



Optimización de la técnica RAPD para identificar cv de olivo

Optimization of RAPD analysis
for identification of olive varieties

Pablo F. Cavagnaro
Ricardo W. Masuelli

Originales
Recepción: 04/07/2002
Aceptación: 19/11/2002

RESUMEN

Entre las técnicas moleculares, RAPD-PCR es una de las más rápidas y operativamente simple para la caracterización de cultivares. Sin embargo, la confiabilidad de sus resultados radica, en gran parte, en la optimización previa de variables que pueden afectar los patrones de amplificación. Se investigó la repetibilidad de patrones RAPD de olivo bajo diferentes condiciones experimentales. Entre ellas, la pureza del ADN, el tipo de Taq ADN-polimerasa, las concentraciones de Mg^{2+} y dNTPs, el uso de tejidos atacados por patógenos y el uso de diferentes termocicladores, modificaron los patrones de bandas. Por el contrario, pequeñas modificaciones de la temperatura de apareamiento de cebadores, la concentración del ADN molde y la edad de los tejidos vegetales de los cuales se aisló ADN, no afectaron los patrones amplificados.

SUMMARY

RAPD-PCR, although a relatively fast and simple technique for cultivar characterization, is influenced by several parameters that need to be optimized prior using it as a routine identification methodology. The repeatability of olive RAPD patterns was investigated under different PCR conditions. Among the conditions tested the quality of the DNA, the Taq DNA polymerase source, changes in Mg^{2+} and dNTPs concentration, pathogen infestation of olive tissues and different thermocyclers could alter the RAPD patterns. In contrast, small changes in the temperature of annealing, the DNA concentration and the age of tissues from which DNA is isolated did not affect the amplification patterns.

Palabras clave

RAPD • PCR • olivo • variedades

Key words

RAPD • PCR • olive • varieties

INTRODUCCIÓN

La utilidad de los marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) en la caracterización de variedades de olivo ya ha sido demostrada (3, 5, 8). Sin embargo, como dichos marcadores pueden ser sensibles a pequeñas modificaciones en las condiciones de la reacción de PCR (Polimerase Chain Reaction), producen cambios en los patrones amplificados. Éste es un serio inconveniente, especial-

Dpto. de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Agrarias. UNCuyo. Alte. Brown N° 500.
Chacras de Coria. Mendoza. Argentina. M5528AHB. ccea@fca.uncu.edu.ar

mente cuando se utilizan como una herramienta para establecer distinción, uniformidad y estabilidad (DUS) de nuevas variedades. En esta técnica, el uso de cebadores cortos, con temperaturas de apareamiento relativamente bajas, puede ocasionar apareamiento inespecífico entre el cebador y el ADN molde, amplificando bandas poco reproducibles (9). Varios factores involucrados en la reacción de PCR pueden afectar la reproducibilidad de los patrones de amplificación: la pureza y concentración del ADN, la concentración de Mg^{2+} (20), el tipo de ADN polimerasa (17, 21), el termociclador empleado (15) y la presencia de ARN (21). La caracterización de las condiciones de amplificación permitiría resolver problemas técnicos mediante el ajuste de las variables involucradas e incrementar la reproducibilidad del análisis por RAPD.

Objetivo

Investigar la reproducibilidad de los patrones de RAPD amplificados bajo diferentes condiciones experimentales y discutir la utilización de esos marcadores en la identificación varietal de olivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

a. Material vegetal

Se recolectaron hojas jóvenes y sanas de diez variedades de olivo del banco de germoplasma del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Mendoza, Argentina.

| | | |
|----------|-----------------------|---------------|
| Aloreña | Manzanilla Española | Arauco |
| Farga | Manzanilla de Carmona | Changlot Real |
| Empeltre | Arbequina | Nevadillo |
| Frantoio | | |

b. Extracción de ADN

Se realizó con el método de micro-extracción (6), ligeramente modificado.

- 0,2-0,3 g de hojas de cada variedad se congelaron en nitrógeno líquido y se molieron en microtubos de 1,5 ml.
- Se añadieron 400 μ l buffer de extracción (0,1 M Tris; pH 8,0; 0,5 M NaCl; 50 mM EDTA; 1,2 % SDS) y 1 μ l/ml β -Mercaptoetanol.
- Se incubó a 70 °C durante 10 minutos.
- Seguidamente, se agregaron 150 μ l acetato de potasio 5 M. Se incubó en hielo durante 20 minutos y se centrifugó 10 minutos a 10 000 rpm.
- La fase acuosa superior fue transferida a un nuevo tubo de microcentrífuga. Se agregaron 250 μ l isopropanol y se centrifugó nuevamente, con igual rpm, durante 5 minutos.
- Se eliminó la fracción acuosa y el sedimento se dejó airear 30 minutos.
- Luego, se re-suspendió en 100 μ l TE (10 mM Tris; pH 8,0; 0,1 mM EDTA). Se agregaron 50 μ l acetato de amonio 5 M y 200 μ l etanol, centrifugando nuevamente a 10 000 rpm durante 5 minutos.
- El sedimento se lavó con etanol 70 % y se resuspendió en 100 μ l TE.
- Las soluciones de ADN se conservaron a -20°C.

La integridad del ADN se analizó mediante electroforesis en minigel de agarosa (11). La pureza (estimada como la relación de absorbancias a 260:280 nm) y la concentración de ADN se determinó con un espectrofotómetro GeneQuanta (PharmaciaTM). Las soluciones de ADN se diluyeron hasta una concentración de 30-40 ng/ μ l.

c. Condiciones de amplificación standard

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20 μ l que contenía:

| | |
|---|--------------------------|
| 10 mM Tris (pH 9,0) | 1,5 mM MgCl ₂ |
| 50 mM ClK | 0,1% Triton X-100 |
| 100 μ M de cada deoxi-nucleótidos (dNTP) | |
| 0,2 μ M de cada cebador de 10 pares de bases de longitud (Operon Technologies, Alameda, California), entre 60 y 80 ng de ADN genómico | |
| 1 U de Taq ADN polimerasa (Promega). | |

El termociclador MJ Research PTC-100 fue programado de la siguiente manera:

- un paso inicial de desnaturalización a 94° C por 3 min
- 45 ciclos a 92 °C por 30 s; 35 °C por un min y 72 °C por 2 min
- finalmente se incluyó un paso final de extensión a 72 °C por 5 min

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis a 5 V/cm en geles de agarosa al 1,5 % (P/V) en buffer TBE. Los geles se trataron con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml), se expusieron a luz ultravioleta y fotografiaron con cámara Polaroid usando película 667. Para la estimación del tamaño de los fragmentos amplificados se utilizó, como referencia, el fago Lambda digerido con las enzimas de restricción Eco RI y Hind III.

d. Condiciones de la reacción de PCR

Para investigar la reproducibilidad de los patrones de RAPD generados por las 10 variedades de olivo, bajo diferentes condiciones de reacción, se realizaron ensayos utilizando diferentes concentraciones de Mg²⁺, dNTPs y ADN molde. También se probaron distintas temperaturas de apareamiento de los cebadores, diferentes ADN polimerasas y termocicladores. En cada experimento, la extracción del ADN y el resto de las condiciones de amplificación se mantuvieron como se describió precedentemente.

Para investigar el efecto de la concentración de dNTPs sobre los patrones de bandas amplificados y determinar la concentración óptima bajo las condiciones establecidas de trabajo, se evaluaron diferentes concentraciones: 25, 50, 75, 100 y 200 μ M, con ADN de 5 variedades de olivo: Aloreña, Arauco, Frantoio, Empeltre, and Changlot Real, utilizando 3 cebadores: OPA 19, OPB 20 y OPB 4. Se ensayaron concentraciones de 1, 2, 3, 4, 6, y 8 mM de MgCl₂, utilizando como ADN molde, las variedades Aloreña y Nevadillo, y los cebadores OPA 19 y OPB19.

Se evaluó el efecto de macromoléculas contaminantes de los extractos de ADN (principalmente ARN, prótidos y polisacáridos) sobre los patrones de RAPD. Para ello se utilizaron, en las reacciones de PCR, extractos de ADN de baja y alta pureza. Como indicador del grado de pureza se midió la concentración de prótidos por espectrofotometría y la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm, con el mismo método.

También se evaluó la reproducibilidad de los productos de RAPD utilizando ADN molde extraído de hojas jóvenes, adultas y senescentes. Para la ocurrencia de apareamiento inespecífico entre cebador y ADN molde, que llevaría a la amplificación de bandas de baja reproducibilidad, se probaron 3 programas de amplificación con diferentes temperaturas de apareamiento, utilizando 9 cebadores y ADN de varios genotipos. Los patrones obtenidos fueron comparados.

Programas utilizados:

1. el programa descrito anteriormente bajo condiciones de amplificación standard;
2. el mismo, con 10 ciclos iniciales con temperatura de apareamiento a 36,5 °C y los últimos 35 ciclos a 35 °C;
3. 45 ciclos usando 36,5 °C como temperatura de apareamiento.

La consistencia de los patrones de RAPD amplificados con ADN-Taq polimerasas de distintos orígenes (Promega y Amplitaq, Perkins Elmer Cetus) se investigó usando los cebadores OPB 6, OPB 20, OPB 14 y OPB 19, y ADN de varios cultivares de olivo. Se estableció la reproducibilidad de patrones de amplificación entre laboratorios con diferentes marcas de termocicladores. Idénticas reacciones de PCR se ejecutaron con los termocicladores MJ Research PTC-100, Biometra UNO Thermoblock y Techne Gene E, para amplificar patrones de 7 variedades utilizando 5 cebadores. Las reacciones se realizaron de acuerdo con las condiciones standard de amplificación. Los productos generados fueron comparados.

e. Contaminación del ADN

El material vegetal del cual se extrae ADN para el análisis por RAPD puede estar infectado por patógenos. La presencia conjunta de ADN de ambas fuentes amplifica patrones con bandas provenientes de ambos genomas. Para evaluar el grado de interferencia del ADN contaminante -en este caso, ADN de cochinilla- en la solución de ADN de olivo, se mezcló ADN de dos variedades de olivo (Farga y Nevadillo) con ADN de *Hemiberlesia latastei* (cochinilla marrón del olivo) en las siguientes proporciones:

| | | | | | |
|----------|---------|-------|------|-------|------|
| 80 000:1 | 8 000:1 | 800:1 | 80:1 | 40:1 | 20:1 |
| 10:1 | 5:1 | 2,5:2 | 1:1 | 1:2,5 | 1:5 |

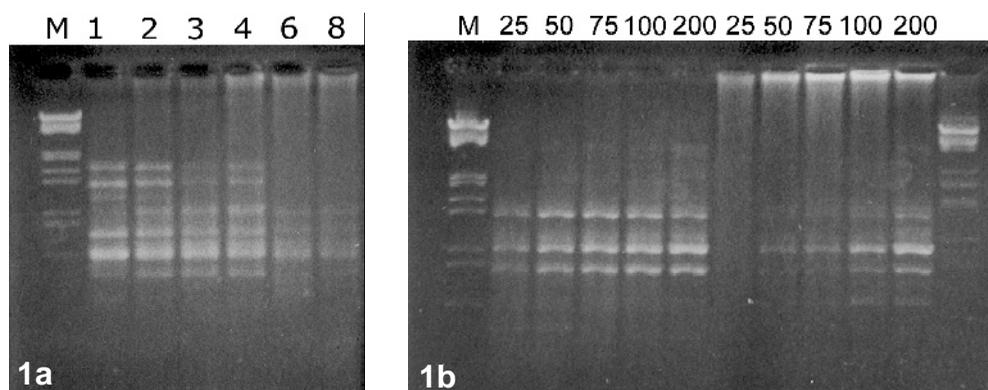
y se realizaron reacciones de RAPD de acuerdo con las condiciones standard utilizando el cebador OPB 19 y OPB 6.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. Extracción de ADN

El método de extracción utilizado permitió obtener extractos de ADN de suficiente pureza para las reacciones de RAPD-PCR. No se realizaron purificaciones adicionales. Ello permitió reducir el tiempo de extracción, procesando 24 muestras en aprox. dos horas. El ADN se conservó a -20 °C durante varios meses, aparentemente (por visualización en gel de agarosa) sin degradación significativa. Los rendimientos de ADN oscilaron entre 15 y 45 µg/g de tejido fresco. No se observaron diferencias en cuanto al número, cantidad e intensidad de bandas de los patrones

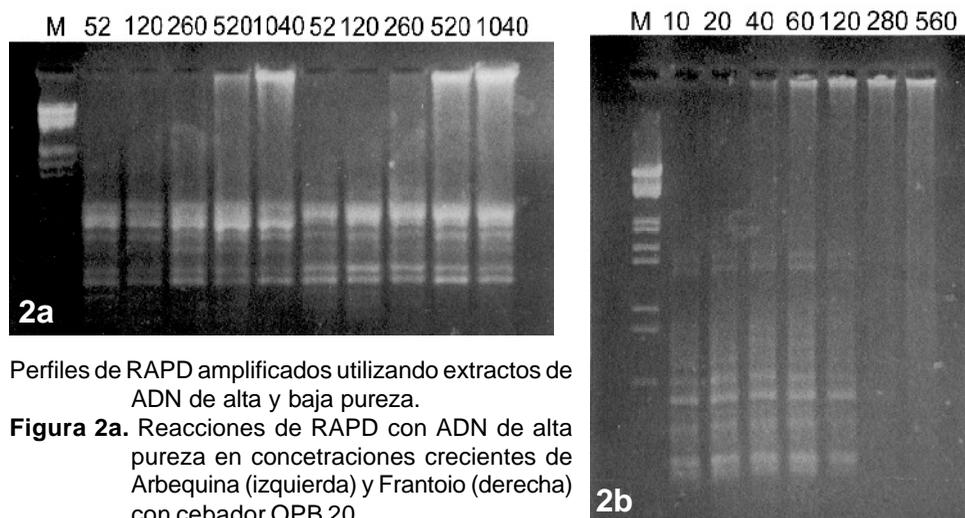
amplificados utilizando extractos de ADN crudos y extractos tratados con ARNasa (datos no presentados). En este trabajo, la presencia de ARN en las muestras no representó un factor de inhibición, o interferencia, de la reacción de PCR. La observación de resultados insatisfactorios en las reacciones de RAPD cuando se utilizaban ADNs extraídos de tejidos viejos de *Cucumber* sp., se atribuyó a su alto contenido de polisacáridos (17, 18). En este ensayo, la utilización de ADN proveniente de hojas senescentes no mostró diferencias en los patrones amplificados. Aparentemente, comparado con otras especies, el nivel de contaminantes presente en las hojas de olivo es relativamente bajo y su influencia puede ser eliminada mediante diluciones apropiadas de los extractos.



Efecto de la concentraciones de Mg^{2+} y dNTPs en las reacciones de RAPD.

Figura 1a. Concentraciones crecientes de Mg^{2+} con Aloreña y cebador OPA 19.

Figura 1b. Concentraciones crecientes de dNTPs con Aloreña (izquierda) y Arauco (derecha) con cebador OPB 4.



Perfiles de RAPD amplificados utilizando extractos de ADN de alta y baja pureza.

Figura 2a. Reacciones de RAPD con ADN de alta pureza en concentraciones crecientes de Arbequina (izquierda) y Frantoio (derecha) con cebador OPB 20.

Figura 2b. Productos de RAPD con ADN de baja pureza de Frantoio y cebador OPB 19.

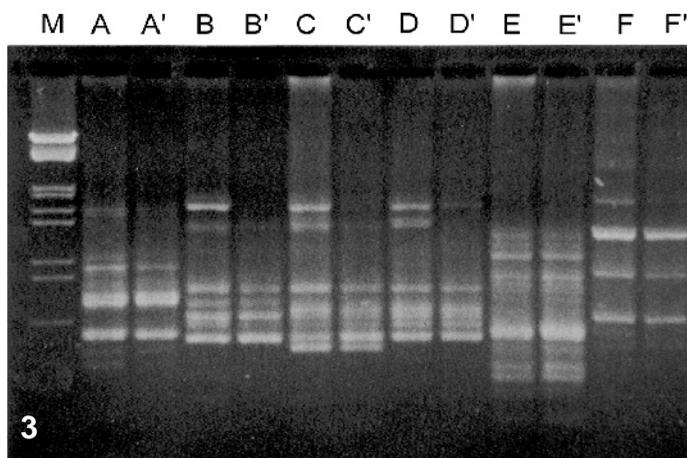


Figura 3. Perfiles de RAPD generados por dos termocicladores, utilizando seis variedades de olivo y cuatro cebadores.

- | | |
|----------------------------------|---------------------------|
| A. Changlot Real y cebador OPB 6 | D. Changlot Real y OPA 19 |
| B. Aloreña y OPA 19 | E. Arbequina y OPB 20 |
| C. Nevadillo y OPA 19 | F. Aloreña y OPB 14 |

Para cada par de letras idénticas, la forma sin apóstrofe y la apostrofada corresponden a los termocicladores MJ Research y Techne Gene Thermocycler, respectivamente.

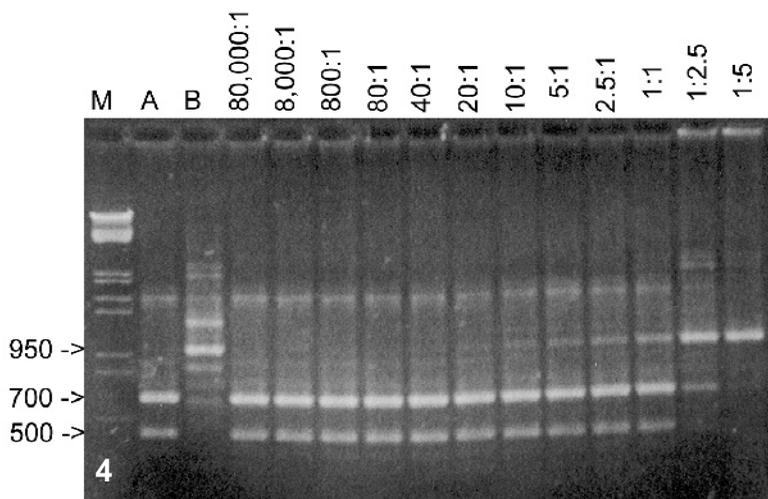


Figura 4. Influencia del ADN contaminante de *Hemiberlesia latastei* sobre los patrones de amplificación de Nevadillo. Para las reacciones de PCR se utilizó una cantidad fija de ADN de olivo (80 ng) los valores de cada "calle" indican la relación $ADN_{olivo}:ADN_{cochinilla}$ en cada reacción. Las fechas indican las bandas específicas de olivo (500 y 700 pb) y de cochinilla (950 pb), junto a sus pesos moleculares estimados.

II. Optimización de la concentración de dNTPs y Mg^{2+} .

Los resultados utilizando concentraciones crecientes de Mg^{2+} en la reacción de PCR mostraron que el mayor número e intensidad de bandas amplificadas se obtuvo utilizando una concentración de 2 mM. La figura 1a (pág. 111) muestra el efecto de diferentes concentraciones de Mg^{2+} sobre los patrones de RAPD generados por la variedad Aloreña con el cebador OPA 19. El mismo experimento utilizando la variedad Nevadillo y el cebador OPB 19 mostró amplificación completa del patrón de bandas, solamente en el caso de 2 mM de $MgCl_2$ (datos no presentados). El número y la intensidad de la bandas amplificadas aumentó al incrementarse la concentración de dNTPs (figura 1b, pág. 111). Este efecto fue mucho más evidente para la variedad Arauco que para la Aloreña. En esta última, sólo se detectó variación en la intensidad del patrón amplificado pero no en el número de bandas. La utilización de otras variedades con otros cebadores (datos no presentados) mostró que el efecto sobre los patrones puede variar en magnitud, dependiendo de la combinación "variedad-cebador". Sin embargo, en todos los casos, las concentraciones óptimas de dNTPs estuvieron entre 100 y 200 μM .

III. Influencia de la calidad y concentración del ADN

No se observaron cambios en los patrones de RAPD para un amplio rango de concentraciones de ADN cuando se utilizaron extractos relativamente puros (considerando de buena pureza extractos con relación de absorbancias $A_{260}/A_{280} = 1,8$ y contenido proteico $\leq 0,3$ mg/ml). Bajo estas condiciones, el patrón de bandas fue reproducible para concentraciones desde 52 a 1040 ng ADN/reacción (figura 2a, pág. 111). Por otro lado, cuando se usó ADN de baja pureza (relación $A_{260}/A_{280} = 1,09$ y contenido de prótidos = 4,2 mg/ml), el patrón de bandas amplificado sólo fue consistente para concentraciones de hasta 60 ng/reacción (figura 2b, pág. 111). El uso de 120 ng/reacción determinó la desaparición de algunas bandas de baja intensidad mientras que concentraciones superiores produjeron total inhibición de la reacción, no pudiéndose visualizar ningún producto de amplificación.

De acuerdo con estos resultados la alta concentración de ADN no sería, en sí misma, la causa de inhibición de reacciones de PCR. Estos resultados sugieren que la inhibición se produce debido a otros contaminantes, como prótidos y polisacáridos muy concentrados en los extractos crudos, sin purificar. Transferidos, junto con el ADN a la solución de reacción, interfieren posteriormente el proceso de amplificación. Para minimizar -y eliminar- esta fuente de error en las reacciones de PCR se diluyeron los extractos de baja pureza. La elevada sensibilidad de la reacción de PCR y la baja cantidad de ADN requerida permiten utilizar extractos diluidos, con baja concentración de contaminantes. Se ha sugerido diluir los extractos de ADN para eliminar el efecto inhibitorio de los polisacáridos en la muestra (13).

IV. Influencia de la temperatura de apareamiento de cebadores, termociclador y Taq polimerasa

Se han recomendado temperaturas de apareamiento de 5 °C por debajo de la temperatura de "melting" (T_m) de cada cebador (10). A pesar de que son aconsejables temperaturas de apareamiento en relación a la T_m de cada cebador, en gene-

ral, en las reacciones de RAPD-PCR, se utiliza una única temperatura de apareamiento (en este trabajo: 35 °C), independientemente del cebador utilizado. Debido a ello es posible la ocurrencia de apareamientos inespecíficos entre cebador y ADN molde, produciendo bandas no-específicas de baja reproducibilidad. El incremento de la temperatura de apareamiento, dentro de un determinado rango, aumenta la especificidad cebador-ADN. Debido a la naturaleza amplificadora y competitiva de la reacción de PCR, los primeros ciclos de la reacción resultan particularmente críticos sobre la especificidad de los productos obtenidos. En este trabajo no se observaron diferencias en los patrones al aumentar la temperatura de apareamiento de 35 a 36,5 °C en los primeros 10 ciclos de amplificación, para ninguna de las combinaciones "cebador:variedad" ensayadas. Tampoco se observaron diferencias al utilizar 36,5 °C a lo largo de todo el proceso de amplificación.

Aparentemente, bajo estas condiciones de reacción y para el rango de temperaturas evaluado, el apareamiento inespecífico entre cebador y ADN molde, no es un fenómeno frecuente. La evaluación de un rango más amplio de temperaturas de apareamiento probablemente permitiría aumentar el rango de temperaturas utilizables sin comprometer la especificidad de los productos obtenibles.

Desde el punto de vista de la utilidad de un marcador molecular, es sumamente importante que sea repetible en las condiciones experimentales establecidas para el mismo. Debido a la gran cantidad de factores involucrados en las reacciones de RAPD, la repetibilidad de los patrones, entre laboratorios, ha sido cuestionada. Se ha sugerido que, si durante el proceso de amplificación las temperaturas dentro de los tubos son idénticas, los productos de RAPD deberían ser reproducibles (15). Si bien las temperaturas y tiempos establecidos para cada ciclo de reacción pueden programarse en los distintos tipos de termocicladores utilizados por los laboratorios, las velocidades de ascenso y descenso (ramping temperatures), así como el tipo de microtubos adaptables al block térmico, suelen ser propios de cada diseño. Estos dos factores influyen sobre la marcha de transmisión de temperaturas desde el block hacia las paredes del tubo y desde éstas hacia la solución de reacción, determinando procesos termodinámicos similares pero no idénticos. Esta fuente de variación, sumada a la baja temperatura de apareamiento de cebadores cortos de baja exigencia de homología con el ADN molde, puede afectar la reproducibilidad de los marcadores RAPD entre laboratorios.

Para corroborar esta hipótesis se probaron otros dos termocicladores de diferentes laboratorios. Los patrones obtenidos por la marca Biometra UNO Thermoblock fueron idénticos a los amplificados en el termociclador empleado, para todas las variedades y cebadores ensayados. Sin embargo, la mayoría de los patrones amplificados por Techne Gene E Thermocycler presentaron variaciones respecto de los amplificados por los otros dos termocicladores. En los primeros se observó una disminución de la intensidad y la pérdida completa de algunas bandas de alto peso molecular (entre 1300 y 1500 pb) (figura 3, pág. 112). Debido a su baja reproducibilidad, estas bandas no deberían considerarse como marcadores utilizables en la identificación varietal. Las demás bandas, de menor peso molecular (< 1000 pb), fueron conservadas en número, tamaño e intensidad.

Otros autores (2, 7) han reportado variaciones similares entre patrones de RAPD amplificados por distintos tipos de termocicladores. De acuerdo con estos resultados, el tipo de termociclador sería otro factor adicional a estandarizar cuando se pretende utilizar, en forma confiable, los marcadores RAPD desarrollados por otros laboratorios. Se han mencionado variaciones en los patrones de RAPD al utilizar diferentes Taq polimerasas, observándose que dicha variación dependía del cebador utilizado (17, 18). En nuestros experimentos, la comparación entre dos Taq polimerasas arrojó resultados coincidentes con aquellos reportados previamente. El cebador OPB 6 produjo el mismo fenotipo de bandas, independientemente de la enzima usada, mientras que los cebadores OPB 14, OPB 20 y OPB 19 presentaron variaciones enzima-dependiente de los patrones generados.

V. Contaminación de las reacciones con DNA de otro organismo

El agregado de ADN contaminante de *Hemiberlesia latastei* a la solución de reacción mostró alteraciones del patrón típico de olivo para relaciones de contenido de ADN_{olivo}:ADN_{cochinilla} iguales o menores a 40:1. Los mismos resultados se obtuvieron con ambas variedades (Farga y Nevadillo) y los cebadores (OPA 19 y OPB 6) ensayados. La figura 4 (pág. 112) muestra que, para relaciones de ADN_{olivo}:ADN_{cochinilla} de 40:1, la banda específica de *H. latastei* (de 950 pb), está presente en forma tenue, apenas perceptible, en el patrón de Nevadillo. La intensidad de dicha banda aumenta progresivamente a medida que se incrementa la proporción de ADN de cochinillas, haciéndose claramente visible a partir de proporciones de 10:1. De acuerdo con estos resultados la presencia de ADN contaminante en las reacciones de RAPD, en proporciones de una décima parte (o aun menores) respecto al contenido de ADN molde, puede afectar los patrones de amplificación. Por ello, la selección de tejidos sanitariamente sanos para la extracción de ADN, es crucial para evitar amplificación de bandas no específica. Asimismo, ensayar diferentes muestras de una misma variedad puede ayudar a identificar bandas foráneas, distintas de las específicas del olivo.

La optimización previa de las variables involucradas en las reacciones de RAPD-PCR es necesaria, para poder utilizar esta técnica como un método confiable de identificación varietal. Los resultados obtenidos, resumidos en la tabla de pág. 116, permitieron optimizar y estandarizar nuestros protocolos para las reacciones de RAPD. Las condiciones óptimas seleccionadas fueron utilizadas para evaluar la reproducibilidad de marcadores RAPD previamente desarrollados, seleccionando y utilizándose aquellos altamente consistentes para la identificación de cultivares de olivo argentinos (3, 4).

Entre las técnicas de marcadores moleculares disponibles, como RAPD, RFLP, AFLP o SSR, RAPD es probablemente la más barata y operativamente simple de ellas (16) porque no requiere información previa sobre secuencias nucleotídicas y no incluye manejo de radioactividad para la revelación de los patrones. Sin embargo, previamente, es necesario, optimizar y estandarizar aquellas variables involucradas en la reacción. Una cuidadosa selección de tejidos sanos para la extracción del ADN y la disminución de la concentración de sustancias contaminantes

Optimización de las variables involucradas en el análisis de RAPD

| Variables | Rango evaluado | Condición óptima seleccionada |
|--|---|-------------------------------|
| Pureza y concentración (ng/reacción) del ADN | Baja pureza ($A_{260}/A_{280} = 1,09$, concentración de prótidos = 4,2 mg/ml): 10-20-40-60-120-280-560 | 20 a 60 |
| | Alta pureza ($A_{260}/A_{280} = 1,80$, conc. de prótidos = 0,3mg/ml): 52-120-260-520-1040 | 52 a 260 |
| Concentración de $MgCl_2$ (mM) | 1-2-3-4-6-8 | 2 |
| Concentración de dNTPs (μM) | 25-50-75-100-200 | 200 |
| Temperatura de apareamiento de cebadores ($^{\circ}C$) | 35 (45 ciclos) 36,5 (x 10 ciclos) seguido de 35 (x 35 ciclos) 36,5 (x 45 ciclos) | 35 (x 45 ciclos) * |
| Termocicladores | MJ Research PTC-100 Biometra UNO Thermoblock Techne Gene E | MJ Research PTC-100 |
| Taq polimerasas | Promega TM – Amplitaq TM | Promega TM |
| Contaminación del ADN (ADN _{olivo} : ADN _{foráneo}) | 80 000-8 000-800-80-40-20-10-5-2,5-1-0,4-0,2 | > 40 |
| Edad de los tejidos | Hojas jóvenes, adultas y senescentes | hojas jóvenes * |

* No se observaron diferencias dentro del rango evaluado. Para estas variables, la selección de la condición óptima obedeció a una conveniencia operativa.

en los extractos de ADN (por ejemplo, diluyendo los extractos de baja pureza) puede aumentar la reproducibilidad de la técnica y la confiabilidad del análisis. Desde otro punto de vista, la conversión de marcadores RAPD a marcadores más robustos como SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions)(14) o STS (Sequence Tagged Sites) (12) permitiría reducir los problemas asociados con el uso de RAPDs.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barranco, D. and Rallo, L. 1984. Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía. Min. de Agric., Pesca y Aliment. España. pp 107-111.
2. Buscher, N.; Zyprian, E. and Blaich, R. 1993. Identification of grapevine cultivars by DNA analysis: Pitfalls of random amplified polymorphic DNA techniques using 10mer primers. *Vitis* 32: 187-188.
3. Cavagnaro, P. et al. 2001. Discriminación de variedades de olivo a través del uso de caracteres morfológicos y de marcadores moleculares. *Agriscientia*, Vol. XVIII: 27-35. Córdoba. Argentina.
4. Cavagnaro, P. F. y Masuelli, R. W. 2002. La homogeneidad varietal en viveros de olivo estudiada con marcadores moleculares. *Rev. FCA UNCuyo*. Tomo XXXIV. N° 2: 17-26.
5. Cresti, M. et al. 1996. Preliminary communication about the identification of DNA in leaves and in olive oil of *Olea europaea*. *Adv. Hort. Sci.* 10:105-107.

6. Dellaporta, S. L.; Wood, J. and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant. Mol. Biol. rep.* 1:19-21.
7. Devos, K. M. & Gale, M. D. 1992. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 84:567-572.
8. Fabbri, A.; Hormaza, J. I. & Polito, V. S. 1995. Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europea* L.) cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120(3):538-542.
9. Heun, M. and Helentjaris, T. 1993. Inheritance of RAPDs in F1 hybrids of corn. *Theor. App. Genet.* 85:961-968.
10. Innis, M. A. and Gelfand, D. H. 1990. PCR protocols: A guide to methods and applications In: M. A. Innis et al. (eds). Academic Press. New York.
11. Maniatis, T.; Fritsch, E. F. and Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor. N.Y.
12. Olson, M. et al. 1989. A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 245:1434-1435.
13. Pandey, R. N.; Adams, R. P. and Flournoy, L. E. 1996. Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. *14 (1):17-22.*
14. Paran, I. and Michelmore, W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to down mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85:985-993.
15. Penner, G. A. et al. 1993. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Meth. Appl.* 2:341-345.
16. Ragot, M. and Hoisington, D. A. 1993. Molecular markers for plant breeding: comparison of RFLP and RAPD genotyping costs. *Theor. Applied Genet.* 86:975-984.
17. Staub, J. E. and Serquen, F. C. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Hortscience.* 31(5):729-741.
18. Staub, J. E. et al. 1996. Sources of potential errors in the application of random amplified polymorphic DNAs in cucumber. *Hortscience.* 31 (2):262-266.
19. Williams, J. G. et al. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids. Res.* 18:6531-6535.
20. _____. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. In: R. Wu (ed). *Methods in enzymology.* Vol. 218: 704-740. Academic Press. New York.
21. Yoon, C. S. & Glawe, D. A. 1993. Pretreatment with RNase to improve PCR amplification of DNA using 10-mer primers. *BioTechniques* 14:908-910.

Agradecimientos

A Oscar Cioca (Centro Regional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas) y Juan Pablo Raimondi (EEA INTA Balcarce) por el uso de los termocicladores de sus laboratorios.



Publicación diagramada en el Centro Coordinador de Ediciones Académicas, Facultad de Ciencias Agrarias, UNCuyo. Mayo 2003.



Tirada: 500 ejemplares

Printed in Mendoza, Argentina
Impreso en Mendoza, Argentina