



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 190 740**

② Número de solicitud: 200102147

⑤ Int. Cl.7: **C12Q 1/08**
A01H 1/04

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **25.09.2001**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2003**

Fecha de la concesión: **17.05.2004**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.06.2004**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.06.2004

⑰ Titular/es: **Universidad de Málaga**
Plaza de El Ejido, s/n
29071 Málaga, ES

⑱ Inventor/es: **Claros Díaz, Gonzalo;**
Bautista Moreno, Rocio y
Cánovas Ramos, Francisco M.

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Método para la identificación de variedades de olivo (Olea europea) mediante la utilización de marcadores moleculares específicos, de los tipos SCAR y CAP, que usan como sustrato ADN de olivo.**

㉑ Resumen:

Método para la identificación de variedades de olivo (Olea europea) mediante la utilización de marcadores moleculares específicos, de los tipos SCAR y CAP, que usan como sustrato ADN de olivo, en el que las secuencias oligonucleotídicas que permiten la obtención de los marcadores moleculares específicos se diseñan a partir de los polimorfismos de ADN localizados en las variedades de olivo a identificar.

La naturaleza de este método permite su aplicación a cualquier especie vegetal, de modo que se puede utilizar como sistema de identificación de sus diferentes variedades.

ES 2 190 740 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Método para la identificación de variedades de olivo (*Olea europea*) mediante la utilización de marcadores moleculares específicos, de los tipos SCAR y CAP, que usan como sustrato ADN de olivo.

5 Sector de la técnica

El presente método tiene su aplicación en la industria olivarera (almazaras, molinos, viveros, etc) que desee identificar, certificar o seleccionar las variedades de olivo objeto de este estudio que estén siendo utilizadas para la fabricación de aceites o en las destinadas para aceituna de mesa. Esta técnica igualmente puede ser aplicada para la mejora genética de los cultivares y en la identificación de los árboles de una plantación con el fin de seleccionar los más propicios para cada ambiente o requerimiento agronómico.

Estado de la técnica

15 Hasta el momento no existe un sistema fiable de identificación de variedades de olivo que suministre suficiente fiabilidad. Las técnicas disponibles, basadas la mayoría de ellas en caracteres morfológicos y pomológicos (*Barranco y Rallo, 1984*), no satisfacen las demandas del sector olivarero que cada vez exige más un sistema que aporte seguridad en la determinación varietal. Se han abordado otras estrategias basadas en el análisis de contenido en diversos ácidos grasos y otros componentes volátiles y no volátiles en los aceites pero esto no ha conseguido aportar mayor claridad en la identificación. Otro criterio que se ha propuesto ha sido la utilización de diferentes patrones de isoenzimas en distintas variedades. Esta técnica presenta un gran inconveniente puesto que depende del estado de desarrollo, tejido utilizado y tratamiento de extracción proteica.

25 La escasa fiabilidad proporcionada por las pruebas antes descritas para determinar variedades de olivos, aceitunas y aceites han llevado a la búsqueda de tipos de marcadores que estén basados en características invariables en cada variedad y que no dependan de la estación climática, tejido, estado desarrollo o cualquier otro criterio de baja fiabilidad.

30 Como alternativa a estos métodos existen los marcadores moleculares basados en el uso de ADN. En este sentido, se han realizado algunas aproximaciones, pero éstas han estado siempre basadas en el uso de marcadores moleculares inespecíficos del tipo amplificación de fragmentos polimórficos de ADN al azar (RAPID), una técnica de gran utilidad pero cuya repetitividad esta condicionada por numerosos factores y cuya aplicabilidad como criterio para diferenciar variedades es reducido. Los estudios llevados a cabo en este sentido, normalmente han comprendido un bajo número de variedades lo que ha dado lugar a que la información obtenida haya sido aún menor.

40 En la presente patente se presenta por primera vez un sistema basado en la detección de marcadores moleculares específicos de ADN como criterio de clasificación y determinación varietal. El método proporciona un elevado grado de repetitividad y por tanto de aplicabilidad.

Explicación

45 La patente que se propone es el procedimiento para la caracterización e identificación de variedades de olivo (*Olea europea*) mediante la realización de una serie de ensayos PCR independientes, en cada uno de los cuales se utiliza una determinada pareja de oligonucleótidos que usan como sustrato el ADN de olivo y amplifican un fragmento de ADN característico de un marcador molecular específico. El patrón de presencias y ausencias de todos estos marcadores moleculares específicos, obtenido tras la realización de los ensayos, es característico de cada variedad, de modo que la combinación de presencias y ausencias de los diferentes marcadores en la variedad analizada permite en primer lugar caracterizarla, e identificarla si coincide con el patrón de alguna de las variedades indicadas en esta patente.

55 El procedimiento esencialmente consiste en la realización de 11 ensayos, en cada uno de los cuales se mezcla en un tubo de ensayo el ADN de olivo a identificar con una de las parejas de oligonucleótidos que detecta un marcador molecular específico. Cada uno de los tubos de ensayo en los que hay ADN de olivo a identificar con una de las parejas de oligonucleótidos, se introduce en un termociclador para realizar una PCR. Los resultados de cada una de estas reacciones se migran en una electroforesis en geles de agarosa no desnaturizantes y se evalúa el patrón de amplificación producido en cada una de ellas. El conjunto de todas las amplificaciones obtenidas con cada una de las reacciones es lo que permite caracterizar la variedad analizada e identificarla si coincide con el patrón de alguna de las variedades conocidas.

60 La utilización de cada pareja por separado o un subconjunto parcial de estas parejas no garantiza

un resultado fiable, porque son tan significativas las presencias como las ausencias de los marcadores moleculares y esto sólo se puede poner de manifiesto si se utilizan todas las parejas de oligonucleótidos. Si se obtuviese un patrón (conjunto de presencias y ausencias) que no cuadrara con ninguno de los descritos en esta invención para las variedades conocidas, supondría que la variedad de olivo usada en el ensayo no está entre las descritas en la patente.

La naturaleza de este método permitiría su aplicación a cualquier especie vegetal, de tal modo que se podría utilizar como sistema de caracterización e identificación de sus diferentes variedades.

10 Explicación detallada de un modo de realización

Para disponer de ADN genómico de olivo se emplea una técnica puesta a punto por los autores de esta patente, en la que el ADN se extrae de las hojas del olivo. De forma resumida, el protocolo consiste en la extracción del ADN a partir de hojas de olivo con nitrógeno líquido en un mortero con un tampón que contiene CTAB (Bromuro de N-cetil-trietilamina) y PVP insoluble (Sigma), la solución es posteriormente extraída con cloroformo y precipitado el ADN, que es resuspendido en TE (Tris-EDTA). Los detalles se encuentran en Claros *et al*, *Euphytica* 116:131-142, 2000.

En la misma publicación se describe detalladamente el procedimiento seguido para la selección de marcadores moleculares inespecíficos por el método de amplificaciones al azar de polimorfismos de ADN (RAPD). Para ello se utilizaron diversos decanucleótidos disponibles comercialmente, que se muestran en la tabla 1 y que se identifican en la Lista de secuencias. De los polimorfismos descritos en la citada publicación se seleccionaron los más significativos para diseñar las parejas de oligonucleótidos que permiten detectar la presencia o ausencia de los marcadores moleculares específicos tal como se describe en la presente patente.

TABLA 1
Decanucleótidos usados para obtener marcadores moleculares inespecíficos

decanucleótido	secuencia	Lista de secuencias
OPX04	ccgctaccga	SEC.ID.Nº1
OPF10	ggaaccttgg	SEC.ID.Nº2
OPAH02	cacttccgct	SEC.ID.Nº3
OPJ18	tggtcgcaga	SEC.ID.Nº4
OPJ06	tcgttccgca	SEC.ID.Nº5
OPJ01	cccggcataa	SEC.ID.Nº6
OPF8	ctctgcctga	SEC.ID.Nº7
OPF6	gggaattcgg	SEC.ID.Nº8

Los marcadores moleculares inespecíficos se seleccionaron atendiendo a criterios de repetitividad en su aparición en sucesivos ensayos, intensidad de amplificación y facilidad para ser purificados a partir de geles de agarosa. También se tuvieron en cuenta en la selección criterios agronómicos de forma que se seleccionaron preferentemente polimorfismos presentes en las variedades de olivo que por su extensión y explotación tienen más importancia económica. El ADN de cada variedad es la mezcla del material genético de 10 árboles distintos con el fin de tener en cuenta la variabilidad genética que puede existir en cada una de ellas.

Los polimorfismos detectados por RAPD fueron clasificados y finalmente se escogieron 11 de ellos, atendiendo a los criterios indicados en el párrafo anterior.

ES 2 190 740 B1

Los 11 polimorfismos seleccionados indicando su tamaño en longitud de pares de bases (pb) son los siguientes:

- fragmento de ADN de 408 pb de la variedad Aloreña
- fragmento de ADN de 978 pb de la variedad Blanqueta
- fragmento de ADN de 453 pb de la variedad Verdial de la Axarquía
- fragmento de ADN de 756 pb de la variedad Hojiblanca
- fragmento de ADN de 978 pb de la variedad Acebuche Fino
- fragmento de ADN de 447 pb de la variedad Verdial de la Axarquía
- fragmento de ADN de 310 pb de la variedad Hojiblanca
- fragmento de ADN de 303 pb de la variedad Hojiblanca
- fragmento de ADN de 264 pb de la variedad Verdial de la Axarquía
- fragmento de ADN de 225 pb de la variedad Verdial de la Axarquía

Estos polimorfismos han sido los utilizados para diseñar las parejas de oligonucleótidos que permiten detectar los marcadores moleculares específicos, que se citan en la primera columna de la Tabla 2. Es el conjunto de presencias y ausencias de estos marcadores moleculares específicos lo que permitirá caracterizar e identificar las variedades de olivo.

Estos polimorfismos, detectados por RAPD y posteriormente seleccionados, se purificaron a partir de preparaciones que fueron sometidas a migración electroforética en geles de agarosa (Sambrook et al, "Molecular Cloning" editado por Cold Spring Harbor Laboratory Press en New York, 1989). Los fragmentos obtenidos se clonaron en vectores comerciales *pGEM-T* (Promega) o *pBluescriptSK+* (Stratagene), y se secuenciaron total o parcialmente. La secuencia obtenida para cada uno de los polimorfismos se utilizó para diseñar las parejas de oligonucleótidos, cada uno entorno a 20 pares de bases de longitud (Tabla 2), que permitieran llevar a cabo los ensayos por PCR para detectar la presencia o ausencia de los marcadores moleculares específicos, que se citan en la primera columna de la Tabla 2, en la que además se indica la longitud en pares de bases (pb) del fragmento de ADN obtenido una vez efectuada la PCR y que caracteriza la presencia del marcador. Los oligonucleótidos diseñados unas veces incluyen la secuencia del decanucleótido RAPD y otras veces no.

TABLA 2

Marcadores moleculares específicos indicando longitud en pares de bases (pb) del fragmento de ADN obtenido tras la PCR y que caracteriza su presencia, parejas de oligonucleótidos usados para su detección, secuencia de los oligonucleótidos, identificación de los oligonucleótidos en la Lista de secuencias y temperatura de alineamiento que ha de utilizarse en la reacción de PCR

Marcador Molecular Específico (pb)	Pareja de oligonucleótidos usada para detectar el marcador	Secuencia de cada oligonucleótido	Lista Secuencias	Temperatura alineamiento
GX4B (337)	GX4B-U GX4B-R	5'-cacttcaacaactttatcga-3' 5'-ttcatcttctcccaaaag-3'	SEC.ID.Nº9 SEC.ID.Nº10	54°C 56°C
GH1 (904)	GH1-U GH1-R	5'-tccacatcatagccaacctt-3' 5'-catgattatatagtcaggc-3'	SEC.ID.Nº11 SEC.ID.Nº12	56°C 58°C
PH2 (720) (740) (780)	PH2-U PH2-R	5'-cacttccgctcattgaagta-3' 5'-cacttccgctgaaactta-3'	SEC.ID.Nº13 SEC.ID.Nº14	58°C 56°C

ES 2 190 740 B1

TABLA 2 (Continuación)

5	Marcador Molecular Específico (pb)	Pareja de oligonucleótidos usada para detectar el marcador	Secuencia de cada oligonucleótido	Lista Secuencias	Temperatura alineamiento
10	GF10 (358)	GF10-U GF10-R	5'-gtgccaatttctgacatttt-3' 5'-acctgataggggaagatttat-3'	SEC.ID.N°15 SEC.ID.N°16	54°C 54°C
15	PF6 (756)	PF6-U PF6-R	5'-gggaattccgcagaactaaa-3' 5'-gggaattccggcacatcctt-3'	SEC.ID.N°17 SEC.ID.N°18	58°C 62°C
20	PJ65 (978)	PJ65-t7 PJ65-t3	5'-tcgttccgcaagttaagaac-3' 5'-tcgttccgcatgtattgtgg-3'	SEC.ID.N°19 SEC.ID.N°20	58°C 60°C
25	PJ11 (447)	PJ11-t7 PJ11-t3	5'-cccggcataatttcgggctc-3' 5'-cccggcataaaccaaatatt-3'	SEC.ID.N°21 SEC.ID.N°22	64°C 54°C
30	PF83 (310)	PF83-t7 PF83-t3	5'-ctctgccgatggtctaggc-3' 5'-ctctgctgaaacagaatt-3'	SEC.ID.N°23 SEC.ID.N°24	56°C 64°C
35	PF80 (303)	PF80-t7 PF80-t3	5'-ctctgctgagttctagtga-3' 5'-ctctgctgaaccaacagaa-3'	SEC.ID.N°25 SEC.ID.N°26	60°C 60°C
40	PF84 (264) (750)	PF84-t7 PF84-t3	5'-ctctgctgaacatattgct-3' 5'-ctctgctgagagatgccta-3'	SEC.ID.N°27 SEC.ID.N°28	58°C 62°C
45	GJ18 (225) (50)	GJ18-U GJ18-R	5'-tggctgcagacggtagcgcgt-3' 5'-tggctgcagaacacgattac-3'	SEC.ID.N°29 SEC.ID.N°30	60°C 66°C

A continuación se describen detalladamente los 11 marcadores, indicados en la Tabla 2, que son los que se han utilizado para la caracterización e identificación de las variedades de olivo:

GX4B. Este marcador se dedujo de un fragmento de ADN de 408 pb de la variedad Alorea. A partir de la secuencia de nucleótidos de este fragmento se diseñaron los dos oligonucleótidos, GX4B-U (SEQ.ID.N°9) y GX4B-R (SEQ.ID. N°10), que por PCR dan lugar a la amplificación de un fragmento de 337 pb, que corresponde al marcador molecular específico GX4B. Antes de analizar mediante electroforesis de agarosa no desnaturante el resultado de la PCR, es necesario digerir enzimáticamente con la enzima de restricción *EcoRI* para obtener los tres fragmentos de ADN característicos del marcador GX4B, de 132, 247 y 379 pb respectivamente (Tabla 3). El hecho de que la suma de las longitudes de estos tres fragmentos de ADN, que se generan tras el tratamiento enzimático, no coincida con la longitud de la banda que se ve inicialmente tras la PCR, de 337 posiblemente se debe a que esta banda corresponde a dos marcadores que migran en la misma posición. La temperatura de alineamiento para la tercera etapa de la PCR fue de 57°C.

GH1. Este marcador se dedujo de un fragmento de ADN de 978 pb de la variedad Blanqueta. A partir de la secuencia de nucleótidos de este fragmento se diseñaron los dos oligonucleótidos, GH1-U (SEQ.ID.N°11) y GH1-R (SEQ.ID.N°12), que por PCR dan lugar a la amplificación de un fragmento de ADN de 904 pb, que corresponde al marcador molecular específico GH1 (Tabla 3). La temperatura de alineamiento para la tercera etapa de la PCR fue de 55°C.

PH2. Este marcador se dedujo de un fragmento de ADN de 720 pb de la variedad Picudo. A partir de la secuencia de nucleótidos de este fragmento se diseñaron dos oligonucleótidos, PH2-U (SEQ.ID.N°13) y PH2-R (SEQ.ID.N°14), que por PCR dan lugar a la amplificación de fragmentos que según la variedad pueden ser de 720, 740 o 780 pb. El producto del ensayo es necesario digerirlo enzimáticamente con la

ES 2 190 740 B1

enzima de restricción *Rsal* para obtener los cinco fragmentos de ADN característicos del marcador PH2, de 290, 300, 350, 430 y 440 pb respectivamente (Tabla 3). La temperatura de alineamiento para la tercera etapa de la PCR fue de 60°C.

5 *GF10*. Este marcador se dedujo de un fragmento de ADN de 453 pb de la variedad Verdial de la Axarquía. A partir de la secuencia de nucleótidos de este fragmento se diseñaron dos oligonucleótidos, GF10-U (SEQ.ID.N°15) y GF10-R (SEQ.ID.N°16), que por PCR dan lugar a la amplificación de un fragmento de ADN de 358 pb característico del marcador GF10 (Tabla 3). La temperatura de alineamiento para la tercera etapa de la PCR fue de 57°C.

10 *PF6*. Este marcador se dedujo de un fragmento de ADN de 756 pb de la variedad Hojiblanca. A partir de la secuencia de nucleótidos de este fragmento se diseñaron dos oligonucleótidos, PF6-U (SEQ.ID.N°17) y PF6-R (SEQ.ID.N°18), que por PCR dan lugar a la amplificación de un fragmento de ADN de 756 pb característico del marcador PF6 (Tabla 3). La temperatura de alineamiento para la tercera etapa de la PCR fue de 63°C.

15 *PJ65*. Este marcador se dedujo de un fragmento de ADN de 978 pb de la variedad Acebuche fino. A partir de la secuencia de nucleótidos de este fragmento se diseñaron dos oligonucleótidos, PJ65t3 (SEQ.ID.N°19) y PJ65-t7 (SEQ.ID.N°20), que por PCR dan lugar a la amplificación de fragmentos de ADN característicos del marcador PJ65, que según la variedad pueden ser de 978 y 1250 pb (Tabla 3). La temperatura de alineamiento para la tercera etapa de la PCR fue de 63°C.

20 *PJ11*. Este marcador se dedujo de un fragmento de ADN de 447 pb de la variedad Verdial de la Axarquía. A partir de la secuencia de nucleótidos de este fragmento se diseñaron dos oligonucleótidos, PJ 11-t7 (SEQ.ID.N°21) y PJ11-t3 (SEQ.ID.N°22), que por PCR dan lugar a la amplificación de un fragmento de ADN de 447 pb, característico M marcador PJ 11 (Tabla 3). La temperatura de alineamiento para la tercera etapa de la PCR fue de 63°C.

30 *PF83*. Este marcador se dedujo de un fragmento de ADN de 310 pb de la variedad Hojiblanca. A partir de la secuencia de nucleótidos de este fragmento se diseñaron dos oligonucleótidos, PF83-t7 (SEQ.ID.N°23) y PF83-t3 (SEQ.ID.N°24), que por PCR dan lugar en todas las variedades a la amplificación de un fragmento de ADN de 310 pb, característico M marcador PF83 (Tabla 3). Atendiendo a la intensidad de 1 amplificación del fragmento de ADN característico de este marcador, se ha definido su presencia de dos formas: alta intensidad (+) y baja intensidad (-), La temperatura de alineamiento para la tercera etapa de la PCR fue de 63°C.

35 *PF80*. Este marcador se dedujo de un fragmento de ADN de 303 pb de la variedad Hojiblanca. A partir de la secuencia de nucleótidos de este fragmento se diseñaron dos oligonucleótidos, PF80-t7 (SEQ.ID.N°25) y PF80-t3 (SEQ.ID.N°26), que por PCR dan lugar a la amplificación de un fragmento de ADN de 303 pb característicos M marcador PF80 (Tabla 3). La temperatura de alineamiento para la tercera etapa de la PCR fue de 65°C.

45 *PF84*. Este marcador se dedujo de un fragmento de ADN de 264 pb de la variedad Verdial de la Axarquía. A partir de la secuencia de nucleótidos de este fragmento se diseñaron dos oligonucleótidos, PF84-t7 (SEQ.ID.N°27) y PF84-t3 (SEQ.ID.N°28), que por PCR dan lugar a la amplificación de un fragmento de ADN de 264 pb en todas las variedades así como otro de 750 pb en algunas de las variedades. El producto del ensayo es necesario digerirlo enzimáticamente con la enzima de restricción *Hinfl* para obtener los fragmentos característicos M marcador PF84 de 101, 163 y 750 pb respectivamente (Tabla 3). En esta tabla no se ha referido la existencia en todas las variedades analizadas de una banda de 264 pb ya que ésta se encuentra presente en todas ellas y por tanto no aporta información adicional. La temperatura de alineamiento para la tercera etapa de la PCR fue de 60°C.

50 *GJ18*. Este marcador se dedujo de un fragmento de ADN de 225 pb de la variedad Verdial de la Axarquía. A partir de la secuencia de nucleótidos de este fragmento se diseñaron dos oligonucleótidos, GJ18-U (SEQ.ID.N°29) y GJ18-R (SEQ.ID.N°30), que por PCR dan lugar a la amplificación de un fragmento de ADN de 225 pb y en algunos casos también de un fragmento de 50 pb característicos del marcador GJ18. La temperatura de alineamiento para la tercera etapa de la PCR fue de 63°C.

60 Los ensayos de PCR se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Paran y Michelmore, en *Theor Appl Genet* 85: 985-993, 1993. Para cada marcador molecular específico detectado por una pareja de oligonucleótidos se prepara una mezcla de reacción en la que en un tubo de 200µl de pared fina se depositan 20µl de reacción conteniendo 20 ng de ADN de olivo a identificar, (NH₄)₂SO₄ 16,6 mM,

ES 2 190 740 B1

Tris-HCl (pH 8,8 a 25°C) 67 mM, Tween-20 0,01 % (p/v), MgCl₂ 2mM, 0,4 μM de cada oligonucleótido específico de cada pareja, mezcla de dNTP 0,1 mM y Ectaq polimerasa 0,025 unidades/μl. Las ampli-
 ficaciones se llevaron a cabo siguiendo un programa de PCR que se muestra a continuación, optimizado
 para la amplificación de los fragmentos de ADN característicos de estos marcadores:

- 5 1°. 91°C 1 minuto
- 2°. 91°C 1 minuto
- 10 3°. Temperatura de alineamiento específica para cada marcador. 1 minuto
- 4°. 72°C 2,5 minutos
- 5°. Repetición 30 veces de los pasos 2 a 4
- 15 6°. 72°C 7 minutos
- 7°. 4°C 1 hora

Una vez terminada la PCR, el contenido de cada uno de los tubos debe migrarse en una electroforesis
 en geles de agarosa no desnaturizante siguiendo los Métodos convencionales. Al terminar la electroforesis
 20 y visualizar el gel bajo luz ultravioleta, se pueden ver los fragmentos de ADN amplificados obtenidos
 como producto de amplificación en cada uno de los tubos. La presencia o ausencia de los fragmentos de
 ADN de cada marcador específico nos da el patrón característico de la variedad analizada, permitiendo su
 caracterización. Este patrón obtenido se compara con los patrones descritos en la Tabla 3 lo que permite
 25 la identificación de la variedad en caso de que coincida con alguno de ellos. En caso de que no coincida
 con ninguno nos permitiría concluir que la variedad analizada no es ninguna de las identificadas en esta
 patente.

Con el fin de poder diferenciar todas las variedades, y además hacerlo con un mayor nivel de garantía,
 las PCR de los marcadores GX4B, PH2 y PF84 hay que digerirlas enzimáticamente siguiendo métodos
 30 convencionales con las enzimas indicadas para cada uno de ellos (*EcoRI*, *RsaI* y *HinfI*). Se recomienda la
 utilización de endonucleasas de la casa *Roche*.

El resultado obtenido permite identificar cada una de las 22 variedades de olivo descritas en la Tabla
 3 con el uso de tan solo 11 marcadores moleculares específicos. La tabla 3 permite analizar claramente
 35 el resultado obtenido para cada marcador con cada una de las variedades de olivo estudiadas.

TABLA 3

40 *Patrones característicos de presencia (+) y ausencia (-) de los fragmentos de ADN característicos de
 los marcadores moleculares específicos, que se pueden obtener en ensayos PCR con los oligonucleótidos
 específicos indicados en esta patente, en las 22 variedades de olivo que se indican en la primera columna
 de la Tabla. En el caso de PF83-310, los signos + y - significan intensa y débil presencia del marcador
 molecular específico. En cada columna se especifica el tamaño de los fragmentos de ADN en pares de
 bases que caracteriza la presencia del marcador molecular específico*

Marcador Molecular →	GX4B/ <i>EcoRI</i>			GHI	PH2/ <i>RsaI</i>					GF10
Variedad ↓	132	247	379	904	290	300	350	430	440	358
Aloreña	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
Acebuche fino	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
55 Acebuche basto	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
Zorzaleño	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
60 Picudo de El Burgo	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+

ES 2 190 740 B1

TABLA 3 (Continuación)

Marcador Molecular →	GX4B/ <i>EcoRI</i>			GH1	PH2/ <i>RsaI</i>					GF10
Variedad ↓	132	247	379	904	290	300	350	430	440	358
Verdial de la Axarquía	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
Blanqueta	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
Hojiblanca	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
Gordial de Archidona	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
Picudo de la Axarquía	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
Nevadillo blanco	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
Arbequina	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
Manzanillo sevillano	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
Lechín de Granada	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
Picudo de Baena	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
Picual	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
Hojiblanca Gaona	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
Morisco	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
Verdial de Ronda	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
Lechín de Sevilla	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
Picudo de Ronda	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
Chorrúo	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+

50

55

60

ES 2 190 740 B1

TABLA 3 (Continuación)

	Marcador Molecular →	PF6	PJ65		PJ11	PF83	PF80	PF84/ <i>Hinfl</i>			GJ18	
5	Variedad ↓	756	978	1250	447	310(*)	303	101	163	750	50	225
	Alore a	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
10	Acebuche fino	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+
	Acebuche basto	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
15	Zorzaleño	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
	Picudo de El Burgo	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
20	Verdial de la Axarquía	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	Blanqueta	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
25	Hojiblanca	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+
	Gordial de Archidona	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
30	Picudo de la Axarquía	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
	Nevadillo blanco	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
35	Arbequina	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
	Manzanillo sevillano	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
40	Lechín de Granada	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
	Picudo de Baena	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
	Picual	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
45	Hojiblanca Gaona	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	Morisco	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
50	Verdial de Ronda	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
	Lechín de Sevilla	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
55	Picudo de Ronda	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
	Chorrúo	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+

60

REIVINDICACIONES

1. Método para la caracterización e identificación de variedades de olivo consistente en la realización de una serie de ensayos PCR independientes, en cada uno de los cuales se dispone de un medio adecuado que contiene el ADN de olivo a analizar al que se añade una cantidad suficiente de una determinada pareja de oligonucleótidos, diferentes para cada ensayo, que usan como sustrato el ADN de olivo y amplifican un fragmento de ADN característico de un marcador molecular específico.

2. Método para la caracterización e identificación de variedades de olivo según reivindicación 1, en el que en cada ensayo se utiliza una de las siguientes parejas de oligonucleótidos, hasta completar la serie de ensayos cada uno realizado con una de las parejas:

- Pareja en la que un oligonucleótido comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 9 y el otro oligonucleótido comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 10.

- Pareja en la que un oligonucleótido comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 11 y el otro oligonucleótido comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 12.

- Pareja en la que un oligonucleótido comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 13 y el otro oligonucleótido comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 14.

- Pareja en la que un oligonucleótido comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 15 y el otro oligonucleótido comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 16.

- Pareja en la que un oligonucleótido comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 17 y el otro oligonucleótido comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 18.

- Pareja en la que un oligonucleótido comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 19 y el otro oligonucleótido comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 20.

- Pareja en la que un oligonucleótido comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 21 y el otro oligonucleótido comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 22.

- Pareja en la que un oligonucleótido comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 23 y el otro oligonucleótido comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 24.

- Pareja en la que un oligonucleótido comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 25 y el otro oligonucleótido comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 26.

- Pareja en la que un oligonucleótido comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 27 y el otro oligonucleótido comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 28.

- Pareja en la que un oligonucleótido comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 29 y el otro oligonucleótido comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 30.

3. Método para la caracterización e identificación de variedades de olivo según reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque:

- En el ensayo en el que se añade el oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 9 y el oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 10, el fragmento de ADN amplificado por PCR hay que digerirlo enzimáticamente con la enzima de restricción *EcoRI* para obtener los fragmentos de ADN característicos del marcador molecular específico.

ES 2 190 740 B1

5 - En el ensayo en el que se añade el oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 13 y el oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 14, el fragmento de ADN amplificado por PCR hay que digerirlo enzimáticamente con la enzima de restricción *Rsal* para obtener los fragmentos de ADN característicos del marcador molecular específico.

10 - En el ensayo en el que se añade el oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 27 y el oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID. N°: 28, el fragmento de ADN amplificado por PCR hay que digerirlo enzimáticamente con la enzima de restricción *Hinfl* para obtener los fragmentos de ADN característicos del marcador molecular específico.

15 4. Uso de las parejas de oligonucleótidos que comprenden las secuencias de nucleótidos mostradas en las SEC. ID. N°: 9 y N°: 10, N°: 11 y N°: 12, N°: 13 y N°: 14, N°: 15 y N°: 16, N°: 17 y N°: 18, N°: 19 y N°: 20, N°: 21 y N°: 22, N°: 23 y N°: 24, N°: 25 y N°: 26, N°: 27 y N°: 28, N°: 29 y N°: 30, u otras cuyo diseño se deduzca de las mismas, en un método para la caracterización e identificación de variedades de olivo como el de las reivindicaciones anteriores.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

ES 2 190 740 B1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Universidad de Málaga
- 5 <120> Método para la caracterización e identificación de variedades de olivo
- <140> P 200102147
- 10 <141> 25/09/2001
- <160> 30
- 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <140> P 200102147
- 20 <141> 25/09/2001
- <210> 1
- <211> 10
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 30 <223> Oligonucleótido cebador
- <400> 1
- 35 ccgctaccga 10
- <140> P 200102147
- <141> 25/09/2001
- 40 <210> 2
- <211> 10
- 45 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <223> Oligonucleótido cebador
- 50 <400> 2
- ggaaccttgg 10
- 55 <140> P 200102147
- <141> 25/09/2001
- 60 <210> 3
- <211> 10

ES 2 190 740 B1

<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5 <223> Oligonucleótido cebador
<400> 3
cacttccgct 10 10
10
<140> P 200102147
<141> 25/09/2001
15
<210> 4
<211> 10
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<223> Oligonucleótido cebador
25
<400> 4
tggtcgcaga 10 10
30
<140> P 200102147
<141> 25/09/2001
35 <210> 5
<211> 10
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial
<223> Oligonucleótido cebador
45 <400> 5
tcgttccgca 10 10
50
<140> P 200102147
<141> 25/09/2001
<210> 6
55 <211> 10
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial
<223> Oligonucleótido cebador

ES 2 190 740 B1

<400> 6
cccggcataa 10
5
<140> P 200102147
<141> 25/09/2001
10
<210> 7
<211> 10
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<223> Oligonucleótido cebador
20
<400> 7
ctctgcctga 10
25
<140> P 200102147
<141> 25/09/2001
30 <210> 8
<211> 10
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial
<223> Oligonucleótido cebador
40 <400> 8
gggaattcgg 10
45 <140> P 200102147
<141> 25/09/2001
<210> 9
50 <211> 20
<212> ADN
55 <213> Olea europea
<400> 9
cacttcaaca actttatcga 20
60
<140> P 200102147

ES 2 190 740 B1

<141> 25/09/2001
<210> 10
5 <211> 20
<212> ADN
10 <213> Olea europea
<400> 10
ttcatcttct tccacaaag 20
15
<140> P 200102147
<141> 25/09/2001
20 <210> 11
<211> 20
25 <212> ADN
<213> Olea europea
<400> 11
30 tccacatcat agccaacctt 20

<140> P 200102147
35 <141> 25/09/2001
<210> 12
40 <211> 20
<212> ADN
<213> Olea europea
45 <400> 12
catgattata tagtccagge 20
50
<140> P 200102147
<141> 2510912001
55 <210> 13
<211> 20
<212> ADN
60 <213> Olea europea

ES 2 190 740 B1

	<400> 13	
	cacttccgct cattgaagta	20
5	<140> P 200102147	
	<141> 25/09/2001	
10	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> Olea europea	
	<400> 14	
20	cacttccgct gaagattaat	20
	<140> P 200102147	
25	<141> 25/09/2001	
	<210> 15	
	<211> 20	
30	<212> ADN	
	<213> Olea europea	
35	<400> 15	
	gtgccaattt ctgacatttt	20
40	<140> P 200102147	
	<141> 25/09/2001	
	<210> 16	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
50	<213> Olea europea	
	<400> 16	
	acctgatagg gaagatttat	20
55	<140> P 200102147	
	<141> 25/09/2001	
60	<210> 17	

ES 2 190 740 B1

<211> 20
<212> ADN
5 <213> Olea europea
<400> 17
gggaattccg cagaactaaa 20
10
<140> P 200102147
<141> 25/09/2001
15 <210> 18
<211> 20
20 <212> ADN
<213> Olea europea
<400> 18
25 gggaattccg gcacatcctt 20

<140> P 200102147
30 <141> 25/09/2001
<210> 19
35 <211> 20
<212> ADN
<213> Olea europea
40 <400> 19
tcgttccgca agttaagaac 20
45
<140> P 200102147
<141> 25/09/2001
50 <210> 20
<211> 20
<212> ADN
55 <213> Olea europea
<400> 20
60 tcgttccgca tgtattgtgg 20

ES 2 190 740 B1

<140> P 200102147
<141> 2510912001
5 <210> 21
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Olea europea
<400> 21
15 cccggcataa tttcgggctc 20

<140> P 200102147
20 <141> 2510912001
<210> 22
<211> 20
25 <212> ADN
<213> Olea europea
30 <400> 22
cccggcataa accaaatatt 20

35 <140> P 200102147
<141> 2510912001
<210> 23
40 <211> 19
<212> ADN
45 <213> Olea europea
<400> 23
ctctgccgat ggtctaggc 19
50
<140> P 200102147
<141> 2510912001
55 <210> 24
<211> 19
60 <212> ADN
<213> Olea europea

ES 2 190 740 B1

<400> 24	
ctctgcctga aacagaatt	19
5	
<140> P 200102147	
<141> 2510912001	
10	
<210> 25	
<211> 20	
15	
<212> ADN	
<213> Olea europea	
<400> 25	
20	
ctctgcctga gttctagtga	20
<140> P 200102147	
25	
<141> 2510912001	
<210> 26	
30	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Olea europea	
35	
<400> 26	
ctctgcctga accaacagaa	20
40	
<140> P 200102147	
<141> 25109120 01	
45	
<210> 27	
<211> 20	
<212> ADN	
50	
<213> Olea europea	
<400> 27	
55	
ctctgcctga acatattgct	20
<140> P 200102147	
60	
<141> 2510912001	
<210> 28	

ES 2 190 740 B1

<211> 20
<212> ADN
5 <213> Olea europea
<400> 28
10 ctctgcctga gagatgccta 20

<140> P 200102147
15 <141> 2510912001
<210> 29
<211> 20
20 <212> ADN
<213> Olea europea
25 <400> 29
tggtcgcaga cggtagcgt 20

<140> P 200102147
<141> 2510912001
<210> 30
35 <211> 20
<212> ADN
40 <213> Olea europea
<400> 30
tggtcgcaga acacgattac 20
45

50

55

60



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 190 740

② Nº de solicitud: 200102147

③ Fecha de presentación de la solicitud: **25.09.2001**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12Q 1/68, A01H 1/04

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	ZIJLSTRA C. Identification of Meloidogyne chitwoodi, M. fallas and M. hapla based on SCAR-PCR: A powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. European Journal of Plant Pathology. Marzo 2000, Vol. 106, nº 3, páginas 283-290.	1,2,4
Y	HERNANDEZ P. et al. First evidence of a retrotransposon-like element in olive (Olea europea): Implications in plant variety identification by SCAR-marker development. Theoretical and Applied Genetics. Mayo 2001, Vol. 102, Nº 6-7, páginas 1082-1087.	1,2,4
A	WO 9856948 A1 (PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL) 17.12.1998	1-4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

30.06.2003

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/1