

MÉTODO MODIFICADO DE OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO EN ORQUÍDEAS (*Cattleya* spp.) PARA AMPLIFICACIÓN CON MARCADORES MOLECULARES

Iris Pérez-Almeida¹, Luis Angulo Graterol¹, Gustavo Osorio¹, Catalina Ramis², Ángela María Bedoya², Rosana Figueroa-Ruiz³, Sandy Molina⁴ y Diógenes Infante⁴

RESUMEN

Dado que la eficacia de los distintos protocolos existentes para aislar ADN en cantidad y calidad suficiente puede diferir según el cultivo, es necesario estandarizar los métodos de extracción para garantizar su sencillez y efectividad. En este trabajo se propone una modificación al método de Risterucci et al. (2000) el cual fue comparado con otros protocolos para la extracción de ADN de hojas de *Cattleya* spp. con el fin de seleccionar el método más apropiado a usar en el análisis del potencial genético de estas especies a través de marcadores moleculares como RAPD e ISTR. Con el método propuesto se obtuvo ADN similar al obtenido utilizando un *kit* comercial, ya que ambas metodologías produjeron ADN en apropiada cantidad y calidad. El método ofrece ventajas sobre otros protocolos, principalmente debido al reducido número de pasos para la obtención del ADN, facilidad de ejecución y, en especial, su alta estabilidad, lo cual le favorece en aquellos casos en que se requiera procesar muchas muestras simultáneamente, minimizando las posibilidades de contaminación accidental.

Palabras clave adicionales: Diversidad genética, ISTR, RAPD

ABSTRACT

Modified method to obtain genomic DNA from orchids (*Cattleya* spp.) for amplification with molecular markers

Since the effectiveness of the different protocols for isolating DNA in sufficient quantity and quality may vary depending on the crop, it is necessary to standardize the extraction methods to ensure its simplicity and effectiveness. In this paper we propose a modification to the method of Risterucci et al. (2000), which was compared with other protocols to extract DNA from leaves of *Cattleya* spp. to select the most appropriate method to use for analyzing the genetic potential of the species through molecular markers such as RAPD and ISTR. With the proposed method the obtained DNA was similar to that extracted using a commercial kit, since both methods produced DNA in appropriate quantity and quality. The method offers advantages over other protocols, mainly because the low number of steps for obtaining DNA, ease of implementation and especially, high stability, which is favorable in cases where it is required to process many samples, reducing the possibility of accidental contamination.

Additional key words: Genetic diversity, ISTR, RAPD

INTRODUCCIÓN

El género *Cattleya* tiene una distribución neotropical que abarca desde México, América Central, Brasil, Venezuela, hasta Perú (Foldats, 1970). Venezuela, Colombia y Brasil se han caracterizado por poseer el mayor número de orquídeas silvestres (Yanes, 1959). Existe una gran diversidad dentro de las orquídeas a nivel tanto reproductivo como vegetativo, además de su variación en tamaño y color. Tal situación

dificulta el trabajo de identificación y descripción de las mismas, para lo cual es importante contar con herramientas más precisas que permitan establecer con certeza una jerarquía de categorías donde pueda registrarse fácilmente la información de las especies, considerando a la especie como la única unidad tangible en la naturaleza que tiene la capacidad para mutar y por ende a evolucionar (Dunsterville y Garay, 1966).

El uso de marcadores moleculares permite estudiar y analizar el potencial genético de una

Recibido: Mayo 17, 2010

Aceptado: Diciembre 17, 2010

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, CENIAP. Apdo. 4653. Maracay. Venezuela. email: iperez@inia.gob.ve

² Centro Investigaciones Biotecnología Agrícola, Facultad de Agronomía, UCV. Apdo. 4579. Maracay. Venezuela.

³ Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay. Venezuela.

⁴ Centro Nacional de Biotecnología Agrícola, Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Caracas. Venezuela

población, con mayor precisión. De este modo se puede determinar la diversidad genética, necesaria para estudiar prácticas de manejo y conservación, incluso de las especies en riesgo de extinción. Sin embargo, la viabilidad de estos estudios es limitada por la dificultad de aislar ADN, en cantidad y calidad suficiente, desde pequeñas muestras de tejido (Aranishi, 2006). Es necesario estandarizar los métodos de extracción de ADN utilizados en *Cattleya* spp. y garantizar su sencillez y eficacia. Además se deben establecer los métodos apropiados de muestreo, tipo de tejido a utilizar y protocolos viables de extracción del ADN (Lopera-Barrero et al., 2008).

Uno de los principales inconvenientes técnicos en el aislamiento y purificación del ADN vegetal es la obtención simultánea de fenoles, polisacáridos, otros productos secundarios, así como la poca cantidad y calidad del ADN obtenido (Molinari y Crochemore, 2001). Entre los protocolos de extracción del ADN más utilizados en diferentes especies se destaca el descrito por Dellaporta et al. (1983). Generalmente se realizan algunas modificaciones en la composición del tampón de extracción, integrando un agente para estabilizar el pH a 8; una sal para disociar las proteínas; un detergente para solubilizar las membranas e inactivar la acción de algunas enzimas, y un inhibidor de la ADNasa para proteger el ADN (Bered, 1998). Los componentes más frecuentes para la degradación y rompimiento de las membranas celulares son dodecil sulfato de sodio (SDS) (Dellaporta et al., 1983); bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Doyle y Doyle, 1991); o sacarosa (Cheung et al., 1993). Sin embargo, variaciones en la eficiencia de lisis, el rendimiento y la pureza del ADN pueden afectar los resultados de técnicas moleculares, como la PCR (Fraga et al., 2004). En orquídeas se encuentran reportados algunos métodos de extracción, como el de Benner et al. (1995), el cual utiliza fenol.

Otro método que se emplea en la extracción de ADN es el desarrollado por Risterucci et al. (2000), el cual es un procedimiento robusto utilizado en especies arbóreas, y ha sido probado con éxito en plantas con tejido foliar coriáceo y suculento, como el de las orquídeas (Pardo et al., 2008). Por su parte, Zambrano et al. (2002) obtuvieron ADN de *Saccharum* spp, *Musa* sp y *Manihot esculenta* mediante un protocolo

económico y rápido que fue validado a través de su amplificación mediante RAPD.

El análisis de ADN genómico de plantas es realizado frecuentemente a través de amplificaciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) reduciendo la necesidad del aislamiento de grandes cantidades de ADN (Zambrano et al., 2002). En sus estudios, estos autores desarrollaron un protocolo rápido de extracción para amplificación por RAPD.

El empleo de técnicas moleculares precisa de un método de extracción de ADN genómico lo más estandarizado posible, con el cual se obtenga un ADN puro, no degradado, libre de ARN y de inhibidores de la PCR (Fraga et al., 2004).

El presente estudio fue planteado con el objetivo de encontrar un método simple, reproducible, rápido y económico para la obtención de ADN en orquídeas (*Cattleya* spp.) destinado a estudios con marcadores moleculares, tales como RAPD e ISTR. Para ello se compararon cuatro protocolos de extracción en muestras de hojas de esta planta.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal consistió en tejido foliar joven sin daños mecánicos y libre de enfermedades de dos especies de orquídeas: *Cattleya violacea* y *Cattleya mossiae*. Las muestras fueron colectadas en vivero en San Cristóbal, estado Táchira y El Hatillo, estado Miranda, y transportadas a bajas temperaturas hasta el Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigaciones de Biotecnología Agrícola (CIBA), Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. En todos los casos, el tejido foliar (0,2-0,5 g) fue pulverizado con nitrógeno líquido.

Para comparar la efectividad de obtención de ADN genómico se utilizaron cuatro (4) protocolos reportados en la literatura: Dellaporta et al. (1983) modificado en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, 1995), el Kit Wizard Genomic DNA de la casa comercial Promega (1998), Risterucci et al. (2000) modificado en este trabajo, y Zambrano et al. (2002). No se consideró utilizar el protocolo propuesto por Benner et al. (1995), el cual utiliza fenol, debido a las características nocivas de este reactivo.

A continuación se describen los pasos

seguidos en cada protocolo.

I. Dellaporta et al. (1983) modificado en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, 1995)

El tejido macerado se colocó en tubos de microcentrifuga (1,5 mL), agregando 1 mL de tampón. Se incubaron los tubos a 65 °C por 45 minutos con agitación. Se agregó 0,4 mL de acetato de potasio incubando en hielo por 30 min. Se centrifugó a 8.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrifuga nuevo. Se agregó un volumen igual de isopropanol frío (-20 °C) y 1/10 del volumen de acetato de sodio (3M, pH 5,2). Los tubos fueron incubados a -20 °C por 1 h. Se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Se lavó el precipitado con 400 µL de etanol al 70 % frío y se dejó secar bien. Fue resuspendido en 75 µL de tampón TE. Se le agregó 1 µL de ARNasa incubando por 30 minutos a 37 °C.

II. Kit Wizard Genomic DNA de la casa comercial Promega (1998)

Todas las soluciones empleadas fueron adquiridas en la casa comercial.

El tejido vegetal macerado fue colocado en tubos de microcentrifuga de 1,5 mL. Se agregó a cada tubo la solución de lisis nuclear (NLS) y se aplicó vortex 1-3 s. Se incubaron a 65 °C durante 15 min. Se agregó la solución de ARNasa. Los tubos fueron incubados a 37 °C por 15 min. Luego fueron colocados sobre hielo durante 5 min. Se agregó la solución de precipitación de proteínas (PPS). Se centrifugaron los tubos a 14.000 rpm por 3 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 1,5 mL con isopropanol. Los tubos se centrifugaron a 14.000 rpm por 1 minutos. El sobrenadante fue descartado y se agregó etanol 70 %. Se centrifugó durante 1 minuto a 14.000 rpm. El precipitado se dejó secar unos 30 min. Se agregaron 100 µL de solución de rehidratación del ADN (RS) y los tubos se colocaron una hora a 65 °C, mezclando y agitando con frecuencia, para su almacenaje final a -20 °C.

III. Risterucci et al. (2000) modificado en este trabajo

1. En tubos de 30 mL se colocaron 0,5 g del tejido macerado y se agregó 5 mL del tampón de extracción (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1,4M NaCl,

20 mM EDTA, 2 % CTAB, 1 % polietileno-glicol y 0,5 % de sulfito de sodio), precalentado a 74 °C. Se aplicó vortex por 3 s (en el protocolo original se utilizan 75 °C para el precalentamiento e incubación).

2. Los tubos fueron incubados a 74 °C durante 20 min, se les aplicó vortex por 10 s y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

3. Se agregaron 5 mL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) a cada tubo y se agitaron por inversión unas 50 veces, para ser centrifugados a 10.000 rpm durante 15 min.

4. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo con 5mL de isopropanol frío, agitando suavemente hasta observar la formación del pelet de ADN.

5. Los tubos fueron colocados un mínimo de 2 h a -20 °C. Con la ayuda de una pipeta Pasteur moldeada se transfirió el pelet a un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL y se resuspendió entre 500 a 1.000 µL de TE (50 mM Tris-HCl, 0,7 M NaCl 10 mM EDTA).

A continuación se mencionan los siguientes pasos, los cuales constituyen modificaciones al protocolo de Risterucci et al. (2000) realizadas en este trabajo:

1. Al pelet resuspendido se le agregaron 500 µL de TE 1X y 50 µL de acetato de sodio 3M pH 5,2, para mezclar por inversión de los tubos.

2. Se agregaron 500 µL de isopropanol frío, mezclando por inversión los tubos y colocándolos sobre hielo durante 20 min. Los tubos fueron centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante descartado y el pelet se lavó dos veces con 500 µL de etanol 70 %.

3. El etanol fue descartado y se dejó secar el tubo a temperatura ambiente.

4. Se agregaron 100-500µL TE 1X para resuspender el ADN.

IV. Zambrano et al. (2002)

Se colocó el material vegetal pulverizado en tubos de microcentrifuga de 1,5 mL. Luego se adicionó el tampón de extracción 2X CTAB incubando a 65 °C durante 30 minutos Se agregaron 300 µL de acetato de potasio (3M, pH 4,8), incubando sobre hielo por 15 min. Se centrifugaron 10 min a 14.000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se adicionaron 500 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), centrifugando nuevamente. La fase superior se

transfirió a otro tubo agregando igual volumen de isopropanol frío y se incubó en hielo por 60 minutos. El pellet de ADN fue lavado dos veces con etanol frío al 70 %, y se dejó secar a temperatura ambiente por 30 min. Finalmente se resuspendió el ADN en 75 μL de tampón TE para ser almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Cuantificación del ADN obtenido

Se determinó la cantidad y calidad del ADN obtenido a partir de cada método de extracción, utilizando ADN del fago lambda no digerido como marcador estándar. Se corrieron las muestras en geles de agarosa al 1 %, por electroforesis horizontal a 70 V por 45 min, en tampón TBE 0,5X (250 mM de Tris-HCl, 30 mM de ácido bórico y 42 mM de EDTA). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio ($0,5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), se visualizaron bajo luz UV en un transiluminador y se capturaron sus imágenes en un analizador de imágenes BIO-RAD Gel Doc XR.

Adicionalmente la cantidad y calidad del ADN fue determinada midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro Nano Drop ND-1000. Se verificó la estabilidad de la concentración de los ADN obtenidos y la relación A_{260}/A_{280} nm, como índice de pureza, transcurrida una semana de la extracción, almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Además, se determinó el porcentaje de estabilidad de la concentración de las muestras, relacionando la concentración final de cada muestra entre la inicial. En cada uno de los métodos se utilizaron dos especies de *Cattleya* y dos repeticiones, para un total de 16 observaciones.

El ADN genómico obtenido con los cuatro métodos fue amplificado vía PCR utilizando los marcadores moleculares RAPD e ISTR. Las muestras del ADN se diluyeron a $20\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ en tampón TE (10 mM de Tris-HCl a pH 8,0 y 1mM de EDTA). Luego se procedió a su validación a través de la amplificación con iniciadores aleatorios RAPD de la Unidad de Biotecnología Agrícola del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP), Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), y marcadores ISTR proporcionados por el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Biotecnología Agrícola de la Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA).

- RAPD. La mezcla de $15\text{ }\mu\text{L}$ de reacción PCR

consistió en Tampón 1X, 2,5 mM MgCl_2 , 0,17 mM de cada uno de los dNTP's, $0,67\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSA, $1,33\text{ }\mu\text{M}$ del cebador Operón (OPC-02 y OPC-05), $0,16\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Taq y $20\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de ADN. La amplificación se realizó en un termociclador PTC 200 DNA Engine Cycler BIO-RAD, en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos, seguida por 45 ciclos de amplificación a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto, hibridación a $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s y extensión $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos. Se realizó un ciclo final de extensión a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 minutos. La separación de los productos de RAPD-PCR se realizó en geles de agarosa 3 %, corridos durante 2,5 horas a 80 V y teñidos con bromuro de etidio. Los geles fueron visualizados bajo luz UV y fotografiados como ya se indicó.

- ISTR: La mezcla de $15\text{ }\mu\text{L}$ de reacción de PCR estuvo constituida por Tampón 1X, 3mM MgCl_2 , 0,17 mM de cada uno de los dNTP's, $0,33\text{ }\mu\text{M}$ iniciador ISTRF y $0,33\text{ }\mu\text{M}$ iniciador ISTRB, $1\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Taq y $20\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ del ADN. Las combinaciones empleadas en la amplificación por PCR de los iniciadores fueron F1/B10, F4/B10 y F10/B10 en un termociclador Applied Biosystems 2700. Las condiciones de amplificación fueron desnaturalización inicial a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificación a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s, $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto y $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos. El ciclo final de extensión fue a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. La separación de los productos amplificados ISTR-PCR se realizó en gel de poliacrilamida al 6 % y se visualizó en un analizador de imágenes Typhoon 9410.

Los resultados del ADN amplificado se presentan como imágenes de las corridas electroforéticas. Las concentraciones de ADN y pruebas de estabilidad se presentan en función de los promedios y su dispersión. Asimismo, los valores se analizaron estadísticamente, de acuerdo con un diseño completamente al azar empleando el programa estadístico SAS (Cary, NC); cuando el análisis de la varianza detectó diferencias significativas se efectuó la prueba de comparación de medias de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La integridad del ADN extraído mediante los cuatro métodos fue corroborada mediante la

electroforesis en geles de agarosa. Se obtuvo ADN genómico de una forma sencilla y de calidad (Figura 1).

El promedio de las concentraciones obtenidas de las dos especies de orquídeas fue mayor por el método de Zambrano et al. (2002) (Cuadro 1). Sin embargo, la mayor estabilidad y menor degradación en el tiempo correspondió a los ADN obtenidos por los protocolos de Risterucci et al. (2000) modificado y Promega (1998), mientras que hubo poca estabilidad de los ADN extraídos según Zambrano et al. (2002) y Dellaporta et al. (1983) modificado, en los que se observó una importante degradación (Figura

2). Los métodos de extracción de Risterucci et al. (2000) modificado y Promega (1998) produjeron los valores más estables en cantidad y calidad del ADN, indicativos de baja contaminación de ARN, proteínas u otras sustancias (estabilidad promedio de 87,3 y 90,3 %, para cada método, respectivamente), así como un buen índice de pureza dado que la mayoría de los valores de la relación A_{260}/A_{280nm} estuvo en el rango 1,8-2,0. Los métodos de Zambrano et al. (2002) y Dellaporta (1983) modificado mostraron baja estabilidad (promedios de 41,1 y 56,5 %, respectivamente) y valores de A_{260}/A_{280nm} menores a 1,8 (Cuadros 1 y 2).

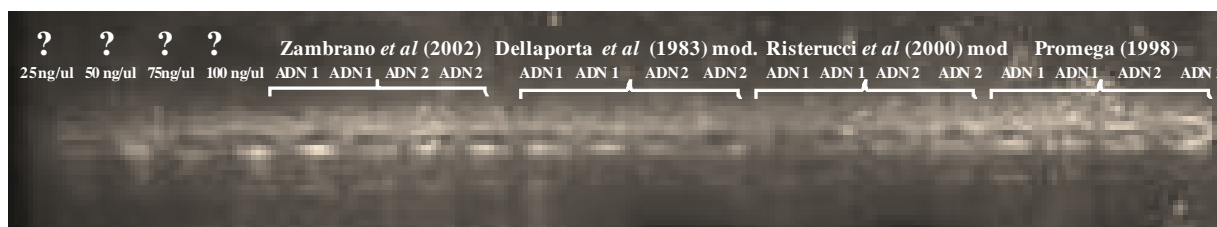


Figura 1. Visualización de la cantidad y calidad del ADN extraído a través de cuatro métodos diferentes en *Cattleya violacea* (1) y *C. mossiae* (2)

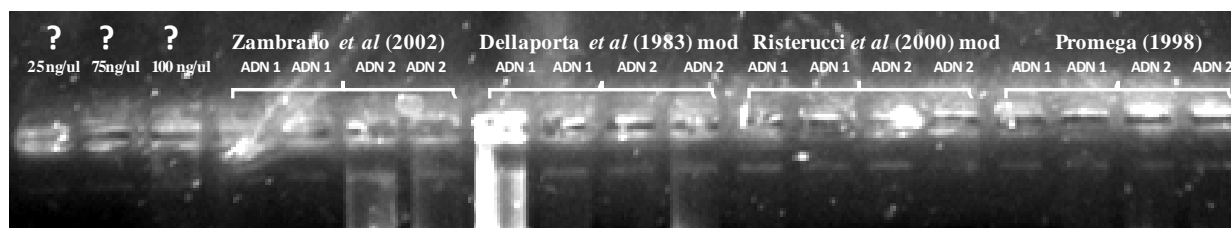


Figura 2. Visualización de la cantidad y calidad del ADN una semana después de su extracción a través de cuatro métodos diferentes en *Cattleya violacea* (1) y *C. mossiae* (2)

Cuadro 1. Cuantificación, calidad y estabilidad del ADN de las dos especies de *Cattleya* ($\bar{X} \pm SD$); n=2

Método de extracción	Especie	Concentración inicial del ADN ($ng \cdot \mu L^{-1}$)	Relación A_{260}/A_{280}	Concentración luego de 7 días ($ng \cdot \mu L^{-1}$)	Relación A_{260}/A_{280}	Estabilidad (%)
Dellaporta et al. (1983)	<i>C. violacea</i>	110,0±63,6	2,06±0,21	82,5±47,4	1,58±0,10	75,1±0,4
	<i>C. mossiae</i>	92,5±24,8	1,67±0,06	33,0±5,7	1,65±0,07	37,9±16,2
Promega (1998)	<i>C. violacea</i>	192,5±10,6	1,89±0,14	168,5±12,0	1,85±0,18	87,8±11,1
	<i>C. mossiae</i>	95,0±14,1	1,79±0,14	88,5±17,7	1,68±0,17	92,8±4,8
Risterucci et al. (2000)	<i>C. violacea</i>	106,5±12,0	1,88±0,06	99,0±22,6	1,83±0,05	92,4±10,8
	<i>C. mossiae</i>	127,5±88,40	1,89±0,14	105,5±74,3	1,84±0,22	82,4±1,2
Zambrano et al. (2002)	<i>C. violacea</i>	175,0±35,4	1,80±0,13	85,0±42,4	1,62±0,04	47,1±14,7
	<i>C. mossiae</i>	177,5±46,0	1,72±0,12	59,0±8,5	1,50±0,21	35,0±13,9

Cuadro 2. Estabilidad y absorbancia de la concentración del ADN luego de una semana de obtención mediante cuatro métodos de extracción en orquídeas (*Cattleya* spp.)

Método de extracción ADN genómico	Estabilidad (%)	Relación A ₂₆₀ /A ₂₈₀
Promega (1998)	90,3 a	1,765 a
Risterucci et al. (2000) modificado	87,3 a	1,835 a
Dellaporta et al. (1983) modificado	56,5 b	1,615 b
Zambrano et al. (2002)	41,1 b	1,560 b

Medias seguidas de letras distintas son estadísticamente diferentes según la prueba de Duncan ($P \leq 0,05$)

El método de Dellaporta et al. (1983) fue el procedimiento de extracción que requirió mayor cantidad de muestra y mayor tiempo para su ejecución (más de un día). Las otras metodologías necesitaron sólo 3-4 h para obtener los resultados (Cuadro 3).

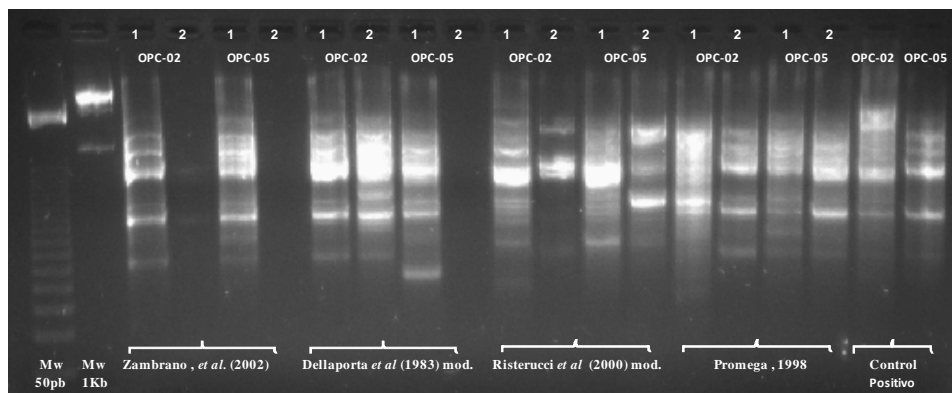
Al utilizar el ADN genómico obtenido, para su amplificación en la prueba de validación vía PCR-RAPD, sólo se observó amplificación de ambos cebadores con ADN extraído por

Risterucci et al. (2000) modificado y Promega (1998) (Figura 3). Usando el ADN extraído por el método de Zambrano et al. (2002), sólo se logró la amplificación para el ADN de *Cattleya violacea*.

El ADN de *Cattleya mossiae* obtenido por el método Dellaporta et al. (1983) modificado no se amplificó con el cebador OPC-05, posiblemente debido a baja estabilidad y degradación a través del tiempo.

Cuadro 3. Cantidad de muestra utilizada y tiempo de duración de los cuatro métodos de extracción

Criterio de comparación	Protocolo de Extracción			
	Dellaporta et al. (1983) modificado	Promega (1998)	Risterucci et al. (2000) modificado	Zambrano et al. (2002)
Muestra (g)	2	0,4	0,5	1
Tiempo de duración	1 d y 4 h	3 h	4 h	3 h

**Figura 3.** Amplificación PCR-RAPD del ADN obtenido mediante cuatro métodos diferentes en *Cattleya violacea* (1) y *C. mossiae* (2). Control positivo: ADN de *Oryza sativa* extraído por el método Dellaporta et al. (1983) modificado

Por su parte, en la prueba de validación vía PCR-ISTR, se observó la amplificación en todas las combinaciones de marcadores (Figura 4). El protocolo de Risterucci et al. (2000) modificado presentó mejor definición en las bandas obtenidas si se compara con las otras tres metodologías propuestas, posiblemente por su alta estabilidad (87,3 %) y calidad

($A_{260}/A_{280}=1,835$).

La metodología y las modificaciones al protocolo de Risterucci et al. (2000) propuestas en este estudio, confirman la obtención de un ADN de calidad a partir de hojas de *Cattleya* spp., libre de contaminantes, estable en el tiempo y sin sobreestimación en su cuantificación, a través de un procedimiento sencillo.

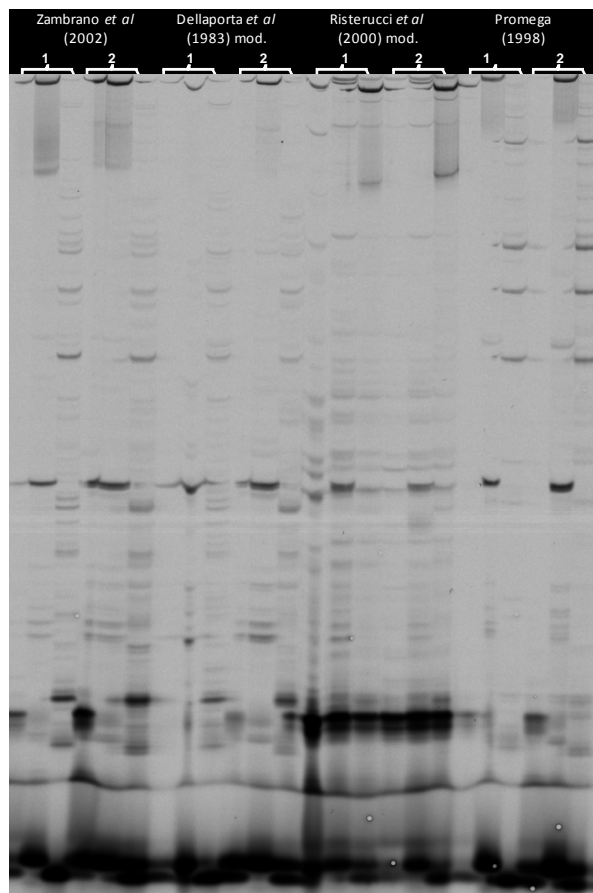


Figura 4. Amplificación PCR-ISTR del ADN obtenido mediante cuatro métodos diferentes en *Cattleya violacea* (1) y *C. mossiae* (2)

CONCLUSIONES

Se logró adaptar un protocolo simple, reproducible, rápido y económico a partir del método básico propuesto por Risterucci et al. (2000) con las modificaciones aquí señaladas, con el cual se aísla ADN de calidad y estable a partir de hojas de *Cattleya* spp. a utilizar con marcadores moleculares como RAPD e ISTR.

LITERATURA CITADA

- Aranishi, F. 2006. Single fish egg DNA extraction for PCR amplification. *Conservation Genetics* 7:153-156.
- Benner, M., M. Braunstein y M. Weisberg. 1995. Detection of DNA polymorphism within the genus *Cattleya* (Orchidaceae). *Plant Mol. Biol. Rep.* 13:147-155.
- Bered, F. 1998. Extracción de ADN: consideraciones prácticas. In: S. Milach (ed.). *Marcadores Moleculares en Plantas*. UFRGS. Porto Alegre, Brasil. pp. 91-98.
- Cheung, W., N. Hubbert y B. Landry. 1993. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. *Technical Tips*. 3: 69-70.
- CIAT. 1995. *Protocolos para marcadores moleculares*. D. González, N. Palacios, G. Gallego y J. Tohme J. (comp. y eds.). Unidad de Biotecnología, Publicación N° 258. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 82 p.
- Dellaporta, S., J. Wood y J. Hicks. 1983. A plant miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Report* 1: 19-20.
- Doyle, J.J. y J.L. Doyle. 1991. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 1:13-15.
- Dunsterville, G. y L. Garay. 1966. *Venezuelan Orchids*. Vol. 4. Andre Deutsch. Cambridge, Massachusetts. 344 p.
- Foldats, E. 1970. Orchidaceae. In: T. Lasser (ed.). *Flora de Venezuela*. Instituto Botánico de Venezuela. Caracas. pp. 122-135.
- Fraga, J., J. Rodríguez, O. Fuentes, M. Castex y A. Fernández-Calienes. 2004. Comparación entre cinco métodos para la extracción de ADN de triatomíneos: Su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 56: 208-213.
- Lopera-Barrero, N., J. Povh, R. Riveiro, P. Gomes, C. Jacometo y T. Da Silva. 2008. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aletas y larva de peces: Extracción modificada con cloruro de sodio. *Ciencia e Investigación Agraria* 35: 77-86.
- Molinari, H. y M. Crochemore. 2001. Genome DNA extraction from *Passiflora* ssp. for PCR-RAPD analyses. *Bras. Frutic.* 23: 447-450.

13. Pardo, A., C. Michelangeli, C. Ramis, N. Mogollón y C. Silva. 2008. Evaluación de la estabilidad genética mediante marcadores RAPD en brotes de *Billbergia rosea* Hortus ex Beer conservados *in vitro*. *Bioagro* 20(2): 97-104.
14. Promega. 1998. Technical Manual. Wizard Genomic DNA Purification Kit. Promega Corporation. 20 p.
15. Risterucci, A., L. Grivet, J. N'Goran, I. Pieretti, M. Flament y C. Lanaud. 2000. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theor. Appl. Gen.* 101: 948-955.
16. Yanes, L. 1959. Orquídeas para aficionados. Ed. Cultivos Tropicales. Caracas. 175 p.
17. Zambrano, A., J. Demey, G. Martínez, F. Fuenmayor, Z. Gutiérrez, G. Saldaña y M. Torrealba. 2002. Método rápido, económico y confiable de minipreparación de ADN para amplificación por RAPD en bancos de germoplasma. *Agronomía Tropical* 52: 235-243.