other one from Costa Rica. The study was carried out at Center for Biotechnology Research (CIB in Spanish) of the Technological Institute of Costa Rica (ITCR, in Spanish) during 2014. Amplified products were analyzed using MEGA v6.0 software to calculate genetic distances using the Tamura-Nei model. The results showed that the *matK* sequence presented the highest percentage of variable sites and the highest intraspecific distance, suggesting the presence of polymorphisms between the two accessions. On the other hand, the *trnH-psbA* spacer for quince had a low ability to discriminate because, at intraspecific level, this locus showed less differences.

**Keywords:** quince, molecular markers, phylogenetic analysis.

<sup>1</sup> Recibido: 24 de setiembre, 2014. Aceptado: 12 de febrero, 2015. Proyecto de investigación financiado por el Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Centro de Investigación en Biotecnología (CIB).

<sup>2</sup> Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Escuela de Biología. Cartago, Costa Rica. [lalvarado@itcr.ac.cr](mailto:lalvarado@itcr.ac.cr), [dflores@itcr.ac.cr](mailto:dflores@itcr.ac.cr), [rchacon@itcr.ac.cr](mailto:rchacon@itcr.ac.cr), [aschmidt@itcr.ac.cr](mailto:aschmidt@itcr.ac.cr), [calvarado@itcr.ac.cr](mailto:calvarado@itcr.ac.cr)



## INTRODUCCIÓN

El membrillo (*Cydonia oblonga*) es un árbol frutal nativo del sur de Europa y Asia, perteneciente a la familia de las rosáceas (Postman, 2009). Comercialmente es reconocido como una fuente dietética, ya que posee propiedades antioxidantes, además de propiedades antimicrobianas y antiulcerosas (Fiorentino et al., 2008; Silva et al., 2008).

Para la discriminación de los genotipos existentes de membrillo se han establecido descriptores de parámetros morfológicos basados principalmente en el tipo de ornamentación del gránulo de polen (Luque y Díez, 2002), ya que las características anatómicas del tallo, hoja y fruto son muy similares entre las accesiones, por lo que es difícil obtener una clasificación fiable (Toshiya et al., 2004). El número reducido de descriptores dificulta en algunos casos la separación de fenotipos en distintos grupos (Hebda y Chinnappa, 1990). Aunado a esto, la plasticidad fenotípica y la variabilidad genética de los caracteres utilizados pueden inducir a clasificaciones incorrectas, ya que las claves morfológicas suelen ser eficaces sólo para una etapa particular del desarrollo (Jarman y Elliott, 2000; Luque y Díez, 2002).

El uso de secuencias de ADN como sitios diagnóstico han evidenciado la existencia de algunas regiones del genoma que podrían comportarse de manera invariable en las poblaciones de una especie, a tal punto que se generen variaciones entre especies (Nicolalde et al., 2011).

En animales existen genes ampliamente estandarizados como códigos de barra para la determinación eficiente y precisa de especies. No obstante, en plantas la situación es más compleja, ya que se han propuesto una gran variedad de regiones del genoma para la identificación de especies vegetales, sin lograr obtener una secuencia que cumpla con las características de un código de barras de ADN (Pang et al., 2012).

El Grupo de Trabajo de Plantas en el Consorcio para el Código de Barras de la Vida (CBOL Plant Working Group, 2009), examinó la idoneidad de siete marcadores: tres espaciadores no codificantes (*atpF-ATPH*, *trnH-psbA* y *psbK-PSBI*) y cuatro regiones codificantes (*matK*, *rbcL*, *rpoB* y *rpoC1*), provenientes del genoma plastídico, con el fin de evaluar la capacidad de discriminación entre especies que presenten estas regiones.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el uso del espaciador plastídico *trnH-psbA* y la secuencia codificante *matK* como posibles marcadores para la caracterización molecular en dos accesiones de membrillo (*C. oblonga*).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Extracción de ADN total, reacción de amplificación y secuenciación

La presente investigación se efectuó en el primer semestre del 2014 en el Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR).

Se realizó la extracción de ADN total a partir de tejido foliar juvenil de dos accesiones de *C. oblonga*, “Golden” proveniente de Argentina y “Costarricense” presente en Costa Rica, utilizando el DNeasy plant extraction mini kit (Qiagen®). Se cuantificó la concentración y pureza del ADN mediante espectrofotometría determinando los valores de absorbancia a 260 nm y 280 nm.

Se realizaron reacciones de PCR de 25 µl utilizando el DreamTaq™ Master Mix 2X (Fermentas®); 1,5 ng de los oligos y 0,7 µl de ADN genómico. Para la amplificación del espaciador *trnH-psbA* se emplearon los oligos *psbA3'f* y *trnH*, así como los oligos *KIM3F* y *KIMIR* para *matK*. Se determinó la temperatura de hibridación de los oligos mediante una prueba de gradiente de temperatura ( $\Delta T$ ) entre 61 °C y 63,5 °C con aumentos de 0,5 °C para las reacciones del espaciador *trnH-psbA*, empleando un perfil térmico de 95 °C por 2 min, (94 °C por 30 seg,  $\Delta T$  por 20 seg, 72 °C por 40 seg), por 35 ciclos, y entre 58 °C y 61 °C con aumentos de 1 °C para *matK*, utilizando un perfil térmico de 95 °C por 3,5 min (95 °C por 30 seg, 60 °C por 1,5 min, 72 °C por 2,5 min), por 35 ciclos. Los productos amplificados fueron enviados a la empresa MacroGen® (USA) para su secuenciación.

### Análisis filogenético

Los productos de PCR secuenciados, fueron editados y ensamblados con el software bioinformático BioEdit® y CAP3® respectivamente, posteriormente fueron alineados junto con sus homólogos mediante la herramienta MUSCLE del EMBL-EBI. Se determinó el porcentaje de sitios variables y la distancia genética

entre las accesiones empleando el modelo Tamura-Nei, el cual se basa en el número de sustituciones de bases entre las secuencias y la eliminación de posiciones con datos faltantes empleando el MEGA v6.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Extracción de ADN total, reacción de amplificación y secuenciación

De las extracciones de ADN total realizados a las dos accesiones de membrillo, se obtuvo una concentración media de 35,54 µg/ml con una relación promedio de  $A_{260}/A_{280}$  de 1,76.

La relación promedio de  $A_{260}/A_{280}$  obtenida, evidenció la existencia de contaminantes proteicos, los cuales presentaron altas absorbancias en 280 nm, debido probablemente, a la presencia de residuos de triptófano como lo informó Glasel (1995). No obstante, el valor de esta relación se encontró cercano al rango de 1,8 a 1,9 indicado por Orozco et al. (2010), como ADN de buena calidad, razón por la cual no hubo problema con la reacción de amplificación.

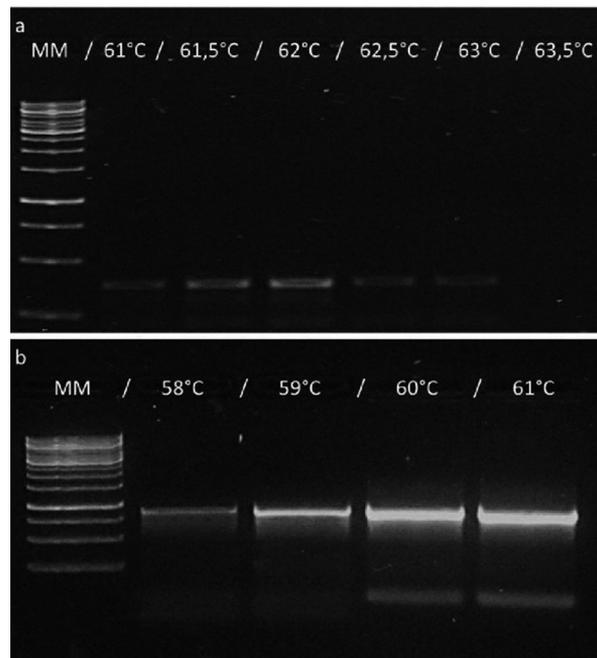
Con respecto a las pruebas de optimización de las reacciones de PCR, se lograron bandas con mayor intensidad a temperaturas de 61,5 °C y 62 °C para *trnH-psbA*, mientras que para *matK* los mejores resultados se obtuvieron a los 60 °C y 61 °C (Figura 1).

Las secuencias Fasta de cada accesión editadas y ensambladas indicaron que el loci analizado de *trnH-psbA* presentó un producto amplificado de 384 pb, similar al reportado por Lo y Donoghue (2012) quienes obtuvieron 302 pb. Con respecto al porcentaje G+C de los locus en las accesiones en estudio fue de 28,9, congruente con el 25,16 obtenido por Lo y Donoghue (2012).

La secuencia *matK* presentó un tamaño de 832 pb y un porcentaje G+C de 33,2, similar al reportado por Fazekas et al. (2008) quienes obtuvieron un dato promedio de 946 pb al realizar un estudio en 92 especies de plantas.

### Análisis filogenético

Se determinó mediante una búsqueda BLAST en la base de datos del GenBank, que las secuencias obtenidas del locus *trnH-psbA* (KM456212 de “Costarricense”



**Figura 1.** Bandas obtenidas durante la optimización de la PCR para la amplificación del espaciador *trnH-psbA* (a) y *matK* (b) de *C. oblonga*. Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), Instituto Tecnológico de Costa Rica. 2014.

**Figure 1.** Bands obtained during the optimization of PCR for amplification of the spacer-*trnH-psbA* spacer (a) and *matK* (b) of *C. oblonga*. Center of Biotechnology Research (CIB) of the Technological Institute of Costa Rica (ITCR), Costa Rica. 2014.

y KM456213 de “Golden”) presentaron en promedio un 99% de identidad con la secuencia JQ390697.1. Los locus *matK* (KM456210 de “Costarricense” y KM456211 de “Golden”) presentaron en promedio homologías de un 97,5% con las secuencias DQ860459.1, JQ390994.1 y JQ390995.1, accesiones de *Cydonia oblonga* correctamente identificadas en esta base de datos. No obstante, esta comparación no permitió hacer una separación de variedades o cultivares.

Los análisis de porcentajes de sitios variables y de distancia intraespecífica, evidenciaron que las secuencias del locus *matK* presentaron las mayores tasas de variación, seguido de la combinación multilocus *trnH-psbA* + *matK* (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Capacidad de discriminación entre accesiones de *C. oblonga* de los marcadores propuestos y su combinación. Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), Instituto Tecnológico de Costa Rica. 2014.

**Table 1.** Ability to discriminate between accessions of *C. oblonga* from the proposed markers and their combination. Center of Biotechnology Research (CIB) of the Technological Institute of Costa Rica (ITCR), Costa Rica. 2014.

<i>Locus o multilocus</i>	Porcentaje de sitios variables	Distancia intraespecífica (Tamura-Nei)
<i>trnH-psbA</i>	0,188	0,003
<i>matK</i>	2,995	0,032
<i>matK + trnH-psbA</i>	1,661	0,025

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica, así como al Consejo Nacional de Rectores (CONARE) por el financiamiento de esta investigación.

## LITERATURA CITADA

- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 106:12794-12797.
- Fazekas, A., K. Burgess, P. Kesanakurti, S. Graham, S. Newmaster, B. Husband, D. Percy, M. Hajibabaei, and S. Barrett. 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE* 3:e2802. doi:10.1371/journal.pone.0002802
- Fiorentino, A., D. D'Abrosca, S. Pacifico, C. Mastellone, V. Piscopo, R. Caputo, and P. Monaco. 2008. Isolation and structure elucidation of antioxidant polyphenols from quince (*Cydonia vulgaris*) peels. *J. Agric. Food Chem.* 56:2660-2667.
- Glasel, J. 1995. Validity of nucleic acid purities monitored by A260/A280 Absorbance Ratios. *Biotechn.* 18:62-63.
- Hebda, R., and C. Chinnappa. 1990. Studies on pollen morphology of rosaceae in Canada. *Rev. Palaeobot. Palynol* 64:103-108.
- Jarman, S., and N. Elliott. 2000. DNA evidence for morphological and cryptic Cenozoic speciations in the Anaspididae, 'living fossils' from the Triassic. *J. Evol. Biol.* 13:624-633.
- Lo, E., and M. Donoghue. 2012. Expanded phylogenetic and dating analyses of the apples and their relatives (Pyreae, Rosaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 63:230-243.
- Luque, C., y M. Díez. 2002. Morfología polínica de las especies de frutales cultivadas en Andalucía occidental: Familia Rosaceae. *Lagascalia* 22:81-91.
- Nicolalde, F., J. Gonzalez, F. Vergarad, y A. Vovides. 2011. Perspectivas sistemáticas de *Zamia* (Zamiaceae) en Megaméxico: de la taxonomía alfa a los códigos de barras genéticos. *Rev. Mex. Biodiv.* 82:341-355.
- Orozco, G., M. Aguilar, H. Muñoz, V. Coria, A. García, R. Salgado, y R. Del Val. 2010. Caracterización molecular en té nurite *Satureja macrostema* (Benth) Briq. mediante marcadores RAPDs. *Foresta Veracruzana* 12(1):27-32.
- Pang, X., C. Liu, L. Shi, R. Liu, D. Liang, H. Li, and S. Cherny. 2012. Utility of the *trnH-psbA* intergenic spacer region and its combinations as plant DNA barcodes: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* 7: e48833. doi:10.1371/journal.pone.0048833
- Postman, J. 2009. *Cydonia oblonga*: The unappreciated quince. *Arnoldia* 67(1):2-9.
- Silva, B., P. Valentão, R. Seabra, and P. Andrade. 2008. Quince (*Cydonia oblonga* Miller): an interesting dietary source of bioactive compounds. En: K.N. Papadopoulos, editor, *Food chemistry research developments*. Nova Science Publishers, Inc., NY, USA. p. 243-266.
- Toshiya, Y., K. Tetsuya, S. Junichi, S. Tetsuro, B. Yoshiyuki, and H. Tateki. 2004. Identification of quince varieties using SSR markers developed from pear and apple. *Breed. Sci.* 54:239-244.