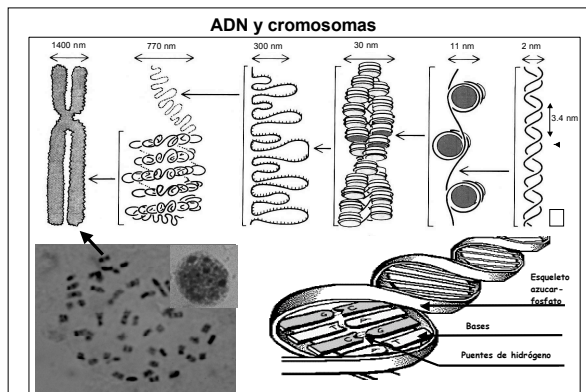
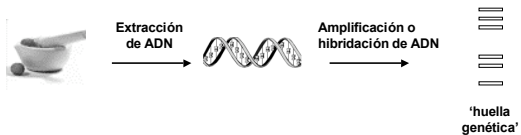


CARACTERIZACIÓN VARIETAL DE ACEITE DE OLIVA VIRGEN MEDIANTE TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN DE ADN

Pilar Hernández Molina
Instituto de Agricultura Sostenible
CSIC



Marcadores moleculares basados en ADN



Desarrollo de técnicas de amplificación de ADN (PCR)

↓

Posibilidades para la aplicación de marcadores moleculares en la mejora del olivo

Ausencia de información sobre la secuencia del genoma de olivo

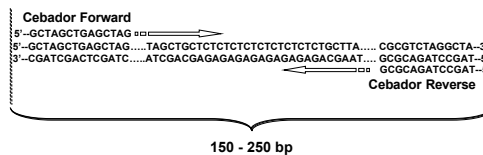
↓

RAPD fue la primera técnica de amplificación de ADN utilizada

↓

Transformación de RAPDs en SCARs

Simple Sequence Repeats (SSRs o microsatélites)



Utilización de la tecnología QRT-PCR

- Detección de los marcadores en sistemas de alto rendimiento ⇒ OLIV-TRACK
- Permite la cuantificación

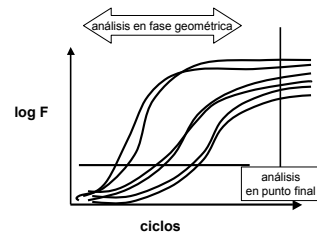
Utilización de sondas TaqMan® (actividad 5' nucleasa de la Taq + FRET)

Utilización de SYBR Green

Fases de la PCR

- Fase 1 (geométrica)
- Fase 2 (lineal)
- Fase 3 (plateau)

Ventajas de la cuantificación en tiempo real PCR en tiempo real vs PCR convencional



OLIV-TRACK: "Traceability of origin and authenticity of olive oil by combined genomic and metabolomic approaches"
 European Commission, Quality of Life and Management of Living Resources - Key action Food, Nutrition and Health, Contract nº OLK1-CT-2002-02298
 Fecha de comienzo: 01.01.2003, finalización: 31.12.2006
 Investigador responsable en España: Antonio Martín Muñoz

OLIV-TRACK

ESTRUCTURA DEL PROYECTO

Viabilidad Estudio de viabilidad de la extracción de ADN de aceite de oliva	Base de datos Colección y base de datos con información sobre cultivares en la UE Colección y base de datos con información sobre producción de aceite y PDOs en la UE	Perfiles genómico y metabólico Determinación de metabolitos en muestras de aceite de 200 cultivares Evaluación de ADN en muestras de aceite y aplicaciones Genotipado de ADN en 200 cvs, desarrollo de marcadores moleculares	Plataforma tecnológica Plataforma en QRT-PCR para aceites monovarietales y mezclas Plataforma microarray para la determinación de la composición varietal de los aceites Aplicación de sondas PNAs en PCR y microarrays para la composición varietal de los aceites	Trazabilidad y diseminación Trazabilidad en aceites de oliva con QRT-PCR y microarrays, carnet de identidad de los aceites Divulgación, aceptación pública
---	---	---	---	---

Aportación de las técnicas de amplificación de ADN al análisis de las características del aceite de oliva:

- Determinación del/los cultivar(es) que intervienen
- Cuantificación de los cultivares que intervienen en una mezcla
- Detección de posibles fraudes
- Información sobre la zona de origen (polen)

Evaluación de los métodos de extracción de ADN de aceite de oliva

Para posibilitar la adaptación de los métodos para su utilización a nivel industrial, la evaluación de los métodos de rendimiento superior a 400 ng/ml aceite se ha realizado en los siguientes términos:

- Cantidad de ADN extraído
- Coste unitario
- Tiempo de ejecución
- Equipamiento requerido
- Cualificación del personal
- Amplificación con diferentes tipos de marcadores moleculares (SSR, RAPD, AFLP, SNP)



WP5: Evaluación del ADN extraído de aceite y aplicaciones

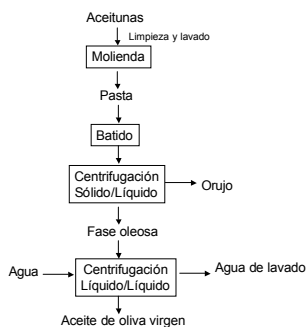
D13. Reconstrucción de eventos durante la cadena productiva (efectos de la matriz) (confidencial).

D14. Condiciones estandarizadas para la extracción, amplificación y análisis de ADN (confidencial).

Cultivares analizados

Alfafa, Aloreña, Arbequina, Ascolana Tenera, Ayvalik, Bical, Blanqueta, Carolea, Castellana, Changlot Real, Chemlali, Chetoui, Cobrançosa, Coratina, Cordovil de Serpa, Cornicabra, Cakir, Domat, Empeltre, Farga, Frantoio, Galega, Gemlik, Gerboui, Gordal Sevillana, Hojiblanca, Kaissy, Kalamon, Konservolia, Koroneiki, Leccino, Lechín de Granada, Lechín de Sevilla, Manzanilla Cacerena, Manzanilla de Sevilla, Memeçik, Meski, Moraiolo, Morisca, Morrut, Picholine Marocaine, Picual, Picudo, Sevillanca, Sourani, Uslu, Verdial de Badajoz, Verdial de Huevar, Verdial de Vélez-Málaga, Villalonga, Zaity

Toma de muestras a distintos niveles de la cadena de producción



Condiciones estandarizadas para la extracción, amplificación y análisis de ADN

- Multiplexado de marcadores microsatélites
- Marcadores de ADN mitocondrial y cloroplastidial
- Identificación de SNPs en olivo
- Puesta a punto de la técnica de PCR en tiempo real para la cuantificación de trazas de ADN en el aceite
- Generación de sondas para un biochip o microarray

OLIV-TRACK. Partner 5. IAS-CSIC

Investigadores responsables:

Dr. Antonio Martín Muñoz. IAS-CSIC
Dr. Gabriel Dorado Pérez. Universidad de Córdoba

Grupo investigador:

Aurora Díaz Bermudez. IAS-CSIC
M^º José Gimenez Alvear. IAS-CSIC
Pilar Hernández Molina. IAS-CSIC
Pilar Rallo Morillo. Universidad de Sevilla
Raúl de la Rosa Navarro. CIFA de Córdoba

AGRADECIMIENTOS:

LUIS DEL PINO S.L.

OLEALMODOVAR

OROBENA