



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

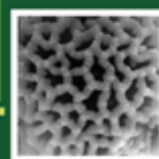
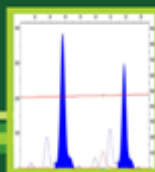
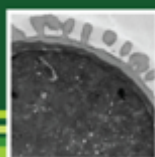


TESIS DOCTORAL

Discriminación Varietal en Polen de Olivo
(*Olea europaea* L.) Mediante Características
Morfológicas y Marcadores Microsatélites.

Construcción de una base de datos y aplicaciones

Mahdi Fendri
Granada, 2011



Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Mahdi Fendri
D.L.: GR 676-2012
ISBN: 978-84-694-6366-6



Discriminación Varietal en Polen de Olivo
(*Olea europaea* L.) Mediante Características
Morfológicas y Marcadores Microsatélites.

Construcción de una base de datos y aplicaciones

Mahdi Fendri
Granada, 2011



Tesis presentada para optar al título de DOCTOR en Biología Agraria y Acuicultura por Mahdi Fendri, bajo la dirección el Doctor Juan de Dios Alché Ramírez y la Profesora María Isabel Rodríguez-García.

Alumno:

Fdo:

Mahdi Fendri

V°D° Directores:

Fdo:

Fdo:

Dr. Juan de Dios Alché Ramírez
Investigador científico del CSIC
Estación Experimental del Zaidín

Prf. María Isabel Rodríguez-García
Profesora de investigación del CSIC
Estación Experimental del Zaidín

Granada, 2011

Este trabajo ha sido realizado en el Grupo de Biología Reproductiva de Plantas del Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C), gracias a la concesión de una beca de postgraduado de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID). Dicho trabajo ha sido financiado por los proyectos MCINN BFU2008-00629, Junta de Andalucía P06-AGR-01791, P10-AGR-6274 y la acción concertada CSIC/Fundação Ciencia e Tecnologia 2007PT0039.

()

En el nombre de Dios clemente misericordioso.

Alabado sea Dios el señor del universo, la paz sea con su mensajero Muhammad, los miembros de su familia, sus compañeros, y todos aquellos que han seguido su camino hasta que Dios herede los cielos y la tierra.

Dice Dios en el sagrado Qurán: “Dios es la luz de los cielos y de la tierra. Su luz es comparable a una hornacina en la que hay un pabilo encendido. El pabilo está en un recipiente de vidrio, que es como si fuera una estrella fulgurante. Se enciende de un árbol bendito, un olivo, que no es del Oriente ni del Occidente, y cuyo aceite casi alumbra aún sin haber sido tocado por el fuego. ¡luz sobre luz! Dios dirige su luz a quien Él quiere. Dios propone parábolas a los hombres. Dios es omnisciente

(Surat An-Nur,35).

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a las personas e Instituciones que han hecho posible la realización de este trabajo:

En primer lugar, me gustaría brindarle mi más sincero agradecimiento a mis directores, el Doctor Juan de Dios Alché Ramírez y la Profesora María Isabel Rodríguez-García que han puesto a mi disposición las enormes capacidades de trabajo de la Estación Experimental de Zaidín de Granada (CSIC) y los múltiples recursos para la realización de este trabajo. Gracias por haber depositado su confianza en mí y por ofrecerme la oportunidad de trabajar en su grupo.

Quiero dedicar una mención especial a la doctora María Isabel Trujillo Navas y al Profesor Luis Rallo Romero por su inestimable ayuda en el aprendizaje de la técnica SSR especialmente durante la realización de mi Máster que ha sido un trabajo precursor para esta tesis. Les agradezco el haber puesto a mi disposición los recursos y la experiencia del Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba. También agradezco a la Doctora María Concepción Muñoz Díez su generosidad y su valiosa ayuda, y a todo el grupo del Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba su colaboración.

Agradezco también al “Institut de l’olivier” (Túnez) y especialmente al Doctor Monji M’sallam y al doctor Ahmed Trigui el haber puesto a mi disposición los recursos genéticos de la colección del Conservatorio Nacional del Olivo de “Bougrhara” de Sfax (Túnez) y por sus excelentes consejos. También a Hsan Belguith y Abdelmajid Yengui les agradezco su ayuda en la recolección de las muestras.

Quiero expresar mi agradecimiento al personal del grupo de empresas Allergenome/Applied Molecular Development S.A./ Inmunal S.A. por la cesión de muestras ciegas de polen y de vacunas, y por el interés mostrado en nuestros resultados.

Agradezco al Doctor Antonio Jesús Castro López su apoyo incondicional y sus excelentes consejos. Igualmente, agradezco a todos los miembros del grupo de Biología Reproductiva de Plantas en la Estación Experimental del Zaidín el aceptarme como compañero. Me considero afortunado por haber contado con

vuestra amistad. Me gustaría comenzar por agradecer a Juan David su ayuda en el análisis de la morfología del polen, a Conchita por haber participado en la preparación de las muestras para el microscopio electrónico de transmisión y a Agnieszka y José Angel por sus sabios consejos y su inestimable ayuda en el laboratorio. Asimismo, deseo expresar mi gratitud a Dori, Krzysztof, María José, Sihem, Alicia y Mari Carmen por su amistad e interés así como a todos aquellos que han pasado por el grupo durante mi estancia, especialmente José Carlos, Cynthia, Sonia, Ali y Abdel Mounim.

Quiero dedicar una mención especial al Departamento de Biología, Faculdade de Ciências Universidade do Porto, dirigido por la Profesora Ilda Abreu, por su colaboración en la observación de las muestras al microscopio electrónico de barrido.

Deseo manifestar un profundo agradecimiento al Doctor Roberto de la Herrán Moreno del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. Le agradezco su ayuda y consejos en los temas relacionados con el análisis de los microsátélites.

No tengo palabras para agradecer a mi querida familia. A mi mujer, Yara el haber estado siempre a mi lado sobre todo en los momentos de desánimo y a mi pequeña Lilia. Agradezco muy especialmente a mis padres y a Sahla, Emna, Amine, y a los pequeños Yousef y Baya. Les agradezco a todos el respaldo y el haber sido siempre fuente de ánimo y de aliento.

Finalmente, deseo dar las gracias a todas aquellas personas de la Estación Experimental del Zaidín que, de una forma u otra, me han ayudado y han seguido mi trabajo durante el tiempo que he pasado aquí. De nuevo, gracias a todos por vuestra ayuda e interés, desde el convencimiento de que sin vosotros este trabajo nunca habría visto la luz.

RESUMEN

La especie *Olea europaea* L. posee una gran diversidad genética, con un número estimado de variedades cultivadas en el mundo superior a 1200. La exploración de esta diversidad despierta un creciente interés en campos como la agronomía, la mejora genética, la industria agroalimentaria y el conocimiento del genoma de la especie. La identificación de las variedades de olivo se ha basado tradicionalmente en esquemas pomológicos que emplean marcadores agronómicos y morfológicos. A estas aproximaciones se ha unido recientemente el desarrollo de marcadores moleculares, entre los que destacan los marcadores microsatélites (SSRs). El polen, que constituye el microgametofito de las plantas espermatofitas, apenas ha sido utilizado para la clasificación de las variedades de olivo ya que la mayor parte de los métodos de discriminación han sido optimizados en materiales vegetativos diploides, especialmente en hojas. La identificación varietal del polen tiene potencialmente numerosas aplicaciones agronómicas, biotecnológicas, médicas, evolutivas y agroalimentarias. Es por ello por lo que en el presente trabajo se pretenden desarrollar y evaluar distintos métodos de clasificación varietal a partir de polen de olivo.

Por una parte, se han utilizado distintos métodos de microscopía y de análisis morfométrico de las imágenes obtenidas para determinar la variabilidad de los caracteres más comúnmente utilizados como descriptores palinológicos: área del grano, su eje polar, su diámetro ecuatorial, el grosor de ectexina, capa basal, endexina, intina, altura de las columelas, distancias entre columelas, altura del muro, anchura del muro, área de los lúmenes y distancias entre elementos esculturales, así como la correlación entre estos parámetros y el origen varietal de las muestras. Los resultados obtenidos han demostrado el potencial considerable de este método, que constituye una herramienta adicional esencialmente utilizable en combinación con otros tipos de marcadores. Asimismo, se ha evaluado de forma preliminar la utilización de la autofluorescencia emitida por la exina en microscopía confocal también como método discriminatorio adicional no disruptivo y de fácil utilización, al no precisar de métodos de preparación de las muestras. Por otra parte, se han optimizado los protocolos para la extracción de ADN de calidad a partir del polen, y para la posterior amplificación de SSRs, demostrándose la eficacia de un panel de 10 marcadores en la identificación de 26 cultivares de olivo. La comparación de los perfiles alélicos obtenidos a partir de muestras suficientemente representativas de polen con aquellos obtenidos a partir de ADN de hojas de los mismos individuos muestra una prácticamente total

identidad. Sobre estas premisas, y con objeto de permitir el desarrollo de futuras aplicaciones de la discriminación varietal del polen, ha sido generada una amplia base de datos de perfiles alélicos en variedades de olivo. Esta base cuenta con perfiles obtenidos de 183 individuos bien caracterizados varietalmente, procedentes de colecciones públicas y privadas de diversos orígenes geográficos que incluyen España, Portugal, Italia, Grecia, Túnez etc. El análisis detallado de esta base de datos ha puesto de manifiesto la gran diversidad genética presente en esta especie, permitiendo la identificación de 90 genotipos diferentes, así como un número considerable de confusiones en la identificación de variedades. También han sido establecidas las relaciones genéticas entre los genotipos identificados y han sido detectadas tendencias de agrupación entre los individuos analizados. La comparación entre las anteriores clasificaciones basadas respectivamente en el uso de parámetros morfológicos del polen y en marcadores SSR indica que los resultados obtenidos en ambos casos son consistentes, comparables y en muchos casos complementarios.

Finalmente, en una de las aplicaciones prácticas del método SSR en polen se ha podido identificar con certeza el origen varietal de 8 muestras ciegas de polen comercial suministrado por una empresa especializada en la fabricación de vacunas alergénicas desensibilizantes. Sin embargo, se ha revelado que el método desarrollado es de momento incapaz de identificar el origen varietal de las citadas vacunas, dado que incluyen únicamente trazas de ADN procedente del polen usado para preparar los extractos. Son esperables futuros desarrollos de la técnica, así como numerosas aplicaciones tanto en el olivo como en otras especies, que son ampliamente discutidas.

RÉSUMÉ

L'olivier *Olea europea* L. présente une grande diversité génétique avec plus de 1200 variétés cultivées. L'étude de cette diversité sollicite de plus en plus d'intérêt notamment dans le domaine de l'agronomie, l'amélioration génétique, l'industrie agroalimentaire et l'exploration du génome de cette espèce. Traditionnellement, l'identification des variétés d'oliviers a été réalisée par des méthodes pomologiques fondées sur l'utilisation d'une série de marqueurs agronomiques et morphologiques. Ces approches ont été appuyées par des méthodes moléculaires qui ont été développées plus récemment, notamment les marqueurs microsatellites (SSR). Le pollen, microgamétophyte des plantes spermatophytes, a été à peine utilisé pour la classification des variétés d'olivier étant donné que la majorité des méthodes de discrimination ont été optimisées sur un matériel végétal diploïde, notamment les feuilles. L'identification variétale du pollen présente plusieurs applications potentielles dans le domaine de l'agronomie, la biotechnologie, la médecine, l'évolution et l'agroalimentaire. C'est pour cette raison que la présente étude a été réalisée, visant à mettre au point et évaluer différentes méthodes de classification variétale à partir du pollen.

D'une part, différentes méthodes de microscopie et d'analyse morphométrique des images obtenues ont été utilisées pour déterminer la variabilité existante au niveau d'un nombre de caractères couramment utilisés pour la description palynologique: superficie du grain, axe polaire, diamètre équatorial, épaisseur de la ectexine, couche basale, endexine, intine, dimension des columelles, distances entre columelles, hauteur du mur, épaisseur du mur et distances entre éléments sculpturaux, ainsi que la corrélation entre ces paramètres et l'origine variétale des échantillons.

Les résultats obtenus ont démontré le potentiel considérable de cette méthode qui constitue un outil additionnel pouvant être utilisé notamment avec d'autres marqueurs. En plus, l'autofluorescence émise par l'exine sous microscopie confocale a été évaluée d'une façon préliminaire en tant que méthode discriminative additionnelle. Cette méthode est relativement simple et permet de maintenir l'état parfait des tissus puisqu'elle n'exige aucune méthode de préparation préalable. D'autre part, des protocoles d'extraction d'ADN de qualité ont été développés pour l'amplification des SSR postérieurement, démontrant l'efficacité d'un ensemble de 10 marqueurs pour l'identification de 26 variétés d'olivier. La comparaison entre les profils alléliques obtenus à partir de l'ADN des feuilles des mêmes individus montre une correspondance presque parfaite. Par

conséquent, une vaste base de données de profils alléliques de variétés d'olivier a été créée afin de développer de futures applications liées à la discrimination variétale du pollen. Cette base de données comporte plus de 183 oliviers identifiés provenant de collections publiques et privées de diverses origines géographiques à savoir l'Espagne, le Portugal, l'Italie, la Grèce, la Tunisie etc.. L'analyse détaillée de cette base de données a permis de mettre en évidence l'importante diversité génétique de cette espèce en permettant d'identifier 90 géotypes différents et un nombre considérable d'erreurs d'identification variétale. Aussi, les relations génétiques entre les différents géotypes identifiés ont été établies et des tendances de regroupement d'un nombre d'individus ont été observées. La comparaison entre la classification basée sur les paramètres morphologiques du pollen et celle basée sur les marqueurs SSR indique que les résultats obtenus dans les deux cas sont consistants, comparables et souvent complémentaires.

Finalement, on a pu identifier avec certitude l'origine variétale de 8 échantillons de pollen inconnu à usage commercial qui ont été fournis par une entreprise spécialisée dans la fabrication de vaccins allergéniques désensibilisants. Cependant, il s'est avéré que la méthode développée est encore insuffisante pour identifier l'origine variétale de ces vaccins dont le contenu en ADN se limite à quelques traces d'ADN qui proviennent du pollen utilisé pour préparer les extraits. On espère introduire une amélioration sur cette technique, et développer d'autres applications qui ont été discutées et qui pourront être appliquées aussi bien sur l'olivier que sur d'autres espèces.

Agradecimientos

Resumen

Résumé

Índice	1
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Botánica	9
1.2. Origen y propagación del cultivo.....	10
1.3. Aparición y difusión de las variedades de olivo	11
1.4. El cultivo del olivo en el mundo	13
1.5. Identificación de variedades de olivo	16
1.5.1. Esquemas pomológicos.....	16
1.5.2. Métodos moleculares	17
1.5.2.1. Isoenzimas	18
1.5.2.2. Marcadores de ADN	18
✓ Marcadores RAPDs.....	19
✓ Marcadores AFLPs.....	20
✓ Marcadores SCARs.....	20
✓ Marcadores SNPs	21
✓ Marcadores microsatélites (SSRs)	21
1.5.3. Identificación varietal en muestras agroalimentarias.....	23
1.5.4. Identificación varietal en tejidos haploides	24
1.6. El polen del olivo	25
1.6.1. Reproducción sexual y gametogénesis masculina en el olivo	25
1.6.2. La pared del polen del olivo	28
1.6.3. El polen de olivo como vector de alérgenos y su utilidad en la preparación de vacunas.....	30
2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	33
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
3.1. Origen de las muestras de olivo estudiadas	39
3.2. Material vegetal estudiado	40
3.2.1. Recolección de hojas para la extracción de ADN genómico.....	40
3.2.2. Polen	40
3.2.3. Vacunas para la extracción de ADN.....	41
3.3. Análisis comparativo de los caracteres morfológicos del grano del polen	41
3.4. Análisis de la autofluorescencia en polen.....	45

3.5. Análisis de los microsatélites en polen y vacunas	46
3.5.1. Extracción del ADN.....	46
3.5.2. Amplificación de los microsatélites.....	46
3.5.3. Análisis de los microsatélites (Secuenciación).....	47
3.5.4. Herramientas bioinformáticas utilizadas para el análisis de los microsatélites	48
3.6. Análisis de los microsatélites en hojas	49
4. RESULTADOS	51
4.1. Identificación de variedades de olivo utilizando caracteres morfológicos del polen.....	53
4.1.1. Análisis del tamaño del grano de polen a microscopía óptica.....	55
4.1.2. Análisis de los componentes de la pared del grano de polen a microscopía electrónica de transmisión (MET).....	58
4.1.3. Análisis de los componentes de la exina a microscopía electrónica de barrido (MEB).....	61
4.1.4. Discriminación de los cultivares y análisis estadístico.....	65
4.1.4.1. Analisis ANOVA	67
4.1.4.2. Análisis factorial	68
4.1.5. Identificación de variedades de olivo usando autofluorescencia.....	72
4.2. Construcción de una base de datos para la identificación de variedades de olivo.	77
4.2.1. Identificación de los individuos que se pretenden incluir en la base de datos	79
4.2.2. Sinonimias y homonimias.....	82
4.2.3. Alelos detectados, índices de variabilidad genética y relaciones genéticas.....	83
4.3. Análisis de los microsatélites en polen y hojas.....	89
4.3.1. Microsatélites en polen	91
4.3.2. Estudio comparativo de discriminación de variedades de olivo a partir de ADN extraído de muestras de hojas y de muestras de polen	92
4.3.3. Evaluación de los marcadores microsatélites utilizados.....	96
4.3.3.1. Alelos detectados	96
4.3.3.2. Índices de heterocigosidad, frecuencias de los alelos nulos y poder discriminativo	97
4.3.4. Identificación de muestras ciegas de polen.....	99
4.2.5. Identificación de muestras ciegas de vacunas.....	104
5. DISCUSIÓN	107

5.1. Identificación de variedades de olivo mediante caracteres morfológicos del polen.....	109
5.1.1. Análisis de los caracteres morfológicos del polen.....	111
5.1.2. Análisis estadístico	113
5.1.3. Comparación entre identificación mediante los marcadores morfológicos del polen y SSR	115
5.2. Construcción de un base de datos para la identificación de variedades de olivo.	119
5.3. Análisis de los microsatélites en polen y hojas.....	127
5.3.1. Identificación del origen varietal del polen mediante el uso de marcadores microsatélites y estudio comparativo	129
5.3.2. Evaluación de los marcadores microsatélites utilizados.....	131
5.3.3. Identificación de muestras ciegas de polen.....	135
5.3.4. Identificación de muestras ciegas de vacunas.....	136
6. CONCLUSIONES	139
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Botánica

Olea europaea L. es una especie diploide con 46 cromosomas ($2n=2x=46$) (Minelli et al., 2000) y pertenece a la familia de las Oleáceas que contiene 29 géneros (Heywood, 1978). El género *Olea* incluye 35 especies entre las que se destaca la especie *Olea europaea* L. que incluye el olivo cultivado y el acebuche (olivo silvestre). Existe un consenso de que éste último forma la sub-especie *sylvestris* mientras que el olivo cultivado constituye la sub-especie *sativa*. El olivo se encuentra habitualmente en zonas climáticas características de la región mediterránea entre 30° y 45° de latitud en ambos hemisferios. El olivo está perfectamente adaptado a hábitats de veranos secos y calurosos, siendo capaz de vivir y producir durante cientos de años debido a su gran capacidad regenerativa.

Las características morfológicas del árbol dependen de la variedad, de las prácticas del cultivo y de las condiciones ambientales. Sin embargo, es un árbol generalmente de tamaño mediano de 4 a 8 m de altura con una copa bastante densa y un tronco grueso. Las hojas del olivo son persistentes y sobreviven habitualmente entre dos y tres años. Son de color verde oscuro y con una cutícula gruesa en el haz, y de color blanquecino en el envés, donde aparecen numerosos tricomas. Las flores que están agrupadas en inflorescencias pueden ser hermafroditas, con estambres y pistilos perfectamente desarrollados (flores perfectas) o bien estaminíferas, constituidas solo por estambres, con un ovario rudimentario o completamente ausente (flores imperfectas) (Uriu, 1959). El fruto es una drupa succulenta altamente oleosa, de color verde al inicio de su formación y negro cuando alcanza su maduración completa. Según las variedades el color en la madurez puede variar entre rojizo, violeta oscuro y distintos grados de negro.

El sistema radical del olivo está constituido habitualmente por múltiples raíces adventicias que pueden alcanzar profundidades más o menos importantes según las condiciones edafo-climáticas de la región y de la edad del árbol, aunque en general el olivo se caracteriza por tener raíces poco profundas, por lo que es un árbol que se puede transplantar fácilmente.

1.2. Origen y propagación del cultivo

Hoy día existe una gran controversia acerca del origen del olivo (Loukas y Krimbas, 1983). Probablemente el cultivo de esta especie se originó hacia el cuarto milenio a.C. en la zona del Mar Muerto, donde se descubrieron las pruebas arqueológicas más antiguas de la existencia de este árbol (Zohary y Spiegel-Roy, 1975). Sin embargo, el descubrimiento en Italia de restos de fósiles de ancestros del olivo de 1 millón de años de antigüedad sugiere el posible origen de esta especie en esta región del mundo (Kapellakis et al., 2007).

La cuenca mediterránea se sigue considerando el ámbito principal y tradicional del cultivo del olivo y donde se encuentra actualmente el 97% del total de la superficie dedicada a este cultivo (Rallo, 2005). El centro primario a partir del cual se empezó a difundir el olivo se sitúa en la orilla este del Mediterráneo (Besnard et al., 2001a). Sin embargo, existen otros centros secundarios y terciarios de difusión que aparecieron como consecuencia de la fundación de varias colonias y de los intensos flujos migratorios asociados a los grandes imperios que han visto la luz en la cuenca mediterránea (De Graaff y Eppink, 1999). La olivicultura representaba entonces una actividad de gran importancia para la economía y la política, a parte de ser una fuente considerable de alimento y de energía. Por lo tanto, el olivo se ha transformado en el árbol cultivado por excelencia en todo el espacio mediterráneo. Más recientemente, y con el descubrimiento del nuevo mundo, se amplió el área del cultivo hacia el continente americano donde encontró unas condiciones favorables a su desarrollo, especialmente en países como Chile y Argentina en el hemisferio sur y California (USA) en el hemisferio norte. Posteriormente, se ha introducido el olivo en nuevas zonas como Sudáfrica, China, Japón y Australia (Civantos, 2004). La figura 1 representa el esquema de la expansión del cultivo del olivo en el mundo.



Figura 1. Propagación del cultivo del olivo en el mundo

1.3. Aparición y difusión de las variedades de olivo

Las primeras variedades del olivo aparecieron mediante selección empírica de los fenotipos sobresalientes a partir de los bosques de acebuches. Los olivereros antiguos apreciaban ciertos caracteres tales como el tamaño del fruto, el contenido graso, la adaptación al medio y la productividad del árbol. Dichos agricultores aprendieron a fijar los caracteres de interés en las descendencias mediante la obtención de clones a partir de los genotipos seleccionados. La facilidad de la multiplicación vegetativa a partir de las plantas madre contribuyó a acelerar de la propagación en esta especie (Rallo, 2005). Posteriormente, las variedades fueron sometidas a una incorporación progresiva de genes a partir de las poblaciones próximas de acebuches mediante el fenómeno de la introgresión (Zohary, 1994). El ciclo continuado de selección, propagación e hibridación con los acebuches y otras variedades cultivadas ha permitido el aumento continuo del número de las variedades del olivo a lo largo del tiempo (Figura 2).

Hoy día, gran parte de las variedades más antiguas siguen siendo cultivadas en torno al área donde se generaron por primera vez (Rallo, 2005). Efectivamente, en algunos casos, la difusión de las variedades tuvo que ser muy lenta e incluso no tuvo lugar en gran número de ellas. Por un lado, la

multiplicación del olivo se ha basado hasta épocas muy recientes en métodos tradicionales de multiplicación vegetativa, utilizando un material vegetal de gran tamaño difícilmente transportable en largas distancias, como por ejemplo las estacas leñosas, las zuecas y las estacas-plantón (Caballero y del Río, 2004). Por otro lado, el desconocimiento del comportamiento de las variedades fuera de sus zonas de origen y la adaptación de varios cultivares exclusivamente al medio donde aparecieron ha hecho todavía más difícil la propagación de muchas variedades. Por otro lado, la baja presión selectiva en los olivares de la mayoría de los países oleícolas tradicionales, especialmente en las zonas de baja intensidad del cultivo, ha favorecido a que hoy día siga existiendo una gran diversidad de variedades en el mundo (Barranco, 2004). Finalmente, la longevidad y la alta capacidad de rejuvenecimiento de la especie han contribuido a que sigan existiendo olivos centenarios e incluso milenarios, impidiendo así la renovación varietal y la expansión de los nuevos cultivares (Civantos, 2004).

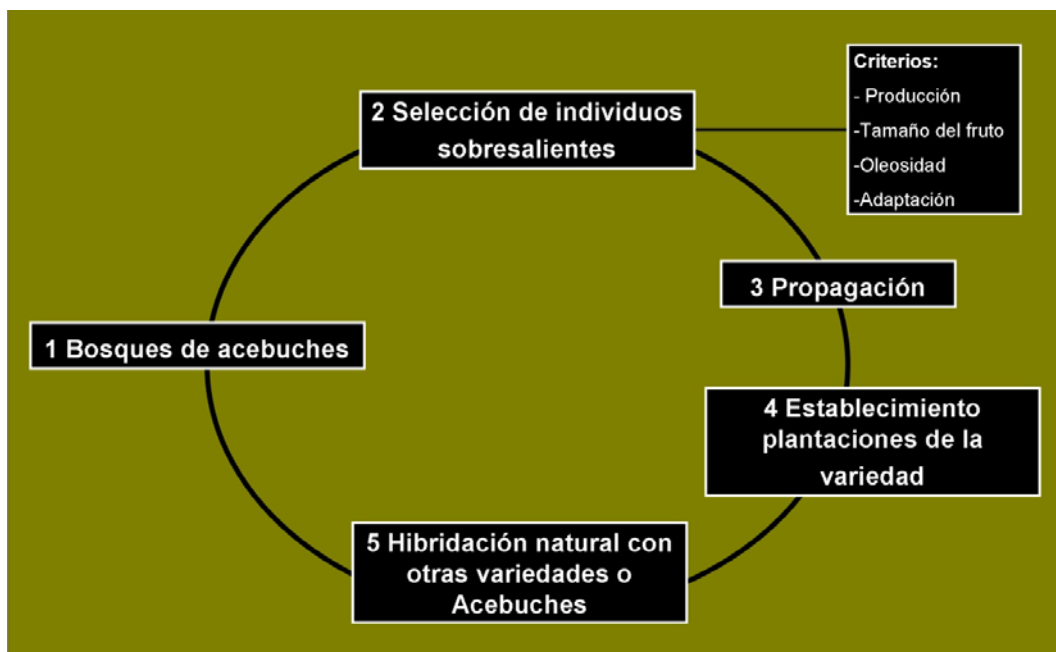


Figura 2. Esquema del ciclo de selección de las variedades de olivo tradicionales (Adaptado de Rallo, 2005)

La base de datos de la FAO, desarrollada tras dos revisiones (Bartolini et al., 1994 y 1998) señala la presencia de más de 1200 variedades autóctonas de olivo en el mundo con más de 3000 denominaciones distintas <http://apps3.fao.org/wiews/olive/oliv.jsp> (FAO, 2010). La presencia de más de una denominación por variedad refleja principalmente el origen tardicional de dichas denominaciones acuñadas por los agricultores, basándose en caracteres muy visibles como la forma del fruto, su tamaño o también otras características llamativas (Trujillo y Barranco, 1999). El estudio del patrimonio genético mundial del olivo ha revelado la existencia de un número importante de errores de identificación y de muchas confusiones relacionadas a la presencia de sinonimias (misma variedad con distintos nombres) y homonimias (mismo nombre para distintas variedades).

1.4. El cultivo del olivo en el mundo

La cuenca mediterránea sigue siendo indiscutiblemente el ámbito principal de esta especie tanto en términos de superficie como en producción. El patrimonio oleícola mundial se estima en 960 millones de árboles, plantados sobre 9,5 millones de hectáreas (Civantos, 2004). Con sus tres países oleícolas tradicionales (España, Italia y Grecia), la Unión Europea (UE) se considera el primer productor y exportador tanto de aceite de oliva como de aceitunas de mesa. Efectivamente, según las medias interanuales del Consejo Oleícola Internacional (COI) calculadas para el periodo 2004-2009, la UE cubre el 75,8% de la producción mundial de aceite de oliva y contribuye el 55,3% del mercado mundial de este producto (exportaciones) (Consejo Oleícola Internacional, 2010). Asimismo, la UE produce el 36,3% del total mundial de aceitunas de mesa, y el 44,3% de su mercado. Siendo el líder mundial en ambos sectores, España contribuye a nivel europeo con más de la mitad de la producción de aceite de oliva (51,5%) y con un 71,4% de producción de aceitunas de mesa. Italia es el segundo productor europeo de aceite de oliva (29,2%) pero se sitúa en la primera posición en cuanto a la exportación de este producto (53,6%), considerándose sustancial en producción de aceitunas. A nivel mundial, Túnez ocupa la segunda posición después la UE en la producción de aceite de oliva, con una media interanual de 185.000t. Gran parte de dicha producción está reservada a la exportación, contribuyendo con 22,6% al mercado mundial. La producción de aceitunas de mesa en este país es de 19.400t

y apenas satisface el consumo nacional (Consejo Oleícola Internacional, 2010). Existen otros países como Siria y Turquía que se consideran como productores importantes de aceite de oliva e influyentes en su mercado mundial. Es el caso también de Marruecos y Argelia pero con menos importancia relativa. En cuanto al mercado de aceitunas de mesa, España, Egipto, Turquía, Siria y Grecia son respectivamente los primeros países productores y garantizan ellos solos el 67,3% del total de la producción mundial. Las figuras 3 y 4 representan las contribuciones en producción, exportación y consumo de los principales países oleícolas principales en los sectores de aceite de oliva y aceitunas de mesa respectivamente.

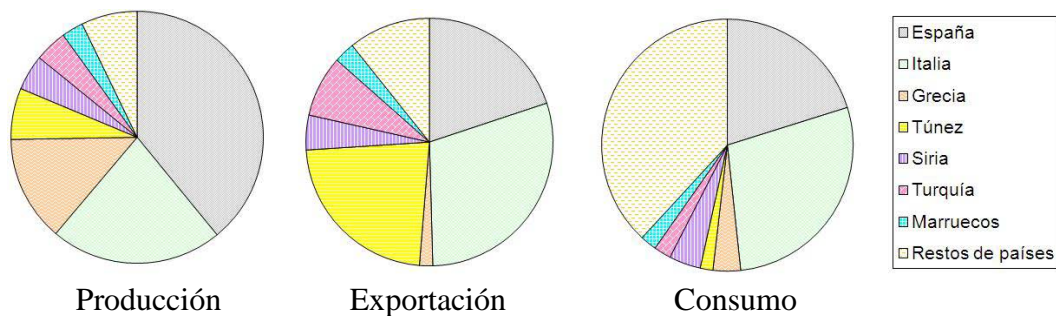


Figura 3. Mercado mundial de aceite de oliva (Consejo Oleícola Internacional, 2010).

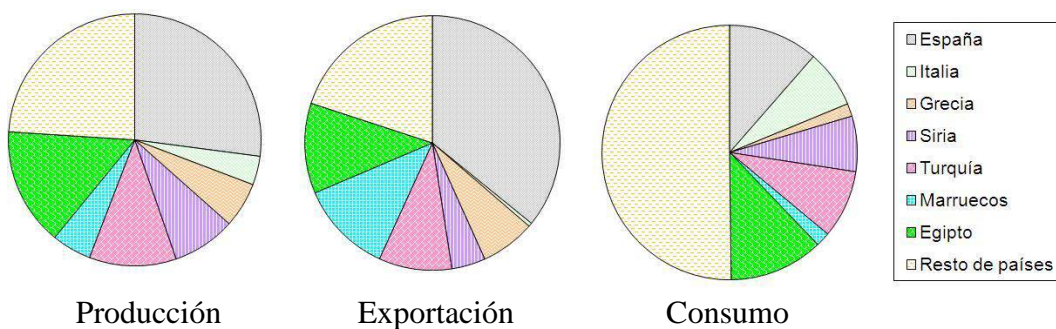


Figura 4. Mercado mundial de aceitunas de mesa (Consejo Oleícola Internacional, 2010).

El olivo se caracteriza por un ciclo de cultivo muy dilatado ya que esta planta puede tardar bastante en entrar en producción, sobre todo en las plantaciones tradicionales, a causa de su extendido periodo juvenil. Por lo tanto, pueden pasar muchos años antes de que la plantación alcance su plena producción, aunque luego, la vida productiva del árbol dura muchos años (Civantos, 2004). De hecho, las políticas agrarias en los distintos países productores se establecieron pensando a largo y medio plazo, lo que ha contribuido a un incremento lento pero constante de las superficies mundiales dedicadas al cultivo. Sin embargo, en los últimos años se ha observado un incremento más rápido de la producción debido a las mejoras del cultivo.

Actualmente, parte del olivar tradicional se ha transformado en un olivar moderno con plantaciones jóvenes e intensivas conducidas en régimen de regadío. Este tipo de olivicultura tiene efectivamente una productividad más elevada y constituye una actividad más rentable para los agricultores. La conversión progresiva a la olivicultura moderna se está llevando a cabo en muchos países oleícolas tradicionales como España, Italia, Grecia, Túnez, Turquía etc. Esta evolución ocurre de manera proporcional a la abundancia de los recursos naturales, la capacidad de inversión y el nivel de la tecnología agrícola de los diferentes países. Los importantes cambios que ha conocido la olivicultura en las últimas décadas ponen de relieve el tema de los recursos genéticos. Para adaptarse a las exigencias del mercado en términos de cantidad y calidad, un cultivo moderno requiere, por un lado, un material vegetal correctamente identificado y que presente un buen potencial agronómico. De hecho, las exigencias del sector viverístico y de los mejoradores en relación a garantizar la autenticidad de las variedades han aumentado considerablemente durante las últimas décadas. Por otro lado, las plantaciones modernas caracterizadas por ser en su mayoría monovarietales, han hecho que un número considerable de variedades antiguas sean de poco interés económico. Del mismo modo, la presión urbana constituye una de las causas de la desaparición de un número de árboles centenarios que pueden ser los últimos representantes de algunas variedades muy antiguas. Por lo tanto, la conservación de los recursos genéticos constituye una de las prioridades hoy día para poder mantener la diversidad genética de esta especie.

1.5. Identificación de variedades de olivo

1.5.1. Esquemas pomológicos

La caracterización e identificación de variedades de las especies de interés agronómico, entre las que se incluye el olivo, se ha basado tradicionalmente en la utilización de esquemas pomológicos, empleando un número considerable de caracteres morfológicos y agronómicos (Barranco y Rallo, 1984). Caracteres tales como el vigor del árbol, la precocidad, la producción media, la aptitud al enraizamiento, la susceptibilidad a ciertas enfermedades y plagas etc... han contribuido a la evaluación agronómica de las diferentes variedades. La utilización adecuada de estos criterios agronómicos requiere un número elevado de repeticiones en espacio y en tiempo ya que se trata de caracteres muy influenciados por las condiciones ambientales (Barranco et *al.*, 2005).

La caracterización morfológica del olivo se ha basado generalmente en marcadores con una elevada capacidad discriminativa, constancia entre los genotipos idénticos y una baja dependencia de las condiciones ambientales y del año (Rallo, 2005). El procedimiento de caracterización debe de ser a la vez fiable, rápido y económicamente rentable. Los métodos de identificación morfológica más empleados para variedades de olivo incorporan un gran número de caracteres del árbol, del ramo, del fruto, del endocarpo, de la hoja y de la inflorescencia (Barranco y Rallo, 1984).

Actualmente, el COI adopta un esquema pomológico simplificado a partir del esquema definido por Barranco y Rallo (1984), incluyendo un total de 28 caracteres del árbol, hoja, fruto y endocarpo. Los caracteres del endocarpo son los de mayor utilidad debido a su menor fluctuación y fácil conservación (Barranco et *al.*, 2005).

Los marcadores morfológicos y agronómicos siguen siendo ampliamente utilizados hoy día, ya que no requieren medios o tecnologías complicadas y también son los únicos marcadores basados en la observación directa de la planta. No obstante, el empleo de dichos métodos presenta ciertas dificultades en la

evaluación de muchos de los caracteres como por ejemplo en las inflorescencias. También es notable la influencia de muchos factores sobre las medidas como por ejemplo la edad, el estadio fenológico y sanitario de la planta, el manejo del cultivo y las condiciones ambientales. Además, existe un alto grado de subjetividad a la hora de hacer la descripción (Trujillo et al., 2005). De hecho, se requiere un personal con mucha experiencia, que sea capaz, sobre todo, de diferenciar entre la variabilidad debida al genotipo en sí y aquella debida a la fluctuación causada por otros factores externos. Dicha experiencia requiere un largo tiempo de aprendizaje, de modo que la identificación con este tipo de marcadores ha llevado en algunos casos a caracterizaciones erróneas (Trujillo y Barranco, 1999). A pesar de estas limitaciones, se puede decir que los métodos agronómicos y morfológicos son muy útiles para llevar a cabo trabajos de prospección (Barranco y Rallo, 1984; Barranco y Rallo, 1985; Cimato et al., 1993; Tous y Romero, 1993; Cantini et al., 1999; Barranco et al., 2000, 2005) y son necesarios para catalogar o describir un banco de germoplasma (Trigui et al., 2002; Caballero et al., 2006).

1.5.2. Métodos moleculares

Desde el inicio de su implantación, los marcadores moleculares han contribuido a un mejor conocimiento de la diversidad genética dentro de la especie *Olea europaea* L. Indudablemente, la utilización de estos marcadores ha resuelto numerosos errores debidos a la subjetividad de los caracteres morfológicos y agronómicos (Hamrick et al., 1992). Los marcadores moleculares del ADN tales como los RFLP, AFLP, SSR, RAPD etc., son completamente independientes de las condiciones ambientales y del año. Numerosos estudios previos han demostrado los considerables niveles de polimorfismo que detectan estos de marcadores y han señalado su gran utilidad para los estudios de identificación varietal en el olivo (Ganino et al., 2006). Hoy día, los marcadores agronómicos, morfológicos y moleculares se utilizan conjuntamente para conseguir una caracterización completa y eficiente de las variedades de olivo (Trujillo et al., 2005).

A continuación se detallan algunos de los marcadores moleculares que han sido ampliamente utilizados para la caracterización de las variedades de olivo.

1.5.2.1. Isoenzimas

La caracterización mediante marcadores isoenzimáticos consiste en distinguir por electroforesis las distintas formas de una enzima codificadas por diferentes alelos de un mismo gen (Soltis y Soltis, 1989). Existe varios ejemplos de la utilización de isoenzimas en la identificación de las variedades de olivo (Ouazzani *et al.*, 1996; Trujillo *et al.*, 2005). Se trata de marcadores codominantes que permiten distinguir los individuos homocigóticos y heterocigóticos. Además, los isoenzimas se consideran como productos primarios del gen y, por lo tanto, sus patrones son reproducibles y muy poco afectados por las condiciones ambientales. Desde el punto de vista práctico, la técnica es relativamente sencilla, rápida y económica (Trujillo *et al.*, 1995). Sin embargo, el principal inconveniente de este tipo de marcadores es su nivel relativamente bajo de polimorfismo, que resulta insuficiente para identificar variedades muy próximas (Liu y Furnier, 1993). Consecuentemente, estos marcadores son hoy día abandonados para su uso en la identificación de las variedades de olivo.

1.5.2.2. Marcadores de ADN

El estudio de la gran variabilidad existente a nivel de los ácidos nucleicos tanto en las regiones codificantes como en las regiones no codificantes ha permitido la caracterización de diferencias entre los distintos genotipos. Los marcadores de ADN han demostrado su gran utilidad en el estudio de la diversidad genética a niveles intraespecífico e interespecífico (Karp y Edwards, 1997). Además, estos marcadores tienen la capacidad de identificar con certeza las variedades de olivo sin tener que recurrir al estudio de otros caracteres, y requieren una cantidad escasa de ADN, obtenido a partir de una pequeña muestra vegetal (generalmente tejido de hoja) independientemente de la edad, del estado de la planta, de las condiciones ambientales o del año (Trujillo *et al.*, 2005).

Los primeros marcadores de ADN, usados a partir de los 80 del siglo pasado, fueron los RFLPs (Restriction Fragment Length Polimorphism), que permiten detectar diferencias en determinadas zonas del ADN mediante la utilización de distintas enzimas de restricción. Las enzimas actúan cortando el ADN y permiten de esta manera obtener un patrón específico de cada genotipo

tras la migración en gel. Los marcadores RFLP fueron ampliamente utilizados en olivo sobre todo para distinguir los olivos silvestres de las variedades cultivadas. También permitieron determinar el momento de divergencia genética entre los distintos taxones de la especie *Olea europaea* L. (Besnard et al., 2001b). Los tipos de RFLPs más utilizados fueron los RFLP mitocondriales (Besnard et al., 2002) y los RFLP cloroplastídicos (Lumaret et al., 2000). Generalmente, los RFLP tienen la ventaja de ser codominantes pero presentan también un bajo nivel de polimorfismo y un número limitado de alelos por locus. Estos inconvenientes han limitado el uso de los RFLPs tras la aparición de la técnica de PCR que dio lugar a una nueva generación de marcadores tales como los RAPDs (Random Amplified Polimorphic DNA), los AFLPs (Amplified Length Polimorphism) y los microsátélites o SSRs (Simple Sequence Repeats). También, existen otros marcadores que derivan de la misma familia y que han sido utilizados en olivo, como por ejemplo los SCARs (Sequenced Characterised Amplified Region), STSs (Sequence Tagged Site PCR), SSAPs (Sequence Specific Amplification Polymorphism) y los ISSRs (Inter-Simple Sequence Repeats). (Vargas y Kadereit, 2001; Ganino et al., 2006)

A continuación se detallan algunos de los marcadores de ADN amplificados por PCR y que han sido frecuentemente utilizados para la identificación varietal y el estudio de la diversidad genética del olivo:

✓ Marcadores RAPDs

Los RAPDs se basan en la utilización de cebadores arbitrarios o semi-arbitrarios de 10 pares de bases (Williams et al., 1990). Este tipo de marcadores fue ampliamente utilizado en el estudio de los recursos genéticos en numerosas especies de interés agronómico (Hormaza, 1996). En olivo, los RAPDs demostraron también una gran utilidad para la identificación y la clasificación de variedades (Bogani et al., 1994; Belaj et al., 2001). También se han utilizado para el estudio de la variabilidad intra e inter-cultivar (Gemmas et al., 2000) y para la estimación de las distancias genéticas dentro de y entre las formas silvestres, asilvestradas y cultivadas de olivo (Sanz-Cortés et al., 2001). Asimismo, dichos marcadores se utilizaron para la detección de la presencia de homonimias y sinonimias tanto en Bancos de Germoplasma como a nivel industrial (viveros) (Belaj et al., 2004a). Los marcadores RAPD tienen ventajas considerables, ya que

generan mucha información sin requerir una inversión elevada ni un conocimiento previo de la secuencia. Además, los RAPDs implican una metodología relativamente sencilla y un número ilimitado de cebadores. No obstante, estos marcadores tienen el inconveniente de presentar resultados poco reproducibles y difíciles de interpretar. Ello requiere ser muy crítico y exigente en la interpretación de los datos (Trujillo y Barranco, 1999).

✓ Marcadores AFLPs

Los AFLPs se basan en la amplificación de fragmentos de ADN predigeridos con enzimas de restricción y unidos a adaptadores específicos. Se usan cebadores marcados que son selectivos y diseñados para dichos adaptadores. En olivo se han empleado los marcadores AFLPs en el estudio de la variación genética inter y intra-cultivar en variedades de distintas partes del mundo (Angiolillo et al., 2006; Grati-kamoun et al., 2006). Para la discriminación entre los cultivares de olivo y el estudio de la variabilidad intra-cultivar, los AFLPs se han utilizados también en combinación con otros tipos de marcadores como los RAPDs, los SSRs y los caracteres morfológicos (Belaj et al., 2004b; Hagidimitriou et al., 2005). Los AFLPs presentan un gran polimorfismo y son capaces de discriminar individuos con mucha similitud genética. Además, existe un número ilimitado de AFLPs, ya que su desarrollo no requiere un conocimiento previo de la secuencia. No obstante, los AFLPs presentan una serie de inconvenientes, como ser marcadores dominantes, generar un coste elevado de análisis y necesitar ADN en mayor cantidad y pureza que en el caso de los RAPDs por ejemplo. Además, estos marcadores son arduos en poner a punto, difíciles de interpretar y ligeramente subjetivos.

✓ Marcadores SCARs

Tanto los marcadores de tipo SCAR (Paran y Michelmore, 1993), al igual que otros marcadores como STSs y SSAPs, se obtienen mediante clonación y secuenciación de fragmentos amplificados con algunos de los marcadores citados anteriormente (RFLPs, RAPDs y AFLPs). Los SCARs son altamente específicos y menos susceptibles a las condiciones de PCR. Generalmente, los marcadores SCAR son dominantes ya que permiten solamente detectar la presencia o la

ausencia de la amplificación. Sin embargo, dichos marcadores se pueden convertir en marcadores codominantes (Rafalski y Tingey, 1993).

✓ Marcadores SNPs

Los SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) se basan en el estudio de pequeñas diferencias que pueden presentarse a nivel de la secuencia de ADN. Los SNPs son muy abundantes en el genoma y pueden ser extremadamente útiles para la identificación de las variedades de olivo. Sin embargo, el desarrollo de este tipo de marcadores requiere un conocimiento previo de la secuencia. Hasta la fecha, solo se ha podido definir un número limitado de marcadores SNPs (Reale et al. 2006, Santos Macedo et al. 2009). El uso de dicho marcadores ha demostrado su gran utilidad para la identificación de las variedades de olivo en los bancos de germoplasma sobre todo cuando se usan conjuntamente con otro tipo de marcadores de ADN como por ejemplo los SSRs (Hakim et al. 2010).

✓ Marcadores microsatélites (SSRs)

Los marcadores microsatélites, llamados también SSRs (Simple Sequence Repeat) o STRs (Short Tandem Repeat) son motivos repetidos en tándem a lo largo del ADN (Hamada et al., 1982). Normalmente, los microsatélites no son codificantes y desempeñan un papel en la regulación genética (Hamada et al., 1982) o actúan como señales en los procesos de conversión genética y recombinación (Jeffreys et al., 1985). Los SSRs pueden ser motivos de di, tri, tetra o penta-nucleótidos, e incluso pueden ser más complejos (Powell et al. 1996). Los SSRs di-nucleotídicos son más abundantes en el genoma (como por ejemplo los motivos de AG/CT) pero son difícilmente interpretados y necesitan por lo tanto un sistema de separación eficiente de los alelos para evitar una identificación errónea (Amos et al., 2007). Sin embargo, el principal inconveniente de los marcadores microsatélites es la labor y el coste bastante elevados que requiere el desarrollo de los cebadores.

Los marcadores SSR han sido ampliamente utilizados tanto en olivo como en otras especies vegetales para la caracterización varietal, para el estudio de las

relaciones genéticas y para el análisis de paternidad (Lacape et al., 2007). Actualmente, la técnica SSR se considera como una herramienta de confianza para la identificación y la caracterización varietal en el olivo ya que se ha demostrado su utilidad en un número importante de estudios que incluyen la caracterización de numerosos ejemplos y diversas colección de germoplasma (Rallo et al., 2000; Bandelj et al., 2002; De la Rosa et al., 2002; Khadari et al., 2003; Belaj et al., 2004c; Montemurro et al., 2005; Baldoni et al., 2006; Díaz et al., 2006a; Ganino et al., 2007; Noormohammadi et al., 2007; Rekik et al., 2008; Taamalli et al., 2008).

Los marcadores SSRs han contribuido al estudio de las relaciones genéticas dentro de la especie (Carriero et al., 2002; Belaj et al., 2003), al estudio de la genética de poblaciones (Breton et al., 2008), a la caracterización de la variación intra-cultivar (Cipriani et al., 2002; Noormohammadi et al., 2007), y también a la realización de pruebas de paternidad en progenies procedentes de cruzamientos controlados entre cultivares de olivo (De la Rosa et al., 2004). Los microsatélites han demostrado también su utilidad en la evaluación de la transferencia de estos marcadores a otras especies del género *Olea* (Rallo et al., 2003) o de otros géneros de la familia *Oleaceae* (De la Rosa et al., 2002). Recientemente se han identificado regiones de SSR cloroplastídico en olivo que pueden ser usados como marcadores capaces de discriminar entre las variedades (Mariotti et al., 2010)

Algunos estudios han revelado la gran eficacia de los marcadores SSRs en la identificación y la caracterización de las variedades de olivo, comparados con otros tipos de marcadores (RAPDs y AFLPs). Dichos estudios se han basado en la evaluación del nivel de información, de su eficiencia en estudios de variabilidad genética y en el establecimiento de las relaciones genéticas (Belaj et al., 2003). Debido al número importante de marcadores SSRs disponibles actualmente para el olivo, se han llevado a cabo estudios para seleccionar una lista de microsatélites eficientes basándose en su reproducibilidad, su poder discriminativo y el número de alelos amplificados (Baldoni et al., 2009). Estos trabajos permitieron recomendar un conjunto de 11 SSRs, seleccionados para su uso en un sistema universal de identificación y caracterización de variedades de olivo. Muchos de estos marcadores han sido utilizados para caracterizar gran parte del banco de

germoplasma de Boughrara-Sfax (Túnez) (Fendri et al., 2010). Dicho trabajo ha sido el precursor de la base de datos de identificación de variedades (en los resultados se describe en detalle esta base de datos), establecida para la identificación de las variedades de olivo.

A partir de los marcadores SSRs, se han desarrollado otros tipos de marcadores llamados ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats) mediante el anclaje de cebadores específicos para dichas repeticiones (Zietkiewicz et al., 1994). Los ISSR son fragmentos de 100 a 3000 pb situados entre las regiones microsatélites. Mediante amplificación con PCR, estos marcadores generan simultáneamente entre 10 y 60 fragmentos, correspondientes a múltiples loci. Este tipo de marcadores ha sido utilizado tanto para la discriminación entre variedades de olivo (Pasqualone et al., 2001), como para el estudio de las relaciones genéticas dentro de la especie *Olea europaea* L. (Vargas et al., 2001).

1.5.3. Identificación varietal en muestras agroalimentarias

El mercado del aceite oliva supone hoy en día un intercambio considerable entre los países productores, con importantes cantidades de aceite que se venden a granel. Las nuevas exigencias del mercado en términos de la diversidad de los productos y su trazabilidad suponen un creciente interés para la identificación del origen varietal del aceite comercializado, especialmente para las denominaciones de origen protegidas (DOPs). Los métodos químicos clásicos basados en el análisis de los ácidos grasos y otros componentes como los metabolitos secundarios no son suficientemente eficaces para identificar el origen varietal del aceite de oliva (Ollivier et al., 2003) aunque algunos casos están alcanzando cotas de gran fiabilidad (Dupuy et al., 2005). Es por tanto aconsejable la utilización de métodos complementarios, como aquellos que utilizan marcadores moleculares amplificados a partir de trazas de ADN presentes en el aceite. Entre los marcadores utilizados figuran los RFLPs, AFLPs y SSRs (Ben Ayed et al., 2009). También, se han utilizado otros tipos de marcadores como los SNPs y los SCARs para el mismo fin (Consolandi et al., 2007; Pafundo et al., 2007). Actualmente, los SSR se consideran unos de los marcadores más fiables utilizados para la identificación del origen varietal del aceite de oliva (Breton et al., 2004) y se han adaptado métodos de extracción para obtener una cantidad suficiente de ADN

para llevar a cabo dicho tipo de análisis (De la Torre et al., 2004; Muzzalupo et al., 2007). La metodología es especialmente recomendable para identificar aceites de oliva monovarietales (Alba et al., 2009) y especialmente para aceite de oliva deshuesada (Doveri et al., 2006).

De forma análoga al aceite se han llevado a cabo análisis de SSR sobre aceituna aderezada con el objetivo de identificar el origen varietal de las aceitunas de mesa comercializadas (Mahious, 2010). En este estudio, se han seleccionado 7 marcadores SSR para el control de trazabilidad de la aceituna de mesa española.

1.5.4. Identificación varietal en tejidos haploides

En general, los estudios de identificación varietal mediante métodos moleculares han tenido por objetivo determinar el origen varietal, conservar las variedades en bancos de germoplasma y estudiar las relaciones genéticas entre ellas. Estos estudios llevados a cabo en olivo y en otras especies de interés agronómico han sido enfocados hacia aspectos relacionados con la agronomía y el manejo de los recursos naturales por lo que se han utilizado de forma clásica en tejidos vegetativos como la hoja, para los cuales la metodología ha sido adaptada con total eficiencia. El análisis de tejidos haploides del olivo como se indica en este trabajo, ofrece una serie de posibilidades y aplicaciones adicionales de las que existen algunos antecedentes. Como aplicaciones relacionadas, los microsatélites han sido usados para identificar genotipos de olivo como donadores potenciales de polen en una plantación comercial en un contexto de polinización libre (Mookergee et al., 2005). En este caso, los microsatélites fueron determinados en los embriones de olivo resultado de los cruzamientos. Son escasos los estudios que utilizan marcadores moleculares para identificar el origen varietal del polen. Una metodología basada en la utilización de marcadores RFLPs ha sido propuesta para la identificación de varias especies (Eliet y Harbison, 2006). En *Magnolia obovata* Thunb, se ha podido amplificar ADN procedente de granos de polen individuales mediante marcadores microsatélites (Matsuki et al., 2007) y un estudio parecido ha sido llevado a cabo mediante marcadores RAPDs en *Solanum* (Naseer Aziz et al., 1999). El análisis de los microsatélites en *Pinus sylvestris* L. permitió identificar muestras de polen fósil y establecer las relaciones genéticas con las poblaciones actuales de esta especie (Parducci et al., 2005);

también se ha realizado alguna aplicación forense, que ha permitido determinar zonas de crímenes mediante la identificación del origen del polen encontrado en ellas (Craft et al., 2007). Según nuestro conocimiento no hay referencias que describan la identificación del origen varietal del polen de olivo mediante marcadores moleculares.

Los granos de polen son haploides y presentan individualmente una información genética no idéntica a la planta madre, como resultado de poseer un único complemento cromosómico, resultante de la recombinación generada en la meiosis. Sin embargo, en una población suficientemente representativa de granos de polen, todas las posibilidades de segregación estarían representadas, por lo que dicha población incluiría la información genética completa de la planta madre. Por lo tanto, se podría identificar el origen varietal de una muestra de polen que contiene millones de granos, siempre que se obtenga ADN a partir de este tejido.

1.6. El polen del olivo

1.6.1. Reproducción sexual y gametogénesis masculina en el olivo

El grano de polen es una estructura fundamental del ciclo de vida de las plantas con semillas entre los cuales el olivo, y corresponde al microgametofito o gametofito masculino. Su formación tiene lugar en la antera, que es la parte del estambre donde tiene lugar la microsporogénesis, fenómeno que constituye la primera etapa de la gametogénesis y que lleva a la formación de las tétradas a partir de las células madres del polen. Inicialmente, el tejido esporógeno de la antera se divide mediante mitosis para constituir una masa compacta. Tras alcanzar un número determinado de células madres del polen, comienza la meiosis, mediante la cual se pasa de la generación esporofítica diploide a la generación gametofítica haploide (microsporas y granos de polen). La primera división meiótica da lugar a 2 células hijas denominadas diadas, y a continuación, tras una interfase muy breve en la que no tiene lugar síntesis de ADN, ocurre la segunda división meiótica, que finaliza con la formación de cuatro microsporas haploides rodeadas por una pared de calosa (tétrada). En esta fase se inicia la formación de la pared propia de la microspora o primexina. Su desarrollo corre paralelo al de la microspora y se va transformando en una pared gruesa bien

estructurada, característica de la exina o pared del grano de polen maduro. La siguiente etapa de la microsporogénesis consiste en la degradación de la calosa bajo la acción de una calasa sintetizada a nivel del tapetum (tejido poliploide con un elevado metabolismo y función nutricional y protectora de las células madre del polen). Las microsporas de la tétrada una vez libres en el lóculo gracias a la degradación de la pared de calosa bajo la acción de una calasa sintetizada en el tapetum, aumentan rápidamente su volumen y entran en un largo periodo de interfase. En esta fase empieza la microgametogénesis que incluye una división asimétrica para generar las denominadas: célula vegetativa y célula generativa; ambas con tamaño y funciones desiguales. En olivo, como en diversas especies, el grano de polen se mantiene con esta estructura celular (polen bicelular) mientras que en otras especies, tiene lugar una segunda división simétrica que origina dos núcleos epermáticos (polen tricelular). Durante la microsporogénesis tiene lugar la formación de la pared del polen maduro (exina). En general, cada grano de polen incluye toda la información genética necesaria para determinar un organismo haploide y también tiene la capacidad de formar un cigoto tras la unión con el gameto femenino (Johri, 1984).

El grano de polen de olivo maduro tiene un diámetro de 19 μm y su forma puede variar según el grado de hidratación que presente, siendo más o menos ovoide hasta tener la forma de un tetraedro. La elevada cantidad de granos de polen en las anteras, y el gran número de flores e inflorescencias en el árbol en el caso del olivo, compensa la gran pérdida de polen durante su transporte a través del aire. El gametofito masculino (polen) ha sido objeto de numerosos estudios en el olivo (Rodríguez-García *et al.*, 1989, 1990; Olmedilla *et al.*, 1997; Alché *et al.*, 1999) debido al papel crucial que desempeña durante la fecundación y por tanto en la formación del fruto. El fenómeno de autocompatibilidad / incompatibilidad es de crucial importancia ya que afecta a los porcentajes de fructificación. En el caso del olivo hay controversia en esta materia (Cuevas 2001; 2005, Díaz *et al.* 2006b). Las interacciones polen-pistilo regulan la reacción de compatibilidad / incompatibilidad y por eso su estudio es clave para elucidar estos procesos.

La reproducción sexual del olivo tiene lugar en las flores perfectas, constituidas por los estambres y el pistilo. Tradicionalmente, se ha considerado que el olivo es una especie autógama (Riera, 1950). Sin embargo, existen pruebas

de que la incorporación de distintas variedades en un diseño de plantación aumenta la productividad del olivo, lo que indica que es una especie preferentemente alógama (Cuevas, 2005). Los granos se transportan de forma anemófila preferencialmente, hasta depositarse sobre el estigma cuya superficie viscosa y papilosa permite la germinación y crecimiento del tubo polínico a través de las papilas estigmáticas, del estigma, el tejido transmisor del estilo y el ovario hasta llegar al saco embrionario donde ocurre la doble fecundación. Tras la liberación de las células espermáticas, tiene lugar la fusión del núcleo de uno de las dos células gaméticas con el de la ovocélula y el de la otra célula gamética con los dos núcleos polares de la célula central. La primera fusión da lugar a un cigoto diploide o embrión, cuyo posterior desarrollo da lugar a la nueva planta. La segunda fusión produce un endospermo triploide que se transformará en un tejido acumulador de reservas necesarias para el desarrollo del embrión. El conjunto de embrión y endospermo se conoce como semilla.

Los caracteres morfológicos del polen en las planas con semilla, y en particular los de la esporodermis, han sido exitosamente utilizados para la clasificación de las especies vegetales (Martens y Fretz, 1980), especialmente las especies con interés agronómico (Fogle, 1977). Gracias a dichos marcadores morfológicos, se ha podido discriminar variedades dentro una misma especie basándose sobre todo en los caracteres discriminativos de la exina. En el olivo, se empezaron los primeros intentos del uso de caracteres del polen para la identificación de un número de variedades (Roselli, 1979). Posteriormente, los caracteres ultraestructurales de la pared del polen han sido repetidamente utilizados por diversos autores para la discriminación varietal de esta especie, demostrando su utilidad en dicho campo (Pacini and Vosa, 1979; Lanza et al., 1995, 1996; Javady and Arzani, 2001). La mayoría de estos trabajos se han basado en las diferencias en la dimensión de los granos y las diferentes estructuras de la pared, observadas mediante el microscopio electrónico de barrido (MEB). Sin embargo las diferencias internas de la estructura de la pared que se pueden analizar mediante el microscopio electrónico de transmisión (MET), apenas han sido exploradas hasta la fecha (Rejón et al., 2009; Ribeiro et al., 2010).

La autofluorescencia de los tejidos y las células es una característica intrínseca debida a la presencia de moléculas endógenas como los aminoácidos

aromáticos, los lipopigmentos, las coenzimas como la piridina (NADPH) y flavina (FADH₂), que emiten fluorescencia cuando se excitan con luz ultravioleta (Chance *et al.*, 1962; Benson *et al.*, 1979). La autofluorescencia en las células vegetales es debida fundamentalmente a la presencia de la clorofila en los cloroplastos y la lignina en las paredes celulares secundarias (Krause *et al.*, 1991). De forma similar a otros tejidos vegetales, el polen también emite autofluorescencia debido a la presencia de componentes como los carotinoides, fenoles y terpenos (Roshchina *et al.*, 1998) que se encuentran unidos a la exina. La emisión de autofluorescencia ha sido utilizada para evaluar la sensibilidad del polen a factores ambientales como ozono y peróxidos, para estudios de la retención del polen en estigma (Weinbaum *et al.*, 198), para monitorizar el desarrollo del polen (Willemse, 1972; Audran y Willemse, 1982), o simplemente para contar los granos de polen (Fonseca *et al.*, 2002; Suzuzi *et al.*, 2005). Los niveles de autofluorescencia del polen cambian durante su ontogenia y envejecimiento y ha sido correlacionados con su viabilidad por diversos autores (Roshchina *et al.*, 1997). Algunos estudios pioneros han descrito la clasificación taxonómica de diferentes especies de gramíneas basándose en el color fluorescente emitido por el citoplasma y la exina así como la intensidad media de ésta (Driessen *et al.*, 1989). Recientemente, el polen de nueve especies diferentes ha sido identificado mediante el análisis de las características del tamaño y la relación entre los espectros de emisión en la región del azul y el rojo (Mitsumoto *et al.*, 2009). Hasta la fecha, no se ha encontrado en la bibliografía ningún estudio que utilice esta propiedad del polen para la identificación de variedades dentro de una misma especie. En olivo, algunos trabajos han utilizado que utilizan el microscopio confocal para medir la forma de los granos de polen y realizar la discriminación varietal (Rejón *et al.*, 2009).

1.6.2. La pared del polen del olivo

Existe una gran confusión en la terminología de la pared del polen debido a que las primeras observaciones se iniciaron con el microscopio óptico y posteriormente se incorporó la microscopía electrónica de transmisión y de barrido. Esto dio lugar a varias interpretaciones y una diversificación de la terminología de los distintos autores (Heslop-Harrison, 1979). En este estudio

hemos adoptado el sistema establecido por Skvarla y Larson (1966) representado en la figura 5.

La exina y la intina constituyen los dos componentes principales de la pared del polen en el olivo como en las otras especies y se distinguen por su naturaleza química, su morfología y su forma de desarrollarse (Heslop-Harrison, 1975). La exina es la capa exterior de la pared del polen que presenta numerosas ornamentaciones y está compuesta mayoritariamente por esporopolenina. La exina, a su vez, se diferencia en endexina, capa basal, columelas o báculas, y tectum, que es el resultado del engrosamiento terminal de las columelas o báculas y que puede llegar a hacerse más o menos continuo y cubrir la parte externa de la exina. En el caso del olivo el tectum no es continuo y por eso se dice que la exina es semitectada. El tectum presenta ciertos elementos externos esculturales. El conjunto de capa basal, báculas y tectum también es conocido como ectexina. Con el microscopio electrónico de barrido se puede apreciar la estructura reticulada de la exina constituida por lo que se denomina muro que corresponde al tectum y que incluye en su parte más exterior los elementos esculturales. Las superficies que se encuentran entre los muros se denominan lúmenes. La exina del olivo puede tener un espesor de 3-4 μm y juega un papel importante de protección del grano de polen. La esporopolenina que la constituye es un polímero que le confiere una particular resistencia a la biodegradación, conservando la integridad del grano (Johri, 1984). La intina consiste en la capa interior en contacto con el plasmalema que se puede considerar propiamente la pared primaria de la célula, por su composición de hemicelulosa y pectinas (Heslop-Harrison, 1968; 1982). A nivel ultraestructural presenta una matriz fibrilar. La intina ocupa la parte más interna de la pared del grano de polen y juega un papel primordial, contrariamente a la exina. En su parte más externa, la intina presenta un alto contenido de polisacáridos ácidos (pectinas) mientras que en su parte interna es de naturaleza celulósica. (Shivanna y Johri, 1985).

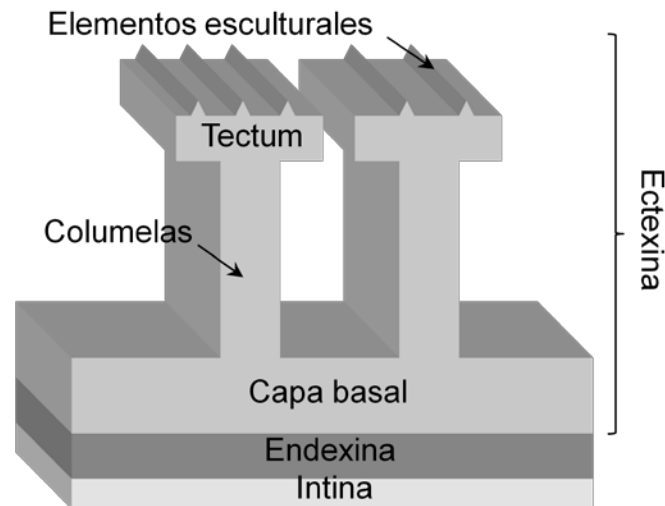


Figura 5. Composición de la pared del polen (Skvarla y Larson, 1966)

Los granos de polen del olivo poseen tres aperturas germinales por donde emerge el tubo polínico durante la germinación. En la zona de la apertura, la exina se reduce y puede desaparecer completamente mientras que la intina aumenta de grosor en esta zona y presenta unos tubulos o proyecciones del plasmalema hacia el exterior (Fernández y Rodríguez-García, 1988). Por el contrario, las estructuras de la exina y de la intina no varían en las zonas intermedias situadas entre las aperturas del grano.

1.6.3. El polen de olivo como vector de alérgenos y su utilidad en la preparación de vacunas

El polen maduro de olivo contiene una elevada cantidad de proteínas, que también se conocen como alérgenos por su capacidad de causar alergias (Blanca *et al.*, 1983, Rodríguez *et al.* 2001). La alergia es una reacción exagerada del organismo cuando se enfrenta a un cuerpo extraño denominado sustancia alérgica o alérgeno, identificado como agresivo para el organismo. La reacción alérgica se caracteriza por dos etapas fundamentales: la sensibilización y la provocación, tras los cuales aparecen los síntomas generales como pueden ser la rinitis, la urticaria, la conjuntivitis o incluso otros síntomas más graves como el asma o los trastornos gastrointestinales, pudiendo llegar a causar un choque anafiláctico. Existe una

multitud de alérgenos de diversos orígenes y formas (International Union of Immunological Societies, 2010) entre los cuales destacan los del polen de diversas plantas con flor, que constituyen uno de los vectores causantes de alergia más importantes.

El polen del olivo es una de las causas principales de la alergia respiratoria estacional (hipersensibilidad tipo 1) en países del área mediterránea, donde este árbol se cultiva masivamente (Bousquet et *al.*, 1985). La alergia al polen de olivo puede ser diagnosticada a través de ensayos clínicos como los SPTs (Skin Prick Tests), realizados tanto de forma dérmica o intradérmica, o gracias a las pruebas RAST (Radio Allergosorbent Test), o también a través de pruebas de liberación de histamina así como pruebas de provocación conjuntival, bronquial o nasal (Beers y Berkow, 1999). Cuando la exposición del paciente al agente alérgico no puede ser reducida (como puede ocurrir con algunos pólenes), es recomendable para numerosos pacientes un tratamiento mediante inmunoterapia con alérgenos a parte de la medicación sintomática tradicional. Dicho tratamiento inmunológico, también denominado como hiposensibilización, desensibilización o vacuna con alérgenos, se basa en la inyección repetida de una dosis progresiva del mismo alérgeno. Existe una gran variabilidad en cuanto a la composición de los alérgenos y la reactividad de los sueros de pacientes frente al polen procedente de distintas zonas geográficas y de distintas variedades de olivo (Bousquet et *al.*, 1985; Waisel et *al.*, 1996; Castro et *al.*, 2003). Actualmente, existen diversas empresas especializadas en la fabricación de vacunas contra la alergia estacional causada por el polen del olivo y también se han comercializado vacunas específicas adaptadas a las variedades cultivadas en la zonas principales del cultivo, como Picual y Hojiblanca (Alché et *al.*, 2003). Sin embargo, en gran parte de los casos, las vacunas suelen prepararse a partir de polen comercial de origen varietal desconocido. Por eso es importante desarrollar métodos sencillos y efectivos para identificar su procedencia. Como se muestra en este trabajo, los microsatelites pueden representar una herramienta potente y eficaz para la identificación del origen varietal del polen utilizado en la fabricación de vacunas.

2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Objetivos y justificación del trabajo

La exploración de la diversidad genética en el olivo ha sido hasta ahora orientada hacia la identificación, la conservación y la mejora de las variedades así como a estudios evolutivos y el conocimiento del genoma de esta especie. Para ello se han desarrollado diferentes métodos de identificación varietal que hasta ahora han implicado especialmente el análisis pomológico de la planta completa o sus órganos (principalmente los endocarpos) y el sondeo del ADN del complemento diploide mediante varios tipos de marcadores moleculares.

El enorme potencial que poseen los sistemas reproductivos de las plantas (y especialmente el grano de polen) en áreas tan dispares como el desarrollo de prácticas agronómicas novedosas, la mejora genética, la biotecnología, la medicina, el análisis filogenético o incluso la alimentación, nos ha hecho plantearnos la posibilidad de extender el uso de métodos de discriminación varietal a este material vegetal. Para ello hemos considerado preciso adaptar los métodos de análisis existentes y desarrollar nuevos métodos de exploración, así como comprobar su utilidad potencial en algunos modelos de uso. Se han planteado por tanto los siguientes

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Establecer un sistema de clasificación varietal basado en el análisis de parámetros morfológicos del polen de olivo.
2. Generar una amplia base de datos de microsátélites en variedades representativas de olivo de diversas procedencias geográficas a partir de tejidos somáticos.
3. Desarrollar un método de identificación del origen varietal del polen de olivo basado en el uso de marcadores microsátélites y establecer comparaciones entre los perfiles esporofíticos y gametofíticos.
4. Evaluar la utilidad potencial del método desarrollado en dos supuestos prácticos.

Objetivos y justificación del trabajo

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Origen de las muestras de olivo estudiadas

En este estudio, se han analizado un total de 183 individuos de olivo procedentes de colecciones de germoplasma (Figura 6). De ellas se han analizado 84 individuos de la colección de Boughrara-Sfax llamada también Conservatorio Nacional del Olivo de “Boughrara”- Sfax y que incluye variedades autóctonas principalmente del sur de Túnez que han sido introducidas en dicho banco de germoplasma tras un programa nacional de prospección de recursos genéticos del olivo. Se han analizado 27 individuos de la colección del centro “Venta del Llano” del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) DE LA Junta de Andalucía situada en Mengíbar que incluye un número considerable de variedades de olivo españolas y también de variedades del resto del mundo. También, se han identificado 11 individuos de la colección del Instituto Nacional de Recursos Biológicos (INRB) situada en la región de Elvas y que incluye un número importante de variedades de olivo cultivadas en Portugal, además de algunas otras variedades del mundo.

Asimismo, se ha analizado la colección situada en la sede del Instituto en Formación de Nutrición Animal (IFNA) que está compuesta por 14 individuos, así como un número de individuos procedentes de plantaciones privadas, en Granada que incluyen 25 individuos de Guejar Sierra, 7 de Pinos Puente y 5 de Santa Fé. También se han analizado 10 individuos procedentes de una plantación privada situada en Serpa (Portugal).



Figura 6. Localización de los bancos de germoplasma analizados.

3.2. Material vegetal estudiado

3.2.1. Recolección de hojas para la extracción de ADN genómico

Se recolectaron muestras de brotes jóvenes de 25 cm de longitud con suficientes hojas jóvenes. Todas las muestras se envolvieron en papel humedecido en agua para evitar su deshidratación. Posteriormente, las hojas fueron transportadas al laboratorio lo más rápidamente posible en bolsas de plástico cerradas herméticamente para poder realizar la extracción de ADN sobre un material fresco.

3.2.2 Polen

Se colocaron bolsas de papel especialmente adaptadas para la recolección de polen en los árboles de cada una de las variedades que se pretendía analizar, en el estadio denominado “flor abierta, anteras turgentes” previo a la dehiscencia de la antera. Después de 3 a 5 días, se quitaron las bolsas, y que fueron transportadas en condiciones óptimas para evitar la hidratación del polen. En el laboratorio, las muestras fueron purificadas separadamente unas de otras para evitar la contaminación: Para ello se utilizaron tamices secuencialmente de 150 y 50 μm . Tras almacenar en viales y congelar en nitrógeno líquido, los viales fueron conservados a -80°C .

También se han suministrado 9 muestras ciegas de polen de la empresa Inmunal S.A. (Madrid, España) sin precisar su origen varietal, ni su procedencia geográfica. Solo se proporcionaron códigos de 1 a 9 para las muestras. Posteriormente, y después de llevar a cabo el análisis y entregar un informe de identificación para dicha empresa, se obtuvo una tabla de identificación del origen varietal de cada una de las muestras.

3.2.3 Vacunas para la extracción de ADN

La empresa Inmunal S.A. (Madrid, España) suministró 8 muestras ciegas de vacunas desensibilizantes al polen de olivo, supuestamente de distintos orígenes varietales. Dichas vacunas fueron numeradas con códigos de 1 a 8. Tras el análisis varietal y la entrega de un informe de identificación se obtuvo la tabla correspondiente de origen varietal.

3.3. Análisis comparativo de los caracteres morfológicos del grano del polen

Para estudiar las diferencias potenciales en el tamaño de los granos de polen entre las distintas muestras se midió el área, la longitud y la anchura de los granos bajo un microscopio óptico LM Zeiss Axioplan. La observación y análisis de los caracteres ultraestructurales de la pared del grano (Figura 7): intina, endexina, estrato basal, ectexina, columelas y distancias entre columelas, fue llevada a cabo en microscopio electrónico de transmisión JEOL modelo JEM1011. Los caracteres de la exina, como son la altura y anchura del muro o

téctum, el área de los lúmenes y las distancias entre elementos esculturales (Figura 7) fueron examinados en microscopio electrónico de barrido FEI modelo QUANTA 400 FEG ESEM / EDAX PEGASUS X4.

Para las observaciones el microscopio óptico, las muestras de polen recolectado se colocaron directamente entre portaobjetos y cubreobjetos y fueron analizadas con un objetivo de 20X. Las imágenes fueron obtenidas usando una cámara ProgRes c3 JENOPTIK (Germany).

Las muestras de polen observadas bajo el MET fueron preparadas mediante una fijación con glutaraldehído al 2% y paraformaldehído al 4% en tampón cacodilato sódico 0,05M (pH 7,2) durante 12 horas a 4 °C (con agitación). Tras realizar 3 lavados de 30 min (4 °C), las muestras fueron sometidas a una post-fijación con tetróxido de osmio al 1% en tampón cacodilato sódico 0,05M (pH 7,2) durante 3 horas a T^a ambiente, con agitación. Nuevamente, se realizaron tres lavados con tampón cacodilato sódico 0,05M (pH 7,2), los dos primeros de 30 min de duración y el último prolongado durante toda la noche. La siguiente etapa consistió en la deshidratación de las muestras, realizando cambios sucesivos en:

- Etanol 30% durante una hora a 4 °C.
- Etanol 50% durante una hora a 4 °C.
- Etanol 70% durante toda la noche a 4 °C.
- Etanol 90% durante una hora a 4 °C.
- Etanol 100% durante una o dos horas a 4 °C.

Seguidamente se hicieron incubaciones en:

- Oxido de propileno durante 5 min.
- Oxido de propileno: EPON (3:1) durante una hora.
- Oxido de propileno: EPON (1:1) durante toda la noche a 4 °C.
- Oxido de propileno: EPON (1:3) durante una hora
- Epón puro durante 12 horas a 4 °C antes de incluir la resina en cápsulas de gelatina y polimerizar a 60 °C durante 48 horas.

Los cortes de las muestras incluidas en las capsulas se realizaron con un microtomo ULTRACUT R (LEICA), primero utilizando una cuchilla de vidrio para obtener cortes semifinos de unas 2 μm y depositarlos en un portaobjetos, para ser examinados al MO tras teñir con azul de metileno, y luego mediante una cuchilla de diamante H-8 8 mm M/DIATOME (ANAME) para obtener cortes ultrafinos de 70-80 nm de espesor. Dichos cortes se recogieron con rejillas de níquel Gilder G200 (Fedelco o Aname) tras cubrirlas con una película de formwar: Polyvinyl Formwar (TAAB, Fedelco). Posteriormente, se realizó una tinción de la muestras con acetato de uranilo al 5 % y citrato de plomo para obtener un mejor contraste a la hora de realizar la observación bajo el MET. Las imágenes se obtuvieron usando una cámara Mega view III (Soft Imaging System). Las medidas de los polenes se realizaron a partir de 10 a 15 granos de polen por variedad sobre fotos de 10.000X de aumento.

Para las observaciones al MEB, las muestras fueron también preparadas previamente mediante una fijación con glutaraldehído al 3% en tampón fosfato sódico 0,025 M (pH 6,8) durante 12 horas a 4°C (con agitación). Después de realizar tres lavados en tampón fosfato sódico 0,025 M (pH 6,8), las muestras fueron sometidas a una etapa de post-fijación con tetróxido de osmio al 1% en tampón cacodilato sódico 0,05M (pH 7,2) durante 12-18 horas a temperatura ambiente (con agitación). Posteriormente, y tras realizar tres lavados en tampón cacodilato sódico 0,05M (pH 7,2) de 30 min cada uno, se procedió con la etapa de deshidratación en etanol 30% (una horas a 4 °C), etanol 50% (una horas a 4 °C), etanol 70% (12 horas a 4 °C), etanol 90% (una horas a 4 °C), etanol 100% (una o dos horas a temperatura ambiente). Mas adelante, se realizó la adhesión de los granos de polen sobre un cubreobjetos mediante una gota de Poly-L-Lys al 1% en solución acuosa durante 1 hora a temperatura ambiente seguida de un lavado con agua destilada. La suspensión de los granos de polen ha sido colocada bajo una atmósfera húmeda saturada con vapores de glutaraldehído en una placa de Petri (14-20 horas a 4°C). Tras realizar tres lavados de 10 min con agua destilada a temperatura ambiente, las muestras fueron recubiertas por vaporización con oro y platino al vacío en un metalizador JEOL HR 1100. La observación al MEB y las fotos fueron realizadas a partir de al menos 6 granos por muestra utilizando aumentos de 4.000X y 20.000X.

Todas las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el programa iTEM Soft Imaging System GMBH que permite realizar las medidas con una calibración previamente establecida para cada sistema de microscopía. Se realizaron al menos 75 medidas por individuo en cada uno de los caracteres estudiados.

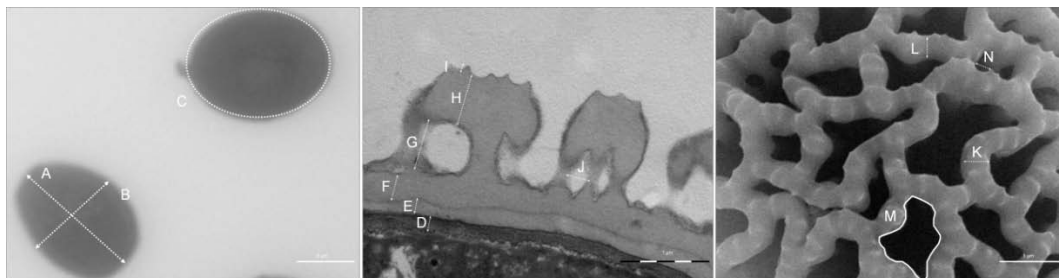


Figura 7. Estructura de la pared del grano de polen de olivo (Punt et al., 2007)

Microscopio óptico A: Eje polar; B: Diámetro ecuatorial; C: Área del grano.

Microscopio electrónico de transmisión: D: Intina; E: Endexina; F: Capa basal; G: Columela; H: Tectum; I: Elementos esculturales del tectum; J: Distancia entre columelas; C+D+E+F: Ectexina.

Microscopio electrónico de barrido: K: Anchura de los muros; L: Altura de los muros; M: Área de los lúmenes; N: Distancia entre lementos esculturales.

Con objeto de simplificar la interpretación de los datos morfológicos de los granos de polen, un sistema de clasificación ha sido establecido previamente mediante un estudio realizado sobre 39 cultivares procedentes de España, Portugal, Túnez, Italia y Líbano (incluyendo las mismas muestras analizadas en el presente trabajo). Este estudio previo permitió determinar 5 categorías de tamaños en cada carácter morfológico. Dichas categorías han sido determinadas considerando la distribución general de las medidas con una repetición de 75 medidas (Tabla 1). Estos rangos establecen un sistema de clasificación de variedades de olivo basado en los caracteres del polen.

Tabla1. Categorías de tamaño para los caracteres morfológicos del grano de polen

	Muy pequeño (1)	Pequeño (2)	Mediano (3)	Grande (4)	Muy grande (5)
Eje polar del grano (µm)	< 19,75	19,75-24,1	24,1-27,1	27,1-29,45	> 29,45
Diámetro ecuatorial de grano (µm)	< 15,2	15,2-17,2	17,2-18,81	18,81-20,3	> 20,3
Área del grano (µm ²)	< 302	302-340	340-490	490-434	> 434
Grosor de ectexina (µm)	< 1,49	1,49-1,65	1,65-1,78	1,78-1,92	> 1,92
Grosor del estrato basal (µm)	< 0,28	0,28-0,39	0,39-0,45	0,45-0,55	> 0,55
Grosor de la endexina (µm)	< 0,15	0,15-0,19	0,19-0,22	0,22-0,25	> 0,25
Grosor de la íntina (µm)	< 0,1	0,1-0,13	0,13-0,155	0,155-0,185	> 0,185
Altura de la columela (µm)	< 0,39	0,39-0,49	0,49-0,60	0,60-0,75	> 0,75
Distancias entre columelas (µm)	< 0,25	0,25-0,45	0,45-0,65	0,65-0,85	> 0,85
Altura del muro (µm)	< 0,60	0,60-0,67	0,67-0,72	0,72-0,75	> 0,75
Anchura del muro (µm)	< 0,39	0,39-0,45	0,45-0,50	0,50-0,58	> 0,58
Área lúmenes (µm ²)	< 0,33	0,33-0,44	0,44-0,53	0,53-0,68	> 0,68
Distancia entre elementos esculturales (µm)	< 0,21	0,21-0,25	0,25-0,28	0,28-0,32	> 0,32

El establecimiento de los rangos de tamaños así como el análisis estadístico de las medidas de los caracteres morfológicos del polen fueron llevados a cabo usando el programa SPSS v13.0 (SPSS Science, apache software foundation, Chicago, IL, USA).

3.4. Análisis de la autofluorescencia en polen

El análisis de la autofluorescencia en polen hidratado y deshidratado fue realizada en 4 variedades de olivo procedentes del banco de germoplasma: Ayrouni (Líbano), Cornicabra (España), Loaime (España) y Picual (España). Se usó un microscopio de barrido láser confocal CI (Nikon, Japón) con una combinación de láseres He-Ne (543 nm) y He-Ne (633 nm). La emisión de autofluorescencia fue capturada independientemente a 590-650 nm (espectro naranja-rojo) y 650LP nm (rojo lejano). Se generaron varias secciones ópticas que fueron posteriormente proyectadas en un único plan. La adquisición fue realizada usando los mismos parámetros en todos los casos para poder comparar entre los

niveles de autofluorescencia registrados para los distintos cultivares. La captura de las imágenes fue llevada a cabo mediante el programa EZ-Cl viewer v.3.30 (Nikon, Japón). Se midió la autofluorescencia de al menos 20 granos de polen de cada variedad, que fue cuantificada en unidades arbitrarias de intensidad por unidad de área (UA/ μm^2) mediante el programa EZ-Cl viewer v.3.30.

3.5. Análisis de los microsatélites en polen y vacunas

3.5.1. Extracción del ADN

En este trabajo se describe por primera vez el análisis de microsatélites en polen de olivo, por lo que fue necesario poner a punto la extracción de ADN de este material. La extracción ha sido llevada a cabo usando el kit Nucleo Spin®Tissue XS (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante y partiendo de 30 mg de muestra. En el caso de las vacunas, se partió de un volumen de 800 μl , utilizando el mismo kit y metodología. La cuantificación del ADN extraído se llevó a cabo con un espectrofotómetro Nano Drop ND-1000 (Wilmington, DE, USA). Se obtuvo una cantidad de ADN de 200 a 400 ng que fue suficiente para llevar a cabo las reacciones de PCR. La extracción del ADN a partir del polen fue llevada a cabo sobre 26 individuos pertenecientes a los Bancos de germoplasma de IFAPA Jaén (España) y Boughrara-Sfax (Túnez).

3.5.2. Amplificación de los microsatélites

La amplificación mediante PCR se realizó en un volumen total de 15 μl que incluía entre 10 y 25 ng de ADN, 1X de tampón de PCR (Biotools, Madrid), 1,5 mM de MgCl, 60 μM de dNTPs, 0,05U / μl de Taq polimerasa (Biotools, Madrid) y 0,2 μM de cada uno de los cebadores (Tabla 2). El ADN procedente del polen ha sido amplificado mediante 10 marcadores microsatélites de las series *ssrOeUA-DCA* (Sefc *et al.*, 2000), *GAPU* (Carriero *et al.*, 2002) y *UDO99* (Cipriani *et al.*, 2002).

La PCR se realizó en un termociclador TGradient Thermoblock (Biometra) con una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, 45 ciclos

de desnaturalización a 95 °C (20 segundos), hibridación dependiendo del cebador (Tabla 2) (1 minuto), una extensión a 72 °C (30 segundos) y una extensión final a 72 °C (8 minutos). Se ha añadido la Taq polimerasa después la etapa de desnaturalización inicial manteniendo las muestras a 80 °C.

Tabla 2. Características de los cebadores de los 10 microsatélites utilizados

Serie cebadores	Motivo repetitivo	Secuencia Forward (5'-3') con marcado fluorescente	Secuencia Reverse (5'-3')	Tª hibridación (°C)
ssrOeUA-DCA3	(GA) ₁₉	FAM-cccaagcggagggttatattgttac	Tgctttgtcgtttgagatgttg	52
ssrOeUA-DCA9	(GA) ₂₃	FAM-aatcaagtctctctcatttcg	gatcctccaaaagtataacctctc	51
ssrOeUA-DCA16	(GT) ₁₃ (GA) ₂₉	FAM-ttaggtgggattctgtagatggtg	Ttttaggtgagttcatagaattagc	50
ssrOeUA-DCA18	(CA) ₁ CT(CA) ₃ (GA) ₁₉	HEX-aagaaagaaaaaggcagaattaagc	Gtttctctctctacataagtgac	50
GAPU59	(CT) ₉	NED-ccctgctttgtcttctctaa	Caaaggtgcactttctctcg	50
GAPU71B	GA(AG) ₆ (AAG) ₈	HEX-gatcaaaaggaagaggataaa	Acaacaaatccgtacgcttg	50
GAPU101	(GA) ₈ (G) ₃ (AG) ₃	NED-catgaaaggaggggacata	Ggcacttgtgtgcagattg	51
GAPU103A	(TC) ₂₆	NED-tgaatttaactttaaccacaca	Gcategctcgattttatcc	50
UDO99-024	(CA) ₁₁ (TA) ₂ (CA) ₄	HEX-ggatttataaaagcaaacatacaaa	Caataacaaatgagcatgataaga ca	52
UDO99-043	(GT) ₁₂	FAM-tcggctttacaaccttcc	Tgccaattatgggctaact	50

3.5.3. Análisis de los microsatélites (Secuenciación)

La presencia de productos de amplificación se visualizó previamente en geles de agarosa al 2%. Estos geles fueron teñidos utilizando el Gel red (Biotium) y visualizados bajo luz ultravioleta en un sistema de documentación de geles Gel Doc 2000 (Bio Rad). Posteriormente, la separación de los fragmentos se realizó mediante un secuenciador automático de tipo capilar ya que permite detectar los tamaños exactos en pares de bases de los alelos. Se usó un secuenciador ABI PRISM 3100 AVANT GENETIC ANALYSER (Applied Biosystems/ Hitachi, Tokyo, Japan), utilizando combinaciones de distintos marcajes fluorescentes de manera que se permita realizar un análisis simultáneo de varios SSRs para un mismo individuo en un sola muestra. Los tamaños de los fragmentos fueron determinados usando los marcadores GeneScan-500 ROX (Applied Biosystems, Warrington, UK) como referencia.

3.5.4. Herramientas bioinformáticas utilizadas para el análisis de los microsatélites

Para analizar el tamaño de los alelos amplificados y detectados en el secuenciador, se utilizaron los programas GENOTYPER 3.7 (Applied Biosystems) y PEAK SCANNER 1.0 (Applied Biosystems).

Para el análisis de los parámetros de variabilidad genética se utilizó el programa CERVUS 3.0 (Marshall *et al.*, 1998). Este programa requiere la elaboración de una matriz alélica que incluye, para cada una de las muestras, los tamaños de alelos obtenidos. Dicho programa ha permitido calcular los valores de heterocigosidad esperada y observada (H_E / H_O). La heterocigosidad esperada se calculó a partir de la frecuencia de cada uno de los alelos asumiendo el equilibrio de Hardy-Weinberg (Nei, 1987), que establece que la composición genética de una población natural permanece en equilibrio mientras no actúen la selección natural, ni ningún otro factor como la mutación o la deriva. La heterocigosidad observada es el número de individuos heterocigotos dividido por el número total de individuos.

El mismo programa permitió calcular la frecuencia de alelos nulos (F_0), una de las principales causas de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (Pemberton *et al.* 1995), que aparecen cuando los oligonucleótidos no pueden hibridar con el ADN, probablemente como consecuencia de la presencia de mutaciones puntuales, de forma que no son por tanto detectables (Pemberton *et al.* 1995). El programa permitió calcular el contenido en información polimórfica (PIC), que es un coeficiente informativo basado en la heterocigosidad esperada y también en las frecuencias alélicas (Botstein *et al.* 1980).

La probabilidad de identidad (PI) fue calculada mediante el programa GIMLET 1.3.3 (Valière, 2002). Este valor representa la probabilidad de que un genotipo determinado no difiera de otros dos individuos elegidos al azar (Waits *et al.* 2001).

El estudio de las relaciones genéticas se realizó mediante el programa NTSYS-PC versión 2.02 (Rohlf, 1998). Dicho análisis se basa en la elaboración de una matriz de 0 y 1 que reúne todos los alelos obtenidos para el conjunto de microsatélites analizados. Cada alelo correspondiente a una banda amplificada se

registró con '1' ó '0', según su presencia o ausencia, respectivamente, para cada genotipo.

El cálculo de las distancias genéticas se realizó adoptando los coeficientes de DICE. El método de agrupación utilizado para la construcción de los dendrogramas fue el método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) (Sneath and Sokal, 1973). La comparación de los perfiles alélicos y el análisis factorial de correspondencia se realizaron usando el programa DARWIN versión 5.0.155 (Perrier et al., 2003).

3.6. Análisis de los microsatélites en hojas

Para la extracción del ADN genómico a partir de las hojas, se usó un protocolo basado en el método de CTAB desarrollado por Murry y Tompson (1980) con modificaciones descritas por De la Rosa et al. (2002).

Los cebadores utilizados pertenecen a las series descritas por Sefc et al., (2000) (ssrOeUA-DCA), Carriero et al., (2002) (GAPU) y Cipriani et al., (2002) (UDO99) (Tabla 2). La amplificación de los SSRs fue realizada de acuerdo con el procedimiento descrito por Belaj et al., (2004c). La amplificación se realizó en un volumen total de 20 µl que incluía: entre 5 y 25 ng de ADN genómico, 1X de tampón de PCR (Biotools, Madrid), 1,5 mM de MgCl, 60 µM de dNTPs, 0,028 U/µl de Taq polimerasa (Biotools) y 0,2 µM de cada uno de los cebadores Forward y Reverse (Thermo). La PCR se realizó en un el mismo termociclador mencionado anteriormente con una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C (20 segundos), hibridación dependiendo del cebador (Tabla 2) (30 segundos), una extensión a 72 °C (30 segundos) y una extensión final a 72 °C (8 minutos). Para la revelación, el análisis de los alelos y todos los análisis posteriores se usaron los mismos métodos descritos en el apartado anterior.

4. RESULTADOS

4.1. Identificación de variedades de olivo utilizando caracteres morfológicos del polen

Con el objeto de determinar si es posible establecer un sistema de identificación varietal del polen de olivo basado en el uso de un amplio panel de parámetros morfológicos, se ha llevado a cabo el estudio de la morfología del polen en 14 individuos procedentes de la colección de germoplasma de Boughrara-Sfax (Túnez), mediante la utilización de microscopía óptica, electrónica de transmisión (MET) y microscopía electrónica de barrido (MEB), después de haber procesado las muestras siguiendo el protocolo correspondiente al tipo de la microscopía a utilizar.

4.1.1. Análisis del tamaño del grano de polen a microscopía óptica

Las muestras observadas bajo microscopio óptico presentan diferencias en el tamaño de los granos de polen entre los individuos analizados. La figura 8 reúne ejemplos de fotos bajo 250X de aumento donde se pueden analizar el eje polar, el diámetro ecuatorial y el área del grano. Todas las muestras fueron recolectadas y procesadas en las mismas condiciones, de manera que los parámetros de los granos de polen son comparables. La figura 9 es un gráfico que representa los valores medios obtenidos a partir de 75 medidas por cada individuo con las desviaciones estándar correspondientes. Como era de esperar, se observa una correlación directa entre estos 3 parámetros. El eje polar varió entre 19,51 μm (variedad Zeitoun Boubazzoula) y 23,28 μm (variedad Echahla) mientras que el diámetro ecuatorial osciló entre 15,53 μm en Chemlali Mahres y 17,56 μm en Khechinet Sig. En cuanto a las medidas del área, los granos de polen que presentaron los valores más bajos fueron de la variedad Chemlali Mahres con una media de 272,49 μm^2 , mientras que aquellos que presentaron el área más grande fueron de la variedad Echahla con una media de 343,69 μm^2 .

Los valores del eje polar, diámetro ecuatorial y área presentaron unas desviaciones estándares constantes que no superaron el 7,8% del valor medio para cada parámetro.

La relación entre el eje polar y el diámetro ecuatorial fue calculada para determinar la categoría de tamaño al que pertenecen los granos de cada individuo basándose en un sistema de clasificación universalmente aceptado (Valdés et al., 1987) (datos no representados). Dicha tasa varió entre 1,14 en la variedad Zeitoun

Boubazoula y 1,43 en Sehli Sned. Los pólenes de las muestras analizadas se dividen en dos grupos; Zeitoun Boubazoula, Horr El Kotti, Boubazoula, Khchinet Sig, Lqam El Kotti, Baldi Charqia y Injassi Hchichina pertenecen al grupo del polen de forma “subprolada” (elíptica: eje polar/diámetro ecuatorial 1,14 – 1,33) mientras que el resto de los individuos pertenece al grupo de polen de forma “prolada” (Alargado hacia los polos: eje polar/diámetro ecuatorial 1,33 – 2).

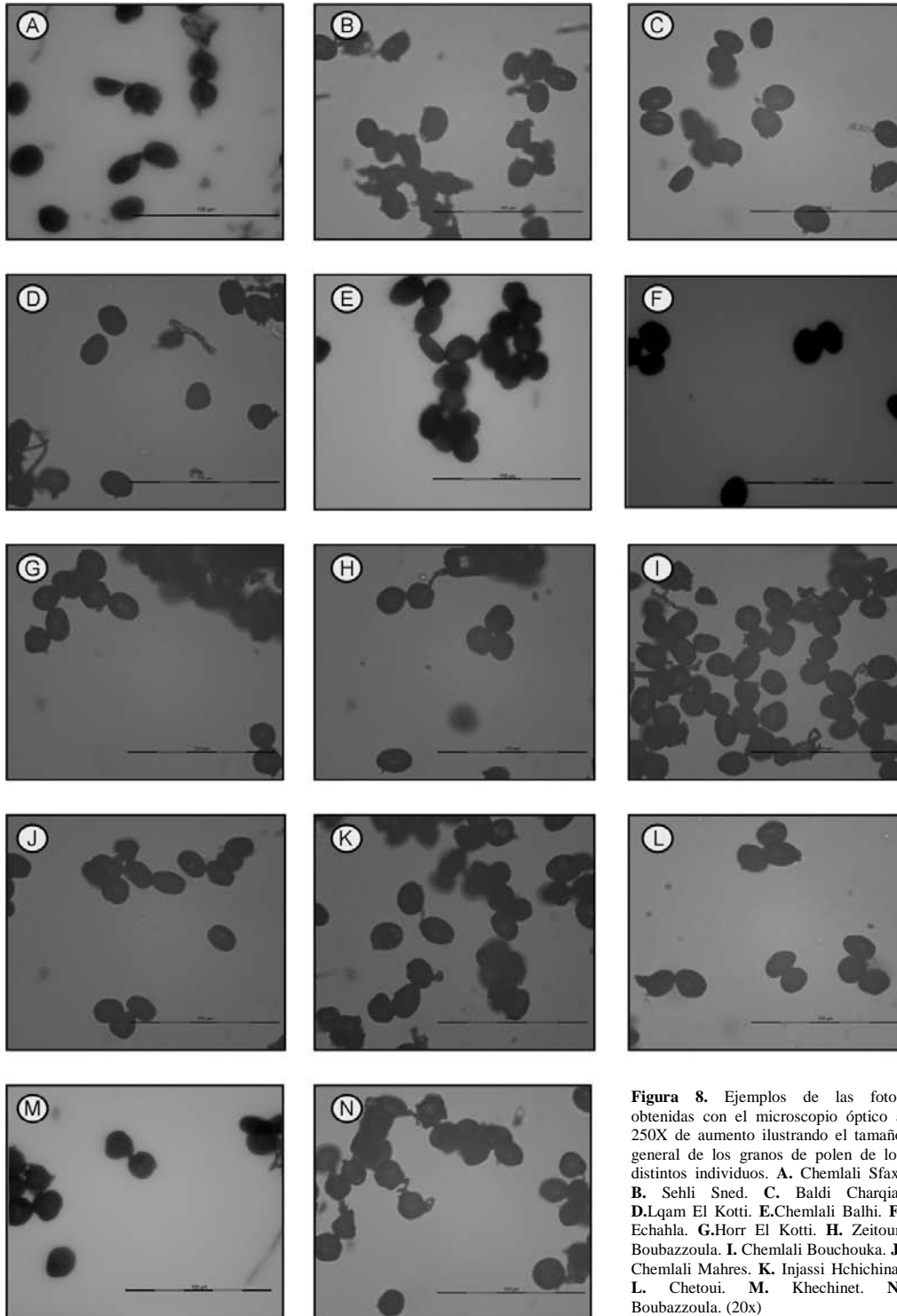


Figura 8. Ejemplos de las fotos obtenidas con el microscopio óptico a 250X de aumento ilustrando el tamaño general de los granos de polen de los distintos individuos. **A.** Chemlali Sfax. **B.** Sehli Sned. **C.** Baldi Charqia. **D.** Lqam El Kotti. **E.** Chemlali Balhi. **F.** Echahla. **G.** Horr El Kotti. **H.** Zeitoun Boubazzoula. **I.** Chemlali Bouchouka. **J.** Chemlali Mahres. **K.** Injassi Hchichina. **L.** Chetoui. **M.** Khechinet. **N.** Boubazzoula. (20x)

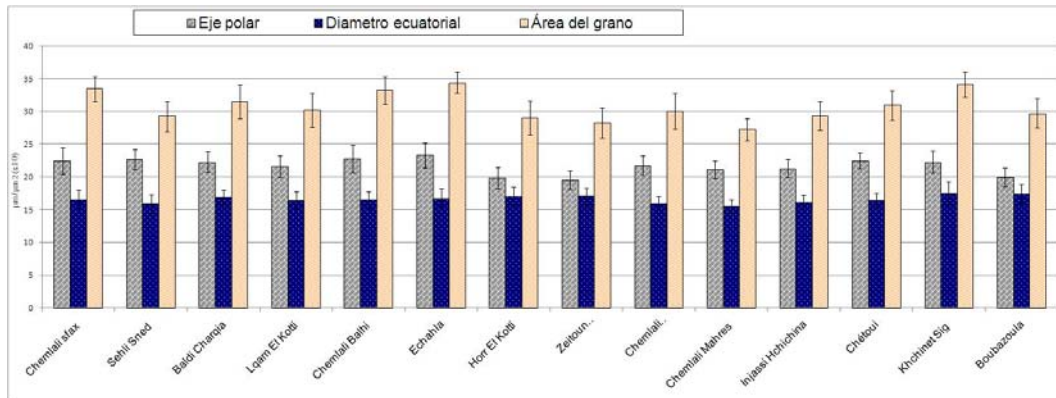


Figura 9. Valores medios del eje polar, diámetro ecuatorial y área de los granos. Los valores del área son representados en el mismo eje Y multiplicando los valores por 10^{-1} .

4.1.2. Análisis de los componentes de la pared del grano de polen a microscopía electrónica de transmisión (MET)

Las fotos obtenidas han permitido observar claramente las diferentes estructuras presentes a nivel de la pared del grano de polen. El estudio de dichas estructuras ha sido llevado a cabo mediante el análisis de 6 parámetros que son: el grosor de ectexina, la capa basal, la endexina, la intina, la altura de las columelas y las distancias entre las columelas. La figura 10 muestra ejemplos de la pared de granos de polen de 14 individuos del banco de germoplasma de Boughrara-Sfax (Túnez). La figura 11 es un gráfico que representa los valores medios obtenidos para los parámetros analizados.

Debido a la variabilidad que presentan las diferentes estructuras de la pared del polen en las proximidades de las aperturas del grano, todas las medidas de los caracteres estudiados han sido realizadas en una zona intermedia situada entre dos aperturas.

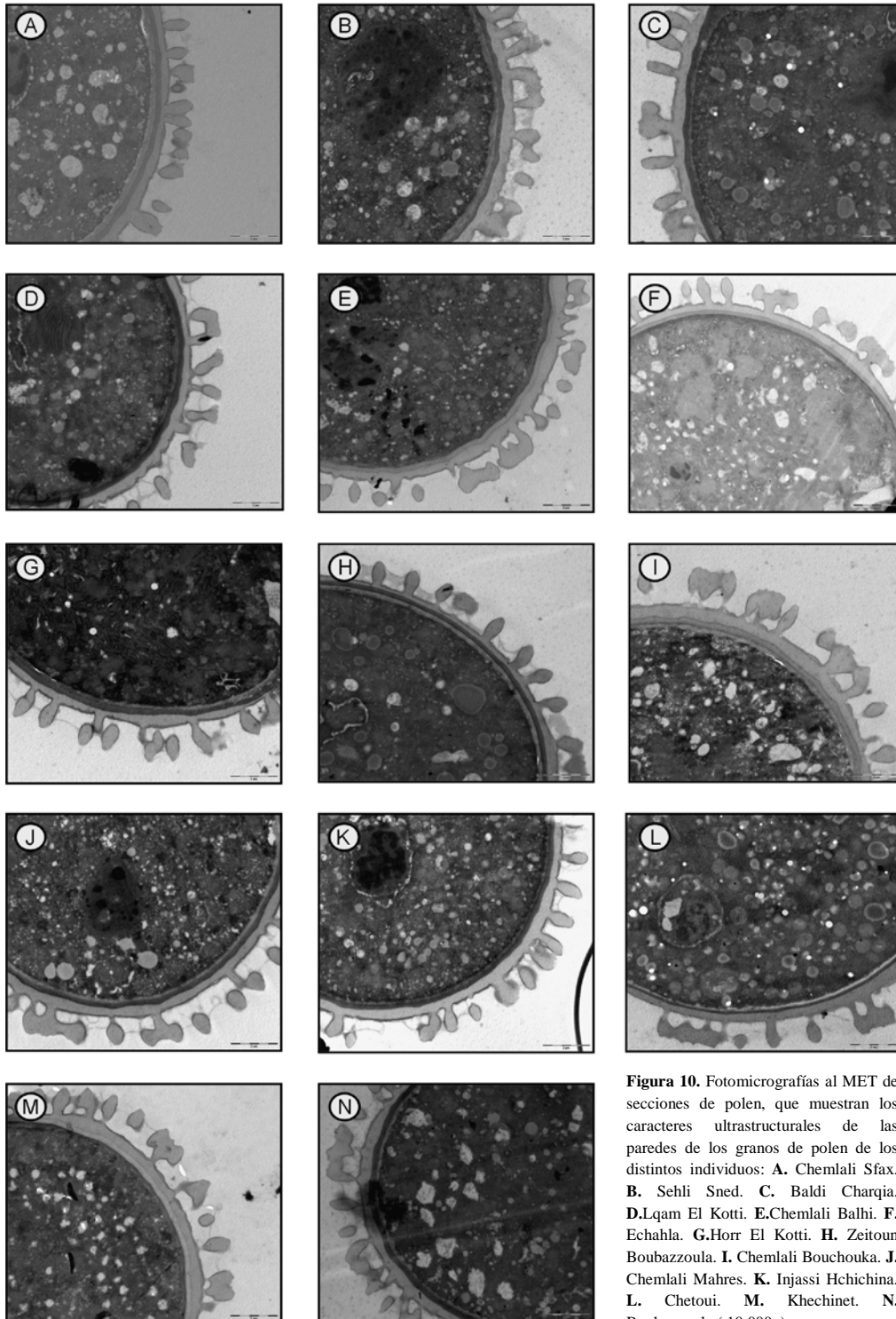


Figura 10. Fotomicrografías al MET de secciones de polen, que muestran los caracteres ultraestructurales de las paredes de los granos de polen de los distintos individuos: **A.** Chemlali Sfax. **B.** Sehli Sned. **C.** Baldi Charqia. **D.** Lqam El Kotti. **E.** Chemlali Balhi. **F.** Echahla. **G.** Horr El Kotti. **H.** Zeitoun Boubazzoula. **I.** Chemlali Bouchouka. **J.** Chemlali Mahres. **K.** Injassi Hchichina. **L.** Chetoui. **M.** Khechinet. **N.** Boubazzoula. (10.000x)

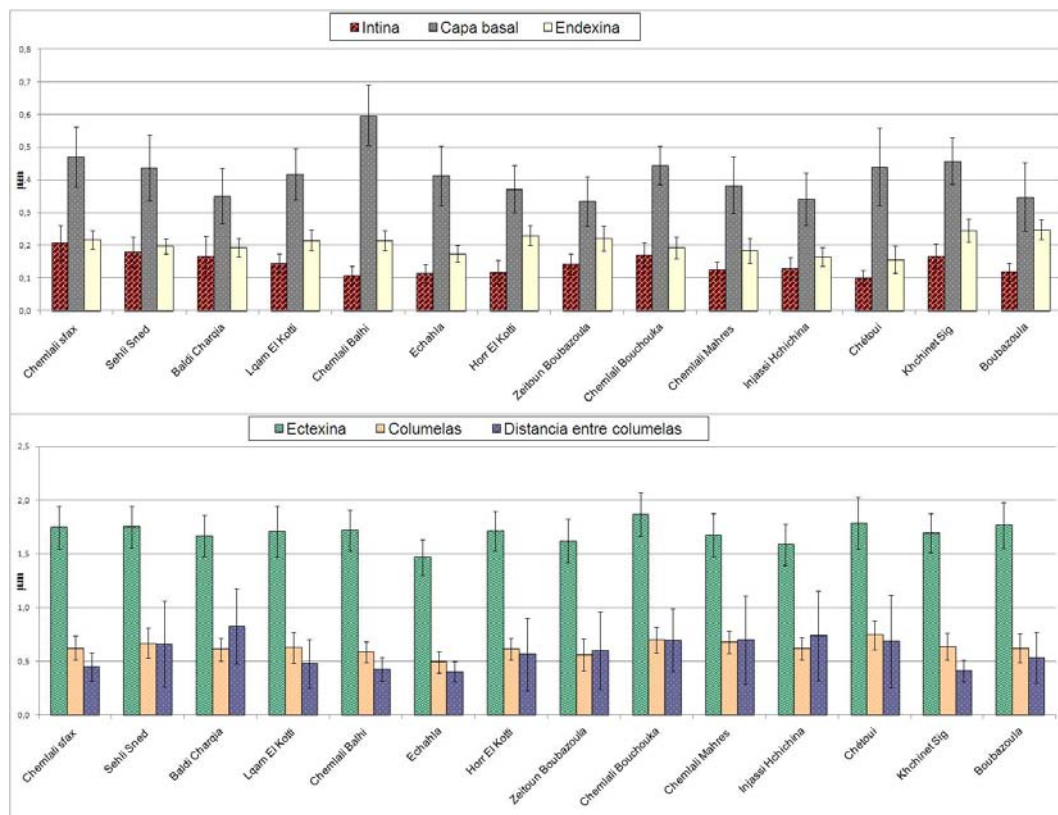


Figura 11. Grafico representando los valores medios del grosor de la intina, capa basal, endexina, ectexina, la altura de las columelas y la distancia entre columelas en los granos de polen de las distintas muestras analizadas.

El tamaño de la intina varió entre $0,1\mu\text{m}$ (en la variedad Chetoui) y $0,2\mu\text{m}$ (en la variedad Chemlali Sfax) mientras que la capa basal osciló entre $0,33\mu\text{m}$ en Zeitoun Boubazoula y $0,59\mu\text{m}$ en Chemlali Balhi. La endexina present valores que variaron entre $0,15\mu\text{m}$ en la variedad Chetoui y $0,24\mu\text{m}$ en la variedad Boubazoula.

El tamaño medio de la ectexina varió entre $1,46\mu\text{m}$ en la variedad Echahla y $1,86\mu\text{m}$ en la variedad Chemlali Bouchouka, mientras que el tamaño de las columelas osciló entre $0,5\mu\text{m}$ en la variedad Echahla y $0,74\mu\text{m}$ en la variedad Chetoui. La variedad que presentó valores de distancias entre columelas más bajos

fue Echahla (0,4 μm) mientras que la variedad Baldi Charquia presentó el valor medio más elevado (0,82 μm).

Excepto las distancias entre columelas, todos los caracteres de la pared del polen observados al MET presentaron una desviación estándar relativamente constante, que no superó el 25% del valor de la media. Para el parámetro “distancia entre columelas”, se ha observado una desviación estándar muy elevada, que representó el 47,6% de la media obtenida.

Aparte de las diferencias de tamaño encontradas entre las diferentes capas de la pared también se observaron diferencias en la densidad electrónica de los diferentes estratos de la pared, y que se hace más llamativa en la capa basal. En la mayoría de los individuos analizados, la capa basal presentó una elevada densidad a los electrones lo que le confiere un alto contraste fácilmente diferenciable del resto de las capas. Sólo en Chemlali Balhi y Khechinet Sig la densidad electrónica es mucho menor, siendo más difícil distinguirla de las otras capas de la exina. Esta característica ha sido repetitiva en todas las muestras de los diferentes individuos analizados.

4.1.3. Análisis de los componentes de la exina a microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las observaciones al MEB han permitido analizar las estructuras externas de la exina y apreciar diferencias entre los distintos genotipos procedentes de la colección de germoplasma de Túnez. Los parámetros analizados han sido la altura y anchura del muro (que corresponde al tectum), el área del lumen (espacio que hay entre las columelas o báculas al MET) y la distancia entre los elementos esculturales del muro. Al igual que para los caracteres ultraestructurales de la pared observados al MET, las medidas de las imágenes al MEB también fueron realizadas en las zonas intermedias entre las aperturas de los granos, ya que existe una variación considerable en las proximidades de las zonas aperturales de la exina. La figura 12, presenta el aspecto general de la pared de los granos de polen de los distintos individuos estudiadas a bajos aumentos (4.000x). La figura 13a y 13b, muestra detalles de los caracteres externos de la exina a mayores aumentos (20.000x)

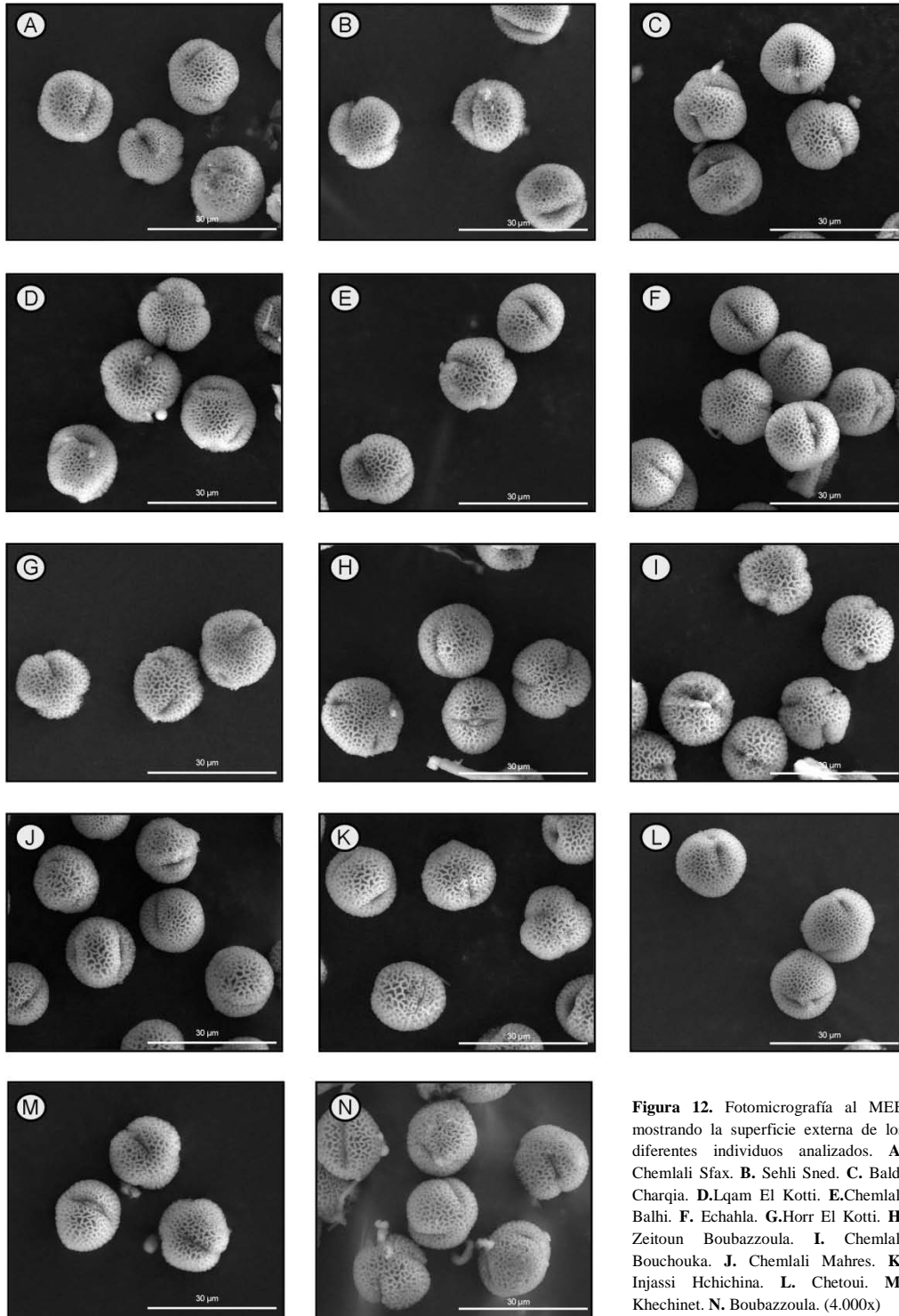


Figura 12. Fotomicrografía al MEB mostrando la superficie externa de los diferentes individuos analizados. **A.** Chemlali Sfax. **B.** Sehli Sned. **C.** Baldi Charqia. **D.** Lqam El Kotti. **E.** Chemlali Balhi. **F.** Echahla. **G.** Horr El Kotti. **H.** Zeitoun Boubazzoula. **I.** Chemlali Bouchouka. **J.** Chemlali Mahres. **K.** Injassi Hchichina. **L.** Chetoui. **M.** Khechinet. **N.** Boubazzoula. (4.000x)

Figura 13a. Fotomicrografías al MEB en los que se puede apreciar los caracteres morfológicos de la exina reticulada. **A.** Chemlali Sfax. **B.** Sehli Sned. **C.** Baldi Charqia. **D.**Lqam El Kotti. **E.**Chemlali Balhi. **F.** Echahla. **G.**Horr El Kotti. **H.** Zeitoun Boubazzoula. (20.000x)

Figura 13b. Microfotografías al MEB en los que se puede apreciar los caracteres morfológicos de la exina reticulada **I.** Chemlali Bouchouka. **J.** Chemlali Mahres. **K.** Injassi Hchichina. **L.** Chetoui. **M.** Khechinet. **N.** Boubazzoula. (20.000x)

Los valores medios de altura del muro variaron entre 0,66 μm para Lqam el Kotti y 0,76 μm para Chemlali Bouchouka teniendo una variación de sólo 0,1 μm . (Figura 14). La anchura del muro, en cambio presenta mayores oscilaciones, que van desde 0,35 μm en Chemlali Bouchouka hasta 0,65 μm en Khechinet Sig. La variedad que presentó el área de lúmenes más pequeño fue Echahla (0,35 μm^2) mientras que Chemlali Bouchouka presentó el área más elevada (0,67 μm^2). En cuanto a la distancia entre los elementos esculturales, la variedad Chemlali Balhi

presentó el valor medio mas pequeño (0,2) y la variedad Chetoui el valor más grande (0,26). Todas las desviaciones estándares de las medidas realizadas fueron inferiores al 20% de los valores medios, excepto el área del lumen cuya desviación estándar fue de 39,1%.

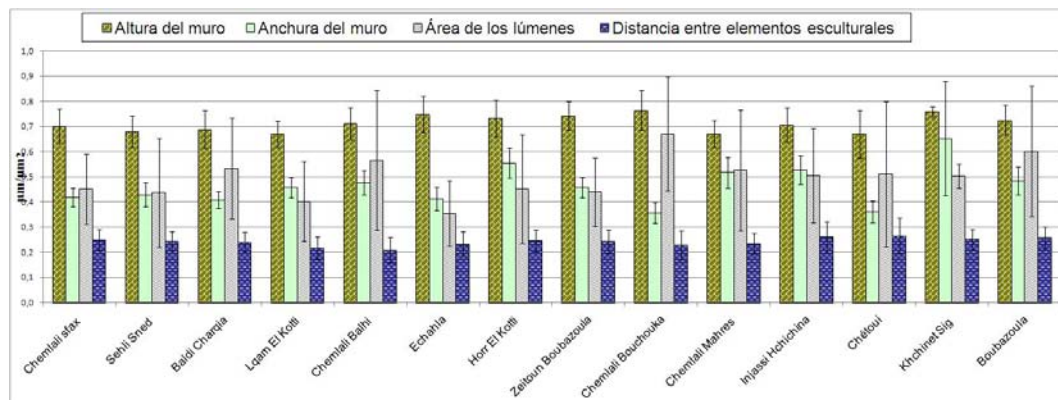


Figura 14. Gráfico representando los valores medios de la altura del muro, la anchura del muro, el área de los lúmenes y la distancia entre los elementos esculturales de la exina del polen de los distintos individuos analizados.

4.1.4. Discriminación de los cultivares y análisis estadístico.

Con objeto de evaluar la utilidad de los caracteres morfológicos de la pared del polen para la discriminación de las variedades de olivo de Túnez, se ha utilizado un sistema de clasificación que consiste en asignar una categoría a cada rango de tamaños en lugar de utilizar las medidas directamente realizadas sobre los pólenes de las distintas variedades (Tabla 1). A partir de dichas categorías, se ha llevado a cabo el análisis estadístico usando 11 caracteres morfológicos del polen. Se han descartado los parámetros de distancias entre columelas y el área del lumen debido a sus elevadas desviaciones estandaradas (47,6% y 39,1% respectivamente). La tabla 3 representa las categorías dominantes obtenidas para cada individuo de la colección de germoplasma de Sfax (Túnez) en cada uno de los parámetros analizados.

Tabla 3. Categorías de las medidas realizadas de los diferentes caracteres morfológicos del grano de polen en los 14 individuos del banco de germoplasma de Boughrara- Sfax.

	Eje polar	Díametro ecuatorial	Área del grano	Grosor de la ectexina	Grosor de la capa basal	Grosor de la endexina	Grosor de la intina	Altura de la columela	Altura del muro	Anchura del muro	Distancias entre elementos esculpturales
Chemlali sfax	2	2	2	3	4	3	5	4	3	2	2
Sehli Sned	2	2	1	3	4	3	5	4	3	2	2
Baldi Charqia	2	2	2	3	2	3	5	4	3	2	2
Lqam El Kotti	2	2	1	4	4	3	3	4	2	2	1
Chemlali Balhi	2	2	2	3	5	3	1	3	3	3	1
Echahla	2	2	3	1	4	2	2	3	4	2	1
Horr El Kotti	2	3	1	2	2	4	1	3	4	4	2
Zeitoun Boubazoula	1	2	1	2	2	4	3	3	4	3	2
Chemlali Bouchouka	2	2	1	5	3	2	5	4	5	1	1
Chemlali Mahres	2	2	1	4	2	2	2	4	3	4	2
Injassi Hchichina	2	2	1	1	2	2	2	4	3	4	2
Chétoui	2	2	2	5	4	1	1	5	2	1	1
Khchinet Sig	2	3	3	2	4	5	4	4	5	5	2
Boubazoula	2	3	1	3	2	5	2	4	4	3	2

4.1.4.1. Analisis ANOVA

Se ha llevado a cabo un análisis de la varianza con el objetivo de determinar si los parámetros de tamaño del polen, y de los caracteres morfológicos de su pared difieren según el origen varietal del polen analizado. El análisis ANOVA, como se muestra en la tabla 4, indica que todos los parámetros estudiados presentan diferencias significativas entre los individuos analizados ($P=0,000$; $<0,05$).

Tabla 4. Análisis de varianza de los parámetros morfológicos del polen

		Suma de Cuadrados	Media cuadrática	F	Sig.
Eje polar	Inter-grupos	74,909	5,762	26,010	,000
	Intra-grupos	228,402	,222		
	Total	303,311			
Diametro ecuatorial	Inter-grupos	101,034	7,772	14,214	,000
	Intra-grupos	563,741	,547		
	Total	664,775			
Area del grano	Inter-grupos	312,218	24,017	85,695	,000
	Intra-grupos	288,946	,280		
	Total	601,164			
Grosor de la ectexina	Inter-grupos	301,678	23,206	14,729	,000
	Intra-grupos	1624,318	1,575		
	Total	1925,996			
Grosor de la capa basal	Inter-grupos	495,676	38,129	40,226	,000
	Intra-grupos	977,246	,948		
	Total	1472,922			
Grosor de la endexina	Inter-grupos	599,773	46,136	52,553	,000
	Intra-grupos	905,111	,878		
	Total	1504,884			
Grosor de la intina	Inter-grupos	809,589	62,276	57,072	,000
	Intra-grupos	1125,010	1,091		
	Total	1934,599			

Altura de la columela	Inter-grupos	207,859	15,989	20,664	,000
	Intra-grupos	797,743	,774		
	Total	1005,602			
Altura del muro	Inter-grupos	494,742	38,057	34,569	,000
	Intra-grupos	1135,034	1,101		
	Total	1629,776			
Anchura del muro	Inter-grupos	897,842	69,065	98,541	,000
	Intra-grupos	722,602	,701		
	Total	1620,444			
Distancias entre elementos esculturales	Inter-grupos	124,961	9,612	6,969	,000
	Intra-grupos	1422,101	1,379		
	Total	1547,062			

4.1.4.2. Análisis factorial

Se ha llevado a cabo un análisis factorial para la reducción de los datos obtenidos con objeto de destacar los componentes principales que agrupan los parámetros estudiados y por tanto reducir el efecto de la interferencia entre dichos caracteres sobre la varianza. Dicho análisis permitió por un lado determinar la naturaleza de las variables dependientes, que en este caso son los parámetros morfológicos del polen, y por otro lado, identificar aquellos parámetros que tienen mayor influencia sobre la varianza. Los resultados han demostrado la presencia de 11 componentes principales que explican el 100% de la varianza. Sin embargo, destacan 4 componentes que explican el 76,74% de la varianza total. Por lo tanto, se pueden considerar únicamente dichos componentes para simplificar los datos, teniendo en cuenta que sólo se pierde el 23,26% de la información (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis factorial: varianza explicada

Componentes	Valores propios iniciales			Extracción de la suma de los cuadrados		
	Total	% de varianza	Cumulativo %	Total	% de varianza	Cumulativo %
1	3,765	34,227	34,227	3,765	34,227	34,227
2	1,851	16,826	51,054	1,851	16,826	51,054
3	1,502	13,651	64,704	1,502	13,651	64,704
4	1,324	12,036	76,741	1,324	12,036	76,741
5	,910	8,273	85,013			
6	,616	5,599	90,612			
7	,470	4,273	94,885			
8	,295	2,682	97,568			
9	,154	1,399	98,966			
10	,092	,836	99,802			
11	,022	,198	100,000			

Para determinar los parámetros morfológicos más influyentes sobre los principales factores, se analizó la matriz de componentes rotados (Tabla 6).

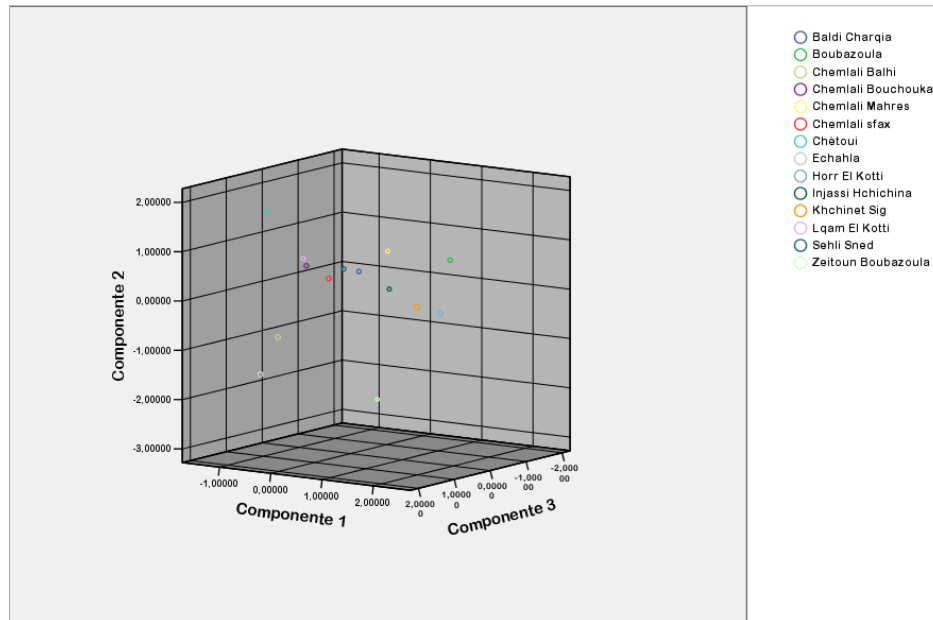
En el primer componente, el cual explica el 34,22% de la varianza, el parámetro más influyente, es la endexina. En el segundo componente (16,82%) el parámetro más influyente es el área de los granos. En el tercer componente son las columelas y en el cuarto es la intina.

Otros parámetros también tuvieron una contribución importante en los diferentes componentes. Así, en el primer componente hay que tener en cuenta la anchura del muro, el diámetro ecuatorial y las distancias entre elementos esculturales. En el segundo componente, se destaca la contribución del estrato basal mientras que en el tercer componente hay que mencionar el eje polar, la intina y el diámetro ecuatorial.

Para tener una idea sobre el efecto discriminativo de los componentes principales y de las variables más influyentes, se han representado los tres primeros componentes como ejes en la figura 15. También, en la figura 16, se han representado los 3 parámetros morfológicos del polen con mayor contribución.

Tabla 6. Análisis factorial: Matriz de componentes rotados

	Componentes			
	1	2	3	4
Eje polar	-,327		,600	-,439
Diámetro ecuatorial	,719		,463	
Área		,829		
Ectexina	-,674	-,335	,336	
Capa basal	-,502	,704		
Endexina	,808			
Intina			,465	,798
Columelas	-,518	-,346	,629	
Altura del muro	,614			,416
Anchura del muro	,799			-,365
Distancias entre elementos esculturales	,701	-,462		

**Figura 15.** Discriminación de los individuos mediante los tres primeros componentes principales

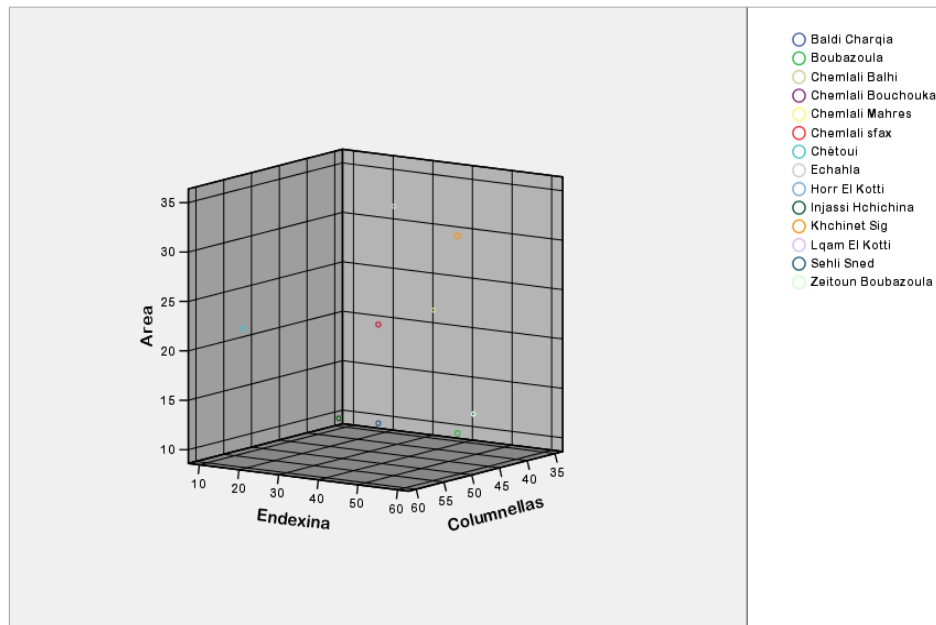


Figura 16. Discriminación mediante los parámetros más influyentes sobre los 3 primeros componentes.

Descartando las distancias entre columelas y los áreas de los lúmenes por presentar una desviación estándar elevada, se establecieron las relaciones entre los 14 individuos analizados basándose sobre los 11 caracteres morfológicos del polen seleccionados. La figura 17 representa el dendrograma obtenido mediante el método de agrupación UPGMA adoptando el coeficiente de similitud de DICE.

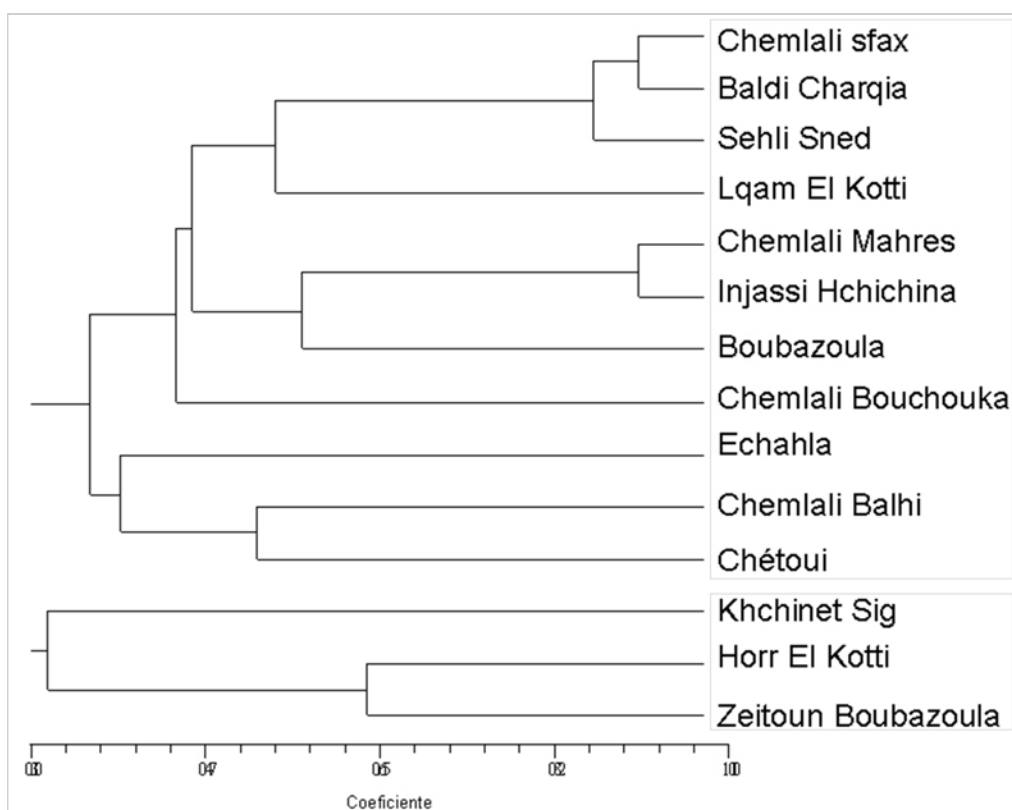


Figura 17. Dendrograma de las relaciones genéticas basadas en 11 parámetros morfológicos del polen

El dendrograma presenta dos grupos principales, el primero constituido por los individuos Chemlali Sfax, Baldi Charqia, Sehli Sned, Lqam el Kotti, Chemlali Mahres, Injassi Hchichina, Boubazoula, Chemlali Bouchouka, Echahla, Chemlali Balhi y Chetoui mientras que el segundo grupo reúne los individuos Khchinet Sig, Horr el Kotti y Zeitoun Boubazoula. Los coeficientes de similitud DICE variaron de 0,18 (por ejemplo entre Chemlali Sfax y Horr el Kotti) a 0,90 (por ejemplo entre Chemlali Mahres y Injassi Hchichina).

A partir del dendrograma se destaca la gran similitud entre los individuos Chemlali Sfax, Baldi Charqia y Sehli Sned que se agrupan juntos. Igualmente, se agrupan los individuos Chemlali Mahres e Injassi Hchichina. También se destaca la gran disimilitud de los individuos Horr el Kotti y Zeitoun Boubazoula.

4.1.5. Identificación de variedades de olivo usando autofluorescencia

La autofluorescencia en el polen fue observada tanto en polen deshidratado como en polen hidratado. La figura 18 representa la suma de la fluorescencia emitida a 590-650 nm y 650LP nm tras excitación a 543 nm (láser verde) y 633 nm (láser rojo) respectivamente, en el polen de la variedad Picual. La autofluorescencia se observó únicamente a nivel de la exina, mientras que las aperturas no mostraron fluorescencia. Existe heterogeneidad entre los diferentes granos de polen de la misma muestra. La autofluorescencia disminuyó considerablemente en el polen hidratado. Sin embargo, se observó que un número determinado de granos mantiene un alto nivel de fluorescencia incluso en el polen hidratado.

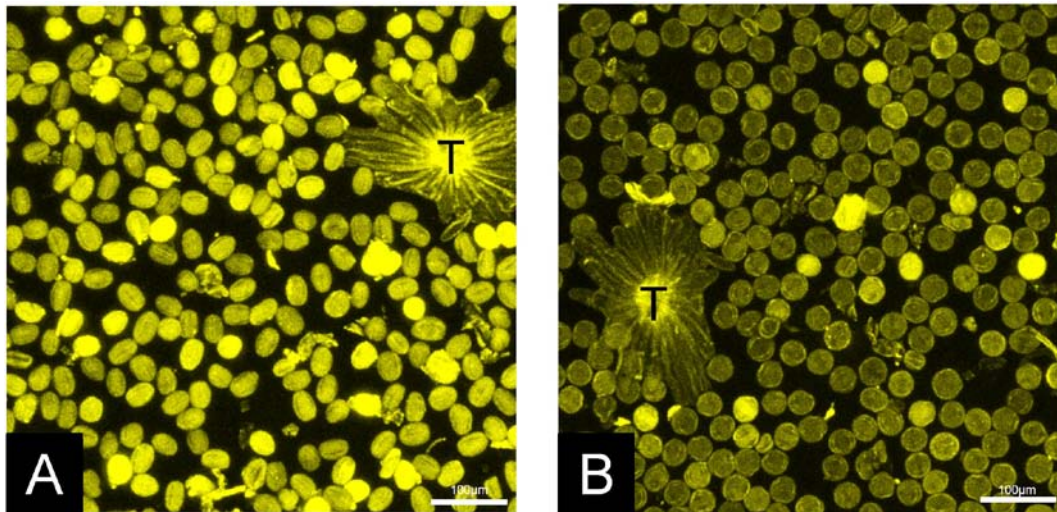


Figura 18. Autofluorescencia en polen de olivo de la variedad Picual. A: Polen deshidratado; B: Polen hidratado.

La figura 19 representa la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia total y la relación entre la fluorescencia emitida en la región verde y roja, tanto en polen deshidratado como hidratado de la variedad Picual. La emisión fue superior en el espectro 590-650 nm que en el espectro 650LP nm. Igualmente, el polen deshidratado mostró niveles medios más elevados de autofluorescencia que el polen hidratado.

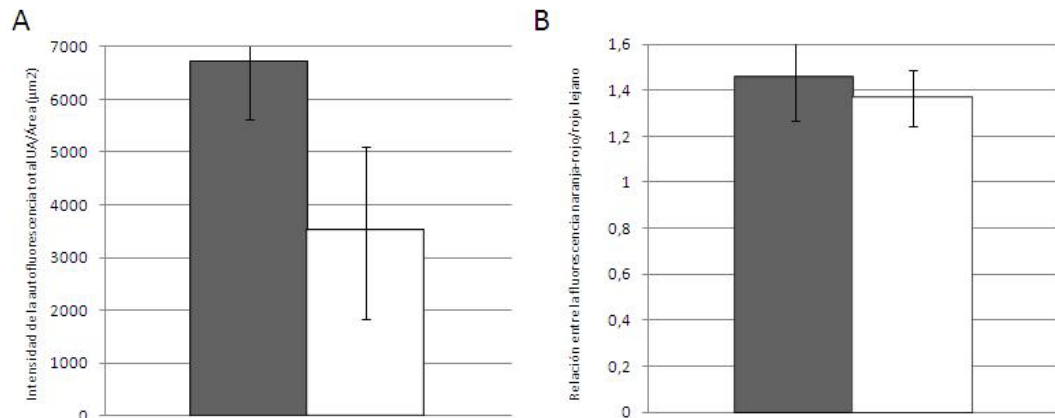


Figura 19. Cuantificación de la autofluorescencia en el polen deshidratado (Barras grises) e hidratado (Barras blancas) de la variedad Picual. A: Autofluorescencia total; B: Relación entre la fluorescencia naranja-rojo/ rojo lejano.

Existen variaciones estadísticamente significativas en el nivel de autofluorescencia total emitida por los granos de polen de cada una de las cuatro variedades analizadas (Kruskal-Wallis test, $\chi^2 = 28.228$, $p = 0.000$) (Figura 20). La figura 21 representa las diferencias registradas en la autofluorescencia total y la tasa de fluorescencia entre el espectro naranja-rojo/ rojo lejano que también mostró diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis test, $\chi^2 = 35.779$, $p = 0.000$). El análisis comparativo usando el test de Mann Whitney indicó que la variedad Ayrouni representa el valor más elevado de autofluorescencia total en comparación con las variedades Picual, Loiamé y Cornicabra cuya autofluorescencia total es parecida. Todos los cultivares presentaron la mayor emisión en el rango 590-650 nm, donde se revelaron también diferencias entre cultivares ya que en este caso la variedad Picual presentó una intensidad superior al resto de las variedades.

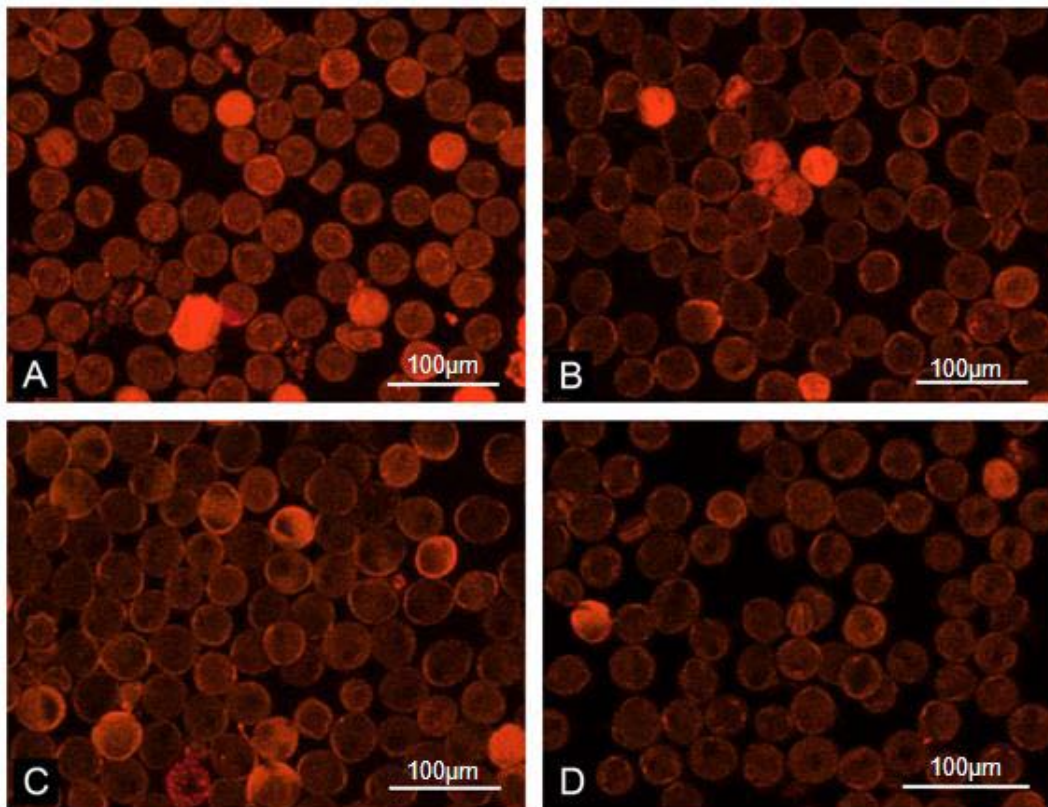


Figura 20. Imágenes de autofluorescencia emitida por el polen hidratado distintos cultivares de olivo. A: Ayrouni, B: Cornicabra, C: Loaime, D: Picual

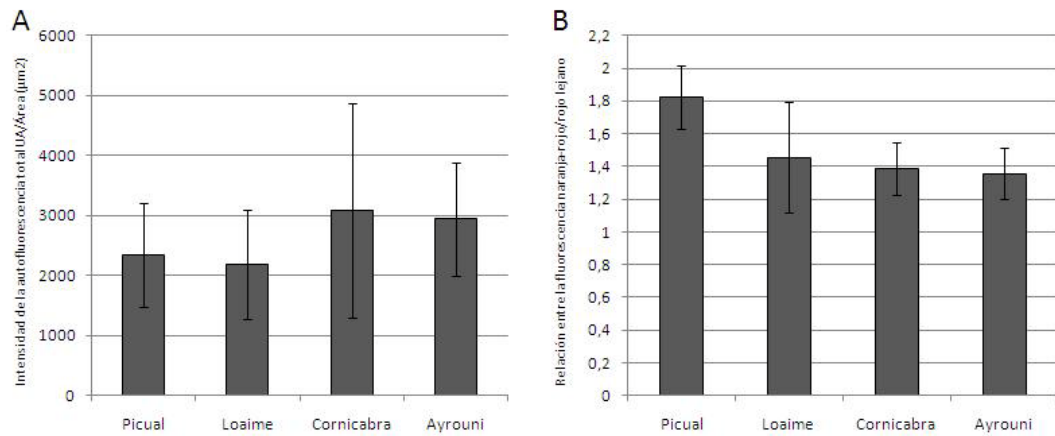


Figura 21. A: Cuantificación de la intensidad de la autofluorescencia en el polen hidratado de 4 variedades de olivo. A: Autofluorescencia total; B: Nivel de fluorescencia naranja-rojo/ rojo lejano

4.2. Construcción de una base de datos para la identificación de variedades de olivo.

4.2.1. Identificación de los individuos que se pretenden incluir en la base de datos

Se ha realizado un análisis de 183 individuos que se pretenden incluir en la base de datos para la identificación de variedades de olivo, usando una combinación de 4 marcadores microsátélites SSR seleccionados por su gran poder discriminativo y su fácil interpretación. La selección de los SSR ha sido realizada en base a la la evaluación llevada a cabo sobre 10 marcadores (capítulo anterior) y en los datos disponibles en la literatura (Baltoni *et al.*, 2009; Fendri *et al.*, 2010). Los marcadores seleccionados son *ssrOeUA-DCA3*, *ssrOeUA-DCA18*, *GAPU101*, *UDO99-043*. Los individuos analizados proceden de España, Túnez, Portugal, Italia, Grecia y Francia, aunque hay que señalar que los tres primeros países son mucho mas representados en término de número de individuos.

El análisis de los individuos permitió discriminar 90 genotipos, 66 de ellos son únicos en esta base de datos, mientras que 24 son duplicados. En total, se han observado 93 perfiles duplicados. El numero más importante de duplicaciones se ha detectado en las variedades Chemlali Sfax procedente de Túnez (30 individuos duplicados) y Picual procedente de España (8 perfiles duplicados para el “Picual genotipo 1” y 6 perfiles duplicados para “Picual genotipo 2”) (Tabla 7). Diferentes tipos de duplicaciones han sido identificados:

- ✓ Simples duplicaciones: más de un individuo con el mismo nombre y que presentan perfiles alélicos idénticos (DUP).
- ✓ Individuos erróneamente nombrados: Nombres distintos atribuidos a nivel de la colección, pero que corresponden al mismo genotipo (ERR).
- ✓ Sinonimias: Nombres distintos atribuidos a nivel del agricultor pero que corresponden al mismo genotipo (SIN).
- ✓ Individuos cuyo origen varietal era completamente desconocido antes de llevar a cabo este análisis (DES).

Tabla 7. Identificación de los individuos presentando perfiles alélicos duplicados

Nombre	Tipo Duplicación	Procedencia	Nombre	Tipo Duplicación	Procedencia
Chemlali Sfax		B. Sfax	Loaime (Genotipo 1)		G. Sierra
Sehli Sned	SIN	B. Sfax	Picual 9	ERR	G. Sierra
Baldi Charqia	SIN	B. Sfax	Lucio 2	ERR	G. Sierra
Chemlali Ouled Youssef	SIN	B. Sfax	Picual 11	ERR	G. Sierra
Chemlali Bjawa	SIN	B. Sfax	Loaime 22	DUP	G. Sierra
Zalmati Zarzis	SIN	B. Sfax	Loaime 14	DUP	G. Sierra
Sehli Gafsa	SIN	B. Sfax	Loaime 20	DUP	G. Sierra
Horr Sfax	SIN	B. Sfax	Aceitera		C. Jaén
Sehli Jbeniana	SIN	B. Sfax	Negrinha	SIN	Elvas
Horr Blettech	SIN	B. Sfax	Judiera	SIN	Serpa
Hchichina 6	DES	B. Sfax	Carrasqueña (Hueso pequeño)	SIN	Serpa
Sig 3PG	DES	B. Sfax			
BL24	DES	B. Sfax	Cornicabra		C. Jaén
Kotti K18	DES	B. Sfax	Verdeal de serpa	SIN	Elvas
Hchichina 10	DES	B. Sfax	Cornuzuelo de mora de Toledo	SIN	C. Jaén
Kotti K12	DES	B. Sfax	Verdeal Real	SIN	EEZ Armilla
K17	DES	B. Sfax	Cornuzuelo	SIN	EEZ Armilla
BL26	DES	B. Sfax	Verdial	SIN	Serpa
Chemlali Sfax COI	DUP	B. Sfax	Hojiblanca		EEZ Armilla
Sig 15	DES	B. Sfax	Hojiblanca	DUP	C. Jaén
BL23	DES	B. Sfax	Santa FÉ 3	DES	Santa FÉ
CHL Ouled Youssef	DUP	B. Sfax	Lechin de Granada Der		C. Jaén
BL20	DES	B. Sfax	Picual 6	ERR	G. Sierra

Resultados

BL16 G	DES	B. Sfax	Verdial de Velez Der		C. Jaén
Hchichina 7	DES	B. Sfax	Verdial de Velez	DUP	C. Jaén
Kotti K9G	DES	B. Sfax	Morisca		C. Jaén
Kotti k21	DES	B. Sfax	Coserva de Elvas	SIN	Elvas
Kotti K30G	DES	B. Sfax	Chemlali Zarzis		B. Sfax
Sig 113 G	DES	B. Sfax	Chemlali Mahares	SIN	B. Sfax
Sahli Gafsa autre que Gtar	DUP	B. Sfax	Injassi Hchichina	SIN	B. Sfax
BL37	DES	B. Sfax	Mfartah Hchichina	SIN	B. Sfax
Picual (Genotipo 1)		EEZ Zaidín	Khchinet Sig		B. Sfax
Picual Izq	DUP	EEZ Zaidín	Bou Bazzoula	SIN	B. Sfax
Desconocido 1	DES	P. Puente	Mbazzel Kbir	SIN	B. Sfax
Desconocido 2	DES	P. Puente	SIG19	DES	B. Sfax
Desconocido 3	DES	P. Puente	Kotti K23 (avec mam)	DES	B. Sfax
Desconocido 4	DES	P. Puente	Chemlali Sig		B. Sfax
Desconocido 5	DES	P. Puente	Horr Sig	DES	B. Sfax
Desconocido 6	DES	P. Puente	Kotti K14	DES	B. Sfax
Desconocido 7	DES	P. Puente	Sig 14 PG	DES	B. Sfax
Picual (Genotipo 2)		G. Sierra	Chemchali Gtar		B. Sfax
Loaime 15	ERR	G. Sierra	Jemri Bouchouka	SIN	B. Sfax
Desconocido 2	DES	G. Sierra	Kotti K30 PG	DES	B. Sfax
Desconocido 4	DES	G. Sierra	Chétoui		B. Sfax
Picual 8	DUP	G. Sierra	Chetoui 2 (à mam)	DUP	B. Sfax
Picual 10	DUP	G. Sierra	Marsaline		B. Sfax

Picual 12	DUP	G. Sierra	Meski Bjawa	SIN	B. Sfax
Arbequina		EEZ Armilla	Zeitoun el Manchar		B. Sfax
Arbequina Izq	DUP	EEZ Armilla	Lqam el Mouammar	SIN	B. Sfax
Arbequina Der	DUP	C. Jaén	Chemlali Bouchouka		B. Sfax
Arbequina Park	DUP	EEZ Armilla	Koroneiki	SIN	C. Jaén
Santa FÉ 1	DES	Santa FÉ	Horr Charqia		B. Sfax
Santa FÉ 4	DES	Santa FÉ	BL31	DES	B. Sfax
Lucio (Genotipo 1)		G. Sierra	Chemlali Chouamekh		B. Sfax
Picual 5	ERR	G. Sierra	Chemlali Tataouine10	SIN	B. Sfax
Loaime 16b	ERR	G. Sierra	Fakhari Tataouine		B. Sfax
Loaime	ERR	EEZ Armilla	Meski Zarzis	SIN	B. Sfax
Lucio 4	DUP	G. Sierra	Gallega		C. Jaén
Picual 5	ERR	G. Sierra	Gallega Vulgar	DUP	Elvas

4.2.2. Sinonimias y homonimias

Un número considerable de sinonimias ha sido observado en este estudio. En la colección de Boughrara- Sfax (Túnez), se han detectado 20 sinonimias, 9 de ellas de la variedad Chemlali Sfax, 3 de la variedad Chemlali Zarsis, 2 de la variedad Khechinet Sig (Tabla 8), mientras que las otras 6 corresponden a las variedades Chemchali Gtar, Marsaline, Zeitoun el Manchar, Chemlali Bouchouka, Chemlali Chouamekh, Fakhari Tataouine. Asimismo, se han detectado 9 casos de sinonimias entre variedades ibéricas: 5 de la variedad Cornicabra, 3 de la variedad Aceitera y una sola sinonimia de la variedad Morisca. Las 5 sinonimias de Cornicabra son Verdeal de serpa, Cornuzuelo de mora de Toledo, Verdeal Real, Cornuzuelo y Verdial mientras que las tres sinonimias de la variedad Aceitera son Negrinha, Judiera y Carrasqueña. La sinonimia de la variedad Morisca es Conserva de Elvas.

También, este análisis ha permitido demostrar que, según los perfiles alélicos de los 4 SSR analizados, el genotipo Chemlali Bouchouka es idéntico al

genotipo Koroneiki. Para confirmar este resultado inesperado, se ha profundizado el análisis mediante el uso de 6 SSR adicionales; *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16*, *GAPU59*, *GAPU71B*, *GAPU103A*, *UDO99-024*, *UDO99-043*. Efectivamente, los resultados obtenidos demuestran que los dos individuos presentan perfiles alélicos idénticos en 10 microsatélites, lo que permite confirmar que se trata de un caso de sinonimia pero entre dos países bastante alejados; Túnez y Grecia.

El presente estudio permitió demostrar que los 11 individuos procedentes de la colección portuguesa de Elvas incluyen 7 variedades y 4 sinonimias de otros genotipos ya identificados previamente. Las 4 sinonimias detectadas son: Negrinha, Verdeal de Serpa, Conserva de Elvas y Gallega vulgar, que se corresponden con las variedades que se encuentran en el banco de germoplasma del IFAPA en Jaén: Aceitera, Cornicabra, Morisca y Gallega respectivamente.

4.2.3. Alelos detectados, índices de variabilidad genética y relaciones genéticas

El análisis mediante los 4 marcadores SSR en los genotipos incluidos en la base de datos permitió detectar un total de 48 alelos, correspondiendo a una media de 12 alelos por locus. El número de alelos por locus varió de 9 en *GAPU101* a 18 en *UDO99-043*. Se ha obtenido una media de contenido en información polimórfica de 0,82. Dicho valor osciló entre 0,79 en *ssrOeUA-DCA3* a 0,89 en *UDO99-043*. La heterocigosidad observada varió de 0,84 en *ssrOeUA-DCA3* a 0,93 en *GAPU101*, presentando una media de 0,9.

A partir de los datos alélicos obtenidos, se han podido establecer las relaciones genéticas entre todos los genotipos identificados (Figura 22).

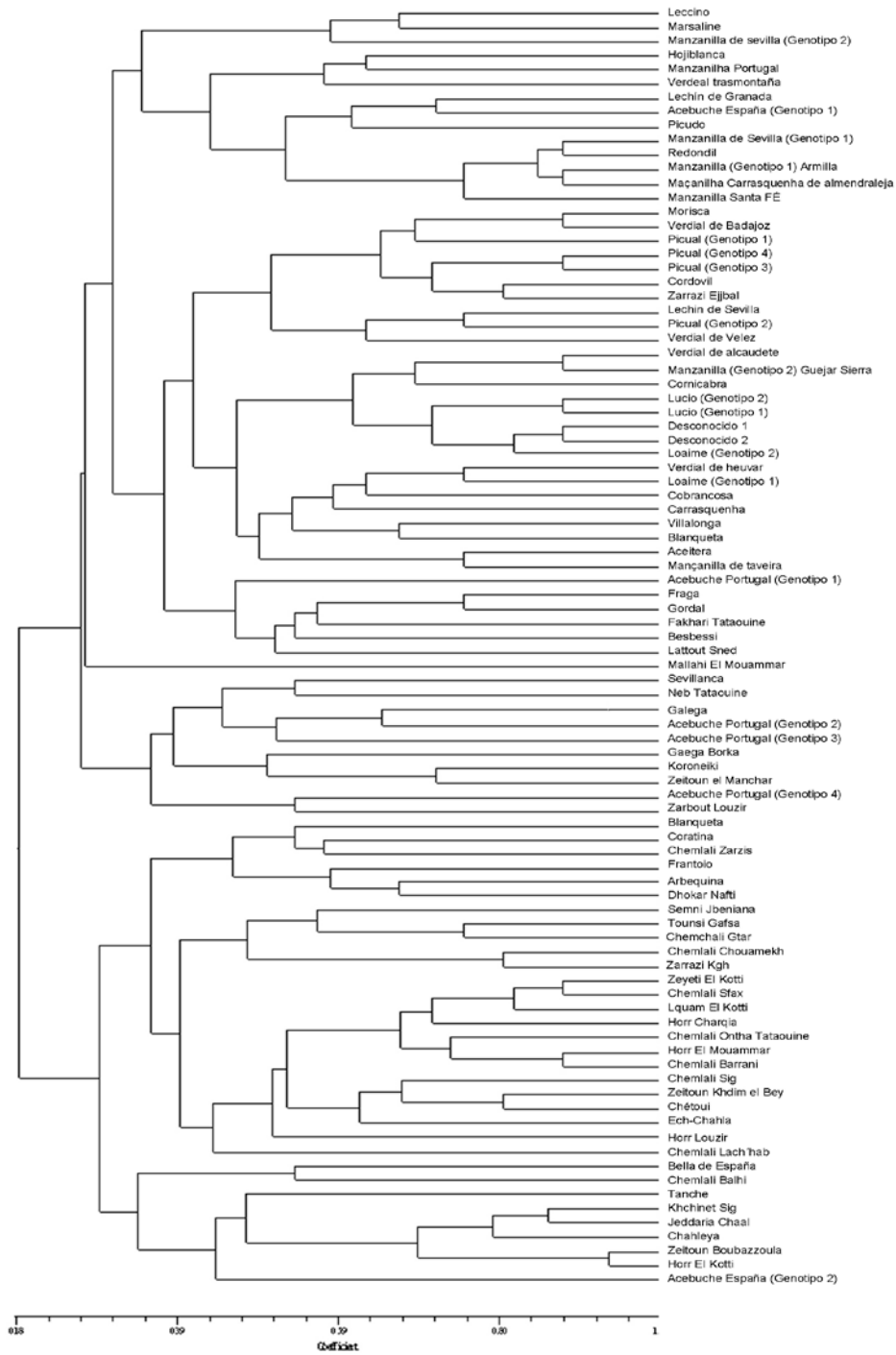


Figura 22. Relaciones genéticas entre genotipos identificados.

Los coeficientes de similitud genética calculados mediante el método de DICE variaron de 0,00 (por ejemplo entre acebuche de Portugal (genotipo 1) y la variedad Lechín de Sevilla) a 0,875 (por ejemplo entre las variedades Morisca y Vedial de Badajoz). Dichos coeficientes de similitud fueron utilizados para llevar a cabo un análisis factorial de correspondencia para identificar posibles agrupaciones basadas en el origen geográfico, en el uso industrial predominante de cada uno de las variedades, o en caracteres morfológicos del endocarpo. Este análisis factorial de correspondencia presentó unos porcentajes de inercia de 14,02% en el primer eje y 8,01% en el segundo eje.

El análisis factorial demuestra que los genotipos se agrupan mayormente por su origen geográfico según el eje de las coordenadas (Figura 23). Todas las variedades Ibéricas se agruparon juntas del lado izquierdo del eje excepto la variedad Arbequina, Manzanilla de Sevilla, un genotipo de acebuche de España y la variedad Blanqueta de Portugal. La mayoría de las variedades de Túnez se agrupan en el otro lado. Sin embargo, las variedades tunecinas Zarrazi Ejbal, Fakhari Tataouine, Besbessi y Mallahi El Mouammar se agruparon con las variedades ibéricas.

Aunque están situadas cerca del eje, las variedades de Italia Coratina y Frantoio se agrupan con las variedades de Túnez mientras que Leccino se encuentra en el lado de las variedades ibéricas. Las variedades francesas Tanche y Marsaline así como la variedad griega Koroneiki se agrupan del lado de las variedades de Túnez.

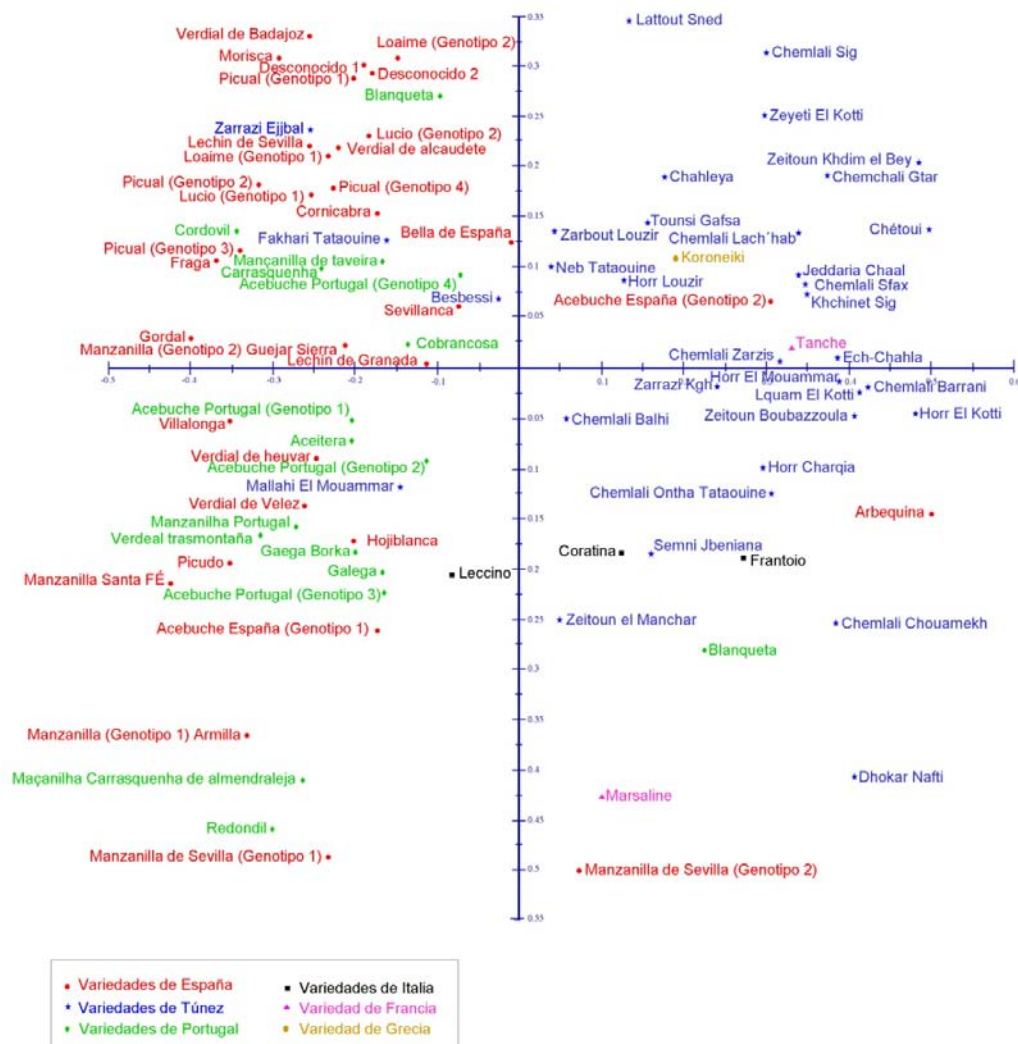


Figura 23. Análisis factorial de correspondencia según la procedencia geográfica

Basándose, en datos de algunos caracteres morfológicos del endocarpo obtenidos a partir de los mismos individuos analizados o encontrados en la literatura (Rallo, 2005), el análisis factorial de correspondencia indica una tendencia de agrupación según el peso del endocarpo (tamaño del endocarpo) (Figura 24). Siguiendo el sistema de clasificación establecido por Barranco y Rallo, 1984 y adoptado por el Consejo Oleícola Internacional, todos los individuos que presentan un endocarpo de bajo peso se agrupan de un lado mientras que los genotipos que presentan un peso elevado o muy elevado se

agrupan del otro lado. Los genotipos que presentan un peso mediano se dispersan en ambos lados del eje de las coordenadas.



Figura 24. Análisis factorial de correspondencia según el peso del endocarpo

Igualmente se estudiaron las agrupaciones según el uso predominante de cada uno de los genotipos identificados (Aceitunas tradicionalmente utilizadas para la obtención de aceite, o para el consumo como aceituna de mesa, o bien a uso mixto). Sin embargo, no se ha podido destacar ninguna tendencia de agrupación según este criterio.

4.3. Análisis de los microsatélites en polen y hojas

4.3.1. Microsatélites en polen

Los 10 loci analizados fueron exitosamente amplificados en la mayoría de las muestras, presentando un porcentaje de genotipado del 97,9%. Los loci *ssrOeUA-DCA9*, loci *ssrOeUA-DCA 16*, *ssrOeUA-DCA18*, *GAPU59* y *UDO99-024* se amplificaron en la totalidad de los individuos, mientras que no se pudo amplificar un individuo en cada uno de los loci *GAPU71B* y *GAPU103A* y dos en cada uno de los loci *ssrOeUA-DCA3*, *GAPU101* y *UDO99-043*. Los fragmentos amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al 2%. La Figura 25, representa un ejemplo de los alelos amplificados revelados en un gel de agarosa antes de analizarlos mediante un secuenciador automático de tipo capilar (Figura 26). Todos los alelos amplificados fueron fácilmente identificados, permitiendo establecer los perfiles alélicos de cada uno de los individuos analizados a partir de las muestras de polen.

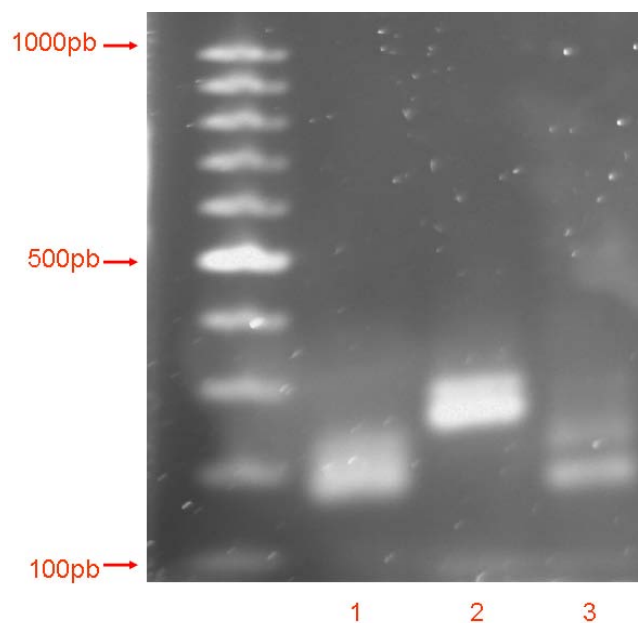


Figura 25. Ejemplo de alelos amplificados, revelados en un gel de agarosa al 2%. (1): Gordal de Sevilla (*ssrOeUA-DCA18*); (2): Picudo (*ssrOeUA-DCA3*); (3): Lechín de Sevilla (*UDO99-043*).

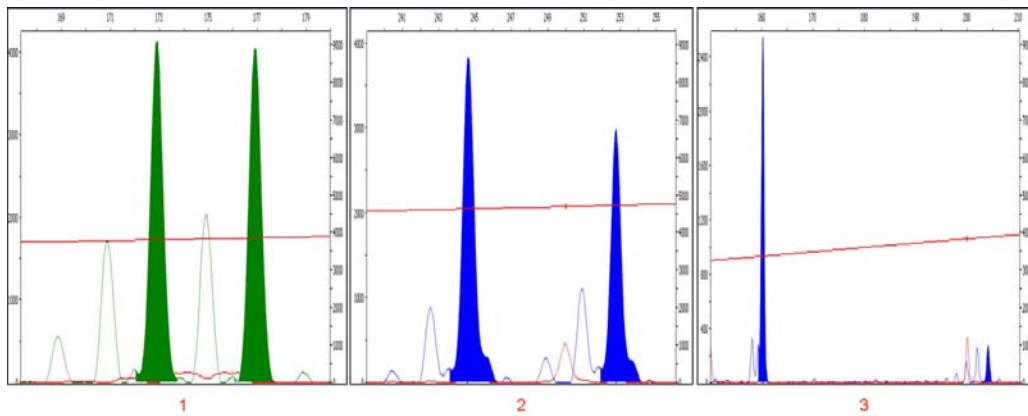


Figura 26. Ejemplo de detección de los tamaños de los alelos en un secuenciador automático de tipo capilar. (1): Gordal de Sevilla (ssrOeUA-DCA18); (2): Picudo (ssrOeUA-DCA3); (3): Lechín de Sevilla (UDO99-043),

4.3.2. Estudio comparativo de discriminación de variedades de olivo a partir de ADN extraído de muestras de hojas y de muestras de polen

Se utilizaron los 10 marcadores microsatélites mencionados anteriormente para llevar a cabo el estudio comparativo de la identificación de 52 muestras de ADN extraído de hoja (26) y de polen (26) de individuos procedentes de Túnez y de España. Dichos marcadores fueron amplificados con éxito en la mayoría de los casos, presentando un porcentaje de genotipado del 98,07%. El análisis de los microsatélites permitió establecer un perfil alélico para cada individuo analizado.

La tabla 8 incluye todos los perfiles alélicos identificados. Los marcadores ssrOeUA-DCA18, UDO99-24, GAPU59 y GAPU103A se amplificaron en la totalidad de los individuos estudiados. Sin embargo, no se consiguió la amplificación de GAPU71B, GAPU101 y ssrOeUA-DCA9 en un individuo, ni tampoco pudieron genotipar 2 individuos con ssrOeUA-DCA3 y ssrOeUA-DCA16, ni 3 individuos con UDO99-043.

La amplificación fue imposible en 7 muestras, 4 de ellas correspondientes a ADN procedente de polen y 3 de ellas de ADN procedente de hojas. Las

variedades Verdial de Velez, Khchinet Sig y Chétoui presentaron cierta dificultad durante el genotipado, ya que no se han podido amplificar en dos microsátélites.

Generalmente, los perfiles alélicos obtenidos a partir de las muestras de ADN extraído de polen fueron idénticos a los perfiles obtenidos a partir de hojas. Sin embargo, en el 2,3% de los casos se observaron diferencias entre dichos perfiles. Efectivamente, las muestras de ADN procedentes de polen revelaron solamente un alelo de los dos alelos detectados en el ADN procedente de las hojas del mismo individuo. Este fue el caso de Picudo, Verdial de Velez, Sehli Sned y Horr Louzir (Tabla 8) en los loci *ssrOeUA-DCA16*, *UDO99-43*, *ssrOeUA-DCA3* y *UDO99-43* respectivamente. Igualmente, no se han podido amplificar los dos alelos en la muestra Hchichina 6 para los loci *ssrOeUA-DCA3* y *GAPU71B*.

Tabla 8. Perfiles alélicos obtenidos a partir del ADN extraído de hojas y de polen para los 10 marcadores microsatélites analizados*

INDIVIDUO	Amplificación ADN	ssrOeUA-DCA18		ssrOeUA-DCA3		ssrOeUA-DCA16		GAPU71B		ssrOeUA-DCA9		GAPU101		UDO99-43		GAPU59		UDO99-24		GAPU103A*	
		Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
		Lechín de Granada	Pollen	166	168	235	241	120	152	121	127	183	204	191	197	212	216	210	220	164	164
Lechín de Granada	Hoja	166	168	235	241	120	152	121	127	183	204	191	197	212	216	210	220	164	164	147	184
Cornicabra	Pollen	168	176	235	245	120	122	121	141	183	193	191	199	172	212	210	210	184	184	220	220
Cornicabra	Hoja	168	176	235	245	120	122	121	141	183	193	191	199	172	212	210	210	184	184	220	220
Gallega	Pollen	168	176	235	249	164	180	117	123	191	193	183	199	170	172	210	222	178	184	184	220
Gallega	Hoja	168	176	235	249	-	-	117	123	191	193	183	199	170	172	210	222	178	184	184	220
Lechín de Sevilla	Pollen	164	172	241	245	122	143	121	141	161	204	191	217	172	177	210	210	184	184	132	155
Lechín de Sevilla	Hoja	164	172	241	245	122	143	121	141	161	204	191	217	172	177	210	210	184	184	132	155
Picudo	Pollen	168	172	241	249	152	152	117	121	183	193	197	217	205	216	210	220	164	164	132	170
Picudo	Hoja	168	172	241	249	152	160	117	121	183	193	197	217	-	-	210	220	164	164	132	170
Arbequina	Pollen	164	174	228	239	120	143	121	141	183	204	183	205	175	175	220	220	199	199	147	184
Arbequina	Hoja	164	174	228	239	120	143	121	141	183	204	183	205	175	175	220	220	199	199	147	184
Verdial de Velez	Pollen	168	172	241	245	152	172	121	141	161	183	197	217	212	212	210	210	164	184	132	147
Verdial de Velez	Hoja	168	172	241	245	-	-	121	141	-	-	197	217	210	212	210	210	164	184	132	147
Manzanilla de Sevilla	Pollen	168	176	241	249	152	172	121	141	161	204	197	217	210	214	210	210	164	164	132	170
Manzanilla de Sevilla	Hoja	168	176	241	249	152	172	121	141	161	204	197	217	210	214	210	210	164	164	132	170
Chétoui	Pollen	170	174	-	-	120	172	117	123	193	193	191	205	-	-	210	212	184	190	132	155
Chétoui	Hoja	170	174	228	235	120	172	117	123	193	193	191	205	175	214	210	212	184	190	132	155
Hojiblanca	Pollen	168	176	235	245	122	152	121	141	193	204	197	199	207	216	210	220	184	184	147	222
Hojiblanca	Hoja	168	176	235	245	122	152	121	141	193	204	197	199	207	216	210	220	184	184	147	222
Koroneiki	Pollen	168	170	235	235	147	147	121	127	181	204	191	205	170	214	206	210	184	186	147	158
Koroneiki	Hoja	168	170	235	235	147	147	121	127	181	204	191	205	170	214	206	210	184	186	147	158
Picual	Pollen	166	172	235	245	122	152	117	127	183	191	191	217	207	212	210	220	184	184	132	170
Picual	Hoja	166	172	235	245	122	152	117	127	183	191	191	217	207	212	210	220	184	184	132	170
Chemlali Sfax	Pollen	170	174	228	235	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	210	210	184	186	158	194
Chemlali Sfax	Hoja	170	174	228	235	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	210	210	184	186	158	194

Resultados

INDIVIDUO	Amplificación ADN	ssrOeUA-DCA18		ssrOeUA-DCA3		ssrOeUA-DCA16		GAPU71B		ssrOeUA-DCA9		GAPU101		UDO99-43		GAPU59		UDO99-24		GAPU103A*	
		Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
		Horr Charqia	Pollen	174	176	228	235	143	143	121	121	171	183	191	197	166	170	210	220	170	184
Horr Charqia	Hoja	174	176	228	235	143	143	121	121	171	183	191	197	166	170	210	220	170	184	170	206
Sehli Sned	Pollen	170	174	235	235	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	210	210	184	186	158	194
Sehli Sned	Hoja	170	174	228	235	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	210	210	184	186	158	194
Chemlali Bouchouka	Pollen	168	170	235	235	147	147	121	127	181	204	191	205	170	214	206	210	184	186	147	158
Chemlali Bouchouka	Hoja	168	170	235	235	147	147	121	127	181	204	191	205	170	214	206	210	184	186	147	158
Chemlali Zarzis	Pollen	172	174	-	-	143	143	121	141	171	193	189	197	166	175	210	220	184	186	156	156
Chemlali Zarzis	Hoja	172	174	235	235	143	143	121	141	171	193	189	197	166	175	210	220	184	186	156	156
Chemlali Mahares	Pollen	172	174	235	235	143	143	121	141	171	193	189	197	166	175	210	220	184	186	158	194
Chemlali Mahares	Hoja	172	174	235	235	143	143	121	141	171	193	189	197	166	175	210	220	184	186	158	194
Injassi Hchichina	Pollen	172	174	235	235	143	143	121	141	171	193	189	197	166	175	210	220	184	186	158	194
Injassi Hchichina	Hoja	172	174	235	235	143	143	121	141	171	193	189	197	166	175	210	220	184	186	158	194
Chemlali Balhi	Pollen	166	168	235	241	136	152	121	121	183	202	189	189	175	179	206	220	164	178	147	184
Chemlali Balhi	Hoja	166	168	235	241	136	152	121	121	183	202	189	189	175	179	206	220	164	178	147	184
Hchichina 6	Pollen	170	174	235	235	120	143	121	121	171	171	191	197	166	212	210	210	184	186	158	194
Hchichina 6	Hoja	170	174	228	235	120	143	121	141	171	171	191	197	166	212	210	210	184	186	158	194
Khchinet Sig	Pollen	170	174	235	235	120	147	121	141	171	185	-	-	-	-	206	220	176	184	147	158
Khchinet Sig	Hoja	170	174	235	235	120	147	121	141	171	185	189	205	179	212	206	220	176	184	147	158
Bou Bazzoula BL19PG	Pollen	170	174	235	235	120	147	-	-	171	185	189	205	179	212	176	184	206	220	147	184
Bou Bazzoula BL19PG	Hoja	170	174	235	235	120	147	121	141	171	185	189	205	179	212	176	184	206	220	147	184
Zeitoun Boubazzoula	Pollen	170	174	235	235	120	147	121	141	171	185	189	205	179	210	206	220	176	184	147	184
Zeitoun Boubazzoula	Hoja	170	174	235	235	120	147	121	141	171	185	189	205	179	210	206	220	176	184	147	184
Semni Jbeniana	Pollen	168	176	228	239	120	120	121	127	193	204	189	205	185	212	210	220	176	176	147	184
Semni Jbeniana	Hoja	168	176	228	239	120	120	121	127	193	204	189	205	185	212	210	220	176	176	147	184
Horr Louzir	Pollen	168	170	235	245	120	157	121	123	171	193	191	197	168	170	210	210	186	190	147	174
Horr Louzir	Hoja	168	170	235	245	120	157	121	123	171	193	191	197	175	212	210	210	186	190	147	174

*Se han señalado en negrita las diferencias encontradas entre perfiles alélicos.

4.3.3. Evaluación de los marcadores microsatélites utilizados

4.3.3.1. Alelos detectados

El análisis de los microsatélites ha permitido evaluar la utilidad de los 10 marcadores SSRs utilizados y la comparación entre los perfiles alélicos obtenidos a partir de ADN procedente de hojas y de polen. Para este estudio, se han descartado todos los perfiles obtenidos a partir de muestras de ADN extraído de polen ya que, como ha sido indicado previamente, se trata de los mismos genotipos identificados a partir del ADN procedente de hojas.

Se han detectado 84 alelos en total, lo que corresponde a una media de número de alelos por locus de 8,4. El número de alelos por locus varió de 5 (en GAPU71B) a 12 (en UDO99-043 y GAPU103). La tabla 9 muestra los tamaños de los alelos obtenidos para cada uno de los loci analizados así como sus frecuencias respectivas. Dichas frecuencias variaron del 2% en los alelos únicos como es el caso del alelo 136 del locus *ssrOeUA-DCA16* a 53% en el alelo 235 del locus *ssrOeUA-DCA3*.

Todos los SSRs analizados en este estudio presentaron como mínimo 2 pares de bases de diferencia entre los tamaños de los alelos, menos el caso del locus GAPU103A. La diferencia de tamaño es de 1 par de bases en dos alelos consecutivos (alelo 3 y alelo 4) para este marcador (Tabla 9).

Tabla 9. Tamaño (expresado en pb), y frecuencia (expresada en %) de los alelos obtenidos en los diferentes loci analizados en la totalidad de los individuos.

INDIVIDUO	ssrOeUA-DCA18		ssrOeUA-DCA3		ssrOeUA-DCA16		GAPU71B		ssrOeUA-DCA9		GAPU101		UDO99-43		GAPU59		UDO99-24		GAPU103A	
	Alelos (pb)	Frecuencia (%)	Alelos (pb)	Frecuencia (%)	Alelos (pb)	Frecuencia (%)	Alelos (pb)	Frecuencia (%)	Alelos (pb)	Frecuencia (%)	Alelos (pb)	Frecuencia (%)	Alelos (pb)	Frecuencia (%)	Alelos (pb)	Frecuencia (%)	Alelos (pb)	Frecuencia (%)	Alelos (pb)	Frecuencia (%)
Alelo 1	164	4	228	13	120	27	117	8	161	4	183	4	166	14	176	2	164	15	132	12
Alelo 2	166	6	235	53	122	8	121	48	171	28	189	17	170	8	184	2	170	19	147	23
Alelo 3	168	26	239	4	136	2	123	6	181	4	191	23	172	6	206	9	176	8	155	4
Alelo 4	170	21	241	12	143	27	127	9	183	14	197	25	175	16	210	5	178	4	156	4
Alelo 5	172	14	245	12	147	15	141	29	185	6	199	6	177	2	212	2	184	42	158	15
Alelo 6	174	26	249	6	152	13			191	4	205	15	179	8	220	27	186	17	170	8
Alelo 7	176	12			157	2			193	22	217	10	185	2	222	2	190	4	174	2
Alelo 8					160	2			202	2			207	4			199	4	184	13
Alelo 9					172	4			204	16			210	6			206	2	194	10
Alelo 10													212	22			220	2	206	2
Alelo 11													214	8					220	6
Alelo 12													216	4					222	2
Nº total alelos	7		6		9		5		9		7		12		7		10		12	
Nº de alelos por locus	8,4																			

4.3.3.2. Índices de heterocigosidad, frecuencias de los alelos nulos y poder dicriminativo

La heterocigosidad observada representa el número de individuos heterocigotos dividido por el número total de individuos genotipados. Ésta fue calculada y presentó un valor medio de 0,83, y varió de 0,65 en los loci GAPU59 y UDO99-024 a 1 en el locus ssrOeUA-DCA18. La heterocigosidad esperada ha sido calculada asumiendo la ley del equilibrio de Hardy-Weinberg (Nei, 1987). La heterocigosidad esperada presentó una media de 0,78 y varió de 0,61 en el locus GAPU59 a 0,89 en el locus UDO99-043. Igualmente, se han calculado las

frecuencias de alelos nulos (F_0), frecuencias que determinan si el nivel de heterocigosidad detectado en los genotipos identificados corresponde al nivel que presenta realmente este grupo de individuos. Los valores de F_0 fueron siempre negativos menos en el caso de *ssrOeUA-DCA16* y *UDO99-024*. La tabla 10, reúne los valores de la heterocigosidad observada y de la esperada en todos los loci analizados, así como las frecuencias respectivas de los alelos nulos.

La heterocigosidad esperada fue siempre inferior a la heterocigosidad observada excepto en los loci *ssrOeUA-DCA16* y *UDO99-024*. Ambos loci presentaron frecuencias positivas de 0,065 y 0,049 de alelos nulos, mientras que dichas frecuencias fueron negativas para el resto de los loci. Se ha detectado un total de 215 heterocigotos y se identificaron 43 homocigotos.

Tabla 10. Heterocigosidad observada (H_O), Heterocigosidad esperada (H_E), Frecuencia de alelos nulos (F_0), Número de heterocigotos y Número de homocigotos en los individuos analizados en cada uno de los loci.

	H_O	H_E	F_0	Numero de heterocigotos	Número de homocigotos
<i>ssrOeUA-DCA18</i>	1	0,83	-0,101	26	0
<i>ssrOeUA-DCA3</i>	0,69	0,67	-0,009	18	8
<i>ssrOeUA-DCA16</i>	0,70	0,82	+0,065	17	7
<i>GAPU71B</i>	0,92	0,68	-0,185	24	2
<i>ssrOeUA-DCA9</i>	0,84	0,83	-0,008	21	4
<i>GAPU101</i>	0,96	0,83	-0,085	25	1
<i>UDO99-43</i>	0,96	0,89	-0,048	24	1
<i>GAPU59</i>	0,65	0,61	-0,031	17	9
<i>UDO99-24</i>	0,65	0,77	+0,049	19	9
<i>GAPU103A</i>	0,92	0,88	-0,038	24	2
Media*	0,83	0,78	-	215	43

* El número de heterocigotos y el número de homocigotos son valores totales

El poder discriminativo de los marcadores utilizados ha sido evaluado mediante el cálculo del contenido en información polimórfica (PIC) y la probabilidad de identidad (PI). El PIC promedio del conjunto de marcadores microsatélites analizado fue de 0,73 y varió de 0,55 en el locus *GAPU59* a 0,86 en el locus *UDO99-043*. La media de la probabilidad de identidad obtenida en este estudio es 0,089 y osciló entre 0,027 en el locus *UDO99-043* (el marcador que presenta el PIC más elevado) y 0,208 en el locus *GAPU59* (el marcador que

presenta el PIC mas bajo). El valor acumulativo total de la probabilidad de identidad del conjunto de los 10 microsatélites fue $4,11 \cdot 10^{-12}$. La tabla 11 representa todos los valore de PIC y PI obtenidos para cada uno de los marcadores SSRs analizados.

Los cuatro marcadores más informativos, (UDO99-043, GAPI103A, ssrOeUA-DCA18 y ssrOeUA-DCA9) permitieron diferenciar el 100% del total de genotipos discriminados (22 genotipos). Es notorio que el primer marcador (UDO99-043) fue capaz por si solo de discriminar el 90,9% de los genotipos, permitiendo identificar 20 genotipos del total de los 22 genotipos analizados.

Tabla 11. Contenido en información polimórfica (PIC), probabilidad de identidad (PI) y marcadores más discriminativos clasificados por rango.

	Contenido en Información polimórfica	Probabilidad de identidad	Rango de marcadores mas discriminativos
ssrOeUA-DCA18	0,79	0,057	4
ssrOeUA-DCA3	0,63	0,145	8
ssrOeUA-DCA16	0,78	0,063	6
GAPI71B	0,61	0,161	9
ssrOeUA-DCA9	0,79	0,055	3
GAPI101	0,79	0,059	5
UDO99-43	0,86	0,027	1
GAPI59	0,55	0,208	10
UDO99-24	0,73	0,085	7
GAPI103A	0,85	0,030	2
Todos los marcadores*	0,73	$4,11 \cdot 10^{-12}$	-

*Contenido en información polimórfica medio y probabilidad de identidad acumulada.

4.3.4. Identificación de muestras ciegas de polen

El conjunto constituido por los 10 marcadores microsatélites descritos anteriormente fue utilizado para identificar 9 muestras ciegas de polen procedentes de la empresa Inmunal S.A. (Madrid, España) especializada en la fabricación de las vacunas desarrolladas contra la alergia respiratoria estacional (hipersensibilidad tipo 1). En una primera etapa, los perfiles alélicos de las muestras de polen fueron comparados con los perfiles alélicos obtenidos a partir de 170 individuos analizados (a partir de hojas) en la base de datos de

identificación de las variedades de olivo que se detalla en el apartado anterior (4.2.). Dicha base de datos ha sido constituida gracias al análisis de los siguientes marcadores SSR: *ssrOeUA-DCA18*, *ssrOeUA-DCA3*, *GAPU101* y *UDO99-43*. Para los individuos cuyos perfiles fueron idénticos a las muestras ciegas, se ha completado el análisis del resto de los 10 SSR.

Los resultados obtenidos demuestran que excepto la muestra ciega número 9, donde no se pudo amplificar ningún microsatélite, la amplificación fue realizada exitosamente en todos los marcadores. Sin embargo, en algunos de ellos fue imposible obtener bandas en determinadas muestras (Tabla 12). La amplificación no ha sido posible en la muestra número 1 en el locus *GAPU101*, la muestra número 4 en el locus *ssrOeUA-DCA9* y la muestra número 7 en el locus *GAPU103A*.

La tabla 12 detalla los perfiles alélicos obtenidos para las muestras ciegas analizadas, así como los genotipos más probables asignados a partir de la base de datos disponible.

La muestra ciega número 4 presentó 4 alelos para los loci *GAPU71B*, *ssrOeUA-DCA9* y *UDO99-043*, y 3 alelos para los loci *ssrOeUA-DCA18* y *ssrOeUA-DCA3*. Igualmente la muestra 5 presentó 4 alelos para los loci *GAPU71B* y *ssrOeUA-DCA9*, y 3 alelos para el locus *ssrOeUA-DCA18*, *GAPU101* y *UDO99-043*. También para la muestra 7, se han amplificado 4 alelos para el locus *GAPU71B*.

Además, se han observado algunas diferencias debidas, bien a la amplificación de únicamente un alelo en lugar de los dos alelos que realmente presenta un determinado genotipo. Estas anomalías fueron detectadas en la muestra número 5, a nivel de los loci *ssrOeUA-DCA16* y *GAPU59* y las muestras número 2 y 3, en el locus *UDO99-024* (Tabla 12).

Los perfiles alélicos obtenidos han permitido la identificación de todas las muestras ciegas de polen menos la muestra número 9, donde no se pudo amplificar ningún SSR. La tabla 13 representa la identificación definitiva basada en el conjunto de los 10 marcadores SSR utilizados.

Tabla 12. Perfiles alélicos de las muestras ciegas de polen y de los genotipos mas probables. Los cuadros en doble línea indican los loci donde se han amplificado más de dos alelos, y los cuadros en negrita muestran las diferencias debidas a la imposibilidad de amplificar los dos alelos en el locus.

INDIVIDUO	ssrOeUA-DCA18		ssrOeUA-DCA3		ssrOeUA-DCA16		GAPU71B		ssrOeUA-DCA9		GAPU101		UDO99-43		GAPU59		UDO99-24		GAPU103A	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
Ciega 1	166	172	235	249	120	172	117	121	161	204	-	-	172	216	210	220	184	184	132	170
Loaime	166	172	235	249	120	172	117	121	161	204	191	217	172	216	210	220	184	184	132	170
Ciega 2	166	172	235	245	122	152	117	127	183	191	191	217	207	212	210	220	184	191	132	170
Picual (Genotipo 2)	166	172	235	245	122	152	117	127	183	191	191	217	207	212	210	220	184	184	132	170
Ciega 3	168	176	235	245	122	152	117	127	193	204	191	217	172	216	210	210	184	184	132	170
Manzanilla de Jaen	168	176	235	245	122	152	117	127	193	204	191	217	172	216	210	210	184	191	132	170
Ciega 4	166 - 168	172	235 - 241	245	122	152	117 - 121	127 - 141	161 - 183	193 - 204	191	191	172 - 207	212 - 216	210	220	184	191	132	170
Picual (Genotipo 1)	166	172	235	245	122	152	117	127	-	-	191	191	207	212	210	220	184	191	132	170
Ciega 5	166 - 168	176	235	245	152	152	117 - 121	127 - 141	193 - 173	204 - 211	191 - 197	217	172 - 207	216	210	220	184	184	132	170
Manzanilla de Jaen	168	176	235	245	122	152	117	127	193	204	191	217	172	216	210	210	184	184	132	170
Ciega 6	164	174	228	239	120	143	121	141	183	204	183	205	175	175	220	220	182	199	147	158
Arbequina	164	174	228	239	120	143	121	141	183	204	183	205	175	175	220	220	182	199	147	158
Ciega 7	168	172	235	249	152	172	117 - 121	130 - 141	183	193	191	199	207	216	210	220	184	184	-	-
Lucio	168	172	235	249	152	172	117	121	183	193	191	199	207	216	210	220	184	184	184	220
Ciega 8	168	172	235	249	152	152	117	121	183	193	191	199	207	216	210	220	184	184	184	220
Lucio	168	172	235	249	152	172	117	121	183	193	191	199	207	216	210	220	184	184	184	220

Tabla 13. Identificación varietal de las muestras ciegas de polen

Individuo muestra ciega	Variedad	Localización de la muestra	Nivel de difusión de la variedad
Muestra ciega 1	Loaime	Guejar Sierra (GR)	Variedad secundaria Granada
Muestra ciega 2	Picual	EEZ Zaidín (GR)	Variedad principal, Toda España especialmente Andalucía
Muestra ciega 3	Manzanilla de Jaén	Guejar Sierra (GR)	Variedad difundida, provincia de Jaen y Córdoba
Muestra ciega 4	Picual estándar		Variedad principal, Toda España especialmente Andalucía
Muestra ciega 5	Manzanilla de Jaén	Guejar Sierra (GR)	Variedad difundida, provincia de Jaen y Córdoba
Muestra ciega 6	Arbequina	IFAPA (Jaen)/EEZ Armilla (GR)	Variedad principal, Cataluña, Aragón y Andalucía.
Muestra ciega 7	Lucio	Guejar Sierra (GR)	Variedad secundaria Granada
Muestra ciega 8	Lucio	Guejar Sierra (GR)	Variedad secundaria Granada

La figura 27a y 27b reúne los fluorogramas de los perfiles alélicos de las muestras ciegas de polen y de los individuos correspondientes identificados a partir de la base de datos.

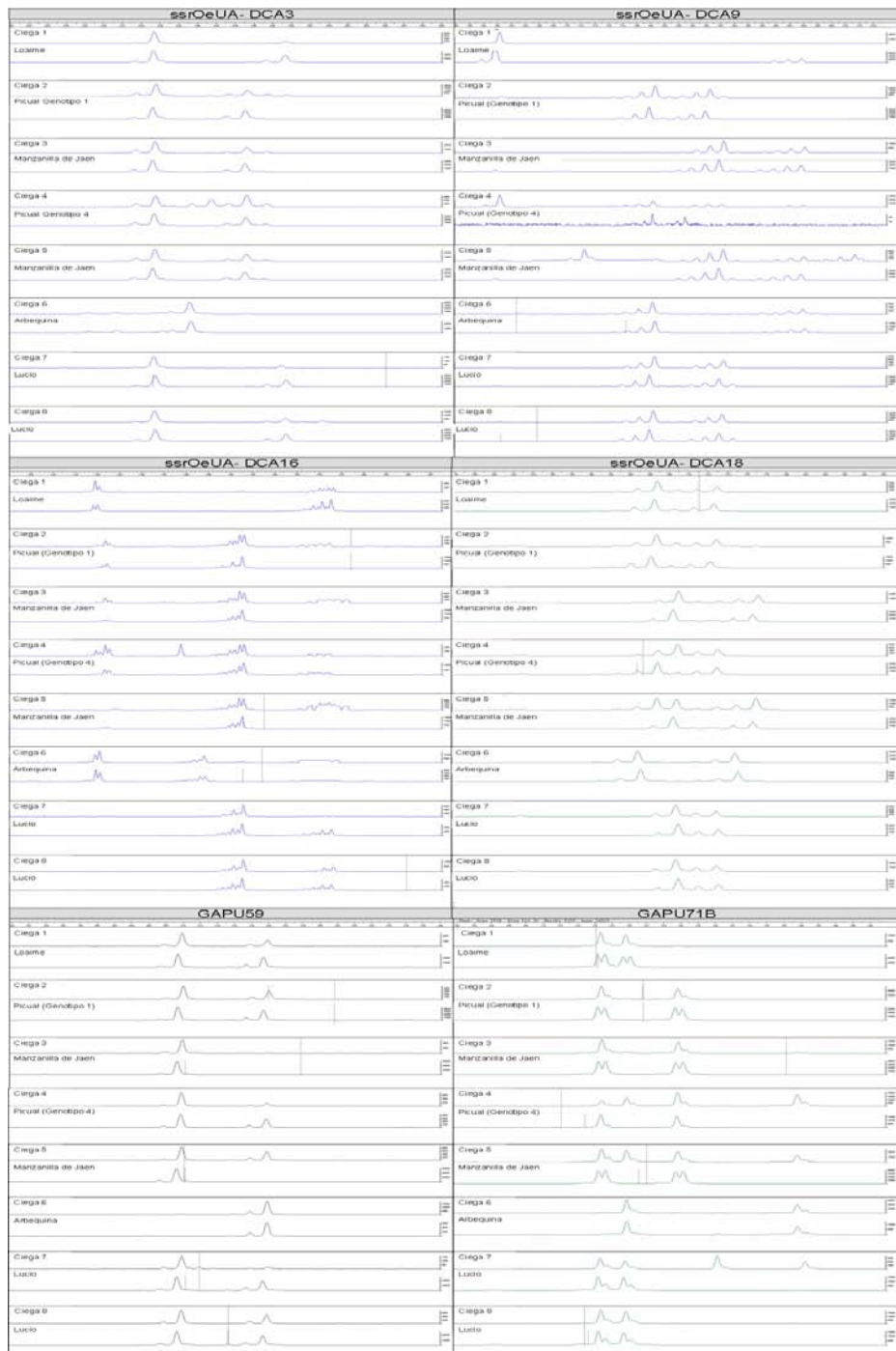


Figura 27a. Fluorogramas de los perfiles alélicos de las muestras ciegas de polen y genotipos correspondientes

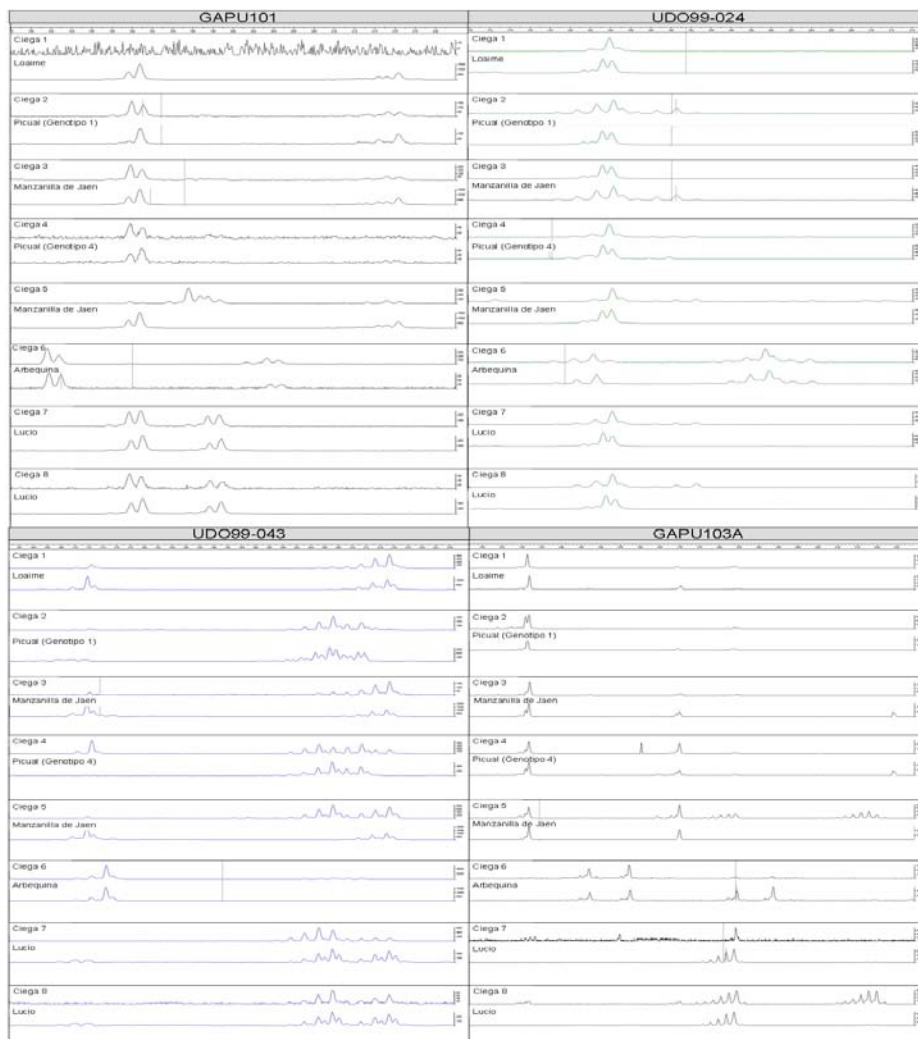


Figura 27b. Fluorogramas de los perfiles alélicos de las muestras ciegas de polen y genotipos correspondientes.

4.2.5. Identificación de muestras ciegas de vacunas

Para la identificación de 8 muestras ciegas de vacunas utilizadas contra la alergia respiratoria estacional causada por el polen del olivo, y suministradas por la empresa Inmunal S.A. (Madrid), se han utilizado los 10 marcadores SSR anteriormente descritos.

En este análisis, solo se han podido amplificar los loci *ssrOeUA-DCA3*, *ssrOeUA-DCA9* y *GAPU71B* mientras que para el resto de marcadores utilizados (*ssrOeUA-DCA16*, *ssrOeUA-DCA18*, *GAPU59*, *GAPU101*, *GAPU103A*, *UDO99-024* y *UDO99-043*) no se pudo obtener ningún producto de amplificación en la totalidad de las muestras ciegas analizadas.

Para *ssrOeUA-DCA9*, se pudo genotipar la totalidad de las muestras de vacunas. Esto no ha sido el caso para los loci *ssrOeUA-DCA3* y *GAPU71B*. En el primero no se pudo amplificar las muestras número 4 y 6 mientras que en el segundo no se pudo amplificar las muestras 2, 3 y 5. En la tabla 14 se detallan todos los perfiles alélicos obtenidos para los tres marcadores SSR amplificados.

Los perfiles alélicos demuestran la presencia de dos alelos para el locus *ssrOeUA-DCA9*, mientras que para *ssrOeUA-DCA3* y *GAPU71B* únicamente se ha podido amplificar un alelo en cada muestra. Dos perfiles alélicos han sido obtenidos, el primero corresponde a la dos muestras ciegas de vacuna 1 y 6 mientras que el segundo corresponde al resto de las muestras genotipadas.

Tabla 14. Perfiles alélicos obtenidos a partir de muestras ciegas de vacunas

INDIVIDUO	<i>ssrOeUA-DCA3</i>		<i>GAPU71B</i>		<i>ssrOeUA-DCA9</i>	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
Muestras ciega de vacuna 1	235	-	121	-	161	171
Muestra ciega de vacuna 2	235	-	-	-	161	171
Muestra ciega de vacuna 3	235	-	-	-	161	171
Muestra ciega de vacuna 4	-	-	127	-	161	171
Muestra ciega de vacuna 5	235	-	-	-	161	171
Muestra ciega de vacuna 6	-	-	121	-	161	171
Muestra ciega de vacuna 7	235	-	127	-	161	171
Muestra ciega de vacuna 8	235	-	127	-	161	171

5. DISCUSIÓN

5.1. Identificación de variedades de olivo mediante caracteres morfológicos del polen

5.1.1. Análisis de los caracteres morfológicos del polen

El estudio de los parámetros relacionados con la morfología del grano de polen se ha llevado a cabo mediante la utilización de un microscopio óptico y se evaluó el polimorfismo existente entre los distintos individuos. El limitado nivel de aumento de este tipo de microscopio (250X) permitió únicamente observar el tamaño y forma del grano sin poder apreciar los caracteres propios de la estructura externa de la pared. Tres caracteres han sido estudiados: el eje polar, el diámetro ecuatorial y el área del grano.

De acuerdo con el sistema de clasificación propuesto por Valdés et al., (1987), los valores medios del eje polar y del diámetro ecuatorial demuestran que el polen de las variedades analizadas se considera de tamaño pequeño. En variedades procedentes de España y Portugal, las medias obtenidas para estos parámetros en los diferentes granos de polen han sido más elevadas. (Rejón et al., 2009; Ribeiro et al., 2010). Consecuentemente, se concluye que el tamaño de los granos de polen probablemente varía dependiendo del origen geográfico de las variedades o de las condiciones medioambientales en las que están plantados los árboles.

El cálculo del ratio entre eje polar y diámetro ecuatorial permite destacar la categoría a la que pertenece cada grano de polen (Valdés et al., 1987). Las variedades analizadas se dividen en dos categorías: forma sub-prolada (Zeitoun Boubazoula, Horr El Kotti, Khechinet Sig, Boubazoula, Lqam El Kotti, Baldi charqia y Injassi Hchichina) y forma prolada (Chemlali Sfax, Chemlali Mahres, Chemlali Bouchouka, Chetoui, Chemlali Balhi, Echahla y Sehli Sned).

El presente estudio pone de manifiesto la utilidad de los caracteres de tamaño del polen para el análisis del polimorfismo existente entre las distintas variedades de olivo. Sin embargo, sólo estos caracteres son insuficientes para explorar las diferencias existentes entre genotipos parecidos. El análisis de los parámetros relacionados con el tamaño del grano ha sido especialmente utilizado para fines taxonómicos y paleontológicos para determinar el polen procedente de distintas especies (Martens y Fretz, 1980) o bien géneros de la misma especie (Xu y Kirchoff, 2008), mientras que su utilización para identificar el origen varietal

dentro de una misma especie, sólo se ha limitado a unos pocos trabajos presentes en la literatura (Arzani et *al.*, 2005).

La observación de secciones ultrafinas de granos de polen al MET permite explorar los caracteres ultraestructurales, tanto internos como externos, de la pared del polen. En este trabajo se han estudiado 6 caracteres de la pared del polen. De acuerdo con nuestras observaciones y con estudios anteriores en olivo sobre la pared del polen (Fernández y Rodríguez-García, 1988), las medidas de los diferentes componentes se realizaron en las zonas intermedias de la pared, situadas entre las aperturas, ya que en estas zonas, la pared presenta modificaciones en su estructura.

Todos los caracteres de la pared del polen (en MET) presentaron una desviación estándar razonable, excepto para el parámetro de distancias entre columelas, que mostró una desviación estándar muy grande, del orden del 47,6% de la media obtenida. Esto se debe a que este parámetro está sujeto a una variación importante debido a las irregularidades que presenta la estructura de la exina, y por lo tanto no es válido para la discriminación de las variedades. Parte de estas irregularidades son debidas a la harmomegata que es la capacidad del polen a adaptarse a la humedad del medioambiente lo que influye la forma del grano y por tanto las distancias entre columelas.

Aparte de los parámetros analizados en el presente trabajo, se han detectado diferencias entre los individuos estudiados a nivel de la capa basal. Efectivamente, excepto para los individuos Chemlali Balhi y Khechinet Sig, esta capa presenta una alta densidad a los electrones y debido a su elevado contraste es fácilmente diferenciable del resto de los componentes de la exina. Las diferencias a nivel de la capa basal han sido estudiadas en todas las muestras (10 grano por individuo) llevando a la conclusión de que dicha propiedad es reproducible. Teniendo en cuenta de que el proceso de preparación de las muestras para el MET ha sido el mismo para todas las muestras y las fotos han sido obtenidas bajo las mismas condiciones de luz y de contraste, se puede deducir que los diferentes grados de densidad a los electrones a nivel de la capa basal podría representar un parámetro discriminativo que se debe a la composición química de los componentes de la exina (Punt et *al.*, 2007). Sin embargo, la determinación del

origen genético de dicho polimorfismo requiere un estudio posterior para poder decidir de su potencial uso como marcador morfológico adicional.

La observación de los caracteres morfológicos de la exina llevada a cabo bajo microscopio electrónico de barrido, permitió confirmar que existen variaciones entre los individuos analizados. Usando la misma metodología, Lanza *et al.*, 1996 demostraron que los caracteres de la exina pueden servir para la determinación del origen varietal del olivo, especialmente el parámetro de anchura del muro. El parámetro área de los lúmenes presentó una desviación estándar muy elevada (39,1%) y por lo tanto no se recomienda su uso para la identificación de las variedades de olivo. La gran variación en este parámetro se corresponde con la elevada variación observada en el parámetro de distancias entre columelas bajo el MET. Ambos parámetros representan la arquitectura de la exina, la primera a nivel tridimensional mientras que la segunda a nivel bidimensional (corte).

De todas las variedades analizadas, la Chétoui, variedad principal del norte de Túnez, es la que presenta unas diferencias más marcadas. Se caracteriza por una intina y una endexina muy delgadas, unas columelas muy grandes, y en la parte externa de la exina, los elementos esculturales de los muros están muy distanciados unos de otros.

5.1.2. Análisis estadístico

El objetivo principal del análisis estadístico de los caracteres morfológicos de polen es conocer si dichos parámetros están influenciados por el origen varietal de los individuos analizados o no. Con el fin de contrastar esta hipótesis, se ha realizado un test ANOVA que demostró que existen diferencias significativas entre los individuos en todos los parámetros morfológicos estudiados.

Aunque la variación entre pólenes de distintas variedades es mínima para algunos caracteres, el uso de un conjunto de parámetros tanto del tamaño del grano como de la estructura de la pared permite obtener un patrón propio a cada variedad. En base al análisis de granos de polen de variedades de albaricoque (Arzani *et al.*, 2005) se ha concluido que un patrón constituido por varios caracteres del polen permite identificar el origen varietal a partir del polen.

El análisis factorial permitió demostrar que la endexina, el área de los granos, las columelas y la intina son los caracteres morfológicos mas discriminativos para la identificación de individuos de olivo de Túnez. Por lo tanto, dichos caracteres se consideran especialmente recomendables. En trabajos previos, la identificación de las variedades de olivo mediante los caracteres morfológicos del polen ha sido basada unicamente sobre el estudio de las características de tamaño del grano y la de exina (Marsilio y Lanza, 1994; Lanza et al., 1996). Estos estudios han recomendado el uso de caracteres observados al MEB, como son el ratio eje polar/diámetro ecuatorial o la anchura del muro de la exina. Sin embargo, esta Memoria pone de manifiesto que las estructuras de la pared del polen analizadas al MET (endexina, columelas, intina) representan también una herramienta importante para la discriminación de los diferentes cultivares. Lo mismo ocurre con el tamaño de los granos de polen.

El resultado de nuestro estudio, junto con trabajos previos llevados a cabo en cultivares procedente de España y Portugal (Rejón et al., 2009; Ribeiro et al., 2010) propone un sistema de clasificación de variedades de olivo basado en la morfología del polen que puede ser utilizado para aplicaciones aeropalinológicas (determinación de la composición varietal del polen en el aire), agronómicas (certificación del origen varietal del polen para cruzamientos dirigidos o previsión de cosecha), o también para fines farmacéuticos (determinación del origen varietal del polen utilizado para la realización de los extractos necesarios para la fabricación de vacunas anti-alergia) etc..

La autofluorescencia debida a la presencia de carotinoides y fenoles en la exina ha sido descrita en otras especies distintas al olivo (Roshchina et al., 1997). Las notorias heterogeneidades entre la autofluorescencia observada en los distintos granos de polen de la misma muestra son probablemente debidas al contenido diferencial en agua de cada uno de los granos, y a que es claramente observable la disminución de la autofluorescencia en el polen hidratado en relación al no hidratado. Resultados similares han sido descritos en un trabajo realizado en polen viable durante el proceso de germinación *in vitro* (Audran y Willemse, 1982). Estas observaciones sugieren que esta técnica permitiría por lo tanto evaluar de alguna forma el estado de hidratación del polen de olivo a través del nivel de autofluorescencia que emite cada grano. De forma análoga, los

granos de polen no viables mantendrían elevados niveles de autofluorescencia después de ser hidratados ya que no se produciría dicha hidratación de forma efectiva. Por lo tanto, aunque este hecho debería ser comprobado experimentalmente, este tipo de ensayos podrían ser también indicativos del estado de viabilidad de una muestra de polen.

La posibilidad de discriminar variedades de olivo mediante el nivel de autofluorescencia que emitan los granos de polen de cada variedad ha sido explorada por primera vez en el presente estudio. Se ha observado una diferencia en la autofluorescencia total emitida entre la variedad Ayrouni por un lado y las variedades Picual, Lojame y Cornicabra por otro. Esta diferencia es probablemente debida a factores intrínsecos del polen como son la composición de la exina y el material unido a ella. Igualmente, la variedad Picual presentó una intensidad superior al resto de las variedades en el rango 590-650 nm.

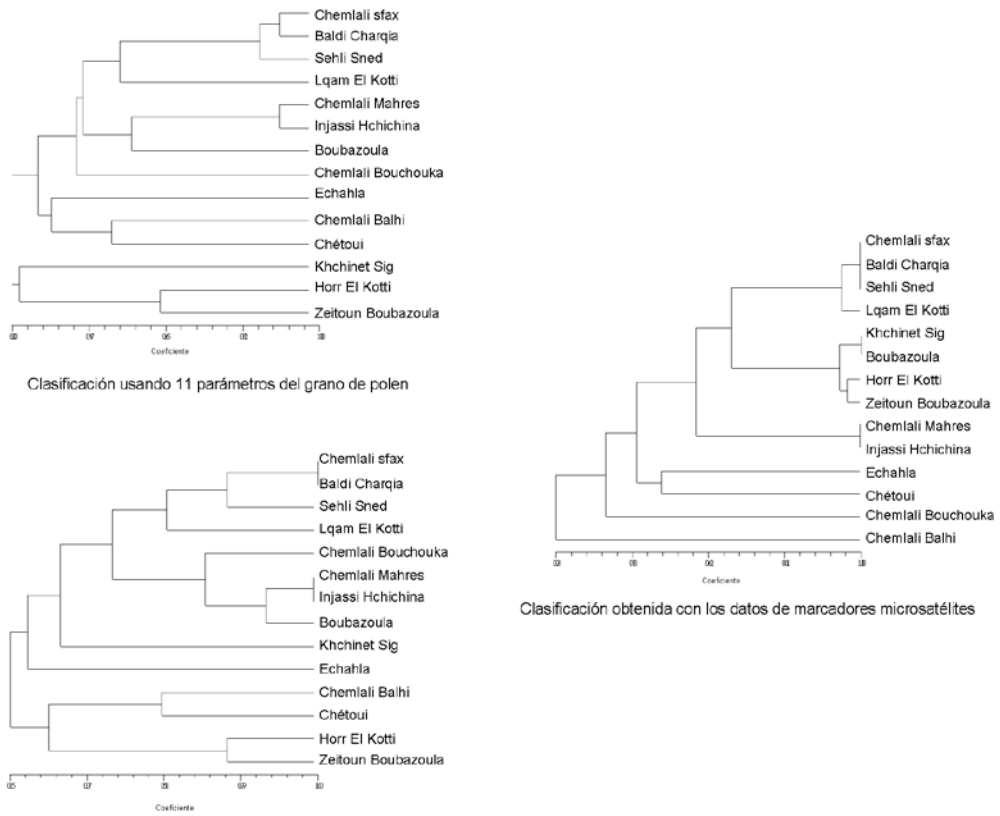
Consecuentemente, la autofluorescencia emitida por el polen del olivo puede constituir una herramienta adicional importante para la clasificación varietal. Sin embargo, es necesario un estudio más amplio, con un número importante de cultivares para evaluar este método y recomendarlo para su uso extensivo en la identificación de las variedades de olivo.

5.1.3. Comparación entre identificación mediante los marcadores morfológicos del polen y SSR

La combinación de diversos métodos de identificación es altamente recomendada en la caracterización de las variedades en las especies cultivadas y especialmente en olivo (Ganino *et al.*, 2006). El uso de esquemas pomológicos basados en el estudio de caracteres morfológicos y agronómicos del árbol, como son las hojas, los frutos, las inflorescencias, y especialmente los endocarpos, en combinación con marcadores moleculares (como los SSR) es una práctica común en los bancos de germoplasma del olivo del mundo (Rallo, 2005). En este sentido, el presente estudio, permite evaluar la utilidad de los marcadores morfológicos del polen mediante su comparación con los datos de microsátélites. El estudio llevado a cabo permitió proponer a los marcadores del polen como un método adicional que se puede usar en combinación con otros tipos de marcadores especialmente

moleculares para una mejor caracterización de las variedades de olivo. La figura 28 compara dos dendrogramas (de los 11 caracteres seleccionados y de los 4 caracteres más discriminativos respectivamente) con el dendrograma obtenido mediante 10 marcadores SSR. La comparación indica que existe una similitud morfológica a nivel del polen entre los individuos que presentan un genotipo idéntico. Dichos individuos son: (i) Chemlali Sfax, Baldi Charqia y Sehli Sned; (ii) Chemlali Mahres y Injassi hchichina. Sin embargo esto no ha sido el caso para los individuos Kchinet Sig y Boubazoula cuya similitud morfológica no es tan destacable. Por otro lado, los individuos Horr el Kotti y Zeitoun Boubazzoula, que presentan una similitud genética bastante elevada a nivel de SSR, también presentan una similitud a nivel de la morfología del polen. También, Lqam el Kotti que presenta una gran similitud genética con los individuos que representan el genotipo Chemlali Sfax muestran una similitud a nivel de la morfología del polen, pero menos destacable. Los datos morfológicos presentan un cierto nivel de similitud entre los individuos Chemlali Balhi et Chétoui mientras que los SSR no presentan ninguna similitud genética.

De manera general, el método de la morfología del polen presenta una correspondencia con el método SSR que proporciona marcadores de una elevada resolución en la identificación de las variedades de olivo (Diaz et al., 2006; Ganino et al., 2007; Rekik et al., 2008). Sin embargo, el sistema de clasificación usando los caracteres morfológicos del polen es recomendable preferentemente en combinación con otro método molecular como es el caso de los marcadores SSR. Las diferencias observadas pueden ser atribuidas bien a factores no genéticos o bien al relativo grado de subjetividad que presentan los caracteres morfológicos del polen, incluso cuando la caracterización la realiza personal con experiencia en el tema (Trujillo y Barranco, 1999; Trujillo et al., 2005). Como consecuencia, el método de clasificación mediante caracteres morfológicos del polen, propuesto en el presente estudio no sustituye en ningún caso el uso de marcadores de ADN.



Clasificación usando los 4 parámetros mas discriminantes del grano de polen

Figura 28. Comparación entre dendrogramas de clasificación de individuos.

5.2. Construcción de un base de datos para la identificación de variedades de olivo.

A pesar del número limitado de marcadores utilizados en el análisis de los 183 individuos que han sido incluidos en la base de datos de identificación de variedades, se ha podido llevar a cabo una identificación eficiente de las mismas. Esto ha sido posible gracias a la combinación de 4 marcadores microsatélites (UDO99-043, *ssrOeUA-DCA18*, GAPU101 y *ssrOeUA-DCA3*) seleccionados a partir de los 10 marcadores utilizados descritos anteriormente. La selección de los marcadores se ha llevado a cabo teniendo en cuenta su gran poder discriminativo, su fácil interpretación y la posibilidad de usarlos en combinaciones durante la separación de los fragmentos en el secuenciador automático. Las ventajas que presentan dichos marcadores han sido también destacadas en estudios previos de otros autores (Bladoni *et al.*, 2009; Fendri *et al.*, 2010).

Nuestro estudio ha permitido identificar 90 genotipos y 93 perfiles duplicados. Esto confirma que un número limitado de SSR con un poder discriminativo bastante elevado es fácilmente capaz de discriminar un número elevado de genotipos (Sarri *et al.*, 2006; Muzzalupo *et al.*, 2008). Los marcadores microsatélites seleccionados para este estudio constituyen entonces una herramienta muy importante tanto para los bancos de germoplasma como para los programas de prospección permitiendo proporcionar una cantidad considerable de información con un coste económico relativamente reducido en comparación con otros análisis SSR que emplean un número elevado de marcadores (Cipriani *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que existen errores considerables de identificación especialmente en las colecciones nacionales de Boughrara-Sfax (Túnez) y INRB Elvas (Portugal), así como las plantaciones locales de Guejar Sierra y de la EEZ en Armilla. Estas confusiones se observaron especialmente entre las variedades más importantes de Túnez y España; Chemlali Sfax y Picual respectivamente. Estos errores son debidos a una identificación equivocada basada en los caracteres morfológicos y agronómicos del árbol, realizada tanto desde una perspectiva científica, como es el caso de la colección de Túnez (Trigui *et al.*, 2002) como a nivel de agricultores, como ocurre en la colección local de Guejar Sierra. Esto pone de manifiesto el problema de la fiabilidad de los marcadores morfológicos y agronómicos en la identificación varietal. Efectivamente, la identificación basada en caracteres generales del árbol y del fruto llevada a cabo por un personal que no

posee la experiencia necesaria conduce a una identificación errónea en la mayoría de los casos (Trujillo y Barranco, 1999). El uso de un esquema pomológico completo como el esquema establecido por (Barranco y Rallo, 1984) con un número importante de repeticiones en tiempo y en espacio es imprescindible para identificar variedades de olivo pero no suficiente para garantizar la certeza de que la clasificación es correcta, ya que el uso de marcadores moleculares aporta en muchos casos un conocimiento adicional y permite aclarar un número considerable de confusiones. Muchos autores recomiendan la combinación de ambas metodologías para llevar a cabo una clasificación adecuada especialmente en los bancos de germoplasma (Cantini et al., 1999; Rallo, 2005). El presente estudio ha permitido identificar un número elevado de duplicaciones y sinonimias en la colección de Boughrara-Sfax (Túnez) cuya identificación agronómica y morfológica ha sido llevada a cabo previamente usando un esquema pomológico parecido al que fue recomendado por el Consejo Oleícola Internacional (Trigui et al., 2002). Esto apoya los resultados obtenidos en el análisis SSR llevado a cabo sobre los mismos individuos de la colección de Boughrara-Sfax usando 8 marcadores microsatélites (Fendri et al., 2010). Solamente se han observado pequeñas diferencias entre la clasificación obtenida en dicho trabajo en comparación con los resultados del presente estudio. Estas diferencias se deben a la limitación del número de marcadores utilizados (de 8 a 4 SSR) y se han observado en los individuos genéticamente muy similares: Zeitoun el Manchar y Lqam el Mouammar, Chemlali Zarzis y Injassi Hchichina, Khchinet Sig y Mbazzel Kbir, Chemlali Sig y Horr Sig. Sin embargo, una pequeña disimilitud genética entre dos genotipos determinados no quiere necesariamente decir que son dos variedades diferentes, sino puede corresponder a un polimorfismo intra-varietal. Esto ha sido discutido por muchos autores que han empleado los marcadores SSR para la clasificación de las variedades de olivo (Noormohamadi et al., 2007). Según el código internacional de nomenclatura para plantas cultivadas, una variedad se define como un conjunto de plantas claramente distinguible por cualquier carácter (morfológico, fisiológico, citológico químico etc.), y que cuando se multiplica sexual o asexualmente, tiene la capacidad de conservar sus características propias (Trehane et al., 1995). De hecho, niveles bajos de disimilitud genética no indica necesariamente que se trate de variedades diferentes. La utilidad de los marcadores SSR para la detección del polimorfismo intra-varietal en el olivo ha sido previamente demostrada (Cipriani et al., 2002).

Esta variabilidad puede ser debida a las mutaciones somáticas que han ocurrido a lo largo del tiempo (Noormohammadi et *al.*, 2007). Los resultados de nuestro estudio ratifican la importancia que tiene para una catalogación adecuada de las variedades de olivo, la combinación de datos agronómicos, morfológicos y tecnológicos junto con los análisis moleculares (Ganino et *al.*, 2006).

El análisis de SSR en la colección portuguesa de Elvas ha permitido también aclarar ciertas confusiones en la clasificación de los 11 individuos examinados. Sólo 7 han sido identificadas como tales, siendo las 4 restantes sinonimias de variedades previamente caracterizadas en el banco de germoplasma del IFAPA en Jaén (España). También se ha detectado que la variedad conocida como “Koroneiki”, variedad principal en Grecia y la variedad “Chemlali Bouchouka”, variedad terciaria difundida localmente en la región de Sfax (Túnez), realmente son una misma variedad con distinto nombre. Llama la atención la coexistencia de sinonimias en dos países bastante lejanos como son Túnez y Grecia. Probablemente este genotipo fue introducido hace mucho tiempo de Grecia a Túnez o quizás en sentido contrario (aunque esto último es menos probable). En la actualidad, la variedad Koroneiki se conoce como una variedad extranjera introducida recientemente en Túnez. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que dicha variedad existía ya en Túnez probablemente desde hace mucho tiempo y se le dió el nombre autóctono de “Chemlali Bouchouka”, utilizado hasta hoy en día por los agricultores. La presencia de sinonimias entre colecciones de distintos países destaca la importancia de llevar a cabo los trabajos de identificación a gran escala, o bien, establecer una estrecha colaboración entre los distintos bancos de germoplasma para conseguir una catalogación más eficiente de las variedades de olivo. En este sentido el trabajo de Baldoni et *al.*, 2009 propone el uso de un sistema universal de identificación de variedades de olivo basado en marcadores microsatélites con un alto poder discriminativo, fácil de interpretar y de reproducir entre laboratorios. Sin embargo, esta última exigencia se enfrenta a la dificultad de reproducir el sistema debido principalmente al uso de secuenciadores diferentes en los distintos laboratorios.

El análisis de los 4 SSR empleados en la base de datos establecida en este estudio permitió detectar un total de 38 alelos con una media de 12 alelos por locus, un promedio de contenido en información polimórfica de 0,82 y una

heterocigosidad observada media de 0,9. Estos valores elevados son debidos no sólo al gran poder discriminativo de los marcadores seleccionados, sino también a la gran diversidad del material analizado a lo largo de nuestro estudio. El material estudiado procede de 6 países diferentes (aunque mayoritariamente de España, Túnez y Portugal) lo que junto con el amplio número de muestras incluidas en el análisis, explica el elevado nivel de diversidad obtenido. Hay que destacar el interés de la base de datos iniciada recientemente para la identificación de variedades de olivo y que reúne un número considerable de recursos genéticos, lo mas probable que algunos de ellos son todavía no conservados en bancos de germoplasma nacionales propiamente dichos.

Los datos de los perfiles alélicos de los individuos discriminados han sido utilizados para establecer las relaciones genéticas entre variedades mostradas en la Figura 22. El dendrograma obtenido confirma el importante nivel de variabilidad de los individuos analizados y la diversidad que se puede observar dentro de la especie *Olea europaea* L. Los coeficientes de similitud genéticas DICE calculados presentaron valores bastante bajos (hasta 0,00 de similitud). Los niveles de diversidad obtenidos pueden servir de base para la creación a largo plazo de una colección de variedades de olivo en la EEZ (CSIC), y que viene a completar los bancos ya existentes en otras partes de España. Disponer de material de diverso origen varietal identificado, permitirá satisfacer a nivel científico las necesidades de experimentación del grupo de investigación de la EEZ.

El análisis factorial de correspondencia demuestra una tendencia de las variedades ibéricas a agruparse separadamente del resto de las variedades procedentes de países del centro del mediterráneo, principalmente de Túnez. Esto significa que existen alelos compartidos entre individuos procedentes de determinadas regiones geográficas de la península ibérica. Resultados parecidos han sido obtenidos en estudios previos entre cultivares de olivo de orígenes geográficos distintos (Carriero et al., 2002) y entre poblaciones de olivos silvestres (Belaj et al., 2010). La agrupación obtenida en el presente análisis se explica por la presencia de una discontinuidad genética entre las regiones del centro del mediterraneo (Túnez) y del oeste del mediterráneo (Península Ibérica), pero no solamente en el espacio sino también en el tiempo (historia del olivar). El

intercambio de material vegetal a lo largo del tiempo tuvo que ser limitado ya que en caso contrario, hubiera ocurrido una continuidad genética entre las dos regiones olivareras.

Basándose en el sistema de clasificación establecido por Barranco y Rallo (1984) y adoptado por el Consejo Oleícola Internacional, se ha estudiado la agrupación de los genotipos disponiendo de datos de caracteres morfológicos del endocarpo (datos medidos en los mismos individuos o encontrados en la bibliografía). Se ha destacado una tendencia de agrupación según el peso del endocarpo, la cual aparentemente está relacionada con el origen geográfico del genotipo (en el análisis factorial se observa una tendencia de separación por tamaño del edocarpo y origen geográfico, siguiendo el eje de las coordenadas, ver Figs 12 y 13):

No se aprecia ninguna agrupación de las variedades en base al uso preferencial de las mismas (aceite, aceituna de mesa, uso mixto) Esto es debido principalmente a la subjetividad de este criterio ya que las aceitunas empleadas para aceite en una determinada zona pueden ser utilizadas como aceituna de mesa en otras zonas. Sin embargo, una agrupación según el uso predominante ha sido obtenida a nivel local dentro del mismo país) (Fendri et al., 2010), como consecuencia de que a lo largo de la historia olivarera la selección de los genotipos se ha debido a la preferencias de los agricultores para elegir ciertos criterios, como puede ser el tamaño de las aceitunas Pero la relativa subjetividad de este criterio, explica la imposibilidad de obtener una agrupación de este tipo, cuando se analiza un número importante de genotipos de distintos países, como es el caso en el presente estudio.

5.3. Análisis de los microsatélites en polen y hojas

5.3.1. Identificación del origen varietal del polen mediante el uso de marcadores microsatélites y estudio comparativo

El análisis de 10 marcadores microsatélites en 52 muestras de olivo, a partir de ADN procedente tanto de hojas como de polen, presentó un elevado porcentaje de genotipado (98,07%). Esto indica la posibilidad de la aplicación de la metodología SSR para genotipar muestras de ADN procedente de polen. Hasta la fecha, no se ha encontrado en la literatura ninguna metodología que describe la identificación varietal del polen del olivo mediante marcadores moleculares. Sin embargo, algunos trabajos mencionan la utilización de marcadores de ADN para la identificación del polen de otras especies vegetales. Una metodología basada en la utilización de marcadores RFLPs ha sido propuesta para identificar varias especies con el objetivo de sustituir los métodos tradicionales basados en la microscopía para aplicaciones forenses (Eliet y Harbison, 2006). Igualmente, en la especie *Magnolia obovata* Thunb, se ha podido amplificar ADN procedente de granos de polen individuales mediante marcadores microsatélites para estudios evolutivos (Matsuki et al., 2007). En un estudio parecido una identificación de granos de polen individuales ha sido llevada a cabo mediante la utilización de marcadores RAPDs en *Solanum* (Naseer Aziz et al., 1999). Igualmente, se ha llevado a cabo un análisis de microsatélites en la especie *Pinus sylvestris* L. que permitió identificar muestras de polen fósil y establecer las relaciones genéticas de éste con las poblaciones actuales (Parducci et al., 2005). Otro trabajo define la utilidad de los marcadores microsatélites en las aplicaciones forense permitiendo determinar la zonas de crímenes mediante la identificación del origen del polen de la especie *Quercus geminata* (Craft et al., 2007).

En el presente estudio, los marcadores microsatélites *ssrOeUA-DCA18*, *UDO99-24*, *GAPU59* y *GAPU103A* han sido amplificados en la totalidad de los individuos analizados, lo que permite confirmar su fácil amplificación con respecto al resto de los marcadores donde no se ha podido amplificar algunas muestras tanto de polen como de hojas. En determinados individuos, se ha destacado particularmente una dificultad de amplificación, es el caso para las variedades Verdial de Velez, Khchinet Sig y Chetoui. Esto indica la influencia de la calidad del ADN sobre el buen desarrollo de la reacción de PCR.

En la mayoría de los casos, los perfiles alélicos obtenidos fueron idénticos entre las muestras de ADN procedentes de polen y aquellas procedentes de hojas de los mismos individuos. Aunque el polen es un tejido gametofítico haploide, que incluye únicamente el material genético masculino, se han podido identificar los dos alelos procedentes de ambos progenitores. Esto es debido al hecho de que una población de granos de polen incluye todas las posibilidades de segregación de la planta madre, segregaciones que han ocurrido durante la meiosis (Johri, 1984). Efectivamente, durante la microsporogénesis que ocurre dentro de la antera, las células diploides del tejido esporógeno sufren dos divisiones meioticas que dan lugar a las microsporas haploides. La segregación que ocurre durante la meiosis permite conservar ambos alelos de la planta madre en la población de granos de polen que se va a generar posteriormente. Existe una diferencia fundamental entre el presente estudio en el que se partió de ADN procedente de una amplia población de polen, y los trabajos anteriormente mencionados que usaron marcadores de ADN de granos de polen individuales para la identificación (Naseer Aziz *et al.*, 1999; Matsuki *et al.*, 2007). La diferencia consiste en el hecho de que un grano de polen contiene una copia única del genoma nuclear haploide y consecuentemente, el grano tiene una elevadísima probabilidad de no reflejar por sí solo el genoma parental a causa de los eventos de recombinación cromosómica durante la meiosis, y por tanto los alelos resultantes de la amplificación de SSRs o el patrón de RAPDs pueden no reflejar la composición parental. Por el contrario, una población suficientemente elevada de granos de polen, como los que se han analizado en el presente estudio, puede ser representativa en su conjunto del genoma parental. De hecho, era un resultado esperado el obtener un mismo genotipo tanto de ADN extraído de hojas como de polen. Y ese fue el caso para la mayoría de las muestras de polen analizadas. Además, la obtención de los mismos perfiles alélicos en ambos materiales demuestra que el método de recolección de polen mediante la colocación de bolsas en el árbol y el proceso de extracción de ADN, son suficientemente eficientes ya que impiden la contaminación de pólenes de distintos genotipos. Sin embargo, la imposibilidad de amplificar los dos alelos presentes en algunos genotipos (solo se amplifica un alelo en lugar de dos), especialmente en las muestras de ADN extraído de polen, se debe probablemente a la escasez del número de copias de un alelo determinado, como por ejemplo en los alelos 160 del locus *ssrOeUA-DCA16* en el genotipo Picudo, así como el alelo 210 del locus *UDO99-43* en el genotipo Verdial de Vélez. Esto es debido a la baja

cantidad y calidad de ADN en dichas muestras en comparación con las muestras donde los perfiles alélicos fueron idénticos entre ADN de ambos materiales.

5.3.2. Evaluación de los marcadores microsatélites utilizados

Según nuestros resultados todos los marcadores utilizados son polimórficos, confirmando los resultados previamente obtenidos en otros estudios llevados a cabo sobre variedades de olivo de distintas partes del mundo (Sefc *et al.*, 2000; Carriero *et al.*, 2002; Cipriani *et al.*, 2002). Esto indica que todos los marcadores utilizados son informativos y no se debe descartar ninguno de ellos, al contrario de lo que ocurre con otros marcadores SSRs monomórfico empleados por otros autores (Baldoni *et al.*, 2009).

El análisis de los 10 marcadores SSR elegidos para este estudio, permitió identificar un número total de alelos de 48, correspondiente a 8,4 alelos por locus, una media que se considera elevada en comparación con otros estudios previos (Muzzalupo *et al.*, 2009). Esto confirma el elevado nivel informativo de los marcadores seleccionados. El uso de una combinación de marcadores SSR parecida al que hemos usado en el presente trabajo en un banco de germoplasma de Iran permitió obtener una media de número de alelos por locus similar (8,5) (Omrani-Sabbaghi *et al.*, 2007). La obtención de un número elevado de alelos en el presente estudio se debe también a la considerable variabilidad del material vegetal analizado a pesar del número limitado de individuos. Este alto nivel de variabilidad se ha confirmado por los valores elevados de heterocigosidad ($HO = 0,83$; $HE = 0,78$). En un estudio llevado a cabo sobre un número similar de muestras de olivo pero que incluye una menor diversidad genética (Noormohammadi *et al.*, 2007) y empleando un conjunto de marcadores parecido al que fue utilizado en el presente estudio, se obtuvieron valores medios inferiores en la heterocigosidad observada (HO medio de 0,66) (Noormohammadi *et al.*, 2007). Igual ocurre en otro trabajo llevado a cabo con un número más importante de individuos (112 individuos procedentes de Italia, España, Francia y Grecia) pero empleando un conjunto de marcadores SSR menos informativos (Montemurro *et al.*, 2005).

Consecuentemente se puede concluir que aunque la heterocigosidad observada en un grupo de individuos indica la diversidad genética de éste, el nivel de heterocigosidad es también determinado por el contenido polimórfico de los marcadores empleados. La obtención de valores de heterocigosidad superiores al valor límite de 0,5 para todos los loci analizados en este estudio, demuestra que estos marcadores pueden ser recomendados para la discriminación entre las variedades de olivo y para el estudio de la variabilidad genética. Tal como fue esperado, la presencia de 83,3% de heterocigotos indica que el material analizado presenta una diversidad genética importante debido al distinto origen geográfico de los individuos analizados.

Excepto dos SSR, todos los marcadores utilizados presentaron una F_0 negativa y una H_E inferior a H_O . Esto indica que, para la mayoría de dichos marcadores, el nivel de homocigosidad obtenido corresponde realmente al nivel existente en los individuos analizados. Sin embargo, cuando la H_E es superior o igual a H_O , la frecuencia de los alelos nulos es entonces positiva o nula indicando una sobreestimación del nivel de homocigosidad en el grupo de individuos analizados. Esto fue el caso para los loci *ssrOeUA-DCA16* y *UDO99-24*. El marcador *ssrOeUA-DCA16* ha permitido identificar 7 individuos homocigotos, mientras que *UDO99-24* destacó la presencia de 9 individuos homocigotos. Algunos de dichos individuos pueden ser heterocigotos en realidad, pero simplemente, no ha sido posible la amplificación de uno de los alelos debido a que los oligonucleótidos no han podido hibridar con el ADN, probablemente como consecuencia de la presencia de mutaciones puntuales (Pemberton *et al.* 1995). Los valores de F_0 se consideran como indicadores importantes de la garantía de los resultados del análisis de microsatélites, sobre todo en estudios genéticos de una población. Dicha frecuencia es calculada mediante un algoritmo iterativo basado en las frecuencias esperadas y observadas de los genotipos analizados (Summers y Amos, 1997).

El contenido en información polimórfica (PIC) representa las posibles combinaciones entre los distintos alelos obtenidos y se considera como un índice de la capacidad informativa de cada uno de los marcadores microsatélites. El promedio del PIC de este análisis fue de 0,73. Este valor se considera bastante elevado teniendo cuenta del número de individuos analizados. Por ejemplo, se ha

obtenido un PIC de 0,54 en 92 individuos de Irán (Noormohammadi et al., 2007) y 0,63 en 84 individuos de Túnez (Fendri et al., 2010). Un valor más elevado de PIC (0,84) ha sido observado en 26 variedades de Grecia (Roubos et al., 2010). Los marcadores utilizados en el presente estudio se consideran altamente polimórficos. Efectivamente, 8 de ellos pertenecen a la lista de los 11 SSRs recomendados por Baldoni et al., (2009) para su uso en la caracterización de los bancos de germoplasma del olivo, tras una selección llevada a cabo a partir de 77 SSRs disponibles para el olivo. Todos los microsatélites utilizados en este trabajo han presentado valores de PIC superiores al valor límite de 0,5 por encima del cual un determinado marcador se considera informativo. También la mayoría de ellos, excepto *ssrOeUA-DCA3*, *GAPU71B* y *GAPU59*, presentan un PIC superior a 0,7, valor por encima del cual los marcadores se consideran de utilidad para la construcción de mapas genéticos (Bandelj et al., 2004).

La probabilidad de identidad (PI) es la probabilidad de que un determinado genotipo elegido al azar sea idéntico a otro genotipo (Waits et al., 2001). La probabilidad de identidad presentó un promedio de 0,089 y un valor acumulativo de $4,11 \cdot 10^{-12}$ para el conjunto de los 10 SSR. Sabiendo que cuanto más baja la probabilidad de identidad más discriminativo es el marcador, los resultados confirman el gran poder discriminativo del conjunto seleccionado. Los marcadores *UDO99-043*, *GAPU103A*, *yssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA18* y *GAPU101* presentan los PI más bajos ya que incluyen un elevado contenido en información polimórfica.

Excepto para *GAPU103A*, todos los marcadores definidos y utilizados en este estudio presentaron, como mínimo, 2pb de diferencia entre los alelos consecutivos. La pequeña diferencia (1pb) observadas entre determinados alelos del locus *GAPU103A* puede inducir a la confusión a la hora de definir los perfiles alélicos. Baldoni et al., (2009) han indicado la presencia de una mutación de 21pb en las regiones flanqueantes de dos de los alelos de dicho SSR y Montemurro et al., (2005) han señalado que en algunos genotipos este marcador ha presentado más de dos alelos. Como consecuencia, este estudio no recomienda su uso en un material cuyo origen varietal sea completamente desconocido, debido a su relativa complejidad en la interpretación de los picos. Por lo tanto, y aunque Baldoni et al., (2009) presentan *GAPU103A* como uno de los marcadores más

recomendables por su alto contenido en información polimórfica, es preferible descartar este marcador para evitar una identificación errónea, teniendo además disponible un número importante de marcadores SSR capaces de discriminar adecuadamente las variedades de olivo.

Los resultados que se presentan en esta Memoria están de acuerdo con las conclusiones de trabajos previos en cuanto a la elección de los mejores marcadores SSR para la discriminación de las variedades de olivo (Belaj et al., 2004c; Sarri et al., 2006; Baldoni et al., 2009; Fendri et al., 2010). Se concluye que es muy recomendable el uso de los siguientes marcadores (mencionados por orden de importancia): UDO99-043, *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA18*, GAPU101, *ssrOeUA-DCA3* y GAUP71B. A parte de GAPU103A que no se recomienda por su realtiva complejidad en la interpretación, se descarta también el uso de GAPU59 por su bajo contenido en información polimórfica, *ssrOeUA-DCA16* por la posible presencia de alelos nulos y UDO99-024 por ambas razones.

El conjunto de marcadores: UDO99-043, *ssrOeUA-DCA18*, GAPU101 y *ssrOeUA-DCA3*, es especialmente interesantes ya que es posibles utilizarlos en combinaciones durante la separación de los fragmentos en el secuenciador automático gracias al tamaño de sus alelos y a los marcajes fluorescentes de sus cebadores (los marcajes pueden ser seleccionados según las necesidades). Este conjunto de marcadores fue capaz de identificar 90% de los genotipos analizados en este estudio. Los dos genotipos no discriminados son: Boubazoula y Chemlali zarzis, cuyas similitudes genéticas son muy elevadas con las variedades Kechinet Sig y Injassi Hchichina respectivamente (Fendri et al., 2010). Consecuentemente, se considera que dicho conjunto es bastante eficiente para la identificación de variedades de olivo y es altamente recomendable para llevar a cabo una caracterización preliminar adecuada con un coste económico bastante reducido. El análisis de varias combinaciones en una misma secuenciación ha permitido también concluir que no se recomienda el uso de marcadores cuyos tamaños de alelos son próximos en una misma secuenciación, especialmente para un material con un origen varietal completamente desconocido, ya que podría causar una confusión entre los alelos de diversos loci. La determinación de los rangos puede ser basada en datos presentes en la literatura, pero siempre teniendo en consideración la naturaleza del material vegetal analizado y el hecho de que los

tamaños de los alelos pueden variar considerablemente entre distintos secuenciadores (hasta 5pb) (Baldoni et *al.*, 2009). Estas posibles diferencias constituyen también una limitación del establecimiento de un sistema universal de identificación de variedades de olivo mediante marcadores SSR y la comparación de los datos obtenidos en varios laboratorios.

5.3.3. Identificación de muestras ciegas de polen

La identificación de muestras ciegas de polen ha sido llevada a cabo exitosamente usando la combinación de los 10 marcadores SSR descritos anteriormente. Excepto para la muestra ciega número 9, donde no se pudo amplificar ningún microsatélites, la extracción y la amplificación del ADN han sido realizadas con éxito a partir de todas las muestras ciegas de polen suministradas por la empresa Inmunal S.A. (Madrid, España). Para determinadas muestras, no se ha podido obtener una amplificación completa debido a la baja cantidad y calidad del ADN. Sin embargo, esto no afecta a la posibilidad de identificar dichas muestras. Problemas de este tipo han sido descritos en varios estudios empleando los marcadores SSR y que se atribuyen a la cantidad y calidad del ADN utilizado y a la sensibilidad de determinados marcadores a la amplificación (Noormohamadi et *al.*, 2007; Baldoni et *al.*, 2009). Indudablemente, este problema se presenta con más frecuencia cuando se trata de analizar muestras de ADN obtenido a partir de polen. Esto es debido a la escasa cantidad de ADN que tienen estas células, en comparación con otros tejidos de la planta como es el caso de las hojas.

Contrariamente a lo que se esperaba, algunas muestras ciegas de polen analizadas en este trabajo han presentado más de dos alelos por locus. Este ha sido el caso para las muestras ciegas número 4 y número 5. Dicha anomalía es posiblemente debida a la contaminación de las muestras de polen. Esta conclusión se apoya en el hecho de que no se ha encontrado un resultado parecido en las 26 muestras de ADN procedente de polen, que habían sido analizadas previamente en este estudio. La contaminación de las muestras 4 y 5 puede haber ocurrido durante la recolección, el transporte, la purificación o la extracción de las muestras. Asimismo, se observó un resultado parecido (pero solamente en un locus) en la muestra ciega numero 7. Este resultado se puede explicar por una ligera

contaminación de otras muestras, que presentan alelos del marcador GAPU71B, debido a la elevada señal que presenta este SSR, (Baldoni *et al.*, 2009).

Para las muestras ciegas, la identificación llevada a cabo corresponde exactamente a la clave de identificación obtenida de la empresa Inmunal S.A. (Madrid, España) y recibida después de haber presentado el informe de identificación.

Como conclusión de este análisis, se puede decir que la metodología de la identificación de cultivares de olivo mediante marcadores microsatélites en polen es perfectamente aplicable sobre muestras ciegas. Sin embargo, para llevar a cabo una identificación adecuada de las muestras de este tipo, y de origen varietal completamente desconocido, es imprescindible utilizar un número elevado de SSR con un alto poder discriminativo como los que han sido descritos y empleados en el presente trabajo. También, es importante poseer una amplia base de datos constituida por los perfiles alélicos de las variedades de olivo más difundidas, sobre todo en la zona de cultivo correspondiente a las muestras analizadas.

5.3.4. Identificación de muestras ciegas de vacunas

La amplificación del ADN procedente de muestras ciegas de vacunas suministradas por la empresa Inmunal S.A. (Madrid, España) ha sido posible únicamente en tres marcadores SSR; *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA3* y GAPU71B. Esto indica que a la hora de analizar muestras que incluyen una cantidad escasa de ADN, el número de copias de un determinado microsatélites disminuye considerablemente y por lo tanto no se pueden amplificar los SSR que presentan una baja frecuencia en el ADN. Trabajos llevados a cabo sobre microsatélites de otras especies demuestran que efectivamente, existen diferencias importantes en las frecuencias de cada uno de los microsatélites en el genoma (Song *et al.*, 2002; Almeida y Penha-Goncalves, 2004). Consecuentemente, un microsatélite que está representado por un número elevado de repeticiones a lo largo del ADN, como es el caso de *ssrOeUA-DCA9* y *ssrOeUA-DCA3*, es fácilmente amplificado en comparación con otros microsatélites, como por ejemplo *ssrOeUA-DCA16*. Debido a esta propiedad, los marcadores actualmente

disponibles para la identificación de las variedades de olivo, se han clasificado por la calidad que presentan los picos de los alelos (intensidad del señal) entre otros factores (Baldoni *et al.*, 2009).

Para *ssrOeUA-DCA9*, se han identificado dos alelos por genotipo mientras que para *ssrOeUA-DCA3* y *GAPU71B*, solo se ha podido amplificar un alelo como máximo en cada muestra. Esto no indica necesariamente que las muestras corresponden a individuos homocigotos en los loci analizados, sino lo más probable que no se ha podido amplificar el segundo alelo debido a la escasa cantidad de ADN y su estado de degradación.

A partir de los datos de perfiles alélicos obtenidos, no ha sido posible identificar el origen varietal de las muestras ciegas de vacunas sin tener ningún conocimiento previo de los posibles cultivares a los que pueden corresponder. Esto es debido, a la cantidad escasa de información generada por solamente 3 marcadores SSR. Además, en dos de dichos marcadores amplificados solo se pudo identificar un alelo por loci. Sin embargo, el análisis permite discriminar dos perfiles alélicos diferentes. Dicha diferencia se manifiesta únicamente en el marcador *GAPU71B*. El primer perfil corresponde a las vacunas número 1 y 6 mientras que el segundo perfil corresponde al resto de muestras. El análisis no permite atribuir un origen varietal a las muestras ciegas de vacunas, pero permite recomendar el uso de los marcadores *ssrOeUA-DCA3*, *ssrOeUA-DCA9* y *GAPU71B* para identificar muestras que incluyen una cantidad escasa de ADN. Posiblemente, con algunas mejoras en el proceso de extracción de ADN, se puede obtener una identificación eficiente mediante el uso de dichos marcadores.

6. CONCLUSIONES

1. Mediante el uso de diversas técnicas de microscopía hemos conseguido definir diversos caracteres morfológicos de la pared del polen del olivo que presentan una notable variabilidad dependiente del cultivar de origen. Estos caracteres han sido utilizados para desarrollar un sistema de clasificación varietal, que es coincidente con la obtenida mediante el uso de marcadores moleculares de tipo microsatélite. Con objeto de cubrir diferentes aplicaciones, es aconsejable la utilización complementaria de ambos tipos de aproximaciones.
2. La captura de imágenes de autofluorescencia de la pared del grano de polen del olivo puede considerarse un método no disruptivo de análisis que puede ser usado en conjunción con los parámetros morfológicos anteriormente descrito para la clasificación varietal del polen, ya que no requiere ningún tratamiento de fijación o tinción.
3. Se ha confirmado la utilidad de los marcadores SSR para la identificación y la clasificación varietal del olivo. Para la identificación preliminar de material esporofítico de origen varietal desconocido, se recomienda comenzar con un análisis preliminar con los marcadores: UDO99-043, *ssrOeUA-DCA18*, GAPU101 y *ssrOeUA-DCA3* por su fácil amplificación e interpretación, su elevada capacidad discriminativa, su gran fiabilidad y la posibilidad de combinarlos entre ellos durante la separación de los fragmentos.
4. A partir de tejidos esporofíticos (hojas), ha sido generada una base de datos de SSRs, que incluye 183 ejemplares de olivo correspondiente a 90 genotipos, y que ha permitido dilucidar un número considerable de errores de identificación varietal presentes en las colecciones y plantaciones privadas analizadas. El estudio de las relaciones genéticas entre los genotipos identificados ha puesto de manifiesto un elevado nivel de diversidad del material estudiado y el gran polimorfismo existente en la especie. Existen tendencias de agrupación según el origen geográfico de los genotipos. Por el contrario, no se ha encontrado ninguna agrupación relacionada con el uso predominante de las aceitunas.
5. Se ha puesto a punto la identificación de variedades de olivo utilizando marcadores moleculares de tipo SSR a partir de muestras de polen. Para la identificación de muestras con bajo contenido en ADN, como son las muestras de

polen, se recomienda el uso de los siguientes marcadores UDO99-043, GAPIU103A, ssrOeUA-DCA9, ssrOeUA-DCA18, GAPIU101 y ssrOeUA-DCA3.

6. Con mínimas excepciones, los perfiles alélicos descritos en una población suficientemente representativa de polen de una variedad de olivo, coinciden con los perfiles alélicos de la contrapartida esporofítica.
7. Se ha demostrado la utilidad de la metodología SSR para la identificación de muestras ciegas de polen de uso comercial. En este caso se recomienda el uso del máximo número de marcadores SSR y también disponer de una amplia base de datos de perfiles alélicos.
8. En el estado actual de la técnica, los SSRs no son suficientemente discriminativos para la identificación varietal de muestras ciegas de vacunas alergénicas desensibilizantes, probablemente debido a la existencia únicamente de trazas de ADN procedente del polen, dada su baja concentración. Se estima la utilidad potencial del método para la discriminación varietal de muestras relacionadas, como las soluciones utilizadas en diagnóstico SPT o soluciones concentradas de alérgenos.

CONCLUSIONS

1. Les différentes techniques de microscopie nous ont permis de définir une série de caractères morphologiques de la paroi du grain de pollen de l'olivier qui présentent une variabilité considérable selon l'origine variétale. Ces caractères ont été utilisés pour établir un système de classification de variétés permettant d'avoir une identification comparable à celle obtenue grâce aux marqueurs microsatellites. Il est conseillé d'utiliser ces deux méthodes simultanément pour avoir une identification variétales adéquate pour un certain nombre d'applications.
2. L'obtention d'images d'autofluorescence de la paroi du grain de pollen de l'olivier peut être considérée comme une méthode d'analyse qui maintient l'état parfait du tissu. Cette méthode peut être utilisée conjointement avec les caractères morphologiques décrits auparavant pour la classification variétale du pollen puisqu'elle n'exige aucun traitement de fixation ou de coloration préalable.
3. L'utilité des marqueurs SSR pour l'identification et la classification variétale de l'olivier a été confirmée. Pour une identification préliminaire d'un matériel végétal sporophytique, il est recommandé de commencer par une analyse préalable utilisant les marqueurs suivant: UDO99-043, *ssrOeUA-DCA18*, GAPU101 et *ssrOeUA-DCA3* puisque ces derniers présentent une facilité lors de leur amplification et interprétation en plus de leur capacité discriminative élevée, leur fiabilité et la possibilité de les utiliser avec différentes combinaisons lors de la séparation des fragments.
4. Une base de données de profils SSR a été créée à partir de tissus sporophytiques (feuilles) et comporte 183 arbres d'oliviers correspondant à 90 génotypes différents, ce qui a permis de détecter un nombre considérable d'erreurs d'identification variétale dans les collections et les plantations privées qui ont été analysées. L'étude des relations génétiques entre les différents génotypes identifiés a permis de mettre en évidence la grande diversité du matériel végétal étudié et le niveau de polymorphisme que présente cette espèce. Des tendances de regroupements de génotypes selon leurs origines géographiques ont été observées. Cependant, aucun regroupement significatif n'a été obtenu en se basant sur la destination commerciale de leurs fruits.
5. L'identification de variétés d'oliviers à partir d'échantillons de pollen en utilisant les marqueurs moléculaires SSR a été mise au point. Il est conseillé d'utiliser les marqueurs suivants: UDO99-043, GAPU103A, *ssrOeUA-DCA9*,

ssrOeUA-DCA18, GAPIU101 et ssrOeUA-DCA3 afin d'identifier des échantillons qui contiennent une faible quantité d'ADN, comme c'est le cas pour le pollen.

6. A part quelques exceptions, les profils alléliques obtenus à partir d'un échantillon suffisamment représentatif de pollen provenant d'une variété d'olivier correspondent parfaitement avec ceux obtenus à partir de tissus sporophytiques du même individu.
7. L'utilité de la méthode SSR pour l'identification d'échantillons de pollen inconnu à usage commercial, a été démontrée. Pour cela, il est préférable d'utiliser le plus de marqueurs SSR possible et de disposer d'une vaste base de données de profil alléliques.
8. Dans l'état actuel de la technique, les SSR ne sont pas assez discriminatifs pour identifier l'origine variétale des échantillons de vaccins allergéniques désensibilisants, probablement à cause de la présence de seulement quelques traces d'ADN provenant du pollen, cela est dû à la faible concentration. Son utilisation comme méthode potentielle pour l'identification variétale d'échantillons similaires est à envisager, notamment dans le cas des solutions utilisées pour le diagnostic SPT ou bien pour les solutions concentrées d'allergènes.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias Bibliográficas

- Alché JD, Castro AJ, Olmedilla A, Fernández MC, Rodríguez R, Villalba M, Rodríguez-García MI. 1999. The major olive pollen allergen (Ole e I) shows both gametophytic and sporophytic expression during anther development, and its synthesis and storage takes place in the RER. *J Cell Sci.* 112, 2501-2509.
- Alché JD, Rodríguez-García MI, Castro López A, Alché-Ramírez V. 2003. Kit para el diagnóstico de hipersensibilidad frente a alérgenos del polen del olivo y su utilización. *Oficina española de patentes y marcas.*
- Alba V, Sabetta W, Blanco A, Pasqualone A, Montemurro C. 2009. Microsatellite markers to identify specific alleles in DNA extracted from monovarietal virgin olive oils. *Eur Food Res Technol.* 229:375–382.
- Almeida P, Penha-Goncalves C. 2004. Long perfect dinucleotide repeats are typical of vertebrates, show motif preferences and size convergence. *Mol Biol Evol.* 21(7), 1226–1233.
- Amos W, Hoffman JI, Frodsham A, Zhang L, Best S, Hill VS. 2007. Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Mol Ecol.* 7, 10–14.
- Angiolillo A, Reale S, Pilla F, Baldoni L. 2006. Molecular analysis of olive cultivars in the Molise region of Italy. *Genetic Res Crop Evol.* 53, 289–295.
- Arzani K, Nejatian MA, Karimzadeh. 2005. Apricot (*Prunus armeniaca*) pollen morphological characterisation through scanning electron microscopy, using multivariate analysis. *New Zealand J Crop Hort Sci.* 33, 381-388.
- Audran JC, Willemse MTM. 1982. Wall development and its autofluorescence of sterile and fertile *Vicia faba* L. pollen. *Protoplasma.* 110:106-111.
- Avjioglu A, Hough T, Singh M.B, Knox RB and col. 1994. Pollen allergens. P.336-359. En: Williams E.G, Clarke A.E Knox R.B. (Eds). *Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants.* Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Baldoni L, Tosti N, Ricciolini C, Belaj A, Arcioni S, Pannelli G, Germana MA, Mulas M, Porceddu A. 2006. Genetic structure of wild and cultivated olives in the central Mediterranean basin. *Ann Bot Lond.* 98, 935–942.
- Baldoni L, Cultrera NG, Mariotti R, Ricciolini C, Arcioni S, Vendramin G, Buonamici A, Porceddu A, Sarri V, Ojda M, Trujillo I, Rallo L, Belaj A, Perri E, Salimonti A, Muzaalupo I, Casagrande A, Lain O, Messina R, Testolin R. 2009. A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping. *Mol Breeding.* 24, 213-231.

- Bandelj D, Jakse J, Javornik B. 2002. DNA fingerprinting of olive varieties by microsatellite markers. *Food Technol Biotech.* 40 (3), 185-190.
- Barral P, Batanero E, Palomares O, Quiralte J, Villalba M, Rodríguez R. 2004. A major allergen from pollen defines a novel family of plant proteins and shows intra- and interspecies cross-reactivity. *J Immunol.* 172(6), 3644-3651.
- Barranco D, Rallo L. 1984. Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía. Ministerio de agricultura, Junta de Andalucía, Madrid, España. 384pp.
- Barranco D, Rallo L. 1985. Las variedades de olivo cultivadas en España. *Olivae.* 9, 16-22.
- Barranco D, Cimato A, Fiorino P, Rallo L, Touzani A, Castañeda C, Serafín F, Trujillo I. 2000. World catalogue of olive varieties. Internacional Olive Oil Council. Madrid. España. 360pp.
- Barranco D. 2004. Variedades y Patrones. P.65-91. En: Barranco D, Fernández-Escobar D, Rallo L (Eds). *El cultivo de olivo (5ª ed)*. Junta de Andalucía. Ediciones Mundi-Prensa, España.
- Barranco D, Trujillo I, Rallo L. 2005. Libro I. Elaiografía Hispánica. En: Variedades de olivo en España. Rallo L, Barranco D, Caballero JM, Del Rio C, Martín A, Tous J, Trujillo I (Eds). Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Bartolini, G, Prevost G, Messeri C. 1994. Olive tree germoplasm: descriptor lists of cultivated varieties in the world. *Acta Hort.* 365, 116-118.
- Bartolini G, Prevost G, Messeri C, Gargnani G. 1998. Olive germoplasm: Cultivars and world-wide collections. FAO. Roma.
- Bartra J, Mullol J, del Cuvillo A, Dávila I, Ferrer M, Jáuregui I, Montoro J, Sastre J, A Valero. 2007. Air pollution and allergens. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 17 (2), 3-8.
- Beers MH, Berkow R. (Eds.). 1999. *The Merck manual of diagnosis and therapy (17th ed.)*. West Point, PA: Merck and Co., Inc.
- Belaj A, Trujillo I, de la Rosa R, Rallo L, Giménez MJ. 2001. Polymorphism and discriminating capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *J Am Soc HortSci.* 126, 64–71.
- Belaj A, Satovic Z, Cipriani G, Baldoni L, Testolin R, Rallo L, Trujillo I. 2003. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theor Appl Genet* 107, 736–744.

- Belaj A, Satovic Z, Rallo L, Trujillo I. 2004a. Optimal use of RAPD markers for varietal identification in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections. *J Am Soc HortSci.* 129 (2), 226-270.
- Belaj A, Trujillo I, Rallo L, Baldoni L. 2004b. Using of RAPD and AFLP markers to distinguish individuals obtained by clonal selection of the olive cultivars “Arbequina” and “Manzanilla” de Sevilla. *HortSci.* 39, 1566-1570.
- Belaj A, Cipriani G, Testolin R, Rallo L, Trujillo I. 2004c. Characterization and identification of the main Spanish and Italian olive cultivars by simple-sequence-repeat-markers. *HortSci.* 39 (7), 1557–1561.
- Belaj A, Muñoz-Diez C, Baldoni L, Satovic Z, Barranco D. 2010. Genetic diversity and relationships of wild and cultivated olives at regional level in Spain *Scien Hort.* 124 (3), 323-330.
- Ben Ayed R, Grati-Kammoun N, Moreau F, Rebaï A. 2009. Comparative study of microsatellite profiles of DNA from oil and leaves of tow Tunisian olive cultivars. *Eur. Food Res. Technol.* 229:757-762.
- Besnard G, Baradat P, Bervillé A. 2001a. Genetic relationships in the olive (*Olea europaea* L.) reflect multilocal selection of cultivars. *Theor Appl Genet.* 102, 251–258.
- Besnard G, Batadat P, Chevalier D, Tagmount A, Bervillé A. 2001b. Genetic differentiation in the olive complex (*Olea europaea*) revealed by RAPDs and RFLPs in the rRNA genes. *Genet Resour Crop Ev.* 48, 165-182.
- Besnard G, Khadari B, Baradat P, Berville A. 2002. *Olea europaea* (*Oleaceae*) phylogeography based on chloroplast ADN polymorphism. *Theor Appl Genet.* 104, 1353–1361.
- Benson RC, Meyer RA, Zaruba MW, McKhann GM. 1979. Cellular autofluorescence – is it due to flavins. *J. Histochem. Cytochem.* 27:44-48.
- Blanca M, Boulton P, Brostoff J, González-Reguera I. 1983. Studies of the allegens of *Olea europaea* pollen. *Clin. Allergy.* 13 (5), 473-478.
- Bogani P, Cavalieri D, Petruccelli R, Polsinelli L, Roselli G. 1994. Identification of olive tree cultivars by using Random Amplified Polimorphic DNA. *Acta Horticulturae.* 365, 98-102.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 32, 314-331.

- Bousquet J, Cour P, Guerin B, Michel FB. 1985. Allergy in the Mediterranean area I. Pollen counts and pollinosis of Montpellier. *Clin Allergy*. 14,249-258.
- Breton C, Claux D, Metton I, Skorski G, Bervillé A. 2004. Comparative study of methods for DNA preparation from olive oil samples to identify cultivar SSR alleles in comercial oil samples: Possible forensic applications. *J. Agric. Food Chem*. 52: 531-537.
- Breton C, Pinatel C, Medail F, Bonhommea F, Bervillé A. 2008. Comparison between classical and Bayesian methods to investigate the history of olive cultivars using SSR-polymorphisms. *Plant Sci*. 175, 524–532.
- Butowt R, Granot D, Rodríguez-García MI. 2003. A putative plastidic glucose translocator is expressed in heterotrophic tissues that do not contain starch, during olive (*Olea europea* L.) fruit ripening. *Plant Cell Physiol*. 44 (11), 1152-1161.
- Caballero JM, Del Río C. 2004. Métodos de multiplicación, P.93-123. En: El cultivo del olivo, 5ª edición. Barranco Fernández-Escobar, Rallo, Eds. Junta de Andalucía/Mundi-Prensa.
- Caballero JM., Del Rio C, Barranco D, Trujillo I. 2006. The Olive World Germplasm Bank of Córdoba, Spain. *Olea*. 25, 14-19.
- Cantini C, Cimato A, Sani G. 1999. Morphological evaluation of olive germoplasm present in Tuscany region. *Euphytica*. 109, 173-181.
- Carreira J, Obispo T, Lombardero M. 1994. Alergenos de *Olea europaea* y otras especies relacionadas. *Rev Esp Allergol Immunol Clin*. 9, 46-50.
- Carriero F, Fontanazza G, Cellini F, Giorio G. 2002. Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theor Appl Genet*. 104, 301–307.
- Castro AJ, Alché JD, Cuevas J, Romero PJ, Alché V, Rodríguez-García MI. 2003. Pollen from different olive tree cultivars contains varying amounts of the major allergen Ole e 1. *Int. Arch. Allergy Immunol*. 131, 164–173.
- Chance B, Cohen P, Jobsis F, Schoener B. Intracellular oxidation-reduction states in vivo. 1962. The microfluorometry of pyridine nucleotide gives continuous measurement of the oxidation state. *Science*. 137:499-508.
- Chapman MD. 1991. Manipulating allergen genes. *Clin. Exp. Allergy* 21, 155-156.
- Chapman MD, Smith AM, Vailes LD, Arruda LK, Dhanaraj V, Pomes A. 2000. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 106(3), 409-418.

- Cimato A, Cantini C, Sani G, Marranci M. 1993. II Germoplasma dell'Olivo in Toscana. Ed. Regione Toscana, Florence, Italy.
- Cipriani G, Marrazzo MT, Marconi R, Cimato A, Testolin R. 2002. Microsatellite markers isolated in olive are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars (*Olea europaea* L.). *Theor Appl Genet.* 104, 223-228.
- Civantos L. 2004. La olivicultura en el mundo y en España. P.17-35. En: Barranco D, Fernández-Escobar D, Rallo L (Eds). *El cultivo de olivo* (5ª ed). Junta de Andalucía. Ediciones Mundi-Prensa, España.
- Consolandi C, Palmieri L, Doveri S, Maestri E, Marmioli N, Reale S, Lee D, Baldoni L, Tosti N, Severgnini M, De Bellis G, Castiglioni B. 2007. Olive variety identification by ligation detection reaction in a universal array format. *J Biotechnology.* 129 (3): 565-574.
- Craft KJ, Owens JD, Ashley MV. 2007. Application of plant DNA markers in forensic botany: Genetic comparison of *Quercus* evidence leaves to crime scene trees using microsatellites. *Forensic Science International.* 165, 64–70.
- Cuevas J. 2005. Incompatibilidad polen-pistilo. En: *Variedades de olivo en España*. Rallo L, Barranco D, Caballero JM, Del Rio C, Martin A, Tous J, Trujillo I (Eds). Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- D'Amato G, Liccardi G, D'Amato M. 2005. Allergenic pollen and Urban air pollution in the Mediterranean area. *Advances in Immunopathology and Respiratory Allergy (III World Congress on Immunopathology and Respiratory Allergy) Pattaya-Thailand February 5-8,2005.* *Int Proc Medimond.* pp13-22.
- De Graaff J, Eppink L A J. 1999. Olive oil production and soil conservation in southern Spain in relation to EU subsidy policies. *Land Use Policy.* 16, 259-267.
- De la Rosa R, James C, Tobutt KR. 2002. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the *Oleaceae*. *Mol Ecol Notes.* 2, 265-267.
- De la Rosa R, James CM, Tobutt KR. 2004. Using microsatellites for paternity testing in olive progenies. *HortSci.* 39, 351–354.
- De la Torre F, Bautista R, Canovas FM, Claros MG. 2004. Isolation of DNA from olive oil: applications in DNA fingerprinting with SCAR markers. *J Food Agric Environ.* 2, 84-89.

- De Linares Fernández C. 2007. Análisis del polen alergógeno en la atmosfera de Granada: Evolución de las concentraciones polínicas, actividad alérgica e incidencia en la población atópica. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- Diaz A, De la Rosa R, Martin A, Rallo P. 2006. Development, characterization and inheritance of new microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and evaluation of their usefulness in cultivar identification and genetic relationship studies. *Tree Genet Genomes*. 2, 165-175.
- Doveri S, O'Sullivan DM, Lee D. 2006. Non-concordance between Genetic Profiles of Olive Oil and Fruit: a Cautionary Note to the Use of DNA Markers for Provenance Testing. *J. Agric. Food Chem.* 54 (24): 9221-9226.
- Driessen MNBM, Willemse MTM, van Luijin JAG. 1989. Grass pollen grain determination by light- and UV- microscopy. *Grana*. 28: 115-122.
- Dupuy N, Le Dreau Y, Ollivier D, Artaud J, Pinatel C, Kister J. 2005. Origin of french virgin olive oil registered designation of origins predicted by chemometric analysis of synchronous excitation-emission fluorescence spectra. *J Agric food chem.* 53 (24): 9361-9368.
- Eliet JR, Harbison SA. 2006. The development of a DNA analysis system for pollen. *International Congress Series* 1288. 825-827.
- Erdtman G. 1948. Did dicotyledonous plants exist in early Jurassic times? *Geol. Fören. Stockholm Förh.* 70, 265-271.
- FAO, 2010: Food and Agriculture Organization: <http://apps3.fao.org/wiews/olive/oliv/>.
- Fendri M, Trujillo I, Trigui A, Rodríguez-García MI, Alché Ramírez JD. 2010. Simple Sequence Repeat Identification and Endocarp Characterization of Olive Tree Accessions in a Tunisian Germplasm Collection. *HortSci.* 45(10), 1429-1436.
- Fernández MC y Rodríguez-García MI. 1988. Pollen wall development in *Olea europaea* L. *New Phytol.* 108, 91-99
- Fernández JE, Moreno F, Martín-Aranda J, Rapoport HF. 1994. Anatomical response of olive roots to dry and irrigated soils. *Adv. Hortic. Sci* 8, 141-144.
- Fernández MC, Olmedilla A, Alché JD, Palomino P, Lahoz C, Rodríguez-García MI. 1996. Immunogold probes for light and electron microscopic localization of Ole e 1 in several *Oleaceae* pollen. *J Histochem Cytochem.* 44, 151-158.

- Florido JF, González-Delgado P, Sáenz de San Pedro B, Quiralte J, Aria de Saavedra JM, Peralta V, Ruíz Valenzuela L. 1999. High levels of *Olea europaea* pollen and relation with clinical finding. *Int Arch Allergy Immunol.* 119, 133-137.
- Fogle HW. 1977. Identification of Tree Fruit Species by Pollen Ultrastructure. *J Am Soc Hort Sci.* 102, 548-551.
- Fonseca AE, Westgate ME, Doyle RT. 2002. Application of fluorescence microscopy and image analysis for quantifying dynamics of maize pollen shed. *Crop Sci.* 42:2201-2206.
- Ganino T, Bartolini G, Fabbri A. 2006. The classification of olive germoplasm. *J Hort Sci and Biotech.* 81 (3). 319-334.
- Ganino T, Beghé D, Valenti S, Nisi R, Fabbri A. 2007. RAPD and SSR markers for characterization and identification of ancient cultivars of *Olea europaea* L. in the Emilia region. *Genetic Res Crop Evol.* 54, 1531-1540.
- Gemas VJ, Rijo-Johansen MJ, Tenreiro R, Fevereço P. 2000. Inter-and Intra varietal analysis of three *Olea europaea* L. cultivars using the RAPD techniques. *J Hort Sci and Biotech.* 75 (3), 312 - 319.
- Grati-Kamoun N, Lamy-Mahmoud F, Rebai A, Gargouri A, Panaud O, Saar A. 2006. Genetic diversity of Tunisian olive tree (*Olea europaea* L.) cultivars assessed by AFLP markers. *Genetic Res Crop Evol.* 53, 265-275.
- Hagidimitriou M, Katsiotis A, Menexes G, Pontikis, Loukas M. 2005. Genetic diversity of major Greek olive cultivars using molecular (AFPLs and RAPDs) markers and morphological traits. *J Am Soc Hort Sci.* 130, 211-217.
- Hakim RI, Grati-Kammoun N, Makhoulfi E, Rebaï A. 2010. Discovery and Potential of SNP Markers in Characterization of Tunisian Olive Germplasm. *Diversity* 2, 17-27.
- Hamada H, Petrini MG, Kakunaga T. 1982. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionary diverse eukaryotic genomes. *Proc National Academy of Sciences of USA.* 79, 6465-6469.
- Hamrick JL, Godt MJW, Sherman-Broyles SL. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests.* 6, 95-124.
- Heslop-Harrison J. 1975. Physiology of the pollen grain surface. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 190, 275-300.
- Heslop-Harrison J. 1979. Aspects of the structure, citochemistry, and germination of the pollen of rye (*Secale cereal* L.). *Ann Bot Suppl.* 1, 1-47.

- Heywood HU. 1978. Flowering plants of the world. Oxford University Press, London. 335 pp.
- Hormaza JI. 1996. Marcadores de ADN aplicados a la mejora de frutales. ITEA. 92 (1), 5-15.
- Höss M, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Pääbo S. 1996. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissue. *Nucleic Acids Research*. 24 (7), 1304–1307.
- Consejo Oleícola Internacional. 2010. Survey and Assessment Division. 14 April 2010. <<http://www.internationaloliveoil.org/>>.
- International Union of Immunological Societies, 2010. Allergen Nomenclature Subcommittee. 8 April 2010. <<http://www.allergen.org/Allergen.aspx>>.
- Javady T, Arzani K. 2001. Pollen Morphology of Five Iranian Olive (*Olea europaea* L.) Cultivars. *J Agric Sci Technol*. 3, 37-42.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein S. 1985. Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature*. 316, 76-79.
- Johri BM (ed). 1984. Embryology of angiosperms. Springer-Verlag. Berlin New York Tokyo.
- Kapellakis IE, Tsagarakis KP, Crowther JC. 2007. Olive oil history, production and by-product management. *Rev Environmental Sci Biotech*.
- Karp A, Edwards KJ. 1997. Techniques for the analysis, characterization and conservation of plant genetic resources. Molecular genetic techniques for plant genetic resources. pp11. IPGRI Workshop, 9-11 October 1995. Editado por Ayad WG, Hodgkin T, Jaradat A, Rao VR. IRGRI. Roma. Italia.
- Khadari B, Breton C, Moutier N, Roger JP, Besnard G, Bervillé A, Dosba F. 2003. The use of molecular markers for germplasm management in a French olive collection. *Theor Appl Genet*. 106, 521–529.
- King TP, Hoffman D, Lowenstein H, Marsh DG, Platts-Mills TA, Thomas W. 1995. Allergen nomenclature. *J Allergy Clin Immunol*. 96, 5-14.
- Knudsen B, Knudsen T, Flensburg M, Sandmann H, Heltzen M, Andersen A, Dickenson M, Bardram J, Steffensen PJ, Monsted S, *et al*. 2009. CLC Sequence Viewer. A/S Cb, version 6.0.2.
- Krause GH, Weis E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mo. Biol*. 42: 313-349.

- Lacape JM, Dessauw D, Rajab M, Noyer JL, Hau B. 2007. Microsatellite diversity in tetraploid *Gossypium* germplasm: assembling a highly informative genotyping set of cotton SSRs. *Mol Breed.* 19, 45–58.
- Lanza B, Marsilio V, Martinelli N. Identificación varietal de cultivares de olivo (*Olea europaea* L.). 1995. Enfoques analíticos cuantitativos del patrón esinico del grano polínico. Actas del congreso: “L’olivicoltura mediterránea: estado y perspectivas de la cultura y de la investigación”, Rende, Italia. 219-24.
- Lanza B, Marsilio V, Martinelli N. 1996. Olive Pollen Ultrastructure: Characterization of Exine Pattern Through Image Analysis- Scanning Electron Microscopy (IA- SEM). *Scien Hort.* 65, 283-294.
- Larsen J.N, Lowenstein H. 1996. Alérgeno nomenclatura. *J Allergy Clin Immunol.* 97, 577-578.
- Liccardi G, D’Amato M, D’Amato G. 1996. *Oleaceae* polinosis: a review. *Int Arch Allergy Immunol.* 111, 210.
- Liu Z, Furnier GR. 1993. Comparación de alozimo, RFLP, y RAPD marcadores para revelar variación genética dentro y entre temblor de abedul y bigote de abedul. *Theor Appl Genet.* 87, 97-105.
- Loukas M, Krimbas CB. 1983. Historia de Olive cultivares basados en sus distancias genéticas. *J Hort Sci.* 58, 121–127.
- Lumaret R, Amane M, Ouazzani N, Baldoni L. 2000. Variación de ADN cloroplasto en las variedades silvestres de olivo del género *Olea* L. *Theor Appl Genet.* 101, 547–553.
- Mahious A. 2010. Optimización de un protocolo para la identificación de variedades de olivo a partir de ADN extraído de la pulpa de aceitunas frescas y aderezadas. Tesis de Master. Universidad de Córdoba.
- Mariotti R, Cultrera NGM, Muñoz Díez C, Baldoni L, Rubini A. 2010. Identificación de nuevas regiones polimórficas y diferenciación de variedades cultivadas de olivo (*Olea europaea* L.) a través de la comparación de secuencias de plastomas. *BMC Plant Biol.* 10: 211.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM. 1998. Confianza estadística para inferencia de paternidad basada en la probabilidad en poblaciones naturales. *Mol Ecol.* 7, 639-655.
- Marsilio V, Lanza B. 1994. Análisis cuantitativo electrónico microscópico de los patrones de exina de polen. In Jouffrey B, Colliex C. (Eds.), *Electron Microscopy 1994.* *Appl bio sci.* (3a- 3b), 1029-1030.
- Martens J, Fretz TA. 1980. Identificación de Ocho variedades de manzanas por la superficie del polen. *J Am Soc Hort Sci.* 105(2), 257-263.

- Matsuki Y, Isagi Y, Suyama Y. 2007. The determination of multiple microsatellite genotypes and DNA sequences from a single pollen grain. *Mol Ecol.* 7, 194–198.
- Minelli S, Maggini F, Gelati MT, Angiolillo A, Cionini PG. 2000. The chromosome complement of *Olea europaea* L.: characterization by differential staining of the chromatin and in-situ hybridization of highly repeated DNA sequences. *Chromosome Res.* 8(7):615-619.
- Mitsumoto K, Yabusaki K, Aoyagi H. 2009. Classification of pollen species using autofluorescence image analysis. *J Biosci Bioeng* 107: 90-94.
- Montemurro C, Simeone R, Pasqualone A, Ferrara E, Blanco A. 2005. Genetic relationships and cultivar identification among 112 olive accessions using AFLP and SSR markers. *J Hort Sci Biotech.* 80, 105–110.
- Mookerjee S, Guerin J, Collins G, Ford C, Sedgley M. 2005. Paternity analysis using microsatellite markers to identify pollen donors in an olive grove. *Tag theo App genet.* 111 (16): 1174-1182.
- Murry MG, Tompson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8, 4321-4325.
- Muzzalupo I, Pellegrino M, Perri E. 2007. Detection of DNA in virgin olive oils extracted from destoned fruits. *Eur. Food Res. Technol.* 224: 469-475.
- Muzzalupo I, Lombardo N, Salimonti A, Perri E. 2008. Molecular characterization of Italian olive cultivars by microsatellite markers. *Adv Hort Sci.* 22(2), 142–148.
- Muzzalupo I, Stefanizzi F, Salimonti A, Falabella R, Perri E. 2009. Microsatellite markers for identification of a group of Italian olive accessions. *Scie Agricola (Piracicaba, Braz).* 66 (5), 685-690.
- Naseer-Aziz A, Seabrook Janet EA, Tai-George CC. 1999. Amplification of RAPD Markers From Single Pollen Grains of Diploid (2N=2X=24) Potato. *Am J Potato Res.* 76, 179-182.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics.* Columbia University Press: New York.
- Noormohammadi Z, Hosseini-Mazinani M, Trujillo I, Rallo L, Belaj A, Sadeghizadeh M. 2007. Identification and characterization of main iranian olive cultivars using microsatellites markers. *HortSci.* 42(7), 1545-1550.
- Ollivier D, Souillol S, Noyer C, Guérère M, Pinatel C, Durbec JP, Artaud J. 2003. Contribution à l'étude de la traçabilité d'huiles d'olive vierges françaises: approche chimique. *Le Nouvel Olivier.* 31: 3-7.

- Olmedilla A, Alché JD, Rodríguez-García MI. 1997. Nucleic acid localisation in nucleolar bodies observed through meiotic prophase of *Olea europaea* pollen mother cells. *Eur J Biol.* 74, 181-189.
- Omrani-Sabbaghi A, Shahriari M, Falahati-Anbaran M, Mohammadi SA, Nankali A, Mardi M, Ghareyazie B. 2007. Microsatellite markers based assessment of genetic diversity in Iranian olive (*Olea europaea* L.) collections. *Sci Hort.* 112 (4), 439-447.
- Pacini E, Vosa CG. 1979. Scanning Electron Microscopy Analysis of Exine Patterns in Cultivars of Olive (*Olea europaea* L.). *Ann Bot.* 44, 745-748.
- Pafundo S, Agrimonti C, Maestri E, Marmioli N. 2007. Applicability of SCAR markers to food genomics: olive oil traceability. *J Agric Food Chem.* 55(15): 6052-6059.
- Paran I, Michelmores RW. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistant genes in lettuce. *Theor Appl Genet.* 85, 985-993.
- Parducci L, Suyama Y, Lascoux M, Bennett D. 2005. Ancient DNA from pollen: a genetic record of population history in Scots pine. *Mol Ecol.* 14, 2873-2882.
- Pasqualone A, Caponio F, Blanco A. 2001. Inter-simple sequence repeat DNA markers for identification of drupes from different *Olea europaea* L. cultivars. *Eur Food Res Technol.* 213, 240-243.
- Pemberton JM, Slate J, Bancroft DR, Barrett JA. 1995. Non-amplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Mol Ecol.* 4, 249-252.
- Perrier X, Flori A, Bonnot F. 2003. Data analysis methods. In: Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann J C. Ed., Genetic diversity of cultivated tropical plants. Enfield, Science Publishers. Montpellier. pp 43 - 76.
- Powell W, Machray GC, Provan J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* 1, 215-222.
- Punt W, Hoen PP, Blackmore S, Nilsson S, Le Thomas A. 2007. Glossary of pollen and spore terminology. *Rev Palaeobot Palynol.* 143, 1-81.
- Rafalski JA, Tingey SV. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet.* 9, 275-280.
- Raghavan V. 1997. Molecular embryology of flowering plants. Cambridge University press. pp: 1-3.
- Rallo P, Dorado G, Martín A. 2000. Development of simple sequence repeats in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theor Appl Genet.* 101, 984-989.

- Rallo P, Tenzer I, Gessler C, Baldón L, Dorado G, Martín A. 2003. Transferability of olive microsatellite loci across the genus *Olea*. *Theor Appl Genet.* 107, 940-946.
- Rallo L. 2005. Variedades de olivo en España: Una aproximación cronológica. P. 17-44. En : Rallo L, Barranco D, Caballero JM, Del Rio C, Martín A, Tous J, Trujillo I (Eds). 2005. Variedades de olivo en España. Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Reale S, Doveri S, Díaz A, Angiolillo A, Lucentini L, Pilla F, Martín A, Donini P, Lee D. 2006. SNP-based markers for discriminating olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Genome.* 49, 1193-1205.
- Rejón JD, Fendri M., Jimenez-López JC, Rodríguez-García MI, Alché JD. 2009. The Joint meeting of the Spanish and Portuguese Microscopy Societies. Segovia (Spain) July 2009. Classification and discrimination of olive cultivars by using pollen morphological and ultrastructural features.
- Rekik I, Salimonti A, Grati-Kamoun N, Muzzalupo I, Perri E, Rebai A. 2008. Characterisation and identification of Tunisian olive tree varieties by microsatellite markers. *HortSci.* 43(5), 1371-1376.
- Ribeiro H, Rejón JD, Fendri M, Calado L, Rodríguez-García MI., Alché JD, Abreu I. 2010. XVII International Symposium APLE. Ourense (Spain) July 2010. Discrimination of Portuguese olive cultivars by pollen morphology and ultrastructure.
- Riera FJ. 1950. Polinización y fecundación en olivicultura Sindicato nacional del olivo. *Olivicultura.* 1, 440-473.
- Roderic DM. 1996. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12, 357-358.
- Rodríguez-García MI, Fernández MC. 1987. Cytoplasmic nucleoloids during microsporogenesis in *Olea europaea* L. *Biol Cell.* 60, 155-160.
- Rodríguez-García MI, Fernández MC. 1989. Developmental changes in the aperture during pollen grain ontogeny in *Olea europaea* L. *New Phytol.* 11, 717-723.
- Rodríguez-García MI, Fernández M.C. 1990. Ultrastructural evidence of endoplasmic reticulum differentiation during the maturation of the olive pollen grain. *Plant Syst Evol.* 171, 221-231.
- Rodríguez R, Villalba M, Monsalve RI, Batanero E. 2001. The spectrum of olive pollen allergens. *Int Arch Allergy. Immunol.* 125, 185-195.
- Rohlf FJ. 1998. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.00. Exeter Software, Setauket, NY.

- Roselli G. 1979. Identificazione di cultivar di olivo da alcuni caratteri del polline. *Rivista di Ortofl orofruticoltura*. 63,435-45.
- Roshchina VV, Mel'nikova EV, Kovaleva LV. 1997. Changes in fluorescence during development of the male gametophyte. *Russ. J Plant Physiol*. 44: 45-53.
- Roshchina VV, Mel'nikova EV, Mit'kovskaya LI, Karnaukhov VN. 1998. Microspectrofluorometry for the study of intact plant secretory cells. *Zh Obshch Biol*. 59: 531-554.
- Roubos K, Moustakas M, Aravanopoulos FA. 2010. Molecular identification of Greek olive (*Olea europaea*) cultivars based on microsatellite loci. *Genet Mol Res*. 9(3), 1865-1876.
- Rovira M, Tous J, Hermoso JF, Valdés G , De la Rosa R. 2009. Polinización de la variedad de olivo 'Arbequina'. II Jornadas nacionales del grupo de olivicultura de la SECH. Tarragona.
- Santos ME, Cardoso HG, Hernández A, Peixe AA, Polidoros A, Ferreira A, Cordeiro A, Arnholdt-Schmitt B. 2009. Physiologic responses and gene diversity indicate olive alternative oxidase as a potential source for markers involved in efficient adventitious root induction. *Physiol Plant*. 137, 532-52.
- Sanz-Cortés F, Badenes ML, Paz S, Iñiguez A and Llácer G. 2001. Molecular characterization of olive cultivares using RAPD markers. *J Am Soc Hort Sci*. 126 (1), 7-12.
- Sarri V, Baldoni L, Porceddu A, Cultrera NGM, Contento A, Frediani M, Belaj A, Trujillo I, Cionini PG. 2006. Microsatellite markers are powerful tools for discriminating among olive cultivars and assigning them to geographically defined populations. *Genome*. 49 (12), 1606– 1615.
- Sefc KM, Lopes MS, Mendonça D, Dos Santos M.Rodrigues, Laimer Da Câmara Machado M, Da Câmara Machado A. 2000. Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea L.*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Mol Ecol*. 9, 1171-1193.
- Shivanna KR , Johri BM (eds). 1985. The angiosperm pollen structure and function. Wiley Estern Limited. New Delhi.
- Skvarla JJ, Larson DA. 1966: Fine structural studies of *Zea mais* pollen.1. Cell membranes and exine ontogeny. *Am J Bot*. 53, 1112-1125.
- Sneath PHA, Sokal RR. 1973. Numerical Taxonomy. San Francisco, CA. WH Friedman and Co. MathSciNet. 573.

- Soltis DE, Soltis PS. 1989. Isozymes in plant Biology. En: Soltis DE, Soltis PS (eds). Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- Song QJ, Fickus EW, Cregan PB. 2002. Characterization of trinucleotide SSR motifs in wheat. *Theor Appl Genet.* 104, 286–293.
- Summers K, Amos W. 1997. Behavioral, ecological and molecular genetic analyses of reproductive strategies in the Amazonian dart-poison frog, *Dendrobates ventrimaculatus*. *Behav Ecol.* 8, 260-267.
- Suzuzi M, Tonouchi M, Muryama K, Mitsumoto K. 2005. An analysis of high concentration of pollen at early morning in 2005 spring and a measurement of Japanese cedar and cypress pollen using autofluorescence characteristics. *J. Aerosol Res.* 20:281-289.
- Taamalli W, Guena F, Bassi D, Daoud D, Zarrouk M. 2008. SSR marker based fingerprinting of Tunisian olive (*Olea europaea* L.) varieties. *J Agron.* 7, 176-181.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25,4876-4882.
- Tous J, Romero A. 1993. Variedades del olivo. Fundación “La Caixa”, Barcelona, España.
- Trehane P, Brickell CD, Baum BR, Hettterscheid WLA, Leslie AC, McNeill J, Spongberg SA, Vrugtman F. 1995. International Code of Nomenclature for Cultivated Plants. Quarterjack Publishing, Wimborne, UK. 175pp.
- Trigui A, Msallem M, Yengui A, Belguith H, Khecherem J, Meliène A, Malek S, Bousselmi A, Samet A, Trabelsi EB. 2002. Oliviers de Tunisie, vol. 1. Ministère de l’Agriculture IRESA, Institut de l’Olivier, République Tunisienne.
- Trujillo I, Rallo L, Arus P. 1995. Identifying olive cultivars by isozyme analysis. *J Am Soc Hort Sci.* 120, 318-324.
- Trujillo I, Barranco D. 1999. Identificación Varietal en Olivo. Consejo Oleícola Internacional. Seminario Internacional sobre innovaciones científicas y su aplicación en la olivicultura y la elaiotecnia. Florencia 1999. 1-10.
- Trujillo I, Morales A, Belaj A, Valpuesta V, Botella MA, Rallo P, Martín A and Dorado G. 2005. Identificación de variedades de olivo por marcadores moleculares. En *Variedades de olivo en España* (Libro III: Mejora y Biotecnología). Rallo L, Barranco D, Caballero JM, Del Rio C, Martín A, Tous J, Trujillo I (Eds). Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

- Uriu K. 1959. Periods of pistil abortion in the development of the olive flower. Proc Am Hort Soc. 73, 194-202.
- Valdés B, Díez MJ, Fernández I. 1987. Atlas polínico de Andalucía Occidental. - Inst.Dess.Univ.Sevilla y Diput.Cadiz, Sevilla.
- Valenta R. 2002. The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. Nat Rev Immunol. 2(6), 446-453.
- Valière N. 2002. GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. Mol Ecol Notes. 2, 377-379.
- Vargas P, Kadereit JW. 2001. Molecular fingerprinting evidence (ISSR, Inter-Simple Sequence Repeats) for a wild status of *Olea europaea* L. (*Oleaceae*) in the Eurosiberian North of the Iberian Peninsula. Flora 196, 142-152.
- Waisel Y, Geller-Bernstein C, Keynan N, Arad G. 1996. Antigenicity of the pollen proteins of various cultivars of *Olea europaea*. Allergy. 51, 819-825.
- Waits LP, Luikart G, Taberlet P. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. Mol Ecol. 10. 249-256.
- Weinbaum SA, Polito VS. 1985. Assessment of pollen retention using exine autofluorescence. Mikroskopie. 42:278-280.
- Willems MTM. 1972. Changes in the autofluorescence of the pollen wall during microsporogenesis and chemical treatments. *Acta Bot. Neerl.* 21:1-16.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18, 6531-6535.
- Xu FX, Kirchoff BK. 2008. Pollen morphology and ultrastructure of selected species of Magnoliaceae. Rev Palaeobot Palynol. 150, 140-153.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20,176-183
- Zohary A, Spiegel-Roy P. 1975. Beginnings of fruits growing in the old world. Science. 187 (4174), 819-827.
- Zohary D. 1994. The wild genetic resources of the cultivated olive. Acta Hort. 365, 62-65.

Referencias Bibliográficas

8. APÉNDICE

Simple Sequence Repeat Identification and Endocarp Characterization of Olive Tree Accessions in a Tunisian Germplasm Collection

Mahdi Fendri

Dpto. de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), C/Profesor Albareda, 1, 18008 Granada, Spain

Isabel Trujillo

Dpto. de Agronomía, Universidad de Córdoba, Ctra. Madrid, Km. 396, 14071 Córdoba, Spain

Ahmed Trigui

Institut de l'Olivier, P.O. Box 1087, 3018 Sfax, Tunisia

María Isabel Rodríguez-García

Dpto. de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), C/Profesor Albareda, 1, 18008 Granada, Spain

Juan de Dios Alché Ramírez¹

Dpto. de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), C/Profesor Albareda, 1, 18008 Granada, Spain

Additional index words. microsatellite markers, *Olea europaea*, characterization, varieties

Abstract. Most traditional olive-producing countries possess a diversified genetic patrimony in *Olea europaea* L. Since the emergence of modern olive growing system, the identification, classification, and conservation of autochthonous olive cultivars is a priority for these countries. In this work, a total of 84 accessions belonging to the “Boughrara”-Sfax olive germplasm collection located in Tunisia have been screened using a powerful set of eight simple sequence repeat markers (SSRs). The study revealed a high genetic variability among the collection and detected a total of 64 alleles. For better management of the mentioned germplasm bank, an improved classification of the entries, including new denominations, has been proposed. In addition, several cases of mislabeling, synonymy, and homonymy have been clarified. Genetic relationships among cultivars have been analyzed showing four major clusters. Finally, a correspondence factor analysis demonstrated that cultivars tend to cluster depending on their main use as oil or table olives. No clear clustering tendencies were observed when the geographical origin of cultivars was used as the criteria for the analysis. All results obtained by SSR screening and classification were in accordance with classification based on morphological traits of fruit endocarps.

Received for publication 22 Apr. 2010. Accepted for publication 10 Aug. 2010.

This research has been supported by FEDER co-funded Projects BFU 2004-00601/BFI, BFU2008-00629, and Junta de Andalucía P06-AGR-01791. Research carried out by M. Fendri was funded by AECID.

Contribution from the Department of Biochemistry, Cell and Molecular Biology of Plants, “Estación Experimental del Zaidín” Granada (Spain) and the Department of Agronomy, University of Córdoba, Córdoba (Spain).

We are grateful to the “Institut de l’olivier” Sfax (Tunisia) for providing the plant material used in the study. Special thanks are due to Drs. C. Muñoz Díez, R. De la Herrán, and A. Hamman-Khalifa for their help analyzing simple sequence repeats.

¹To whom reprint requests should be addressed; e-mail juandedios.alche@eez.csic.es.

Olive (*Olea europaea* L.) is one of the oldest cultivated species in the Mediterranean basin. Tunisia has played an important role in the establishment of the crop in this area as a result of its dynamic history and geographical location (Trigui et al., 2006). Olive still plays a significant role in both the economy and society of Tunisia today. It occupies one-third of the cultivated land (1,667,000 ha), represents the predominant activity of 29% of farmers, and affects one million Tunisian people’s revenues (Jardak, 2006). Tunisia is considered the second producer and exporter of olive oil in the world, only preceded by the European Union. Tunisian production and exporting averages reach 185,000 tons and 139,600 tons, respectively (averages 2004 to 2009; International Olive Council, 2010). Like most of traditional olive-producing countries

(Rallo et al., 2005), Tunisia includes diversified genetic resources, which are mainly formed by small distributed autochthonous cultivars. The characterization of this diversity is essential for the better management of the national germplasm and for genetic breeding programs.

The classical approach in the identification of olive cultivars has been based on agronomical and/or morphological studies. It consists of measures such as production average, precocity, vigor, etc. and the direct observation of several distinctive traits on branches, fruits, endocarps, leaves, and inflorescences (Barranco and Rallo, 1984; Barranco et al., 2005). Among the aforementioned morphological characters, endocarps are considered one of the most discriminative traits. These traits are highly inheritable, have low sensitivity to environmental conditions, and are easily observed on collected and stored material (Rallo et al., 2005). A number of analyses has been conducted on Tunisian germplasm material from different regions of the country using morphological and/or agronomical characters (Mehri et al., 1997; Taamalli et al., 2006; Trigui et al., 2002). Several collections of olive cultivars have been created in Tunisia. Among them, the “Boughrara”-Sfax olive germplasm collection is considered the most important in terms of cultivar numbers. Although the morphological and agronomical studies are very useful for both exploration surveys (Barranco et al., 2000, 2005; Barranco and Rallo, 1984; Cimato et al., 1993) and germplasm bank characterization (Caballero et al., 2006), results can be influenced by several non-genetic factors. As a consequence, molecular methods are very suitable to reach a better understanding of the material’s genetic diversity.

Molecular studies have started with the use of isoenzyme markers (Ouazzani et al., 1993; Trujillo et al., 1995) and at a later stage have been carried out using DNA markers as restriction fragment length polymorphisms (Besnard et al., 2001a), random amplified polymorphic DNAs (Belaj et al., 2001; Fabbri et al., 1995), amplified fragment length polymorphisms (Angiolillo et al., 1999) and microsatellite markers [simple sequence repeats (SSRs)] (Baldoni et al., 2009; La Mantia et al., 2005).

The microsatellite technique is one of the most reliable methods used in olive cultivar characterization. It has revealed a high informative level because the markers are polymorphic, multiallelic, and codominant. Moreover, it consists of a relatively simple methodology that permits an easy interpretation of results (Rafalski et al., 1996). SSR markers have been successfully used in germplasm bank classification and contributed to better management of several olive collections around the world (Khadari et al., 2003; Muzzalupo et al., 2006). To provide a better worldwide applicable tool for olive DNA typing, a list of 11 SSR markers has been recently selected among 37 microsatellites available for olive cultivar characterization. The mentioned list has been based on the reproducibility, quality of scoring, information content, independent segregation,

and discriminative capacity of the markers (Baldoni et al., 2009).

Some studies using microsatellite markers have been achieved on Tunisian cultivars. They have been carried out in olive trees belonging to different collections (Taamalli et al., 2008), on trees of commercial interest original from different geographical regions of Tunisia (Rekik et al., 2008), or to study the

differences between cultivated varieties of olive and Oleaster trees mainly from the northern region of the country (Hannachi et al., 2008).

The present work aims to identify and classify 84 olive accessions obtained by a national exploration survey and introduced in the "Boughrara"-Sfax olive germplasm collection (South of Tunisia). The work has been carried out using eight microsatellite

markers, seven of them mentioned as some of the most reliable existing microsatellite markers for olive cultivar characterization (Baldoni et al., 2009). Furthermore, this work emphasizes the possibility of integration of both molecular and morphological approaches for germplasm classification because endocarp traits have been used to corroborate all conclusions obtained by the SSR screening.

Table 1. Morphological characters of the endocarps on 84 analyzed accessions.

	Wtr	Form ^a	Symmetry of position		Position of the maximum transversal diam ^b	Form of the apex ^c	Form of the base ^e	Roughness of the surface ^d	Number of vascular bundles over the surface ^f	Distribution of vascular bundles over the surface ^g	Presence of micro ^h
			A ^x	B ^w							
Chemlali Sfax	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Chemlali Sfax COI	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Sig 3PG	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Baldi	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Charqia BL8											
BL24	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Kotti K18	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
CHLOuled	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Youssef											
Sig 13											
Hchichina 10	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Sehli Sned 7	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Kotti K12	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
K17	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Hchichina 6	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
BL26	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Chemlali Bjawa	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Zalmati Zarzis	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Sig 15	L	EL	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Sehli Gafsa	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Dawlal											
BL23	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
BL20	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Horr Sfax	L	EP	SA	SA	C	R	R	S	M	G	P
BL16 G	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Hchichina 7	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Kotti K9G	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Kotti k21	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Kotti K30G	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Sig 113 G	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Sehli Jbeniana	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
BL15 Bent											
Louzir											
BL37	L	EL	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Chemlali Ouled	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Youssef											
Sahli Gafsa	L	EP	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
autre que Gtar											
Horr Bleitech	L	EL	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
BL11 PG											
Khehinet Sig	L	EP	SA	SA	A	R	R	S	L	G	P
SIG19	L	EP	SA	SA	A	R	R	S	L	G	P
Bou Bazzoula	L	EP	SA	SA	A	R	R	S	L	G	P
BL19PG											
Kotti K23	L	EP	SA	SA	A	R	R	S	L	G	P
(avec mam)											
BL2	L	EP	A	S	B	R	R	S	M	R	A
BL31	L	EP	A	S	B	R	R	S	M	R	A
Chemlali	L	EP	A	SA	A	R	P	S	L	G	P
Zarzis											
Mfartah	L	EP	A	SA	A	R	P	S	L	G	P
Hchichina											
H9											
Chemchali	M	EP	SA	S	C	R	R	R	M	R	P
Gtar 3											
Jemri	M	EP	SA	S	C	R	R	R	M	R	P
Bouchouka											
Kotti K30 PG	M	EP	SA	S	C	R	R	R	M	R	P

(Continued on next page)

Table 1. (Continued) Morphological characters of the endocarps on 84 analyzed accessions.

	Wt	Form	Symmetry of position A	Symmetry of position B	Position of the maximum transversal diam	Form of the apex	Form of the base	Roughness of the surface	Number of vascular bundles over the surface	Distribution of vascular bundles over the surface	Presence of micro
Injassi	L	EP	SA	SA	A	R	P	S	L	G	P
Hehichina											
Chemlali	L	EP	SA	SA	A	R	P	S	L	G	P
Mahares											
Chetoui 2	L	EL	A	S	B	P	R	R	M	G	P
Chetoui 2 à mam	L	EL	A	S	B	P	R	R	M	G	P
Marsaline	H	EP	S	S	C	R	R	R	M	G	A
Meski Bjawa	H	EP	S	S	C	R	R	R	M	G	A
Fakhari Tataouine	H	O	S	S	C	R	R	W	M	G	A
Meski Zarzis	H	O	S	S	C	R	R	W	M	G	A
Chemlali	L	EL	A	S	C	R	R	R	M	G	P
Chouamekh											
Chemlali	L	EL	A	S	C	R	R	R	M	G	P
Tataouine10											
Chemlali Sig	L	EL	A	S	C	R	R	S	M	G	P
Kotti K14	L	EL	A	S	C	R	R	S	M	G	P
Sig 14 PG	L	EL	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Besbessi	VH	EP	SA	S	C	R	T	W	M	R	P
Lattout Sned 3	L	O	S	S	B	P	R	W	L	G	A
CHL Sig 12PG	L	EL	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Chemlali Ontha	L	EP	SA	S	C	R	R	S	H	R	P
Tataouine											
Chemlali	L	EL	SA	S	C	R	P	S	M	G	P
Bouchouka											
Horr Louzir	L	EL	A	S	C	R	R	S	M	G	P
BL32 PG											
Chahla	L	O	S	SA	A	R	P	R	M	G	P
Semni Jbeniana	L	EP	A	S	C	R	P	S	M	R	P
Sig 0											
Jeddaria Chaal	L	EP	A	SA	A	R	R	S	M	G	P
Mallahi	H	EL	A	S	C	P	T	W	L	G	P
ElMouammar											
Sig 1G											
Tounsi Gafsa	L	EP	A	S	C	R	R	W	M	G	P
autre Zarrazi	L	EP	S	S	C	R	R	S	M	G	P
Ech- Chahla /g	L	O	SA	SA	A	R	P	R	M	G	P
Neb Tataouine	L	EP	A	SA	A	R	P	S	M	G	P
Kotti K9 PG	L	O	SA	S	C	R	R	S	M	G	P
Lqam El Kotti	L	EP	S	S	C	R	R	S	L	G	A
Kotti K3											
Kotti K56 G	L	EP	S	S	C	R	R	R	M	G	A
Chemlali	L	EL	S	S	C	R	P	R	M	G	A
Barrani											
K56PG	L	EL	SA	S	C	P	P	S	L	G	P
Chemlali Balhi	M	EP	SA	SA	C	R	R	S	L	G	P
Sig 112PG	L	EL	A	S	C	R	R	S	H	R	P
Zeitoun	M	EP	SA	S	C	R	R	R	M	G	P
Bouazzoula											
COI											
Kotti K32	L	EL	A	S	C	P	P	S	L	G	P
BL32 G	L	O	SA	S	C	R	R	R	M	G	A
Zarrazi Kgh	M	O	SA	S	C	R	R	W	L	G	P
Zeitoun	L	EP	S	SA	A	R	R	S	L	G	P
Bouazzoula											
COI											
Dhokar Nafti	L	O	SA	S	C	R	R	S	L	G	P
Zarbout Louzir	L	EL	A	S	C	P	P	S	H	G	P
Kotti K11	L	EP	S	S	C	R	R	S	M	G	P

*Weight: low = L (less than 0.3 g); medium = M (0.3 to 0.45 g); high = H (0.45 to 0.7 g); very high = VH (greater than 0.7 g).

*Form: spherical = S (length/width less than 1.4); ovoid = O (length/width 1.4 to 1.8); elliptic = EP (length/width 1.8 to 2.2); elongated = EL (length/width greater than 2.2).

*Symmetry of position A: symmetric = S; slightly asymmetric = SA; asymmetric = A.

*Symmetry of position B: symmetric = S; slightly asymmetric = SA.

*Position of the maximum transversal diameter: toward the base = B; centered = C; toward the apex = A.

*Form of the apex: pointed = P; rounded = R.

*Form of the base: pointed = P; truncated = T; rounded = R.

*Roughness of the surface: smooth = S; rough = R; wrinkled = W.

*Number of vascular bundles over the surface: low = L (less than 7); medium = M (7 to 10); high = H (greater than 10).

*Distribution of vascular bundles over the surface: regular = R; grouped together in the suture = G.

*Presence of micro: present = P; absent = A.

Material and Methods

Plant material and DNA extraction. Samples from 84 accessions were obtained from the national olive collection: "Conservatoire National de l'Olivier de 'Boughrara'-Sfax" (south of Tunisia: long. 34°59'05" N, lat. 10°32'56"; elevation: 125 m). Total genomic DNA was isolated from fresh, young leaves following a CTAB protocol originally developed by Murry and Tompson (1980) and further modified by De la Rosa et al. (2002).

Microsatellite assay. A set of eight microsatellite markers (ssrOeUA-DCA3, ssrOeUA-DCA9, ssrOeUA-DCA15, ssrOeUA-DCA16, ssrOeUA-DCA18, GAPU71B, GAPU101, and UDO99-43) were selected (Carriero et al., 2002; Cipriani et al., 2002; Sefc et al., 2000). The majority of the selected markers has been described to be very efficient for olive cultivar identification and population genetic studies (Baldoni et al., 2009). Polymerase chain reactions (PCRs) were carried out in a T-Gradient Thermoblock (Biometra, Goettingen, Germany) thermal cycler in a total volume of 20 µL containing 5 ng of genomic DNA, 1.5 mM MgCl₂, 60 µM dNTPs, 0.028 U/µL Taq polymerase (Biotools, Madrid, Spain), 0.2 µM forward primer (either FAM, HEX, or NED fluorescently labeled), and 0.2 µM of the corresponding unlabelled reverse primer. PCR steps were: initial denaturation at 95 °C for 5 min, 35 cycles with three steps: of 95 °C for 20 s (denaturation), 50 to 52 °C depending on the primers combination for 30 s (annealing), and 72 °C for 30 s (extension). A final extension step of 72 °C for 8 min was carried out. PCR products were separated in an automatic capillary sequencer, ABI PRISM 3100-AVANT GENETIC ANALYSER (Applied Biosystems/Hitachi, Tokyo, Japan), using a definite size marker: GeneScan-500 ROX Size Standard (Applied Biosystems, Warrington, U.K.).

Data analysis. Amplified fragments were analyzed and scored using the GENEMAPPER 3.0 and GENOTYPER 3.7 software (Applied Biosystems). Both the expected and the observed heterozygosity (H_E / H_O) indices were calculated by using the CERVUS 3.0 software (Marshall et al., 1998) according to the equilibrium law of Hardy-Weinberg (Nei, 1987) as well as the polymorphic information content (PIC) (Botstein et al., 1980) and the frequency

of null alleles (Pemberton et al., 1995). The probability of identity (Waits et al., 2001) was computed by using the GIMLET 1.3.3 program (Valiere, 2002). The genetic relationships among the identified cultivars and the cophenetic correlations were analyzed by NTSYS-PC 2.02 software (Rohlf, 1998) using the DICE coefficient and the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973). Factor analysis was carried out through the DARWIN 5.0.155 program (Perrier et al., 2003) and also by adopting the DICE coefficient for the calculation of the genetic distances.

Morphological description of endocarps. For endocarp description, 11 characters were selected from the pomological pattern widely used for olive cultivar characterization (Barranco et al., 2005). They are described in Table 1.

Results and Discussion

Microsatellites diversity in the "Boughrara"-Sfax germplasm collection. All accessions were screened for the eight selected microsatellite markers. Amplification products were obtained for the majority of them (98.8%). In the remaining samples, amplification failure was observed in three accessions at GAPU 101 locus, two accessions at UDO99-43 locus, and only one accession at both ssrOeUA-DCA15 and ssrOeUA-DCA16 locus. Microsatellites showed a high level of polymorphism throughout the analyzed accessions and revealed the existence of 64 alleles. The number of alleles per locus ranged from five (ssrOeUA-DCA15 and GAPU71B loci) to 12 (UDO99-43 locus), with an average of eight alleles per locus (Table 2). Such a high average reveals the elevated level of variability within the "Boughrara"-Sfax germplasm collection when compared with similar studies. The lower averages obtained in other studies can be explained by either the use of less polymorphic microsatellite markers (Belaj et al., 2004; Montemurro et al., 2005; Rekkik et al., 2008) or by the use of less diversified plant material (Carriero et al., 2002; Noomohammadi et al., 2007). Higher averages have been reported by other workers (Baldoni et al., 2009; Taamalli et al., 2008) most likely as a consequence of using more

diversified genotypes. The analysis of the distinctive endocarp characters also revealed high variability in the current study. The diversity in Tunisian olive germplasm has been already reported by using morphological and agronomical traits (Mehri et al., 1997; Trigui et al., 2002) and molecular analysis as well (Grati-Kamoum et al., 2006; Rekkik et al., 2008; Taamalli et al., 2006, 2008).

Expected heterozygosity values ranged between 0.54 (ssrOeUA-DCA15) and 0.82 (UDO99-43) with an average of 0.68, whereas H_O varied from 0.31 (ssrOeUA-DCA15) to 0.96 (in both ssrOeUA-DCA18 and UDO99-43) with an average of 0.77 (Table 2). Except for the ssrOeUA-DCA15 and ssrOeUA-DCA9 loci, H_E was lower than H_O . In the case of the ssrOeUA-DCA15 and ssrOeUA-DCA9 loci, H_E higher value of H_O is most likely the result of the positive probability of null alleles ($F_0 = 0.3$ and $F_0 = 0.08$, respectively), whereas F_0 was negative in all the remaining cases. Null alleles usually exist when primers cannot anneal with DNA during PCR reaction as a result of point mutations (Pemberton et al., 1995) and thus it affects the estimated heterozygosity level in the correspondent locus. Positive null allele's frequencies have been also reported for the ssrOeUA-DCA15 locus by Baldoni et al. (2009) and Noomohammadi et al. (2007). Therefore, we recommend the mentioned marker to be discarded for further uses. The high H_O average (0.77) confirms the important diversity among the "Boughrara"-Sfax germplasm collection. Similar averages (0.74 and 0.62) have been reported by Rekkik et al. (2008) and Taamalli et al. (2008) in Tunisian cultivars.

Polymorphic information content (PIC) calculated from H_E and allele frequencies showed an average value of 0.63. This index ranged from 0.48 (ssrOeUA-DCA15) to 0.79 (UDO99-43) (Table 2). Similar PIC values have been reported in other studies (Bandelj et al., 2004; Noomohammadi et al., 2007). Except for the ssrOeUA-DCA15, all PIC values were higher than 0.5, which demonstrates the powerfulness of the markers. Two of them presented values over 0.7; hence, they can be considered particularly useful for genetic mapping (Bandelj et al., 2004). The results recently obtained by Baldoni et al. (2009), who recommend a consensus list of SSRs for worldwide olive

Table 2. Characteristics of the alleles observed after amplification with the eight simple sequence repeat combinations and different genetic indexes.

	Size range	No. of alleles	No. of unique alleles	No. of allele patterns	H_E^a	H_O^b	F_0^c	PIC ^d	PI ^e
SsrOeUA-DCA18	166-180	7	0	13	0.72	0.96	-0.16	0.67	0.12
SsrOeUA-DCA3	228-249	6	0	11	0.65	0.72	-0.05	0.58	0.18
SsrOeUA-DCA15	241-264	5	1	9	0.54	0.31	+0.3	0.48	0.26
SsrOeUA-DCA16	120-172	11	2	19	0.74	0.86	-0.09	0.69	0.10
GAPU71B	117-141	5	0	11	0.66	0.91	-0.17	0.60	0.17
SsrOeUA-DCA9	161-208	11	1	16	0.60	0.52	+0.08	0.56	0.19
GAPU101	183-217	7	0	15	0.75	0.91	-0.1	0.70	0.10
UDO99-43	166-214	12	2	21	0.82	0.96	-0.08	0.79	0.05
Mean ^f	—	64	6	115	0.68	0.77	—	0.63	0.15

^a H_E = expected heterozygosity.

^b H_O = observed heterozygosity.

^c F_0 = probability of null alleles.

^dPIC = polymorphic information content.

^ePI = probability of identity.

^fNumber of alleles, unique alleles, and allele patterns are total.

DNA typing, are in complete accordance with the current work. Seven of the eight SSRs used here for the analysis of "Boughrara"-Sfax germplasm collection together with the GAPU103A (not used in this work) are currently considered the most reliable markers for olive cultivar discrimination and for population genetic studies (Baldoni et al., 2009).

Discrimination and identification of Tunisian cultivars in the germplasm collection. The probability of identity (PI) can be considered as an index of the microsatellite discriminative power. In the present study, it ranged from 0.05 (UDO99-43) to 0.26 (ssrOeUA-DCA15) with an average of 0.15

(Table 2). In a similar study, Noormohammadi et al. (2007) obtained a higher average (0.19) for this index because they used a less discriminative set of microsatellites. In the current work, the cumulative PI value was $1.23 \cdot 10^{-7}$, which confirms the high discriminative level of the used microsatellite set. UDO99-43, GAPU101 ssrOeUA-DCA16, and ssrOeUA-DCA18 were the most informative markers (cumulative PI: $7.6 \cdot 10^{-5}$). They were able by themselves to discriminate 82.5% of the whole genotypes identified by the eight microsatellites altogether. UDO99-43 alone allows the discrimination of 21 genotypes, which means 52.5% of the entire

identified genotypes. The mentioned marker showed a very low probability of identity ($5 \cdot 10^{-2}$). It can be considered the most powerful marker used in this work. The same observation has been reported by other workers (Baldoni et al., 2009; Belaj et al., 2004; Noormohammadi et al., 2007) and thus UDO99-43 is a highly recommended marker for olive cultivar discrimination.

Numerous duplications (44) were observed within the "Boughrara"-Sfax germplasm collection, whereas only 40 genotypes were identified among the 84 analyzed accessions (Table 3). The highest number of duplications (30) was detected regarding the

Table 3. Accessions studied, geographical origin, and proposed denominations.

Accession name	Origin	Diffusion level	Proposed name	Accession name	Origin	Diffusion level	Proposed name
Chemlali Sfax ^a	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Injassi Hchichina	Sfax	Secondary	Injassi Hchichina
Chemlali Sfax COI	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Chemlali Mahares ^c	Sfax	Secondary	Injassi Hchichina
Sig 3PG	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Chétoui 2	Tunis	Primary	Chetoui
Balûi Charqia BL8 ^b	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Chétoui 2 à mam	Tunis	Primary	Chetoui
BL24	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Marsaline	Tunis	Primary	Marsaline
Kotti K18	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Meski Bjawa ^d	Tunis	Primary	Marsaline
CHL Ouled Youssef Sig 13	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Fakhari Tataouine	Tataouine	Primary	Fakhari Tataouine
Hchichina 10	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Meski Zarzis ^e	Mednine	Primary	Fakhari Tataouine
Sehli Sned 7 ^f	Gafsa	Primary	Chemlali Sfax	Chemlali Chouamekh ^g	Mednine	Primary	Chemlali Chouamekh
Kotti K12	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Chemlali Tataouine10 ^h	Tataouine	Primary	Chemlali Chouamekh
K17	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Chemlali Sig ⁱ	Sfax	Secondary	Chemlali Sig
Hchichina 6	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Kotti K14	Sfax	Secondary	Chemlali Sig
BL26	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Sig 14 PG	Sfax	Secondary	Chemlali Sig
Chemlali Bjawa ^b	Tunis	Primary	Chemlali Sfax	Besbessi	Tunis	Primary	Besbessi
Zalmati Zarzis ^b	Mednine	Primary	Chemlali Sfax	Lattout Sned 3	Gafsa	Primary	Lattout Sned
Sig 15	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	CHL Sig 12PG ²	Sfax	Tertiary	Horr Sig
Sehli Gafsa Dawla1 ^b	Gafsa	Primary	Chemlali Sfax	Chemlali Ontha	Tataouine	Secondary	Chemlali Ontha
BL23	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Tataouine ^e	Tataouine	Secondary	Tataouine
BL20	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Chemlali Bouchouka ^h	Sfax	Tertiary	Chemlali Bouchouka
Horr Sfax ^b	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Horr Louzir BL32 PG	Sfax	Tertiary	Horr Louzir
BL16 G	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Chahla ^h	Sfax	Tertiary	Chahleya
Hchichina 7	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Semni Jbeniana Sig 0	Sfax	Tertiary	Semni Jbeniana
Kotti K9G	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Jeddaria Chaal	Sfax	Tertiary	Jeddaria Chaal
Kotti k21	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Mallahi El Mouammar	Sfax	Tertiary	Mallahi El Mouammar
Kotti K30G	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Sig 1G	Sfax	Tertiary	Sig 1G
Sig 113 G	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Tounsi Gafsa	Gafsa	Secondary	Tounsi Gafsa
Sehli JbenianaBL15	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Autre Zarrazi ^w	Mednine	Secondary	Zarrazi Ejjbal
Bent Louzir ^h	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Ech-Chahla/g ²	Sfax	Tertiary	Ech-Chahla
BL37	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Neb Tataouine	Tataouine	Secondary	Neb Tataouine
Chemlali Ouled Youssef ^h	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Kotti K9 PG	Sfax	Tertiary	Horr El Kotti
Sahli Gafsa autre que Gtar ^b	Gafsa	Primary	Chemlali Sfax	Lqam El Kotti Kotti K3	Sfax	Tertiary	Lqam El Kotti
Horr Blettech BL11 PG	Sfax	Primary	Chemlali Sfax	Kotti K56 G	Sfax	Tertiary	Horr El Mouammar
Khechinet Sig	Sfax	Secondary	Chemlali Sfax	Chemlali Barrani ²	Mednine	Secondary	Chemlali Barrani
SIG19	Sfax	Secondary	Khechinet Sig	K56PG	Sfax	Tertiary	Lqam El Mouammar
Bou Bazzoula BL19PG ²	Sfax	Secondary	Chemlali Balhi ²	Chemlali Balhi ²	Mednine	Secondary	Chemlali Balhi
Kotti K23 (avec mam)	Sfax	Secondary	Khechinet Sig	Sig 112PG	Sfax	Tertiary	Zeitoun Khdim El Bey
BL2	Sfax	Tertiary	Khechinet Sig	Zeitoun Boubazzoula COI ^h	Sfax	Tertiary	Zeitoun Boubazzoula
BL31	Sfax	Tertiary	Horr Charqia	Kotti K32	Sfax	Tertiary	Zeitoun El Manacher
Chemlali Zarzis ²	Mednine	Primary	Horr Charqia	BL32 G	Sfax	Tertiary	Chemlali Lach'hab
Mfartah Hchichina H9 ²	Sfax	Primary	Chemlali Zarzis	Zarrazi Kgh ^w	Mednine	Primary	Zarrazi Kgh
Jemri Bouchouka	Tataouine	Primary	Chemlali Zarzis	Zeitoun Boubazzoula COI ^h	Sfax	Secondary	Mbazzel Kbir
Chemchali Gtar 3 ²	Gafsa	Primary	Jemri Bouchouka	Dhokar Nafti	Mednine	Secondary	Dhokar Nafti
Kotti K30 PG	Sfax	Primary	Jemri Bouchouka	Zarbout Louzir	Sfax	Secondary	Zarbout Louzir
			Jemri Bouchouka	Kotti K11	Sfax	Tertiary	Zeyeti El Kotti

^aCases of homonymy in "Chemlali" denomination.

^bCases of homonymy in "Chahla" denomination.

^cCases of homonymy in "Zeitoun Boubazzoula" denomination.

^dCases of homonymy in "Zarrazi" denomination.

^eCases of synonymy in Chemlali Sfax cultivar.

^fCase of synonymy in Khechinet Sig cultivar.

^gCase of synonymy in Chemlali Zarzis cultivar.

^hCase of synonymy in Jemri Bouchouka cultivar.

ⁱCases of synonymy of Injassi Hchichina cultivar.

^jCase of synonymy of Marsaline cultivar.

^kCase of synonymy of Fakhari Tataouine cultivar.

^lCase of synonymy of Chemlali Chouamekh cultivar.

'Chemlali Sfax' genotype explained by the wide distribution of this cultivar across the country.

The identification achieved in the present work is extremely important for better management of the "Bougrara"-Sfax germplasm collection. Furthermore, it can be useful for providing a well-identified material to olive nurseries.

Synonyms and homonyms. Several cases of synonyms (different denomination for the same genotype) and homonyms (same denomination for different genotype) were detected in the collection. The highest number of synonyms (nine) was also observed in the cultivar Chemlali Sfax, which is the most widely cultivated in the southern part of the country. Moreover, our results showed that 'Chemlali Sfax' synonyms exist in the majority of the olive-producing regions of Tunisia (Sfax, Gafsa, Mednine, and Tunis) with different denominations (Table 3). Among them, "Schli Sned," "Schli Gafsa," and "Schli Jbeniana Bent Louzir" accessions are associated with the same adjective "Schli" (which means "olive from the coast"). The remaining cases of synonymy are represented in

Table 3. Similar cases of synonymy have been reported in Tunisian cultivars belonging to different collections and olive groves (Rekik et al., 2008; Taamalli et al., 2008). Endocarp characters displayed low variability among all duplicated profiles (Fig. 1). This scarce variability is most likely the result of the influences of the field and tree conditions (nutrition, water and phytosanitary status, etc.). However, more clear differences were revealed in all the endocarp characters analyzed between these individuals identified as independent genotypes.

On the other hand, a typical case of homonymy among Tunisian olive groves is that of "Chemlali," which has been reported by morphological, agronomical, and molecular studies (Grati-Kamoun et al., 2006; Mehri et al., 1997; Rekik et al., 2008; Taamalli et al., 2008; Trigui et al., 2002). This homonymy was also observed within the "Bougrara"-Sfax germplasm collection. In fact, "Chemlali" is a common and general denomination used by growers, although it has been reported that a high level of polymorphism exists within this denomination. The present work

demonstrates that polymorphism among this denomination is extremely high. In some cases, only one of 16 alleles was shared between homonymous cultivars such as 'Chemlali Sfax' and 'Chemlali Balhi'. Several other cases of homonymy were detected in the collection (Table 3). Homonymous confusions are basically the result of the traditional denomination system. Cultivar names are mostly based on generic denominations like "Injassi" (pear form) or "Dhokar" (pollinator), etc. Similar cases have been reported in other olive-producing countries after using molecular markers (Belaj et al., 2001; Khadari et al., 2003; Mekuria et al., 1999; Noormohammadi et al., 2007; Trujillo et al., 2005). Homonyms were analyzed using endocarp morphology as the criteria. As an example, high variability in endocarp characteristics was detected particularly within Chemlali's denominations, in which the form and symmetry of the endocarp showed conspicuous differences as well as the form of the base, the roughness of the surface, and the number and distribution of vascular bundle over the surface.

Genetic relationships. Genetic relationships between identified genotypes were studied by means of the DICE coefficient. All duplicated samples were discarded from the analysis. The highest value of cophenetic coefficient (0.75) was obtained using the UPGMA clustering method. Therefore, the mentioned method was adopted as the most appropriate for further clustering (Fig. 1). DICE coefficient ranged from 0.0 (between cultivars like Mallahi El Mouammar and Chemlali Ontha Tataouine) to 0.96 (between 'Horr El Kotti' and 'Zeitoun Boubazzoula'). The dendrogram demonstrated the presence of four major groups, five cultivars widely separated, and several very similar genotypes. Group 1 contains eight clearly discriminated genotypes. The second cluster was formed by seven genotypes, including the cultivar Chetoui, the second most widely distributed cultivar in Tunisia. 'Chetoui' was clearly separated within the cluster (0.61 DICE coefficient with 'Zeitoun Khdim El Bey', the closest cultivar). Two genotypes of this group ('Horr Sig' and 'Zeitoun Khdim El Bey') were very similar to 'Chemlali Sig' with DICE coefficients higher than 0.85. The third cluster was the most important in terms of genotype number (15 genotypes). It included the widely distributed cultivar, Chemlali Sfax, which is situated close to three genotypes with DICE similarity coefficients higher than 0.92 ('Zeyeti El Kotti', 'Lqam El Kotti', and 'Horr El Mouammar'). The fourth cluster included five genotypes. Two of them ('Lqam El Mouammar' and 'Zeitoun El Manchar') presented a DICE coefficient close to 0.93. Other workers have also reported such a high level of similarity between olive cultivars from several regions of the world (Belaj et al., 2004; Montemurro et al., 2005; Noormohammadi et al., 2007) and also among Tunisian cultivars (Rekik et al., 2008). These and other studies support the idea of these genotypes being considered as independent cultivars, although similarity

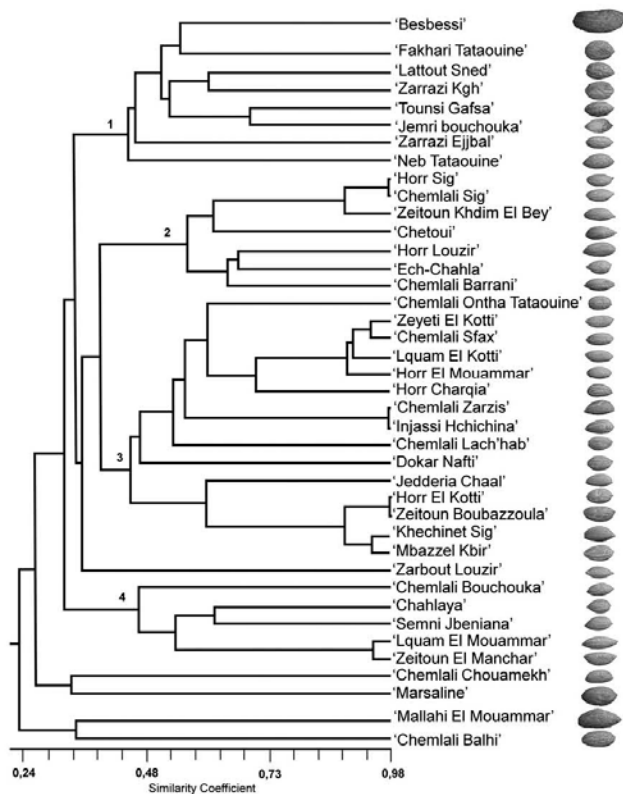


Fig. 1. Dendrogram of the identified cultivars based on DICE coefficient and unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) cluster analysis of the simple sequence repeat (SSR) data obtained. A picture of a representative endocarp is included for each accession.

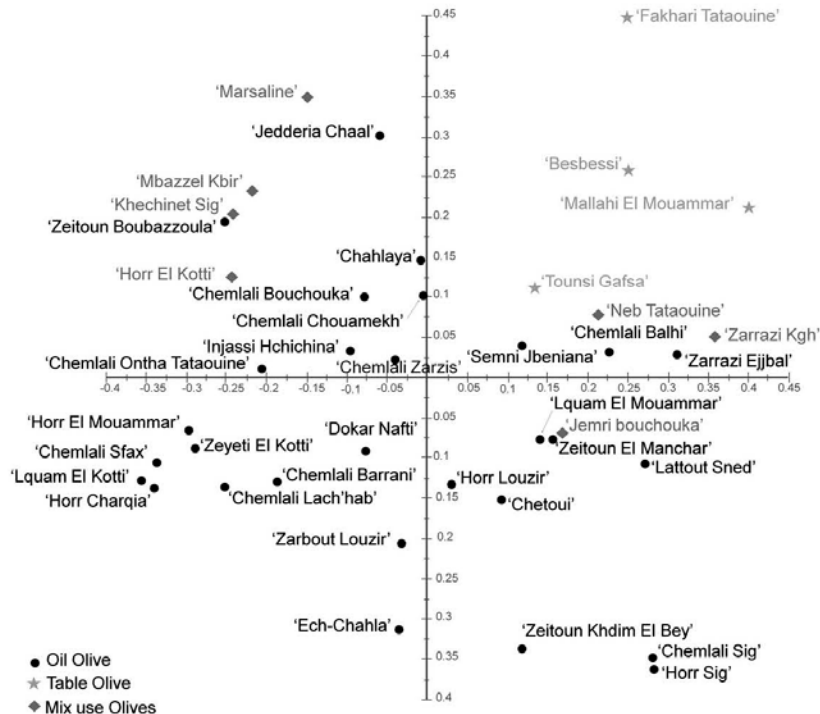


Fig. 2. Factor analysis of the identified genotypes according to their main uses.

among them is relatively high. In fact, microsatellites, as low proportions of the genome, were unable to detect intracultivar polymorphism as a result of mutations occurring in very long-living trees asexually propagated (Baldoni et al., 2009). This proposal is supported by previous agronomical observations within the collection.

On the other hand, the five cultivars Zarbout Louzir, Chemlali Chouamek, Marsaline, Mallahi El Mouammar, and Chemlali Balhi were clearly separated and distant from any other observed clusters. This can be attributed to their different origins. For example, Marsaline is a French cultivar, whereas the denomination 'Mallahi El Mouammar', which can be translated as "settler's table olive," is most likely a foreign cultivar. The morphological characters of the endocarps were in accordance with the dendrogram of the genetic relationship shown here (Fig. 1). For example, only very small differences were detected between Horr Sig and Chemlali Sig cultivars, which showed a high coefficient of DICE similarity (0.96). On the contrary, wide morphological differences were observed between the endocarps of 'Mallahi El Mouammar' and 'Chahleya' (with DICE coefficient 0.27).

Finally, factor analysis has been conducted to characterize clustering tendencies among the identified cultivars (Fig. 2). The

analysis revealed only 16.38% and 12.14% of clustering according to two principal components. Such low percentages only allow considering the clustering as tendencies and not as clear separations. The test ended with the clustering of the four olive table cultivars altogether. This is probably a result of Tunisian growers' selections during the olive cultivation history of the country. The selection has been made according to producer requirements, genotypes intended for table olive consumption, and others for olive oil and mixture uses. However, no clustering tendencies were reported according to the cultivar's geographical origin, probably as the result of the land continuity between olive-producing regions, which promoted the genetic exchange (data not shown). Cultivar clustering in accordance to the geographical area of cultivation has been reported by different authors (Besnard et al., 2001b; Claros et al., 2000; Fabbri et al., 1995). However, it is not generally observed, even using powerful genetic markers like SSRs, except in those regions where the genetic exchange has been very limited.

In conclusion, the total number of alleles, the number of allele per locus, and the H_D demonstrate the high genetic diversity in the "Boughrara"-Sfax germplasm collection located in Tunisia. A high number of mislabeled accessions and several synonymous and homonymous cases were reported. These

results put emphasis on the necessity of an improved classification within this collection, containing a very important part of the Tunisian olive genetic resources.

With the exception of ssOeUA-DCA15, all the microsatellites used confirmed to be reliable for olive cultivar classification in a germplasm collection. Therefore, the set used here can be recommended for DNA fingerprinting in other Tunisian collections and thus contribute to the establishment of a universal molecular database of olive genetic resources based on standard SSR markers as proposed by Baldoni et al. (2009).

The results of the SSR classification were in good agreement with the differences observed after analyzing morphological characters of the endocarps. We therefore suggest that the incorporation of both approaches is extremely advisable for accurate characterization of olive germplasm.

Literature Cited

- Angiolillo, A., M. Menecchini, and L. Baldoni. 1999. Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* 98:411-421.
- Baldoni, L., N.G. Cultrera, R. Mariotti, C. Ricciolini, S. Arcioni, G. Vendramin, A. Buonamici, A. Porceddu, V. Sarri, M. Ojda, I. Trujillo, L. Rallo, A. Belaj, E. Perri, A. Salimonti, I. Muzzalupo, A. Casagrande, O. Lain, R. Messina,

Taxonomical discrimination of pollen grains by using confocal laser scanning microscopy (CLSM) imaging of autofluorescence

A.J. Castro, J.D. Rejón, M. Fendri, M.J. Jiménez-Quesada, A. Zafra, J.C. Jiménez-López, M.I. Rodríguez-García and J.D. Alché,

Department of Biochemistry, Cellular and Molecular Biology of Plants, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain

Several components of the exine (i.e. the outer layer of the pollen wall) show conspicuous autofluorescence in the pollen grain. We describe the autofluorescence properties of pollens from the Mediterranean cypress, lily, turnip and olive (cvs. Picual, Loaime, Cornicabra and Ayrouni). The intensity and pattern of autofluorescence largely varied depending on the species and the hydration stage of pollen. In the case of olive, differences in the level of autofluorescence were detected among the four cultivars analyzed. This technique also allowed further morphological characterization of pollen (e.g. determination of pollen size and shape, and the number and type of apertures, the pattern of the exine, etc), evaluation of pollen integrity, detection of additional components (e.g. the pollen coat) over the surface of the pollen wall, etc. The methods used can be considered non-disruptive and lack of sample preparation. Monitoring pollen autofluorescence could be useful in disciplines like Aerobiology, Plant Taxonomy, and Cell and Molecular Biology.

Keywords autofluorescence; CLSM; cultivars; exine; hydration; pollen; pollen coat; pollen wall; species; taxonomy

1. Introduction

Autofluorescence of living cells and tissues is an intrinsic property arising from to the presence of endogenous molecules like aromatic amino acids, lipo-pigments and pyridine (NADPH) and flavin (FADH₂) co-enzymes, which become fluorescent when excited by ultraviolet (UV) light [1, 2]. In plant cells, autofluorescence is mainly derived from the presence of chlorophyll in chloroplasts and lignin in secondary cell walls [3].

Similar to other plant cells and tissues, the pollen grain (i.e. the male gametophyte) also exhibits autofluorescence [4-6]. This property relies on compounds like carotenoids, phenolics (e.g. flavonoids) and terpenoids [7], which are firmly bound to the outer layer of the pollen wall (i.e. exine). The emission of autofluorescence has been used to assess pollen sensitivity to environmental factors such as ozone and peroxides [8-9], to study pollen retention in the stigma [10], to monitor pollen wall development [11-13] or simply to count pollen grains in an appropriate device [14-15]. Pollen autofluorescence levels change during its ontogeny and ageing. These changes have been correlated with pollen viability by several authors [16]. Autofluorescence has begun to be used for taxonomical discrimination. In a pioneer study, 15 out of 21 grass pollen species were classified on the basis of the autofluorescence colour of the cytoplasm and exine layers, and the overall autofluorescence intensity [17]. More recently, pollen from nine plant species were identified on the basis of its size and the ratio of the blue to red autofluorescence spectra [18].

In the present work, we examine the autofluorescence properties of mature pollen obtained from four plant species: olive, Mediterranean cypress, lily and turnip. In the case of olive, pollen from cultivars Picual, Loaime, Cornicabra and Ayrouni was imaged and analyzed.

2. Material and methods

2.1 Plant material

Mature pollen grains from olive (*Olea europaea* L., cvs. Picual, Loaime, Cornicabra and Ayrouni), Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.), lily (*Lilium longiflorum* L.) and turnip (*Brassica rapa* L.) plants were sampled by vigorously shaking the flowering shoots inside paper bags. Olive, cypress and turnip pollen grains were collected from their natural habitats, whereas lily pollen was obtained from flowering shoots purchased in a local flower nursery. Pollen grains (approximately 0.05 g for each plant species) were hydrated by placing them on a wet filter paper and incubating at 30°C for 30 min in the dark.

2.2 CLSM imaging

The autofluorescence of pollen exine was imaged at different magnifications with a C1 confocal laser scanning microscope (Nikon, Japan) using a combination of He-Ne (543 nm) and He-Ne (633 nm) lasers. Autofluorescence emission was captured independently at 590-650 nm (orange-red spectrum) and 650LP nm (far red spectrum). In all cases, section stacks were generated, which were then projected into a single plane. Identical parameters for each

acquisition were used, in order to enable making comparisons of the registered autofluorescence. The image capture was performed using the EZ-C1 viewer v.3.30 software (Nikon, Japan). Pseudocolours were assigned to each type of pollen to differentiate species.

2.3 Measurement of pollen autofluorescence intensity and statistical analysis

The intensity of autofluorescence of intact pollen surfaces was calculated in arbitrary units (A.U.) per area unit using the EZ-C1 viewer v.3.30 software (Nikon, Japan). Means ($N=20$ pollen grains per species) \pm SD were calculated and plotted using the SSPS Statistics v. 17.0.0 software (SSPS, USA). Non-parametric comparisons of variables (total autofluorescence intensity and 590/650 to 650LP fluorescence ratio) for two unpaired groups (Mann-Whitney test) and more than three unmatched groups (Kruskal-Wallis test) were performed using the SSPS Statistics v. 17.0.0 software (SSPS).

3. Results and Discussion

3.1 Discrimination of plant species by pollen autofluorescence

The autofluorescence intensity of the pollen varied depending on the species and its hydration status, as shown in Fig. 1. Contaminating structures (trichomes) in olive pollen samples also fluoresced but they were easily distinguishable from true pollen grains (Fig. 1A, E). Pollen autofluorescence mainly came from the exine wall, while the apertures did not fluoresce in any of the species analyzed (Fig. 1G, H). This fluorescence is likely due to carotenoids and phenols present in the exine, as described in other species [16, 19-22]. Indeed, the extraction of these compounds with organic solvents was demonstrated to lead to a loss of pollen autofluorescence [23]. We observed that the intensity of autofluorescence was heterogeneous in each pollen sample, some grains being brighter than others. This intraspecific variability was more marked in the olive and turnip and could reflect differences in the water content of each grain within a species (Fig.1).

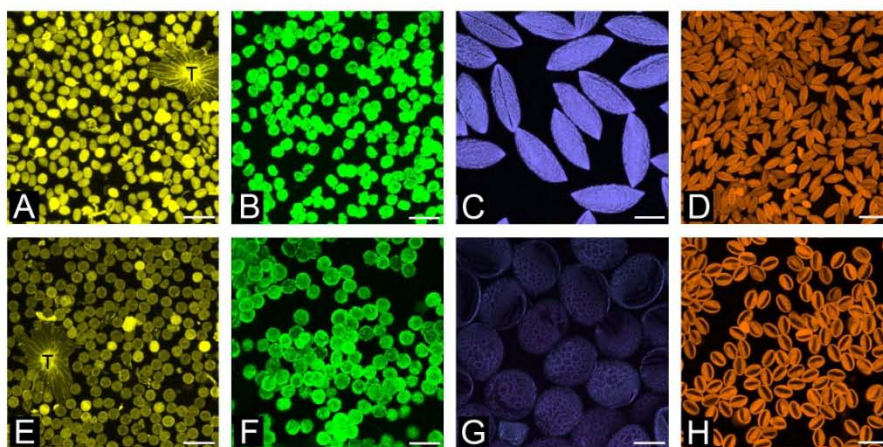


Fig. 1 Representative autofluorescence images of olive (cv. Picual), Mediterranean cypress, lily and turnip pollen before (Fig. 1A, B, C and D, respectively) and after (Fig. 1E, F, G and H, respectively) rehydration. Images were obtained with a confocal laser microscope and represent the sum of the fluorescence emitted at 590-650 nm and 650LP nm after excitation at 543 nm (green laser) and 633 nm (red laser), respectively. Different pseudocolours were used to differentiate species. T, trichome. Bars= 100 μ m.

The brightest autofluorescent signal was detected in the dry pollen, independently of the species. Then the autofluorescence intensity decreased as pollen becomes fully hydrated. It was previously described that water quenched the autofluorescence of viable pollen during *in vitro* germination [13] and upon contact of pollen with the stigma surface [20]. Supposedly non-viable pollen grains, however, remained fluorescent after pollen wetting. A similar pattern occurred in olive, cypress, lily and turnip. Figure 2 highlights the results of quantifying both the total fluorescence intensity and the green to red illumination-emitted fluorescence ratio for each type of pollen. The statistical analysis of these data showed significant differences in the total autofluorescence intensity among the species studied (Fig. 2A),

independently of whether the pollen grain was fully hydrated (Kruskal-Wallis test, $\chi^2=55.664$, $p=0.000$) or not ($\chi^2=49.996$, $p=0.000$). Before rehydration, cypress pollen produced the highest emission of autofluorescence, while turnip pollen showed the lowest values. These interspecific differences could be due to both quantitative and qualitative variations in the composition of the exine and/or differences in the degree of pollen hydration at maturity, as demonstrated in other plant species [9, 13]. Non-parametric comparisons of two unpaired groups of species revealed that the dry pollen grains of olive and lily present similar autofluorescence intensity values (Mann-Whitney test, $U=105.0$, $p=0.071$), but the rest of comparisons resulted in significant differences. After hydration, measurements indicated a different situation, with olive and turnip pollens showing similar values of autofluorescence ($U=130.0$, $p=0.311$), and the remaining comparisons resulting in significant differences.

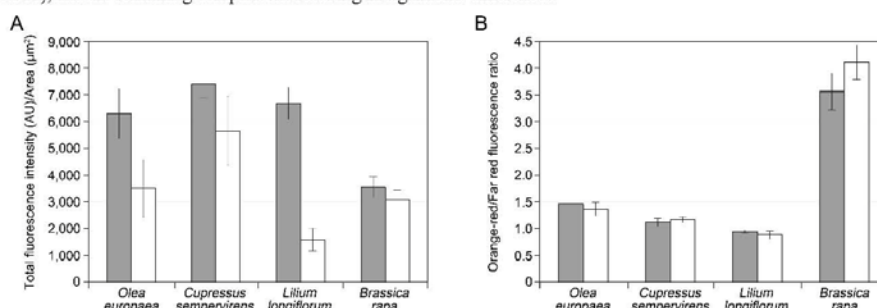


Fig. 2 Quantification of total autofluorescence intensity (A) and orange-red/far red autofluorescence ratio (B) of olive (*Olea europaea*), Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens*), lily (*Lilium longiflorum*) and turnip (*Brassica rapa*) pollen. Grey columns refer to dry pollen, whereas white columns refer to hydrated pollen. Means (N= 20) \pm SD are displayed for each plant species. AU= arbitrary units.

Pollen from olive, cypress and turnip showed a higher fluorescence emission in the 590-650 nm spectrum than in the far red (650LP nm) region (Fig. 2B). Contrary, lily pollen displayed higher autofluorescence values in the far red (650LP nm) emission wavelength. Interestingly, the orange-red/far red fluorescence ratio also varied significantly among the species studied (Fig. 2B) in both hydrated (Kruskal-Wallis test, $\chi^2=64.680$, $p=0.000$) and dry ($\chi^2=63.884$, $p=0.000$) pollen. Non-parametric comparisons of G/R fluorescence for two unpaired groups of species always resulted in significant differences, independently of the water status of pollen. Therefore, this last parameter alone or in combination with the autofluorescence intensity allowed classifying the four plant species studied.

Autofluorescence visualization also allowed identifying additional pollen morphological traits (Table 1). Parameters like pollen shape and size (i.e. pollen diameters), exine pattern, and type and number of pollen apertures were easily determined in our samples (Fig. 3A-B). Thus, lily pollen was almost four-fold larger in diameter than the other species studied, and experienced a drastic change in its shape after hydration. Turnip pollen kept its oval shape after hydration while pollen grains rounded off in the other species. All together, these parameters might be a valuable supplement to the autofluorescence data for fine discrimination of a higher number of plant species.

Table 1 Morphological parameters examined in four plant species using the autofluorescence properties of pollen.

Species	Pollen diameter and shape (P/E)						Exine pattern	Classification of pollen according to the number and type of apertures
	Dry			Hydrated				
	Polar (P) (µm)	Equatorial (E) (µm)	P/E	Polar (P) (µm)	Equatorial (E) (µm)	P/E		
Olive	38.58 \pm 6.34	28.14 \pm 3.77	1.37	34.37 \pm 6.19	31.96 \pm 4.20	1.08	Reticulate	Trizonocolporate
Cypress	40.50 \pm 9.40	33.64 \pm 6.46	1.20	48.00 \pm 13.62	44.81 \pm 8.12	1.07	Smooth	Inaperturate
Lily	227.34 \pm 11.75	86.97 \pm 4.74	2.61	194.47 \pm 9.22	152.88 \pm 7.28	1.27	Reticulate	Monocolpate
Turnip	63.53 \pm 4.88	27.05 \pm 2.63	2.35	60.53 \pm 5.43	40.57 \pm 2.51	1.49	Reticulate	Dicolpate

In addition to these morphological traits, imaging of autofluorescence at higher magnification allowed analyzing other characteristics of pollen. In this way, the hydration status of pollen could be easily monitored. Fully hydrated pollen was discernible from partially dehydrated pollen owing to autofluorescence emission was significantly quenched by water. This technique also permitted to detect the presence of additional secreted components over the surface of the pollen wall. We could observe drops of fluorescent material filling the cavities of the exine in the lily pollen (Fig. 3C).

This material, likely of lipidic nature constitutes the “pollen coat”, which is synthesized by the *tapetum* and released to the anther loculus after degradation of tapetal cells [24]. Moreover, the material released from pollen to the aqueous medium was also visualized as fluorescent spots scattered in the vicinity of pollen grains (Fig. 3D).

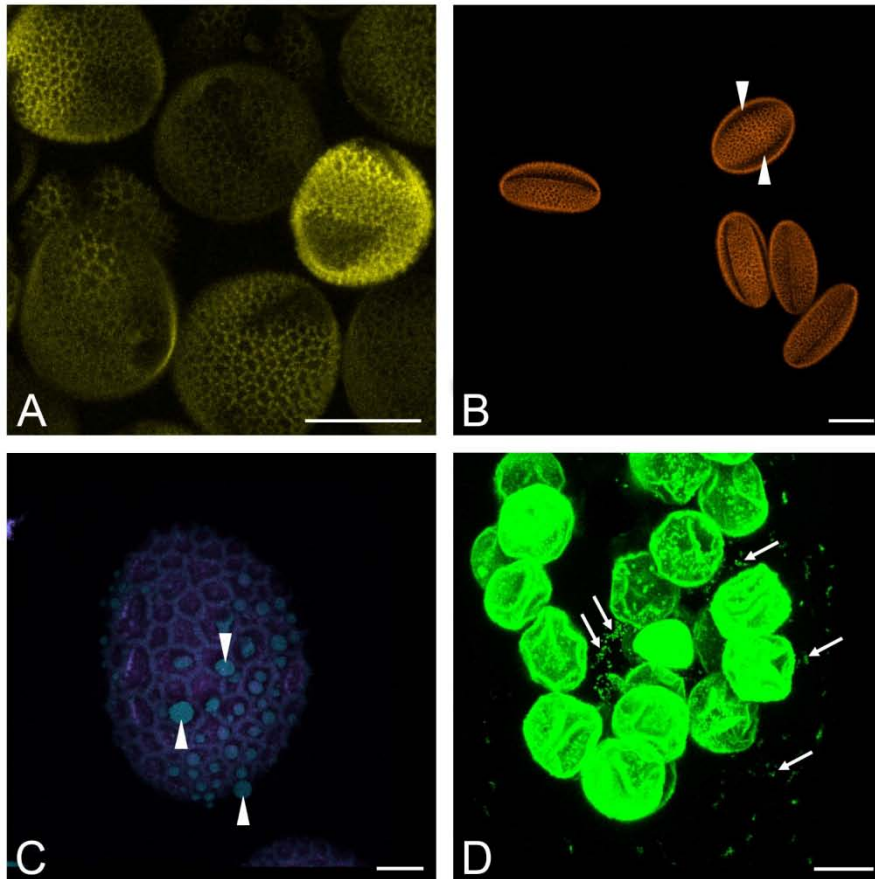


Fig. 3 (A) Olive pollen showing details of the sculpted exine. (B) Turnip pollen showing the non-fluorescent apertures (arrowheads) in contrast with the fluorescent exine. (C) Lily pollen showing the pollen coat material filling the cavities of the exine (arrowheads). (D) Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens*) pollen showing the presence of fluorescent particles likely originated after disruption of pollen grains and/or secretion into the aqueous medium (arrows). Bars= 20 μ m.

3.2 Olive cultivars identification by pollen autofluorescence

The olive world germplasm is quite broad as a result of its cultivation during millennia [25]. Olive classification into cultivars has been traditionally based on morphological and biometric traits of vegetative organs, as well as on agronomical characteristics [26]. However, reproductive traits have never been considered as a tool for olive identification. Here, we have explored for the first time the prospect of using pollen autofluorescence properties as a tool for varietal discrimination in this species of agronomic interest.

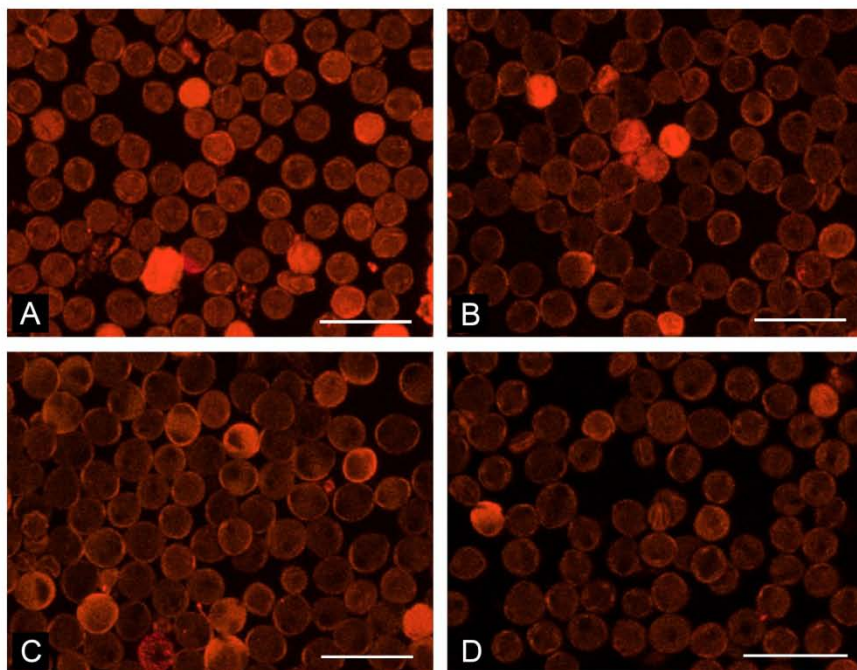


Fig. 4 Images of autofluorescent olive pollen from cultivars Ayrouni (A), Cornicabra (B), Loaime (C) and Picual (D) after rehydration, showing slight differences in size and autofluorescence intensity. Bars= 100 μ m.

The autofluorescence emission pattern after pollen rehydration was similar for all cultivars to that described above (Fig. 1E), with some pollen grains being brighter than others (Fig. 4). Similarly, this intra-varietal variability could reflect differences in the water content of each grain within a cultivar. As shown in Fig. 5A, the total autofluorescence intensity significantly varied among cultivars (Kruskal-Wallis test, $\chi^2= 28.228$, $p= 0.000$). Comparisons using the Mann-Whitney test revealed that Ayrouni presented higher autofluorescence values than Picual, Loaime and Cornicabra cultivars. These differences are likely due to intrinsic factors of pollen (i.e. composition of exine and the material adhered to it) since all cultivars showed similar performance in terms of viability (data not shown).

In all cultivars studied, olive pollen showed a higher fluorescence emission in the range 590-650 nm, although also exhibited significant fluorescence at 650LP nm (Fig. 5B). Interestingly, the orange-red/far red autofluorescence ratio also varied significantly among cultivars (Kruskal-Wallis test, $\chi^2= 35.779$, $p= 0.000$). Non-parametric comparisons of the autofluorescence ratio for two unpaired groups of species always resulted in significant differences except when Cornicabra and Ayrouni cultivars were compared. Therefore, all together, these parameters allowed classifying the four olive cultivars studied. However, to validate this method for cultivar identification purposes, this study needs to be extended to a larger number of olive cultivars. Moreover, the use of microscopes fitted with spectral detection will help to obtain further data regarding the autofluorescence properties of these samples, and will improve taxonomical discrimination ability.

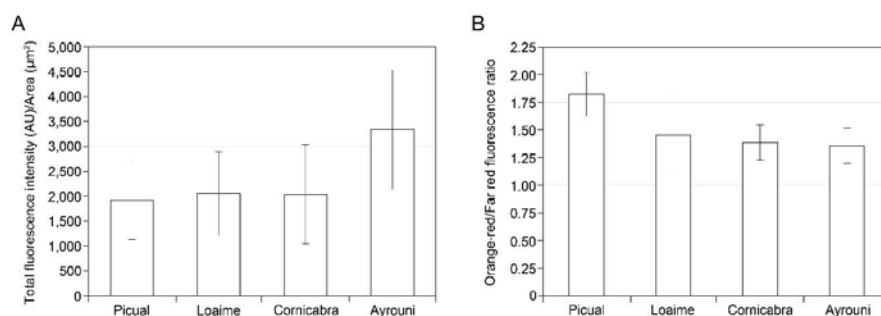


Fig. 5 Quantification of total autofluorescence intensity (A) and orange-red/far red autofluorescence ratio (B) of hydrated pollen from four olive cultivars. Means (N= 20) ±SD are displayed for each plant species. AU= arbitrary unit.

4. Conclusions

Autofluorescence imaging can be considered a non-disruptive method for pollen classification since it does not require any treatment of fixing or staining of the specimens. Therefore, this simple and fast method can be used for pollen counting and taxonomical classification in multiple applications that concern disciplines like Aerobiology, Plant Taxonomy and Cell and Molecular Biology. Moreover, autofluorescence properties of pollen could be used in combination with other morphological parameters to classify olive cultivars.

Acknowledgements The support by the Spanish Ministry of Science and Innovation (ERDF-cofinanced project BFU2008-00629) and CSIC (cooperation agreement 2007PT0039) is gratefully acknowledged.

References

- [1] Chance B, Cohen P, Jobsis F, Schoener B. Intracellular oxidation-reduction states *in vivo*. The microfluorometry of pyridine nucleotide gives continuous measurement of the oxidation state. *Science*. 1962;137:499-508.
- [2] Benson RC, Meyer RA, Zaruba MW, McKhann GM. Cellular autofluorescence – is it due to flavins. *J. Histochem. Cytochem.* 1979;27:44-48.
- [3] Krause GH, Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1991;42:313-349.
- [4] Ruhland W, Wetzl K. Der nachweis von chloroplasten in den generativen zellen von pollenschläuchen. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 1924;42:3-14.
- [5] Berger F. Das verhalten der heufieber-erregenden pollen in filtrien ultravioleten licht. *Beitr. Biol. Pflanzen.* 1934;22:1-12.
- [6] Asbeck F. Fluoreszieren der blütenstaub. *Naturwiss.* 1955;4:632.
- [7] Roshchina VV, Mel'nikova EV, Mit'kovskaya LI, Kamaukhov VN. Microspectrofluorometry for the study of intact plant secretory cells. *Zh. Obshch. Biol.* 1998;59:531-554.
- [8] Roshchina VV, Kamaukhov VN. Changes in pollen autofluorescence induced by ozone. *Biol. Plant.* 1999;42:273-278.
- [9] Roshchina VV, Mel'nikova EV. Pollen chemosensitivity to ozone and peroxides. *Russ. J. Plant Physiol.* 2001;48:74-83.
- [10] Weinbaum SA, Polito VS. Assessment of pollen retention using exine autofluorescence. *Mikroskopie.* 1985;42:278-280.
- [11] Willemse MTM. Changes in the autofluorescence of the pollen wall during microsporogenesis and chemical treatments. *Acta Bot. Neerl.* 1972;21:1-16.
- [12] Willemse MTM. Autofluorescence of pollen wall of *Lilium* and changes in pollen wall of *Gasteria* and *Lilium* anther. *Acta Soc. Bot. Pol.* 1981;50:103-110.
- [13] Audran JC, Willemse MTM. Wall development and its autofluorescence of sterile and fertile *Vicia faba* L. pollen. *Protoplasma.* 1982;110:106-111.
- [14] Suzuzi M, Tonouchi M, Muiyama K, Mitsumoto K. An analysis of high concentration of pollen at early morning in 2005 spring and a measurement of Japanese cedar and cypress pollen using autofluorescence characteristics. *J. Aerosol Res.* 2005;20:281-289.
- [15] Fonseca AE, Westgate ME, Doyle RT. Application of fluorescence microscopy and image analysis for quantifying dynamics of maize pollen shed. *Crop. Sci.* 2002;42:2201-2206.
- [16] Roshchina VV, Mel'nikova EV, Kovaleva LV. Changes in fluorescence during development of the male gametophyte. *Russ. J. Plant Physiol.* 1997;44:45-53.
- [17] Driessen MNB, Willemse MTM, van Luijck JAG. Grass pollen grain determination by light- and UV- microscopy. *Grana.* 1989;28:115-122.

- [18] Mitsumoto K, Yabusaki K, Aoyagi H. Classification of pollen species using autofluorescence image analysis. *J. Biosci. Bioeng.* 2009;107:90-94.
- [19] Stanley RG, Linskens HF, eds. *Pollen: Biology, Biochemistry, Management*. Berlin: Springer-Verlag; 1974.
- [20] Roshchina VV, Popov VI, Novoselov VI, Mel'nikova EV, Peshenko IV, Khutsyan SS, Fesenko EE. Transduction of chemosignal in pollen. *Cytology*. 1998;40:964-971.
- [21] Roshchina VV, Mel'nikova EV, Gordon Rya, Konvalov DA, Kuzin AM. A study of the radioprotective activity of proazulenes using a chemosensory model of *Hippeastrum hybridum* pollen. *Doklady Biophys.* 1998;358:20-23.
- [22] Roshchina VV, Mel'nikova EV, Kovaleva LV. Autofluorescence in the pollen-pistil system of *Hippeastrum hybridum*. *Doklady Biol. Sci.* 1996;349:118-120.
- [23] Mel'nikova EV, Roshchina VV, Kamaukhov VN. Microspectrofluorometry of pollen. *Biophys.* 1997;42:226-233.
- [24] Pacini E, Juniper BE. The ultrastructure of pollen-grain development in the olive (*Olea europaea*). 2. Secretion by the tapetal cells. *New Phytol.* 1979;83:165-174.
- [25] Zohary D, Spiegel-Roy P. Beginnings of fruit growing in the Old World. *Science*. 1975;187:319-327.
- [26] Trujillo I, Morales A, Belaj A, Valpuesta V, Botella MA, Rallo P, Martín A, Dorado G. Identificación de variedades de olivo por marcadores moleculares. In: Rallo L, Barranco D, Caballero JM, Del Río C, Martín A, Tous J, Trujillo I, eds. *Variedades de olivo en España*. Madrid: Junta de Andalucía, MAPA and Ediciones Mundi-Prensa; 2005:431-450.



Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201130568	
Fecha de recepción:	11 abril 2011, 15:19 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	ES1641.747	
Solicitante:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)	
Número de solicitantes:	1	
País:	ES	
Título:	MÉTODO Y KIT PARA LA IDENTIFICACIÓN VARIETAL DEL ORIGEN DEL POLEN DE OLIVO.	
Documentos enviados:	Descripción-1.pdf (15 p.) Reivindicaciones-1.pdf (3 p.) Resumen-1.pdf (1 p.) OLF-ARCHIVE.zip FEERCPT-1.pdf (1 p.) SEQLPDF.pdf (6 p.) SEQLTXT.txt	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=ENTIDAD PONS CONSULTORES DE PROPIEDAD INDUSTRIAL SA - CIF A28750891 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50534279J,OU=703015345,OU=fnmt clase 2 ca,O=FNMT,C=es	
Fecha y hora de recepción:	11 abril 2011, 15:19 (CEST)	
Codificación del envío:	3E:2B:C5:AE:9D:3D:A4:0B:33:AA:31:C3:BE:4C:B2:FD:72:E8:03:1F	

/Madrid, Oficina Receptora/



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO





Oficina Española
de Patentes y Marcas

(1) MODALIDAD:	PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(2) TIPO DE SOLICITUD:	PRIMERA PRESENTACION ADICION A LA PATENTE EUROPEA ADICION A LA PATENTE ESPAÑOLA SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:	MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:	
4) LUGAR DE PRESENTACION:		OEPM, Presentación Electrónica
(5) DIRECCION ELECTRONICA HABILITADA (DEH):		
(6-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACION SOCIAL: NACIONALIDAD: CODIGO PAIS: DNI/CIF/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CODIGO POSTAL: PAIS RESIDENCIA: CODIGO PAIS: TELEFONO: FAX: PERSONA DE CONTACTO: MODO DE OBTENCION DEL DERECHO:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC) España ES Q2818002D C/ SERRANO, 117 MADRID 28 Madrid 28006 España ES <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(7-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CODIGO PAIS: DNI/PASAPORTE:	ALCHE RAMIREZ JUAN DE DIOS España ES
(7-2) INVENTOR 2:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CODIGO PAIS: DNI/PASAPORTE:	MAHDI FENDRI Tunez TN
(7-3) INVENTOR 3:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CODIGO PAIS: DNI/PASAPORTE:	RODRIGUEZ GARCIA MARIA ISABEL España ES


(8) TÍTULO DE LA INVENCIÓN:	MÉTODO Y KIT PARA LA IDENTIFICACIÓN VARIETAL DEL ORIGEN DEL POLEN DE OLIVO.
(9) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:	SI NO <input checked="" type="checkbox"/>
(10) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACELERADO DE CONCESIÓN	SI NO <input checked="" type="checkbox"/>
(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:	SI NO <input checked="" type="checkbox"/>
(12) DEPÓSITO:	REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO: NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):
(13) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS:	LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD LA LISTA DE SECUENCIAS EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS <input checked="" type="checkbox"/>
(14) EXPOSICIONES OFICIALES:	LUGAR: FECHA:
(15) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	PAÍS DE ORIGEN: CÓDIGO PAÍS: NÚMERO: FECHA:
(16) AGENTE/REPRESENTANTE:	APELLIDOS: PONS ARIÑO NOMBRE: ÁNGEL CÓDIGO DE AGENTE: 0499/5 NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES DNI/CIF/PASAPORTE: 50534279-J DOMICILIO: GLORIETA DE RUBÉN DARÍO, 4 MADRID LOCALIDAD: 28 Madrid PROVINCIA: 28010 CÓDIGO POSTAL: España PAÍS RESIDENCIA: ES CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: NÚMERO DE PODER: 20081765
(17) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPANAN:	DESCRIPCIÓN: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 15 REIVINDICACIONES: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de reivindicaciones: 15 DIBUJOS: <input type="checkbox"/> N.º de dibujos: RESUMEN: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: <input type="checkbox"/> N.º de figura(s): ARCHIVO DE PRECONVERSIÓN: <input checked="" type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: JUSTIFICANTE DE PAGO (1): <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 LISTA DE SECUENCIAS PDF: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 6

<p style="text-align: center;">ARCHIVO PARA LA BUSQUEDA DE LS: OTROS (Aparecerán detallados):</p>	<p style="text-align: center;"><input checked="" type="checkbox"/></p>
<p>(18) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASA PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES, DECLARA: BAJO JURAMIENTO O PROMESA SER CIERTOS TODOS LOS DATOS QUE FIGURAN EN LA DOCUMENTACIÓN ADJUNTA:</p> <p style="text-align: right;">DOC COPIA DNI: [] N.º de páginas: DOC COPIA DECLARACIÓN DE CARENCIA DE MEDIOS: [] N.º de páginas: DOC COPIA CERTIFICACIÓN DE HABERES: [] N.º de páginas: DOC COPIA ÚLTIMA DECLARACIÓN DE LA RENTA: [] N.º de páginas: DOC COPIA LIBRO DE FAMILIA: [] N.º de páginas: DOC COPIA OTROS: [] N.º de páginas:</p>	<p style="text-align: center;">[]</p>
<p>(19) NOTAS:</p>	
<p>(20) FIRMA:</p> <p style="text-align: center;">FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE:</p> <p style="text-align: right;">LUGAR DE FIRMA: FECHA DE FIRMA:</p>	<p>ENTIDAD PONS CONSULTORES DE PROPIEDAD INDUSTRIAL SA - CIF A28750891 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50534279J Madrid 11 Abril 2011</p>

 <p>MINISTERIO DE INDUSTRIA, TURISMO Y COMERCIO</p>	 <p>Oficina Española de Patentes y Marcas</p>	<p>TASA en materia de Propiedad Industrial CÓDIGO 511</p>	<p>Modelo 791</p>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------	------------------------------

Identificación	
Ejercicio: 2011	
Nro. Justificante: 7915112590752	
Sujeto Pasivo:	
N.I.F.:	Apellidos y Nombre o Razón social:
Calle/Plaza/Avda.:	Nombre de la vía pública: N° Esc Piso Puerta Tfno.
Municipio:	Provincia: Código Postal:
Agente o Representante legal: (1)	
N.I.F.:	Apellidos y Nombre o Razón social:
A28750891	PONS CONSULTORES DE PROPIEDAD INDUSTRIAL SA
Calle/Plaza/Avda.:	Nombre de la vía pública: N° Esc Piso Puerta Tfno.
Municipio:	Provincia: Código Postal:
Código de Agente o Representante: (2)	Digito de control:
0499	5

Autoliquidación	
Titular del expediente si es distinto del pagador: Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)	
Expediente Modalidad: P	Número: Tipo: (3)
Clave: IE01	Año: 2011 Concepto: Solicitud de Invención por Internet
Unidades: 1	Importe: 61,2
Referencia OEPM: 88039872833	
909992100200188039872833	

Declarante	Ingreso
Fecha: 11/04/2011	Importe en Euros:
Firma: PONS CONSULTORES DE PROPIEDAD INDUSTRIAL SA	Adeudo en cuenta: 
	Entidad: 2100 Oficina: D.C. Nro. Cuenta
	NRC Asignado: 7915112590752BA05D94EA

- (1) Solo cuando el pago se realice con cargo a la cuenta corriente del representante o agente.
 (2) En el caso de que tenga asignado un número por la OEPM.
 (3) En el caso de patentes europeas, se pondrá una P si es el número de publicación o una S si es el número de solicitud.
 (4) Una copia de este impreso se acompañará con la presentación de documentación en la OEPM.



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS		
Hoja informativa sobre pago de tasas de una solicitud de patente o modelo de utilidad		
1. REFERENCIA DE SOLICITUD	ES1641.747	
2. TASAS	Importe (en euros)	
Concepto	Código de barras asignado	Importe
Solicitud de demanda de depósito o de rehabilitación.	88039872833	61,20
Solicitud de cambio de modalidad en la protección		0,00
Prioridad extranjera (0)		0,00
Petición IET		0,00
El solicitante se acoge a la exención del pago de tasas	<input type="checkbox"/>	
El solicitante es una Universidad pública	<input type="checkbox"/>	
	Importe total	61,20
	Importe abonado	61,20
	Importe pendiente de pago	0,00

Se ha aplicado el 15% de descuento sobre la tasa de solicitud de acuerdo con la D. Adic. 8.2 Ley de Marcas.

Si no hubiera realizado el pago previamente al envío de la solicitud, consignando los números del código de barras en la casilla correspondiente, recibirá una notificación de la Oficina Española de Patentes y Marcas a partir de la recepción de la cual tendrá un mes para realizar dicho pago.

Transcurrido este plazo, sin que se hubiera procedido al pago de la tasa de solicitud, la solicitud de patente de invención o de modelo de utilidad se tendrá por desistida.

Método y kit para la identificación varietal del origen del polen de olivo.

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biotecnología. Específicamente, se refiere a un método para la identificación del origen
5 varietal del polen del olivo basado en marcadores SSRs así como a un kit que comprende los elementos necesarios para llevar a cabo dicho método.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10 La identificación varietal de las plantas es uno de los elementos más importantes en la agricultura, ya que la variedad vegetal puede determinar por ejemplo las características agronómicas de una planta. Esto es importante para que el agricultor decida cual es la variedad más interesante para cultivar, bien por las características del terreno donde se va a llevar a cabo la siembra, o
15 bien por la necesidad de un tipo de producto determinado que llevar al mercado.

La determinación varietal, en la actualidad se lleva a cabo mediante la obtención de tejidos diploides del vegetal, y analizando su genoma.

20 La identificación del origen del polen resulta interesante en múltiples campos como por ejemplo el de la aeropalinología, y fundamentalmente en las alergias, ya que las personas alérgicas pueden reaccionar de forma diferente al polen proveniente no solo de diferentes especies vegetales, sino también de distintas
25 variedades dentro de una especie (Bousquet *et al.* 1985, *Clin Allergy.*, 14: 249-258; Castro *et al.* 2003, *Int. Arch. Allergy Clin. Immunol.*, 131:164-173). Diversos estudios han demostrado que la reactividad de sueros procedentes de diferentes pacientes es variable en función del origen varietal del polen al que se expongan. En la actualidad existen muchos métodos de muestreo que
30 permiten captar el polen para por ejemplo determinar la composición del aire (Mandrioli *et al.* 1998, *Methods in Aerobiology.* 47-68). Este polen captado se analiza a nivel de especie y permite la realización de calendarios polínicos que detallan las concentraciones de los taxones de pólenes en una determinada

localidad. La identificación del origen varietal de dichos pólenes se convertiría en una herramienta adicional que permitiría la mejora de los calendarios polínicos además de permitir una mejor determinación del riesgo alérgico.

5 Por otro lado, dentro de la medicina también resultaría interesante la determinación del origen varietal del polen, ya que permitiría por ejemplo llevar a cabo la certificación del polen utilizado en la preparación de las vacunas o kits de diagnóstico ya que permiten una mejor identificación del mismo lo que proporcionaría una mayor seguridad y una mayor eficacia para el paciente.

10

Además de en medicina, la identificación del polen sería útil en otras áreas como por ejemplo en los bancos de germoplasma, donde su identificación es relevante a la hora de llevar a cabo la administración del polen con un origen varietal certificado para la mejora de especies (Stephan Mercier 1995, *Grana.*
15 6: 367-370).

Otra aplicación interesante de la determinación varietal de un vegetal se da a la hora de llevar a cabo el análisis de la propagación de genes a partir de plantas transgénicas. Los organismos transgénicos se pueden difundir en la naturaleza
20 a través, fundamentalmente, de la polinización cruzada. Esto puede afectar a la biodiversidad además de modificar poblaciones genéticamente compatibles de plantas silvestres presentes alrededor del cultivo (Lefol *et al.* 1996, *Sex Plant Reprod.* 9: 189-196; Ellstrand *et al.* 1999, *Annu Rev Ecol Syst.*, 30: 539-563). En la actualidad el método para determinar el porcentaje de polinización
25 cruzada ocurrida en plantas transgénicas consiste en la recolección y germinación de semillas. La capacidad de identificar el polen de la progenie permitiría determinar la tasa de flujo de genes entre diferentes especies y/o variedades. El disponer de un método para llevar a cabo la identificación del origen varietal del polen, permitiría determinar el grado de dispersión del polen
30 transgénico tras la recolección de muestras.

Cabe destacar también que los métodos actualmente disponibles para caracterizar el origen varietal de diversas especies sólo se aplican actualmente

a material diploide Gökirmak et al. 2009, *Genet Resour Crop Evol.*, 56:147–172, por lo que no se está realizando el análisis del polen utilizado comercialmente, por ejemplo, para la polinización artificial de especies. Debido a la autoincompatibilidad existente entre algunas variedades vegetales, por ejemplo del olivo, se hace necesaria una variedad polinizadora. Esto hace que exista por tanto, una necesidad tanto por parte de las empresas suministradoras como por parte de los agricultores de conseguir un método que permita la certificación del origen varietal para que el agricultor pueda determinar cual es el más acorde con sus necesidades.

La determinación del origen vegetal del polen se ha encontrado con diversas dificultades como por ejemplo la dotación genética haploide del polen que no permite disponer de toda la información genética de la planta madre, o como la necesidad de un método diferente para el análisis del polen en función de la especie vegetal de la que se trate, ya que el polen presenta diferencias importantes a nivel morfológico, estructural y genético que hacen que cada método haya de ser adaptado en función de la especie que se quiera analizar.

Por todo lo descrito anteriormente, se hace necesaria la búsqueda de un sistema que permita la rápida identificación del polen, ya que esto permitiría superar muchas de las barreras existentes en la actualidad para la determinación de la variedad vegetal únicamente mediante el uso de tejidos diploides. Este método presentaría multitud de aplicaciones de utilidad tanto en aspectos agronómicos como médicos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para la identificación del origen varietal del polen de olivo mediante el uso de marcadores SSRs (*Simple Sequences Repeats* o repeticiones de secuencias simples), así como a un kit que comprende los medios necesarios, preferiblemente cebadores específicos para los SSRs, para llevar a cabo dicho método.

En la presente invención se demuestra, mediante el uso de muestras ciegas que el método de la invención permite la identificación de la variedad vegetal de la que proceden diversos pólenes de olivo. Esta identificación se realiza mediante la amplificación de marcadores SSRs. Estos marcadores presentan un elevado polimorfismo inter e intraespecífico. Además su segregación es codominante por lo que la contribución de ambos alelos es detectable en las muestras. Estas características contribuyen a que estos marcadores presenten una serie de ventajas frente a otros marcadores utilizados previamente como son una alta reproducibilidad, una elevada facilidad de detección, o un gran poder discriminativo. Además, presentan como ventaja adicional la segregación independiente, lo que los convierte en unos marcadores ideales para la determinación del origen varietal del olivo.

El método descrito en la presente invención presenta además como particularidad que es llevado a cabo a partir de muestras de polen de olivo. Esto supone una mejora frente a lo previamente descrito, ya que los granos de polen presentan una dotación genética haploide, lo que hace que presenten una información genética incompleta de la planta madre. Sin embargo, en una población de polen, todas las posibilidades de segregación están representadas, y por tanto una población suficiente de polen comprendería la información genética completa de la planta madre. El polen no ha sido usado con anterioridad fundamentalmente debido a la relativa complejidad de la extracción de su material genético frente a otros tejidos, a la baja cantidad obtenible a partir de polen con respecto por ejemplo a hojas, y a la necesidad de una población suficiente para disponer de la dotación genética completa de la planta madre.

El uso de polen para la identificación presenta como ventaja adicional, además, la no necesidad de dañar el vegetal para obtener tejido para la identificación varietal, ya que este polen se desprende naturalmente de la planta.

Cabe indicar que los métodos a llevar a cabo en granos de polen, han de ser adecuados a cada una de las especies en que se realicen debido

fundamentalmente a las diferencias tanto morfológicas como bioquímicas del polen perteneciente a diferentes especies. Estas diferencias son tanto más acusadas cuanto más alejadas evolutivamente se encuentran las especies.

- 5 La identificación varietal del polen de olivo, debido a la importancia de este elemento en la agricultura, a nivel ambiental o en medicina presenta multitud de aplicaciones como por ejemplo la certificación previa a la venta del polen para la fecundación de plantas o de la inclusión en kits de diagnóstico o de vacunas.
- 10 Por todo ello, un primer aspecto de la invención se refiere a un método de identificación del origen varietal del polen de olivo (de ahora en adelante método de la invención) que comprende:
- a) Obtener una muestra de polen de olivo,
 - b) extraer el DNA de la muestra obtenida en (a),
 - 15 c) amplificar marcadores SSRs en el DNA obtenido en (b),
 - d) analizar el perfil alélico de los SSRs amplificados en (c) para obtener el genotipo,
 - e) comparar el genotipo del paso (d) con genotipos de variedades vegetales conocidas, y
 - 20 f) determinar la variedad vegetal en base a la comparación de (e).

Se entienden por "marcadores SSRs" en la presente invención repeticiones de 1 a 6 pares de bases de DNA, presentes en el genoma de la planta, en las que el número de repeticiones es variable entre diferentes alelos lo que permite la

25 discriminación de diferentes variedades. Los marcadores SSRs se encuentran situados en regiones no codificantes por lo que no son transcritos en RNA. Por ello el material genético a extraer en el método de la invención es DNA.

Para que se pueda identificar el origen varietal del polen de olivo, se ha de

30 disponer de una población suficiente de polen para que sea representativa del genoma parental, es decir, ha de incluir todas las posibilidades de segregación del genotipo parental. Además, es necesario que de esta población se extraiga suficiente cantidad de material genético para poder llevar a cabo la

amplificación de todos los marcadores necesarios para la identificación. Por todo ello, en una realización preferida del método de la invención la cantidad de DNA extraído en el paso (b) es de al menos 50 ng. En una realización más preferida del método de la invención la cantidad de DNA extraído en el paso (b) es de al menos 200 ng.

Para llevar a cabo la correcta identificación del origen varietal del polen, es necesario disponer de varios marcadores, ya que un único marcador no sería suficientemente discriminatorio debido a las elevadas posibilidades parentales y no llevarían a una correcta identificación. Por el contrario, el uso de un alto número de marcadores supondría un gasto innecesario de recursos ya que no llevaría a una determinación mejor del origen varietal. Por ello, en otra realización preferida del método de la invención, los SSRs amplificados en el paso (c) son al menos 3. En una realización aun más preferida de este aspecto de la invención, los SSRs amplificados en el paso (c) del método de la invención son al menos 6. En una realización todavía más preferida de este aspecto de la invención, los SSRs amplificados en el paso (c) del método de la invención son al menos 10. En una realización particular de este aspecto de la invención, los SSRs amplificados en el paso (c) del método de la invención son 10.

En los ejemplos de la presente invención los SSRs usados y que resultan útiles para la discriminación del origen varietal del polen de olivo son *ssrOeUA-DCA3*; *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16*, *ssrOeUA-DCA18*, *GAPU71B*, *GAPU59*, *GAPU101*, *GAPU103A*, *UDO99-24*, *UDO99-43*. Estos marcadores permiten una perfecta discriminación del origen varietal del polen del olivo, sin la adición de datos duplicados o superfluos que no aportan información para la identificación. Cabe indicar que los SSRs desarrollados para una especie en particular podrían ser utilizados en especies estrechamente relacionadas, pero el porcentaje de loci que se amplifican decrece significativamente cuando aumenta la distancia genética. Por todo ello, en una realización preferida del método de la invención los marcadores amplificados en el paso (c) se seleccionan de la lista que comprende: *ssrOeUA-DCA3*; *ssrOeUA-DCA9*,

ssrOeUA-DCA16, ssrOeUA-DCA18, GAPI71B, GAPI59, GAPI101, GAPI103A, UDO99-24 y UDO99-43. En una realización más preferida del método de la invención los marcadores amplificados en el paso (c) son ssrOeUA-DCA3; ssrOeUA-DCA9, ssrOeUA-DCA16, ssrOeUA-DCA18, GAPI71B, GAPI59, GAPI101, GAPI103A, UDO99-24 y UDO99-43.

Para llevar a cabo la amplificación de los marcadores se utilizan cebadores específicos para cada uno de los marcadores SSRs. Los cebadores se pueden encontrar unidos a fluoróforos como por ejemplo aunque sin limitarse a FAM (6-carboxifluoresceína), HEX (4, 7, 2', 4', 5', 7'-hexacloro-6-carboxifluoresceína), NED (2'-cloro-5'-fluoro-7',8' fenil-1.4-dicloro-6-carboxifluoresceína) para facilitar la posterior detección de los elementos amplificados. La tabla 1 refleja los marcadores de la invención así como los cebadores utilizados para llevar a cabo la amplificación de dichos marcadores para su posterior detección mediante fluoróforos unidos a los cebadores utilizados.

Tabla 1. Características de los cebadores de los 10 microsatélites SSR utilizados y secuencias amplificadas.

Marcador SSR	Secuencia amplificada	Secuencia del cebador Sentido (marcado con sonda fluorescente)	Secuencia del cebador Antisentido	*T ^a (°C)
ssrOeUA-DCA3	SEQ ID NO:1	FAM - SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	52
ssrOeUA-DCA9	SEQ ID NO:2	FAM - SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14	51
ssrOeUA-DCA16	SEQ ID NO:3	FAM - SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:16	50
ssrOeUA-DCA18	SEQ ID NO:4	HEX - SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18	50
GAPI59	SEQ ID NO:5	NED - SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20	50
GAPI71B	SEQ ID NO:6	HEX - SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22	50
GAPI101	SEQ ID NO:7	NED - SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24	51
GAPI103A	SEQ ID NO:8	NED - SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26	50
UDO99-024	SEQ ID NO:9	HEX - SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:28	52
UDO99-043	SEQ ID NO:10	FAM - SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:30	50

*T^a se refiere a la temperatura de hibridación.

20 FAM, HEX y NED se refieren a los fluoróforos unidos a los cebadores para su detección.

Los cebadores de la tabla son utilizados en parejas que permiten la amplificación de cada uno de los marcadores SSR para los que se han diseñado cada uno de ellos. Las parejas son las formadas por los cebadores SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15-
5 SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17-SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19-SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23-SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25-SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27-SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:29-SEQ ID NO:30. Las secuencias complementarias de cada una de las parejas también serían útiles para la amplificación de la secuencia, y por tanto podrían utilizarse de
10 forma análoga a las parejas descritas.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit de identificación del origen varietal del polen de olivo que comprende cebadores específicos para llevar a cabo el método de la invención (de ahora en adelante kit de la invención). En
15 una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende los cebadores específicos para la amplificación de al menos 3 marcadores seleccionados de la lista que comprende: *ssrOeUA-DCA3*; *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16*, *ssrOeUA-DCA18*, *GAPU71B*, *GAPU59*, *GAPU101*, *GAPU103A*, *UDO99-24* y *UDO99-43*. En una realización más preferida de este
20 aspecto de la invención el kit de diagnóstico comprende los cebadores específicos para la amplificación de al menos 6 marcadores seleccionados de la lista que comprende: *ssrOeUA-DCA3*; *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16*, *ssrOeUA-DCA18*, *GAPU71B*, *GAPU59*, *GAPU101*, *GAPU103A*, *UDO99-24* y *UDO99-43*. En una realización aun más preferida el kit comprende los
25 cebadores específicos para la amplificación de los marcadores *ssrOeUA-DCA3*; *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16*, *ssrOeUA-DCA18*, *GAPU71B*, *GAPU59*, *GAPU101*, *GAPU103A*, *UDO99-24* y *UDO99-43*.

En otra realización preferida, el kit comprende al menos 3 parejas de
30 cebadores seleccionadas de la lista que comprende SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15-SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17-SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19-SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23-SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25-SEQ ID NO:26, SEQ ID

NO:27-SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:29-SEQ ID NO:30. En una realización más preferida, el kit comprende al menos 6 parejas de cebadores seleccionadas de la lista que comprende SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15-SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17-SEQ ID NO:18, SEQ ID
5 NO:19-SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23-SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25-SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27-SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:29-SEQ ID NO:30. En una realización aun más preferida el kit comprende las parejas de cebadores SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15-SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17-SEQ ID NO:18, SEQ
10 ID NO:19-SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23-SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25-SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27-SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:29-SEQ ID NO:30.

En la presente descripción, el termino "específicos" implica que los cebadores
15 comprenden una secuencia nucleotídica parcial o totalmente complementaria a las secuencias adyacentes a los marcadores *ssrOeUA-DCA3*; *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16*, *ssrOeUA-DCA18*, *GAPU71B*, *GAPU59*, *GAPU101*, *GAPU103A*, *UDO99-24*, *UDO99-43* empleados por el método de la presente invención, permitiendo su unión específica a dichas secuencias adyacentes y
20 sirviendo de base para la amplificación de la región de ADN comprendida entre los cebadores.

Dicho kit puede comprender además de cebadores todos aquellos reactivos necesarios para llevar a cabo el método de la invención. El kit además puede
25 incluir, sin ningún tipo de limitación, sondas, tampones, polimerasas, cofactores para obtener una actividad óptima de éstas, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización.

30 Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención. A título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, el kit contendrá todos los elementos necesarios para la identificación del origen varietal de polen de olivo por la técnica que se ha descrito

anteriormente.

5 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

10

EJEMPLOS

15 Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

20

EJEMPLO 1. IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS CIEGAS DE POLEN USANDO MARCADORES SSRs.

25 La identificación de las variedades de olivo se ha basado tradicionalmente en esquemas pomológicos empleando caracteres morfológicos y agronómicos. En la actualidad existen marcadores moleculares que han sido identificados y desarrollados con el fin de identificar las variedades vegetales. Entre estos marcadores destacan los SSRs (Simple Sequence Repeat) que son
30 generalmente motivos de di, tri o tetra-nucleótidos repetidos en tándem a lo largo del DNA. Dichos marcadores han sido exitosamente utilizados en la discriminación varietal en un número considerable de colecciones y bancos de germoplasma de olivo en el mundo a partir de tejidos diploides de los que se

obtiene la dotación genética completa del vegetal. Los microsatélites se consideran unos de los marcadores de DNA más potentes ya que son muy polimórficos, multi-alélicos, codominantes y relativamente reproducibles entre laboratorios. El análisis de los SSRs requiere la extracción de DNA genómico
5 procedente de los tejidos vegetales de distintas partes del árbol (generalmente hojas). El presente análisis se ha realizado con el objetivo de identificar 8 muestras ciegas de polen suministradas por una empresa especializada en la fabricación de vacunas y kit de diagnóstico contra la alergia respiratoria estacional (hipersensibilidad tipo 1). La utilización de material vegetal bien
10 identificado es de capital importancia para una mejor eficiencia y trazabilidad de las vacunas o los kit de diagnóstico.

Las 8 muestras ciegas de polen de olivo supuestamente con distintos orígenes varietales han sido aportadas sin precisar la variedad que representa cada una,
15 ni la procedencia geográfica de las muestras. Solo se han proporcionado códigos de 1 a 8. La metodología consiste en llevar a cabo una extracción de DNA a partir del polen usando el kit Nucleo Spin®Tissue XS (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) partiendo de 30 mg de polen. Se realizó una etapa de pre-lisis añadiendo 80 µl de tampón T1 y 8 µl de proteinasa K al polen e incubando
20 12 h a 56°C. Posteriormente se añadieron 80 µl de tampón B3 a la muestra, que se incubó 5 min a 70 °C. Después de añadir a la solución 80 µl de Etanol 100%, se realizó una centrifugación durante 1 min a 11.000 g en una columna del Kit y luego se realizaron dos lavados con 50 µl del Buffer B5 a 11.000 g de
25 1 y 2 min respectivamente. Finalmente el DNA fue resuspendido en 20 µl de tampón BE tras una centrifugación a 11.000 g durante 1 min. La amplificación de los microsatélites, se realizó mediante PCR en un volumen total de 20µl que incluía: DNA genómico, 1X tampón de PCR, MgCl₂, dNTPs y cada uno de los cebadores sentido y antisentido para cada SSRs marcados con distintos fluorocromos (FAM, HEX y NED) (Tabla 1). La Taq Polimerasa se añadió
30 después de la etapa de la desnaturalización inicial. La PCR se realizó en un termociclador TGradient Thermoblock (Biometra) utilizando las temperaturas de hibridación descritas en la Tabla 1.

Los fragmentos amplificados fueron analizados en un secuenciador, y los perfiles alélicos de las muestras analizadas se compararon con los perfiles de 190 accesiones procedentes de distintas colecciones de germoplasma de distintos países incluidas en la base de datos del grupo de la reproducción sexual de plantas de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC).

Los SSRs analizados para la correcta identificación varietal de los granos de polen son los indicados en la tabla 1: *ssrOeUA-DCA3*; *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16*, *ssrOeUA-DCA18*, *GAPU71B*, *GAPU59*, *GAPU101*, *GAPU103A*, *UDO99-24*, *UDO99-43*.

La amplificación se ha realizado exitosamente en todos los marcadores SSRs analizados aunque en algunos de ellos ha sido imposible obtener amplificación en algunos loci. En dichas muestras, la identificación se ha basado en el resto de los loci.

Todos los microsatélites utilizados han sido polimórficos presentando un promedio de 4,8 alelos por locus. Se han detectado un total de 48 alelos en los 8 individuos analizados. El contenido en información polimórfica (PIC) presentó una media de 0,62 para todo el conjunto de los 10 marcadores. El PIC es un coeficiente indicativo del nivel de información aportado por el marcador que se calcula basándose en la heterocigosidad esperada y también en las frecuencias alélicas. Estos datos demuestran el alto poder discriminativo de los marcadores utilizados. Los valores de la probabilidad de identidad (PI) indican que 4 de los marcadores han sido los más discriminativos con una probabilidad de identidad acumulada de $5,8 \times 10^{-4}$. El PI representa la probabilidad de que un genotipo determinado sea idéntico al de otros dos individuos elegidos al azar, por lo que cuanto menor sea este coeficiente (más próximo a cero), mayor es la probabilidad de que todos los genotipos sean diferentes entre sí. El PI máximo sería teóricamente 1 y en este caso teórico todos los genotipos serían idénticos. Como la probabilidad calculada para este ejemplo es muy cercana a cero, podemos deducir que el conjunto de marcadores utilizado es altamente discriminativo.

En la tabla 2, se detallan los perfiles alélicos obtenidos para las muestras ciegas analizadas. Se han identificado 7 perfiles alélicos distintos representando 7 genotipos previamente identificados mediante los mismos marcadores y cuyos perfiles existen en la base de datos del grupo de la reproducción sexual de plantas del departamento de Bioquímica, Biología molecular y celular de plantas de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC).

Tabla 2. Identificación de los perfiles alélicos de las muestras ciegas de polen.

DENOMINACIÓN ACCECIÓN COLECCIÓN	Código del genotipo en la base de datos	Alelos identificados																			
		166	172	235	249	120	172	117	121	161	204	-	172	216	210	220	184	184	132	132	
Ciega 1	1P	166	172	235	249	120	172	117	121	161	204	-	172	216	210	220	184	184	132	132	
Loaime	Lo22	166	172	235	249	120	172	117	121	161	204	191	217	216	210	220	184	184	132	170	
Ciega 2	2P	166	172	235	245	122	152	117	127	183	191	191	217	207	210	220	184	184	132	170	
Picual (Genotipo 2)	11	166	172	235	245	122	152	117	127	183	191	191	217	207	210	220	184	184	132	170	
Ciega 3	3P	168	176	235	245	122	152	117	127	193	204	191	217	172	216	210	184	184	132	170	
Ciega 5*	5P	168- 166	176	235	245	152	152	117- 121	127- 141	193- 173	204- 211	191- 197	217	207	210	220	164	184	132	147	
Manzanilla de Jaen	Mn23	168	176	235	245	122	152	117	127	193	204	191	217	172	216	210	184	184	-	-	
Ciega 4*	4P	-	-	-	-	122	152	117- 121	127- 141	183- 161	193- 204	-	-	207- 172	212- 216	220	164	184	132	170	
Picual (Genotipo 1)	S7P	166	172	235	245	122	152	117	127	183	191	191	217	207	210	220	184	184	132	170	
Ciega 6	6P	164	174	228	239	120	143	121	141	183	204	183	205	175	220	220	199	199	147	158	
Arbequina	S1P	164	174	228	239	120	143	121	141	183	204	183	205	175	220	220	199	199	147	158	
Ciega 7	7P	168	172	235	249	152	152	-	-	183	193	191	199	207	210	220	184	184	-	-	
Lucio	U4	168	172	235	249	152	172	117	121	183	193	191	199	207	210	220	184	184	184	220	
Ciega 8	8P	168	172	235	249	152	152	117	121	183	193	191	199	207	210	220	184	184	184	220	
Lucio	U4	168	172	235	249	152	172	117	121	183	193	191	199	207	210	220	184	184	184	220	

*Las muestras ciegas 4 y 5 contienen polen de más de una variedad. Existe posibilidad de contaminación ocurrida durante la recolección, purificación y/o manejo de las muestras.

La muestra 4 presentó 4 alelos en lugar de 2 en 3 loci. Dicha muestra presentó dificultad en la amplificación de los SSRs lo que también indica que puede existir una contaminación de la muestra o que está formada por pólenes de más de una variedad..

La muestra 5 presentó 3 alelos en lugar de 2 en 4 loci y 4 alelos en lugar de 2 en el otro locus. No se ha observado en la literatura que los microsatélites mencionados puedan presentar más de dos alelos, lo que refuerza la hipótesis de contaminación.

La tabla 3 indica el resultado final de la identificación del origen varietal de las muestras ciegas de polen suministradas.

5 Tabla 3. Identificación del origen varietal de las muestras ciegas de polen.

MUESTRAS CIEGAS	VARIEDAD SEGÚN LA BASE DE DATOS DE LA EEZ-CSIC	PRODECENCIA	DIFUSIÓN DE LA VARIEDAD
Muestra ciega 1	Loaime	Colección de Sierra Nevada	Variedad secundaria – Granada
Muestra ciega 2	Picual	EEZ-CSIC. Granada	Variedad principal – Toda España especialmente Andalucía
Muestra ciega 3	Manzanilla de Jaén	Colección de Sierra Nevada	Variedad difundida – provincia de Jaén y Córdoba
Muestra ciega 4*	Picual estándar	Colección de Jaén	Variedad principal – Toda España especialmente Andalucía
Muestra ciega 5*	Manzanilla de Jaén	Colección de Sierra Nevada	Variedad difundida – Provincia de Jaén y Córdoba
Muestra ciega 6	Arbequina	EEZ CSIC. Granada	Variedad principal – Cataluña, Aragón y Andalucía.
Muestra ciega 7	Lucio	Colección de Sierra Nevada	Variedad secundaria – Granada
Muestra ciega 8	Lucio	Colección de Sierra Nevada	Variedad secundaria – Granada

* Estas muestras incluyen más de una variedad. La tabla indica una posible identificación de la variedad mayoritaria o más probable en cada una de ellas.

REIVINDICACIONES

1. Método de identificación del origen varietal del polen de olivo que comprende:
 - 5 a) Obtener una muestra de polen de olivo,
 - b) extraer el DNA de la muestra obtenida en (a),
 - c) amplificar marcadores SSRs en el DNA obtenido en (b),
 - d) analizar el perfil alélico de los SSRs amplificados en (c) para obtener el genotipo,
 - 10 e) comparar el genotipo del paso (d) con genotipos de variedades vegetales conocidas, y
 - f) determinar la variedad vegetal en base a la comparación de (e).

2. Método según la reivindicación 1 donde la cantidad de DNA extraído en el paso (b) es de al menos 50 ng.
15

3. Método según la reivindicación 2 donde la cantidad de DNA extraído en el paso (b) es de al menos 200 ng.

- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde los marcadores SSRs amplificados en el paso (c) son al menos 3.

5. Método según la reivindicación 4 donde los marcadores SSRs amplificados en el paso (c) son al menos 6.
25

6. Método según la reivindicación 5 donde los marcadores SSRs amplificados en el paso (c) son al menos 10.

7. Método según la reivindicación 6 donde los marcadores SSRs amplificados son 10.
30

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde los marcadores SSRs amplificados en el paso (c) se seleccionan de la lista

que comprende *ssrOeUA-DCA3*; *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16*, *ssrOeUA-DCA18*, *GAPU71B*, *GAPU59*, *GAPU101*, *GAPU103A*, *UDO99-24* y *UDO99-43*.

- 5 9. Kit de identificación del origen varietal del polen de olivo que comprende cebadores específicos para llevar a cabo un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 10 10. Kit de identificación del origen varietal del polen de olivo que comprende cebadores específicos para al menos 3 de los marcadores de la lista que comprende *ssrOeUA-DCA3*; *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16*, *ssrOeUA-DCA18*, *GAPU71B*, *GAPU59*, *GAPU101*, *GAPU103A*, *UDO99-24* y *UDO99-43*.
- 15 11. Kit de identificación del origen varietal del polen de olivo según la reivindicación 10 que comprende cebadores específicos para al menos 6 de los marcadores *ssrOeUA-DCA3*; *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16*, *ssrOeUA-DCA18*, *GAPU71B*, *GAPU59*, *GAPU101*, *GAPU103A*, *UDO99-24* y *UDO99-43*.
- 20 12. Kit de identificación del origen varietal del polen de olivo según la reivindicación 11 que comprende cebadores específicos para los marcadores *ssrOeUA-DCA3*; *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16*, *ssrOeUA-DCA18*, *GAPU71B*, *GAPU59*, *GAPU101*, *GAPU103A*, *UDO99-24* y *UDO99-43*.
- 25 13. Kit de identificación del origen varietal del polen de olivo según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 que comprende al menos 3 parejas de cebadores seleccionadas de la lista que comprende SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15-SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17-SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19-SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23-SEQ ID NO:24,
- 30

SEQ ID NO:25-SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27-SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:29-SEQ ID NO:30.

5 14.Kit de identificación del origen varietal del polen de olivo según la reivindicación 13 que comprende al menos 6 parejas de cebadores seleccionadas de la lista que comprende SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15-SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17-SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19-SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23-SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25-SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27-SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:29-SEQ ID NO:30.

15 15.Kit de identificación del origen varietal del polen de olivo según la reivindicación 14 que comprende las parejas de cebadores SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15-SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17-SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19-SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23-SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25-SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27-SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:29-SEQ ID NO:30.

RESUMEN**Método y kit para la identificación varietal del origen del polen de olivo.**

- 5 La presente invención se refiere a un método para la identificación del origen varietal del polen del olivo basado en marcadores *Simple Sequences Repeats* o Repeticiones de Secuencias Simples (SSRs) así como a un kit que comprende los elementos necesarios, preferiblemente cebadores específicos para la amplificación de los marcadores, para llevar a cabo dicho método.



Resumen

*La especie *Olea europaea* L. posee una gran diversidad genética, con un número estimado de variedades cultivadas en el mundo superior a 1200. La exploración de esta diversidad despierta un creciente interés en campos como la agronomía, la mejora genética, la industria agroalimentaria y el conocimiento del genoma de la especie. La identificación de las variedades de olivo se ha basado tradicionalmente en esquemas pomológicos que emplean marcadores agronómicos y morfológicos. A estas aproximaciones se ha unido recientemente el desarrollo de marcadores moleculares, entre los que destacan los marcadores microsatélites (SSRs). El polen, que constituye el microgametofito de las plantas espermatofitas, apenas ha sido utilizado para la clasificación de las variedades de olivo ya que la mayor parte de los métodos de discriminación han sido optimizados en materiales vegetativos diploides, especialmente en hojas. La identificación varietal del polen tiene potencialmente numerosas aplicaciones agronómicas, biotecnológicas, médicas, evolutivas y agroalimentarias. Es por ello por lo que en el presente trabajo se pretenden desarrollar y evaluar distintos métodos de clasificación varietal a partir de polen de olivo.*

Por una parte, se han utilizado distintos métodos de microscopía y de análisis morfométrico de las imágenes obtenidas para determinar la variabilidad de los caracteres más comúnmente utilizados como descriptores palinológicos: área del grano, su eje polar, su diámetro ecuatorial, el grosor de ectexina, capa basal, endexina, intina, altura de las columelas, distancias entre columelas, altura del muro, anchura del muro, área de los lúmenes y distancias entre elementos esculturales, así como la correlación entre estos parámetros y el origen varietal de las muestras. Los resultados obtenidos han demostrado el potencial considerable de este método, que constituye una herramienta adicional esencialmente utilizable en combinación con otros tipos de marcadores. Asimismo, se ha evaluado de forma preliminar la utilización de la autofluorescencia emitida por la exina en microscopía confocal también como método discriminatorio adicional no disruptivo y de fácil utilización, al no precisar de métodos de preparación de las muestras. Por otra parte, se han optimizado los protocolos para la extracción de ADN de calidad a partir del polen, y para la posterior amplificación de SSRs, demostrándose la eficacia de un panel de 10 marcadores en la identificación de 26 cultivares de olivo. La comparación de los perfiles alélicos obtenidos a partir de muestras suficientemente representativas de polen con aquellos obtenidos a partir de ADN de hojas de los mismos individuos muestra una prácticamente total identidad. Sobre estas premisas, y con objeto de permitir el desarrollo de futuras aplicaciones de la discriminación varietal del polen, ha sido generada una amplia base de datos de perfiles alélicos en variedades de olivo. Esta base cuenta con perfiles obtenidos de 183 individuos bien caracterizados varietalmente, procedentes de colecciones públicas y privadas de diversos orígenes geográficos que incluyen España, Portugal, Italia, Grecia, Túnez etc. El análisis detallado de esta base de datos ha puesto de manifiesto la gran diversidad genética presente en esta especie, permitiendo la identificación de 90 genotipos diferentes, así como un número considerable de confusiones en la identificación de variedades. También han sido establecidas las relaciones genéticas entre los genotipos identificados y han sido detectadas tendencias de agrupación entre los individuos analizados. La comparación entre las anteriores clasificaciones basadas respectivamente en el uso de parámetros morfológicos del polen y en marcadores SSR indica que los resultados obtenidos en ambos casos son consistentes, comparables y en muchos casos complementarios.

Finalmente, en una de las aplicaciones prácticas del método SSR en polen se ha podido identificar con certeza el origen varietal de 8 muestras ciegas de polen comercial suministrado por una empresa especializada en la fabricación de vacunas alérgicas desensibilizantes. Sin embargo, se ha revelado que el método desarrollado es de momento incapaz de identificar el origen varietal de las citadas vacunas, dado que incluyen únicamente trazas de ADN procedente del polen usado para preparar los extractos. Son esperables futuros desarrollos de la técnica, así como numerosas aplicaciones tanto en el olivo como en otras especies, que son ampliamente discutidas.