



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
*Facultad de Ciencias Experimentales*

Trabajo Fin de Grado

# **Utilización de un set de microsatélites para la tipificación y determinación de su huella alélica en nuevos cultivares de olivo**

**Alumno: Josefa León Ruiz**

**Julio, 2018**



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
*Facultad de Ciencias Experimentales*



Trabajo Fin de Grado

**Utilización de un set de  
microsatélites para la  
tipificación y  
determinación de su  
huella alélica en nuevos  
cultivares de olivo**

Alumno: Josefa León Ruiz

Julio, 2018

## Índice

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Resumen .....                                                                                          | 4  |
| 2. Abstract .....                                                                                         | 4  |
| 3. Introducción .....                                                                                     | 5  |
| 3.1. Generalidades del olivo .....                                                                        | 5  |
| 3.2. Importancia del olivar .....                                                                         | 6  |
| 3.3. Microsatélites o marcadores SSR .....                                                                | 8  |
| 3.3.1. ¿Cómo se generan los microsatélites? .....                                                         | 9  |
| 3.3.2. Aplicaciones de los marcadores SSR .....                                                           | 10 |
| 3.4. Identificación de las variedades de olivo .....                                                      | 10 |
| 4. Objetivos.....                                                                                         | 12 |
| 5. Materiales y métodos .....                                                                             | 12 |
| 5.1. Recolección de muestras .....                                                                        | 12 |
| 5.2. Extracción del ADN. determinación de la calidad y cuantificación del ADN<br>obtenido .....           | 13 |
| 5.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....                                                      | 13 |
| 5.4. Secuenciación capilar .....                                                                          | 16 |
| 5.5. Análisis de los datos obtenidos con el software GeneMarker .....                                     | 16 |
| 6. Resultados y discusión .....                                                                           | 17 |
| 6.1. Determinación de la calidad y cuantificación del ADN .....                                           | 21 |
| 6.2. Preparación de las PCRs múltiples.....                                                               | 21 |
| 6.3. Secuenciación capilar y electroferogramas obtenidos .....                                            | 25 |
| 6.4. Perfiles alélicos de las muestras para los 12 microsatélites e identificación<br>de variedades ..... | 41 |
| 6.5. Discusión .....                                                                                      | 45 |
| 7. Conclusión .....                                                                                       | 46 |
| 8. Bibliografía.....                                                                                      | 47 |

## **1. Resumen**

La especie *Olea europaea* representa uno de los cultivos más importantes de la cuenca del Mediterráneo y una gran diversidad genética, con más de 1200 cultivares diferentes descritos. El conocimiento acerca de dicha diversidad mediante la identificación de los cultivares con herramientas moleculares supone un beneficio importante en la actividad agroalimentaria de esta especie. En este trabajo se ha obtenido la huella alélica de 12 cultivares de olivo de varias procedencias, recolectados todos en el jardín de variedades del IFAPA “Venta del Llano” de Mengíbar con la ayuda de 12 marcadores SSR de núcleo largo tetra y hexanucleótidos previamente diseñados. Para la obtención de los perfiles alélicos de cada cultivar se llevaron a cabo varias PCR múltiples. Los productos de PCR fueron secuenciados utilizando un secuenciador capilar tipo de ADN 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies) y los resultados se analizaron con el software Gene Marker V2.6.3. Este set de marcadores moleculares representa una potente herramienta en estudios de biodiversidad.

## **2. Abstract**

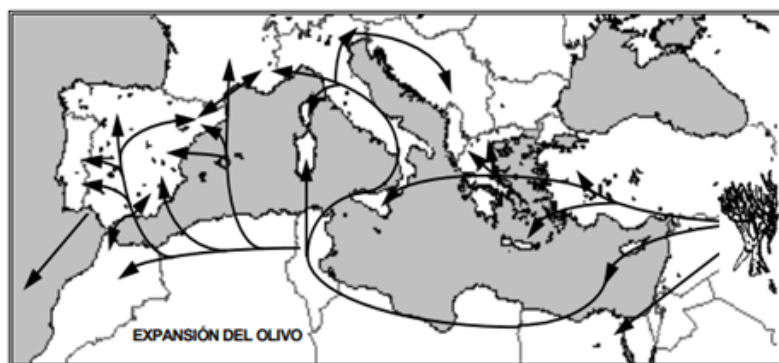
*Olea europaea* is one of the most important crops in the Mediterranean basin besides presenting great genetic diversity with more than 1200 different cultivars described. The knowledge of this diversity through the identification of cultivars suppose an important benefit in the agri-food activity of this species. In this work, we have obtained the allele trace of 12 olive varieties from several backgrounds, all collected in the garden of varieties IFAPA “Venta del Llano” from Mengibar, by the aid of 12 long core tetra and hexanucleotide microsatellite markers previously designed. To obtain the allele trace of each cultivar several multiplex PCR were carried out. The PCR’s products were sequenced using a 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies) DNA capillary sequencer and the results were analyzed with the software Gene Marker V2.6.3. This set of molecular markers represents a powerful tool in biodiversity studies.

### **3. Introducción**

#### **3.1. Generalidades del olivo**

El olivo (*Olea europaea* L. Spp. *Europaea*), es uno de los cultivos fundamentales para la producción de aceite siendo cultivado desde tiempos inmemoriales. (Buendía et al, 2013). Su cultivo se remonta al Neolítico, mucho antes de la aparición de la escritura, 3.000 a 4.000 años a.C. Se han encontrado hojas de olivo en los yacimientos pliocénicos de Mongardino (a 18 km de Bolonia) y huesos del mismo fruto en las estaciones neolíticas de El Garcel, en España (Buendía et al, 2013). Historiadores como De Candolle, (1883) consideran que el olivo proviene de Siria y que la transformación del olivo silvestre en olivo cultivado se debe a los pueblos de dicho país. Parece ser que entró en Europa desde el Sudeste del Mediterráneo y se fue propagando por toda la cuenca del Mediterráneo (Figura 1). A pesar de que el olivo llegó a España en 1050 a.C no fue hasta el año 50 a.C. cuando su cultivo adquirió relevancia con la dominación romana (Blázquez, 1996). En Andalucía, el cultivo del olivo no se produjo hasta la época romana, hacia el siglo I d. C cuando aparecen restos de carbones y semillas fuera del área natural de crecimiento del acebuche (Rodríguez-Ariza et al, 2007).

Las plantas de esta familia son principalmente árboles y arbustos, a veces trepadores. Muchas de ellas producen aceites esenciales en sus flores o frutos, algunos de los cuales son utilizados por el hombre (García, 1999). Existen unas 35 especies en el género *Olea*. Aunque la taxonomía de este género todavía está cuestionada hay un acuerdo general en la subdivisión de *O.europaea* en dos subespecies diferentes: *sativa* y *oleaster*. La primera incluye todas las variedades de olivos cultivadas, mientras que la segunda son arbustos silvestres que portan pequeños frutos con contenido bajo en pulpa. Todos los olivos cultivados y también los acebuches u olivos silvestres están incluidos por tanto en la especie *Olea europaea* L. de la que existen más de 1.200 variedades diferentes.



**Figura 1.** Posibles vías propagación del olivo. (Lavee, 1944).

Con respecto a su distribución en todo el planeta (Figura 2), a día de hoy, podemos encontrar alrededor de 7.455.000 hectáreas de olivares, aunque el 98% de la superficie total se concentra en la cuenca mediterránea quedando el 2% restante repartido entre el continente americano (1,2%), Asia Oriental (0,4%) y Oceanía (0,4%). (Barranco et al, 2008).



**Figura 2.** Distribución de cultivos de olivo en el mundo

### 3.2. Importancia del olivar

De la superficie total dedicada al cultivo del olivar un 16 % corresponde a España (2.100.000 has), y casi un 9 % a Italia (1.114.000 has). Otros países europeos importantes cultivadores de olivos son Grecia (738.000 has) y Portugal (322.000 has) (Castillo, 2012).

El olivar es el principal cultivo de Andalucía, con más de 1´5 millones de hectáreas que están repartidas en más de 170.000 explotaciones, las principales distribuidas en Jaén, Córdoba, Granada, Málaga y Sevilla. El valor de la producción oscila en 3.000 millones de euros, contando con el aceite de oliva y las aceitunas de mesa. Aunque podemos encontrar cultivo de olivos en cualquier provincia de Andalucía, el cultivo se concentra fundamentalmente en las provincias de Jaén y

Córdoba (Figura 3), Sólo la primera de ellas, con 66 millones de olivos cultivados en sus campos, rebasa la superficie total de olivos cultivados en Italia. Por ello se la ha llamado, merecidamente, *la capital mundial del olivo y del aceite de oliva*. representando entre Jaén y Córdoba el 60% de la superficie de olivar en Andalucía



**Figura 3.** Distribución del cultivo del olivar en Andalucía (Oteros, 2014).

La demanda de aceite no para de incrementarse en el mundo y desde 1990 ha crecido un 60%. Según La FAO (Figura 4), el principal país productor de aceite de oliva a nivel mundial es España (41,2% en el año 2009) especialmente tras la incorporación de nuestro país a la Unión Europea, en 1986, con la llegada de distintas ayudas europeas, se paralizó la política de arranque de olivos, y se incrementó considerablemente el número de ejemplares en sus campos, sobre todo en la década de los 70. Hoy día, el olivar español está presente en 34 provincias de 13 Comunidades Autónomas (Castillo, 2012) de forma que el sector del aceite representa el 5 % de las empresas agroalimentarias españolas y el 9 % de las exportaciones del sector alimentario. Otros países productores son por orden de producción, Italia (20,2%), Grecia (11,4%), Túnez (9%), Siria (5%) y Portugal (1,8%).

Con respecto al consumo de aceite de oliva virgen en Europa, éste ronda en torno al 70% del total producido en el mundo. Fuera de la Unión Europea, podemos decir que el consumo está aumentando notablemente en países como Estados Unidos, Australia, Japón o Canadá. Según datos del ministerio de Agricultura El valor de las exportaciones en España en la campaña 2017-18 superó los 1.200 Millones de Euros, por encima de la media de las 4 últimas campañas. Los valores unitarios de exportación se sitúan en niveles máximos para estas fechas, habiéndose incrementado un 9% respecto del año anterior y un 26% respecto a la media.

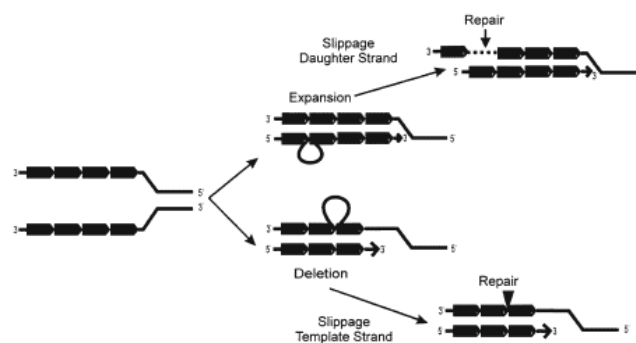




**Figura 5.** Estructura de un microsatélite. Se observan las secuencias flanqueantes a ambos lados del microsatélite y la repetición del triplete CAC 8 veces.

### 3.3.1. ¿Cómo se generan los microsatélites?

La tasa de mutación es aquella a la que un loci SSR muta, varía, y depende del motivo de repetición, el contenido en GC de la secuencia de ADN flanqueante, el tamaño del alelo, la posición en el cromosoma, la división celular (mitótica o meiótica), el sexo, edad, tipo de repetición y genotipo (Hancock et al, 1999). La tasa de mutación para secuencias de eucariotas es de aproximadamente  $10^{-9}$  por nucleótido por generación (Crow et al, 1993) y varía entre especies e incluso dentro de la misma especie varía entre diferentes loci (Zhu et al, 2000). El principal evento de mutación es la ganancia o pérdida de unidades de repetición completas lo que sugiere un mecanismo de mutación específico llamado "replication slippage" (deslizamiento en la replicación). Este incluye el deslizamiento de ADN, como se puede observar en la Figura 6, durante la replicación causada por desajustes entre las hebras de ADN cuando se están replicando durante la meiosis (Tachida et al, 1992; Tautz et al, 1994). Se estima que este proceso ocurre una vez cada 1000 generaciones (Weber et al, 1993).



**Figura 6.** Durante la replicación, debido al deslizamiento de ADN, puede haber una pérdida (deleción) o ganancia (expansión) de repeticiones dependiendo del error que contenga la hebra. Imagen procedente de Carbondali, IL, USA Stella K. Kantartzi, (Microsatellites: Evolution and Contribution) En: Microsatellites-Methods and Protocols [2013]

El segundo mecanismo comprende la recombinación entre hebras de ADN (Harding et al, 1992). En este mecanismo se podría cambiar la longitud del SSR por un entrecruzamiento asimétrico o por conversión génica (Hancock et al, 1999).

Por lo tanto, existen dos posibles mecanismos mutagénicos que pueden ser utilizados para explicar las altas tasas de mutación.

### **3.3.2. Aplicaciones de los marcadores SSR**

Los microsatélites se han convertido en marcadores de elección para diferenciación Genómica y Genética, presentando gran cantidad de aplicaciones (Mullis et al, 1986). Dado que, la repetición por sí misma no codifica para formar ninguna proteína, y debido a que las secuencias de ADN repetitivo pueden recombinarse y expandirse más frecuentemente que otros tipos de secuencias, estas regiones altamente variables son útiles para medir el polimorfismo entre especies o variedades muy relacionadas (Phillips et al.1995; Valadez y Kahl 2000). Por ejemplo, los marcadores SSR, son útiles en la identificación genética de cultivares de plantas debido a su reproducibilidad, naturaleza multialélica, herencia codominante, abundancia relativa y buena cobertura del genoma (Powel et al, 1996). También son empleados por los genetistas como una herramienta eficiente para relacionar la variación genotípica y fenotípica (Powell et al, 1996). Además, el conocimiento de la variación genética es muy útil para la caracterización de plantas en colecciones de germoplasma y estudios taxonómicos y filogenéticos (Gupta et al, 2000).

### **3.4. Identificación de las variedades de olivo**

Desde el comienzo de su domesticación, el olivo ha sido propagado vegetativamente con el fin de conseguir las mejores características fenotípicas del árbol que se traducen en la mejor combinación de genes, obtenida a partir de cruces al azar o mutaciones. En esta selección, a lo largo de la historia de la humanidad se ha buscado un mayor tamaño del fruto y contenido graso elevado del mismo, resistencia a plagas y enfermedades, así como buena adaptación al medio en general. Existen cultivares resistentes a muy distintas condiciones estresantes en la naturaleza, que no han sido bien caracterizados hasta la fecha. Como resultado, existe un gran número de variedades o cultivares de olivo en los países mediterráneos. En este sentido, la clasificación de germoplasma de olivo es compleja, no solo por su rico patrimonio genético, sino también por la ausencia de referencias y la confusión de los nombres de los cultivares, con homónimos (uso del mismo nombre popular para dos cultivares diferentes) y sinónimos (uso de diferentes nombres populares para el mismo cultivar) en numerosos casos

originando problemas para la gestión y conservación del germoplasma. (Carriero et al. 2002).

La identificación y caracterización de variedades de las especies de interés agronómico, entre las que se incluyen el olivo, se ha basado tradicionalmente en la utilización de caracteres morfológicos (Rallo, 2005). El procedimiento de caracterización debe ser fiable por lo que los métodos de identificación morfológica más utilizados para las variedades de olivo incorporan gran número de caracteres del árbol, ramas, fruto, endocarpo, hoja e inflorescencia (Barranco y Rallo, 1984).

Los marcadores morfológicos siguen siendo ampliamente utilizados hoy día ya que no requieren medios o tecnologías complicadas. No obstante, el empleo de dichos marcadores presenta ciertas dificultades en la evaluación de algunos de los caracteres como por ejemplo las inflorescencias o la influencia de múltiples factores sobre las medidas como la edad, condiciones ambientales o el estadio sanitario de la planta (Fendri, 2012). A esto se le suma el alto grado de subjetividad a la hora de hacer la descripción (Trujillo et al, 2005).

El desarrollo y utilización de marcadores moleculares en las últimas décadas ha contribuido a perfeccionar los estudios de los recursos genéticos en olivo reduciendo las incertidumbres debidas a la fluctuación en los caracteres morfológicos y agronómicos (Hamrick y al., 1992) ya que dichos marcadores son independientes de las condiciones externas, en caso de los marcadores de ADN, que se basan en el análisis directo del genotipo de la planta (Fendri, 2008), y pueden ser analizados en distintos tejidos y en diferentes estadios de desarrollo de la planta. Este tipo de marcadores ha demostrado niveles de polimorfismo considerables y han sido de gran utilidad para los estudios de identificación en olivo. Hoy día, los marcadores agronómicos, morfológicos y moleculares se utilizan conjuntamente para conseguir una evaluación completa de los recursos genéticos (Rallo et al., 2005).

Aunque en España se mantiene en cultivo más de 260 variedades, sólo 24, son las principales en las diferentes zonas de cultivo y representan más del 95 % de la aceituna producida, por lo que el resto de variedades quedan a menudo relegadas a bancos de germoplasma como el que se encuentra en el IFAPA Venta

del Llano en Mengíbar, (Jaén). Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica).

Las muestras utilizadas en el presente trabajo han sido recolectadas en dicho centro de investigación. Se han estudiado doce cultivares de olivo, en su mayoría de España, pero también algunos procedentes de Francia, Italia y Portugal utilizando 12 marcadores microsatélites tetra y hexanucleótidos para la determinación de sus perfiles alélicos e inclusión de las mismas dentro de una colección de más de 80 variedades de olivo diferentes.

#### **4. Objetivos**

El principal objetivo de este trabajo es determinar el perfil alélico de 12 variedades de olivo procedentes del jardín de variedades del IFAPA “Venta del Llano” con un set de 12 microsatélites long core repeats, hexa- y tetra-nucleótidos con el fin de identificar genéticamente las mismas. Para ello, se pretende poner a punto una PCR multiplex. Esta técnica permite ahorrar tiempo, costos en reactivos y secuenciación de muestras, y por tanto, economizar en el trabajo.

Para lograr el objetivo principal se han planteado una serie de subobjetivos:

1. Diseñar un programa de PCR multiplex para amplificar de forma simultánea y en un único tubo de PCR el número máximo de marcadores o secuencias diferentes pertenecientes a distintos microsatélites.
2. Obtener la huella alélica de las 12 variedades estudiadas con cada uno de los 12 marcadores SSR de núcleo largo empleados.
3. Definir genotipos exclusivos.
4. Identificar cada una de las variedades empleando el menor número de marcadores posible.

#### **5. Materiales y métodos**

##### **5.1. Recolección de muestras**

Las muestras se recolectaron en la estación experimental de olivicultura IFAPA “Venta del Llano” de Mengíbar (Jaén). De cada árbol, se cogieron varias hojas jóvenes de los brotes nuevos. Se recogieron un total de 12 muestras procedentes de las variedades de olivo siguientes:

| Variedad                    | Ubicación en el Banco de Germoplasma |
|-----------------------------|--------------------------------------|
| Redondil                    | A <sub>11</sub> F <sub>8</sub>       |
| Bouteillan                  | A <sub>11</sub> F <sub>9</sub>       |
| Bella de Spagna             | A <sub>10</sub> F <sub>14</sub>      |
| Buidiego                    | A <sub>2</sub> F <sub>8</sub>        |
| Callosina                   | A <sub>9</sub> F <sub>2</sub>        |
| Campanil                    | A <sub>10</sub> F <sub>2</sub>       |
| Caninese                    | A <sub>11</sub> F <sub>15</sub>      |
| Cañivano Blanco             | A <sub>8</sub> F <sub>2</sub>        |
| Celina                      | A <sub>10</sub> F <sub>17</sub>      |
| Cornicabra Parda de Villena | A <sub>4</sub> F <sub>2</sub>        |
| Genovesa                    | A <sub>5</sub> F <sub>1</sub>        |
| Golbina de Belchite         | A <sub>4</sub> F <sub>6</sub>        |

**Tabla 1.** Cultivares y su ubicación en el Banco de Germoplasma.

Las muestras se etiquetaron adecuadamente y se guardaron en bolsas herméticas para ser posteriormente almacenadas a -80°C hasta el momento de la extracción del ADN.

## **5.2. Extracción del ADN, determinación de su calidad y cuantificación**

El ADN genómico fue extraído a partir de 100 mg de hojas almacenadas a -80°C de cada una de las 12 variedades de olivo anteriormente citadas. La extracción del ADN fue llevada a cabo utilizando el kit "Illustra DNA Extraction Phytopure (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido se cuantificó con la ayuda de un lector de microplacas (modelo Bio Tek, Synergy HT) utilizando el accesorio para microvolúmenes (Take3-Biotek). Para considerar que el ADN extraído era de buena calidad se observó la relación de absorbancia 260/280 para cada muestra. Para poder utilizar esas muestras fue necesario que esta relación de absorbancias se encontrase en el rango de valores entre 1,8 y 2. Posteriormente, se prepararon diluciones de los ADNs a una concentración final de 100 ng/μl de cada una de las muestras para utilizarlas en la posterior amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

## **5.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Se llevaron a cabo varias PCR con varios marcadores en cada una. Cada uno de los marcadores presenta diferencias en el tamaño de amplificación que se obtiene, el fluoróforo utilizado y el tamaño en pares de bases que amplifican. La Tabla 2 indica los marcadores SSR utilizados en este trabajo, así como el tamaño del

amplicón y el fluoróforo de marcaje que llevan en cada caso en el primer forward o reverso. Para la amplificación se utilizó un termociclador de Bio-Rad (MyCycler160™). En esta modalidad de PCR se llevan a cabo reacciones que consiguen amplificar simultáneamente en un único tubo (y por ende una única reacción), diferentes secuencias diana (Bolívar et al, 2013).

| Primer                                         | Tip<br>o | Motivo | Secuencia primer 5'-3'                                                                | Tamaño<br>del<br>amplicón |
|------------------------------------------------|----------|--------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| <b>Olea40.13R-NED</b><br><br><b>Olea40.13F</b> | p4       | CTTT   | CAA TGG AAG TAG GGA TCT AAA TTA AAC<br><br>TTT TGT TCA TAA TTA AGC TTA TAT TAT<br>TCC | (93pb)                    |
| <b>Olea42.9R-NED</b><br><br><b>Olea42.9F</b>   | p4       | GAAA   | GAA AGA GGC GTC AGA GTC AGA AC<br><br>CTC CAT CTT TAC TCT CTA TAC ATC TCG<br>TA       | (157pb)                   |
| <b>Olea41.2R-FAM</b><br><br><b>Olea41.2R</b>   | p4       | TCAT   | AAT ATG ATG ATC CAG CAG CTT AAC A<br><br>TTT TCA TCC TCC ATC TCT ATG ATT G            | (119pb)                   |
| <b>Olea42.30R-PET</b><br><br><b>Olea42.30F</b> | p4       | GAAA   | AGC TCC TAT CTG TTC ATT TCA TAA AG<br><br>ATA CAA AAA GCA GAG TAT CTT CAC TGA         | (149pb)                   |
| <b>Olea42.34F-PET</b><br><br><b>Olea42.34R</b> | p4       | GAAA   | GTA ACG GAG AAA GAT TGA ACA AGA T<br><br>TTT TGT TCA TAA TTA AGC TTA TAT TAT<br>TCC   | (301pb)                   |
| <b>Olea42.31-NED</b><br><br><b>42.31F</b>      | p4       | GAAA   | GGA TGA ACT GGA CAG AGA ACA ATA C<br><br>ACT ATC TTC CAA ATC TGG AGA TAA AGT          | (120pb)                   |

|                                    |    |            |                                                                          |         |
|------------------------------------|----|------------|--------------------------------------------------------------------------|---------|
| <b>Olea39F-VIC</b><br><b>39R</b>   | p4 | CTCG       | GGA TCG CAC ATA TCA AAG ATT CTA C<br>GAC TCA GAG GGT GAT CTT AAT TCT TC  | (141pb) |
| <b>Olea9.4F VIC</b><br><b>9.4R</b> | p6 | GAAGA<br>G | GTT AAA TGG CCA TAA GAT TGA TGA T<br>CAT TAC CTG TGT AGT GAT TCT ACC AAC | (199pb) |
| <b>OleagenH.20.1</b><br><b>FAM</b> | p6 | GGTGA<br>A | TTC AAC CAG TCC TCC CAG TC<br>GTAAGCGAGGGA GAG GCT TT                    | (245pb) |
| <b>OleagenH.21 VIC</b>             | p6 | CCTCC<br>A | AAG AGT TGT TTC TGC CGC TC CGC<br>CAAAGCTACACATGAGA                      | (280pb) |
| <b>OleagenH.2 FAM</b>              | p6 | ACCAG<br>C | TCA AAA TGA TGC AAC AAC CC<br>TGCAGGAGCAGA AAC ATT TG                    | (200pb) |
| <b>OleagenH4.1 FAM</b>             | P6 | GCTCC<br>G | ACA CGG AGG ATC CAA GTC TG<br>TGA GCA GGT GGT AGA GGC TT                 | (145pb) |

**Tabla 2.** Marcadores SSR utilizados en este trabajo junto con el fluoróforo usado para su marcaje, motivo de repetición y su secuencia. También se indica el tamaño del amplicón que se espera que dé lugar cada uno de los marcadores.

Para prevenir errores de pipeteo se preparó una misma mezcla de reacción (Master mix) para las doce muestras (y una extra) por cada PCR realizada. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo con un volumen total de 10µl con 100 ng de ADN, 0.5µl de primer marcado con uno de los 4 fluoróforos posibles (FAM, NED, VIC o PET), 0.5µM de primer reverso, 1mM de la mezcla de dNTP (Roche), 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X Buffer Gold y 0.25 U de AmpliTaq Gold® ADN polimerasa.

El programa de PCR empleado fue uno de tipo Touchdown se basa en la utilización de una temperatura de hibridación decreciente en cada ciclo hasta alcanzar una temperatura óptima que se mantiene en los ciclos restantes. El programa consistía en la desnaturalización inicial del ADN a 95°C durante 5 min., 20 ciclos a 95°C durante 30s, y a 65°C durante 30s, 10 ciclos a 95°C durante 30s, y 55°C durante 30s, 10 ciclos a 95°C durante 30s, y 50°C durante 30s, y una extensión final a 72°C durante 30 min.

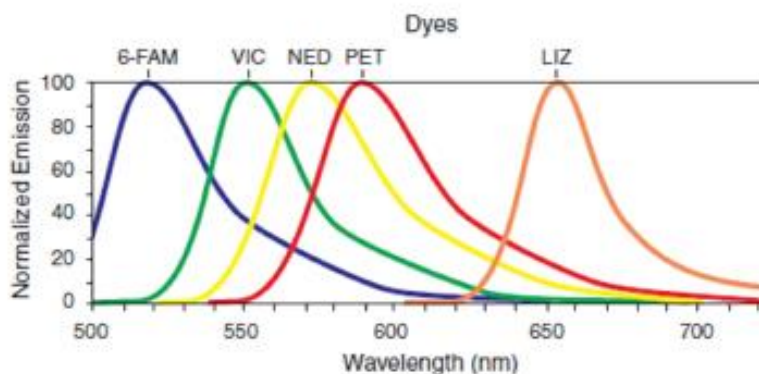
En el caso de los marcadores Olea40.13 y Olea42.34 se necesitó un programa de PCR diferente ya que con el anteriormente mencionado no se consiguieron amplificar. La variante del programa de PCR empleada consistió en la desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, 40 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos, y por último, una extensión final a 72 °C durante 30 minutos. Los productos de PCR obtenidos se almacenaron en frío a -20°C hasta el momento de llevarlos a secuenciar.

#### 5.4. Secuenciación capilar

Las muestras fueron procesadas en el Centro de Instrumentación Científico-Técnica de la Universidad (CICT) de Jaén con un secuenciador capilar de ADN 3500 Genetic Analyzer (Life technologies) utilizando el estándar interno GeneScan™ 600 LIZ(R) Size Estándar v2.0 (Life technologies). Para la secuenciación, una vez hechas las PCRs anteriormente descritas, siempre que en la reacción (pre-PCR) no hubiesen 5 marcadores diferentes, se mezclaron (post- PCR) los productos a partes iguales para proceder a la secuenciación de los mismos.

#### 5.5. Análisis de los datos obtenidos con el software GeneMarker

El perfil de los alelos y el análisis de los fragmentos estudiados fueron caracterizados utilizando el software Gene Marker. Los electroferogramas mostraron señal fluorescente con diferente intensidad en forma de una línea para cada fluoróforo con el que se encontraba marcado el cebador: FAM, VIC, NED y PET (Figura 7). Se obtuvieron archivos que fueron procesados. El procesamiento incluyó el filtrado de "picos ruidosos", ajuste de una escala adecuada y la comparación con un panel alélico conocido.



**Figura 7.** Espectro de emisión cromática de los fluoróforos empleados en el experimento y del patrón (LIZ600). Fuente: USER GUIDE DNA fragment Analysis by Capillary Eletrophoresis.



El marcador usado como patrón de tamaños fue LIZ600. Este patrón se utiliza para el análisis de fragmentos de entre 20 y 600 pares de bases. Se analizaron los picos obtenidos para cada uno de los pares de primers empleados con el fin de identificar las 12 cultivares de olivo objeto de estudio. Los genotipos que mostraban un único pico en un locus dado, se consideraron homocigotos mientras que los genotipos que mostraban dos picos en un locus eran heterocigotos. La ausencia de picos en el tamaño de rango esperado fue comprobada dos veces antes de confirmarlos como perfiles con genotipo nulo.

## 6. Resultados y discusión

En el presente trabajo se ha llevado a cabo la determinación por primera vez de los perfiles alélicos de 12 cultivares de olivo recolectados en el jardín de variedades de olivo del IFAPA “Venta del Llano” de Mengíbar, Jaén. Para ello se han empleado 12 marcadores microsatélites de nucleo largo, tetra y hexanucleótidos con el fin de poder identificarlas de manera fiable y reproducible.

A continuación (Figura 8), se muestran las imágenes de los cultivares utilizados en este trabajo:



**Olivo de la variedad Redondil, común en Portugal, apreciadas como aceitunas de mesa.**



**Olivo de la variedad Bouteillan, zona de Francia.**



**Olivo de la variedad Bella di Spagna. Tipico de Italia. Aceituna de gran tamaño, apreciada**



**Variedad Buidiego. Cultivada en España. Apreciada**

para la salmuera.



como aceituna de mesa.



**Variedad Callosina. Cultivada en España. Excelente aceituna de mesa.**



Aceituna de la variedad Campanil. Cultivado en España. Aderezo verde.



**Caninese. Cultivada en Italia.**



Cañivano blanco. Cultivada en España. Aceite de muy buena calidad.



**Celina di Nardo. Cultivada en Italia. Aceite de fácil extracción.**

Cornicabra Parda de Villena. Cultivada en España.



**Genovesa. Cultivado en España. Aceituna de mesa y aceite de buena calidad.**

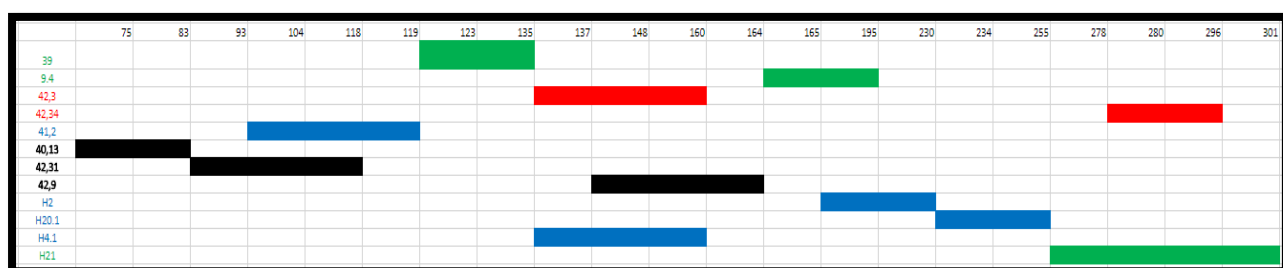
**Golbina de Belchite. Cultivado en España. Buen aceite y apreciada como aceituna de mesa.**

**Figura 8.** Tabla en la que se muestra cada una de los cultivares objeto de estudio.

El ADN de cada muestra ha sido amplificado mediante la puesta en marcha de varias PCRs múltiples, de forma que en cada eppendorf se pusieron hasta cinco marcadores SSR diferentes. Se tuvo cuidado de seleccionarlos adecuadamente para que no interfirieran unos con otros. Así pues, se mezclaron microsatélites que dieran lugar a amplicones de diferente tamaño (Tabla 3) y en caso de que los amplicones tuvieran un tamaño similar se procuró que no estuvieran ambos marcados con un fluróforo del mismo color (Figura 7). Como se puede ver en la Figura 9, todos los marcadores podrían mezclarse sin dar lugar a confusiones en tamaños de amplicones. No obstante, más de cinco marcadores en un mismo programa de PCR multiplex, no aseguran la correcta amplificación de los mismos, ya que producen interacciones entre ellos que impiden una adecuada amplificación. A veces se producen amplificaciones deficitarias que hacen difícil discernir con seguridad la presencia de los alelos en las muestras. Por esta causa, el número máximo de marcadores considerado en cada tubo de PCR multiplex es de cinco o menor. Se pueden distinguir los electroferogramas pertenecientes a cada variedad perfectamente.

| Primer                           | Tamaño de los fragmentos que producen |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| Olea39F-VIC<br>39R               | 123-135                               |
| Olea9.4F VIC<br>9.4R             | 165-195                               |
| Olea42.30R-PET<br>42.30F         | 137-160                               |
| Olea42.34F-PET<br>42.34R         | 280-296                               |
| Olea41.2R-FAM<br>41.2F           | 104-119                               |
| Olea40.13R-NED<br>40.13F         | 75-83                                 |
| Olea42.31-NED<br>42.31F          | 93-118                                |
| Olea42.9R-NED<br>42.9F           | 148-164                               |
| OleagenH2R-FAM<br>H2F            | 198-227                               |
| OleagenH20.1R-<br>FAM<br>H20.1-F | 234-252                               |
| OleagenH4.1R-<br>FAM<br>H4.1F    | 137-148                               |
| OleagenH21R-VIC<br>H21F          | 278-301                               |

**Tabla 3.** Tabla que muestra el par de marcadores junto con el fluoróforo utilizado para identificarlos y el rango de fragmentos que pueden generar.



**Figura 9.** Esquema que muestra el tamaño de los amplicones obtenidos con cada marcador y el fluoróforo con el que van marcados y que posteriormente aparecerá en los electroferogramas obtenidos de la secuenciación.

### 6.1. Determinación de la calidad y cuantificación del ADN

Los resultados de la determinación de la calidad y cuantificación del ADN obtenido fueron los recogidos en la siguiente tabla:

| Muestra                     | Absorbancia a 260/280nm | ng/μl   | μl adn para 100ng/μl | μl de H2O |
|-----------------------------|-------------------------|---------|----------------------|-----------|
| Redondil                    | 2.081                   | 852.436 | 11,7311              | 88,2689   |
| Bouteillan                  | 2.003                   | 761.402 | 13,1337              | 86,8663   |
| Bella de Spagna             | 2.016                   | 135.769 | 7,36545              | 92,6345   |
| Buidiego                    | 2.000                   | 675.781 | 14,7977              | 85,2023   |
| Callosina                   | 1.947                   | 39.856  | 25,0903              | 74,9097   |
| Campanil                    | 2.054                   | 722.346 | 13,8438              | 86,1562   |
| Caninese                    | 2.031                   | 72.805  | 13,7353              | 86,2647   |
| Cañivano Blanco             | 1.995                   | 766.615 | 13,0444              | 86,9556   |
| Celina                      | 1.930                   | 61.056  | 16,3784              | 83,6216   |
| Cornicabra Parda de villena | 2.026                   | 758.260 | 13,1881              | 86,8119   |
| Genovesa                    | 2.000                   | 75.083  | 11,3213              | 88,6787   |
| Golbina de Belchite         | 2.053                   | 837.654 | 11,9381              | 88,0619   |

**Tabla 4.** Resultados obtenidos de la cuantificación del ADN y determinación de su calidad.

Como ya se ha comentado previamente, se considera que el ADN extraído es de buena calidad si la relación de absorbancia 260/280 nm se encuentra en el rango de valores entre 1,8 y 2.1. Como se puede ver en la tabla todos los valores de absorbancia obtenidos a 260/280 nm se encuentran en dicho rango por lo que el ADN utilizado en este estudio era de buena calidad.

### 6.2. Preparación de las PCRs múltiples

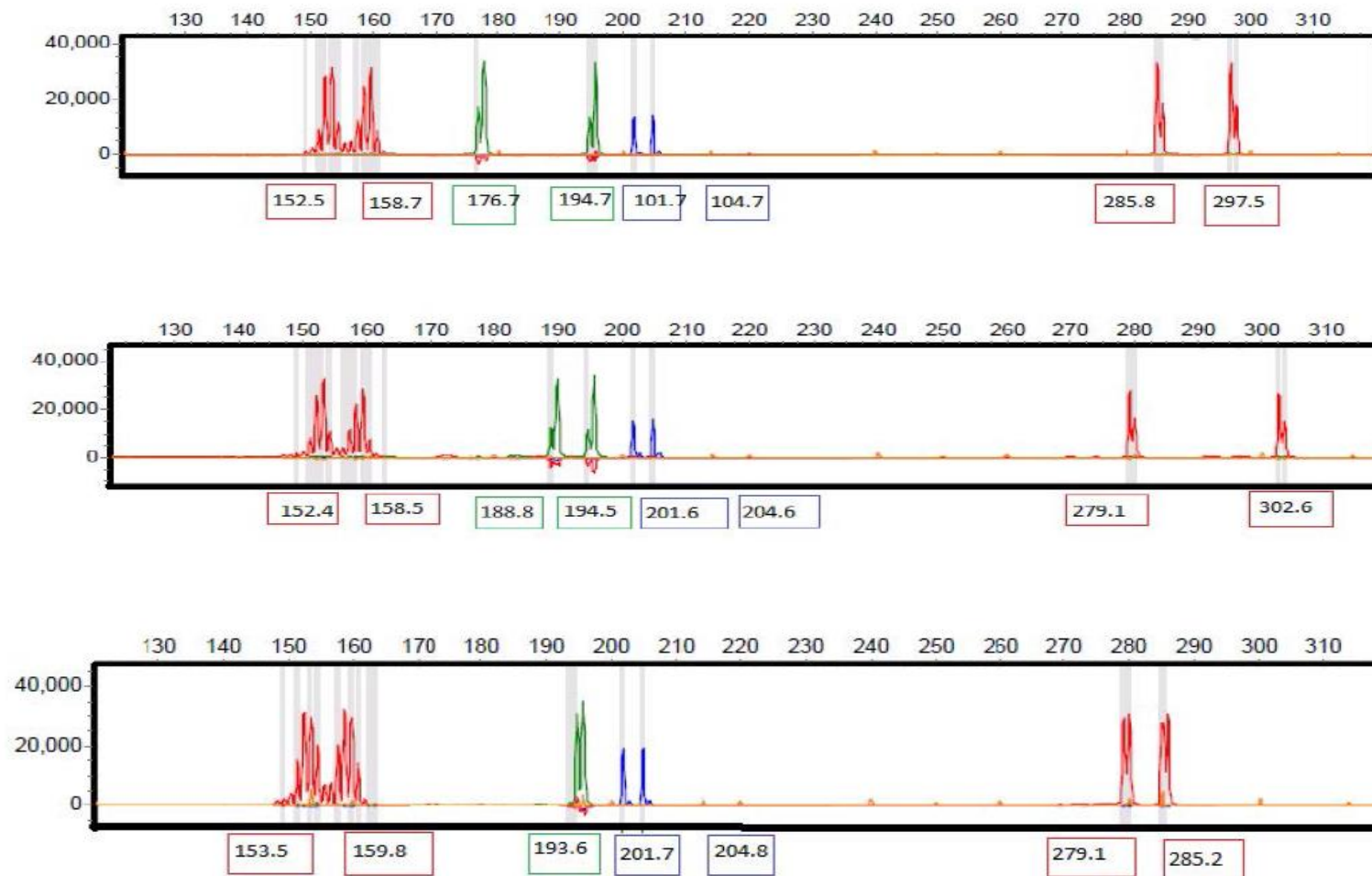
Para la realización de las PCRs se partió de una concentración de ADN de 100ng/ml y se preparó una misma MasterMix para cada una de las 12 variedades de olivo estudiadas y una cantidad extra con el fin de evitar posibles errores. Por cada PCR múltiple realizada se introdujeron un máximo de 5 parejas de primers cuyos tamaños fueran diferentes entre sí o en caso de tener tamaños similares, se

marcaron con fluoróforos de colores diferentes para poder distinguirlos posteriormente y no hubiera pérdida de señal. De esta manera, se obtuvieron buenos resultados con una señal óptima.

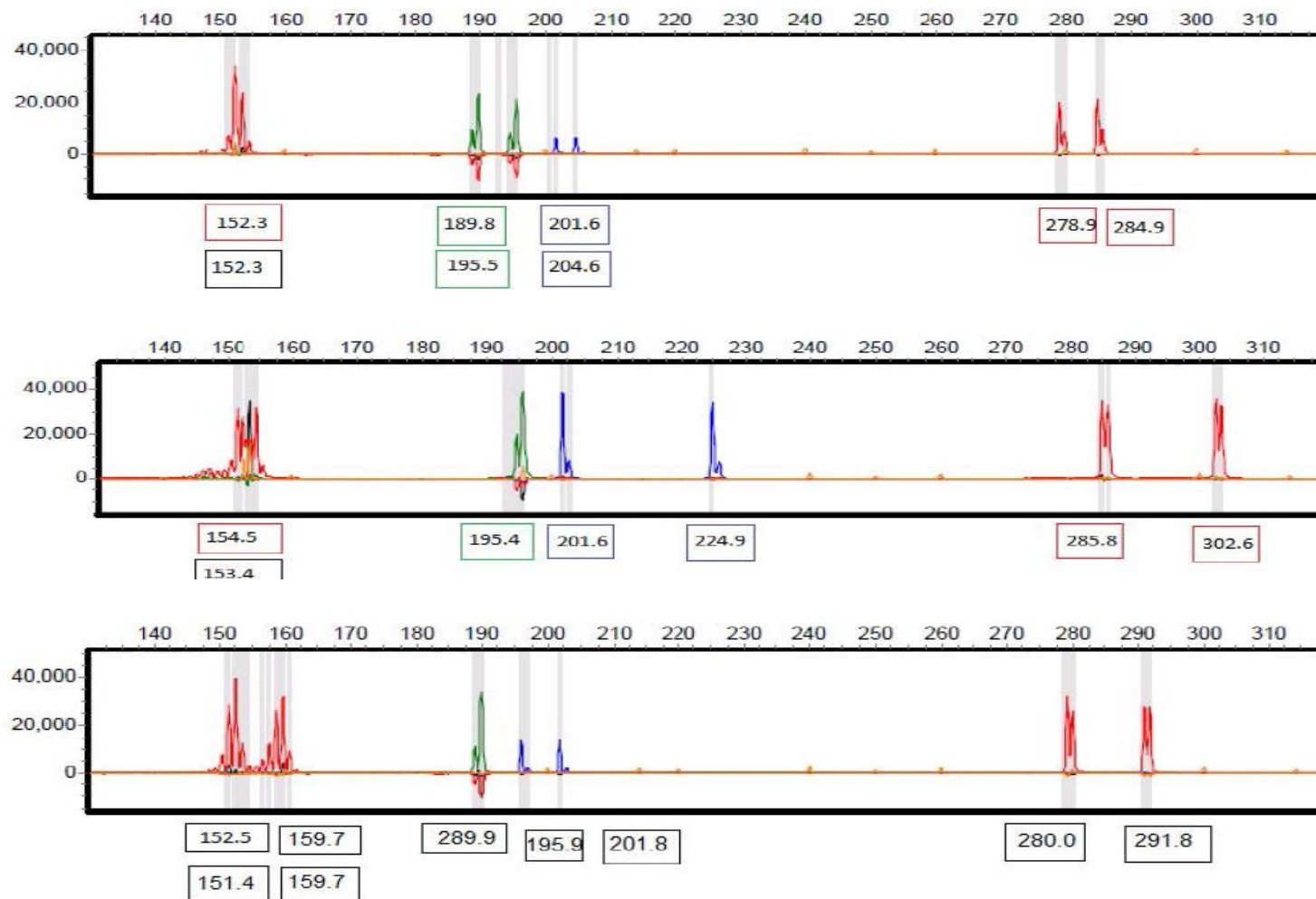
En la figura 10 se observa varios ejemplos de electroferogramas de las variedades Campanil, Cañivano Blanco y Cornicabra Parda de Villena respectivamente obtenidos mediante la PCR múltiple. Como se puede apreciar cada uno de los cuatro marcadores analizados genera amplicones de diferentes tamaños y cada marcador está marcado con un fluoróforo diferente, excepto 42.3 y 42.34 ambos marcados con PET en rojo. En este caso se pueden distinguir perfectamente gracias a sus diferentes tamaños de amplicones.

En cuanto a la figura 11, podemos observar tres electroferogramas pertenecientes a las variedades Redondil, Bella de Spagna y Golbina de Belchite respectivamente. Destacar que aunque parezca que solo hay 4 marcadores, en realidad, hay 5 ya que 42.3 (PET) genera un tamaño de amplicón similar al 42.9 (Figura 8) pero al estar este último marcado en negro (NED) podemos distinguir un marcador de otro.





**Figura 10.** Ejemplo de una PCR múltiple en las variedades Campanil, Cañivano Blanco y Cornicabra Parda de Villena. Se amplificaron en un solo tubo fragmentos de ADN correspondientes a los marcadores Olea42.3 PET, Olea42.34 PET, Olea9.4 VIC y OleagenH2.1 FAM.



**Figura 11.** Ejemplo de una PCR múltiple en las variedades Redondil, Bella de Spagna y Golbina de Belchite. Se amplificaron en un solo tubo fragmentos de ADN correspondientes a los marcadores 42.3 PET, 42.9 NED, 42.34 PET, 9.4 VIC y H2.1 FAM

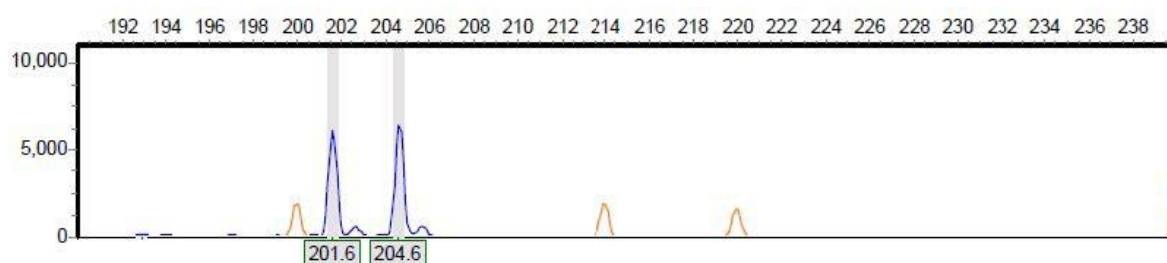


### 6.3. Obtención de los perfiles alélicos. Electroferogramas obtenidos

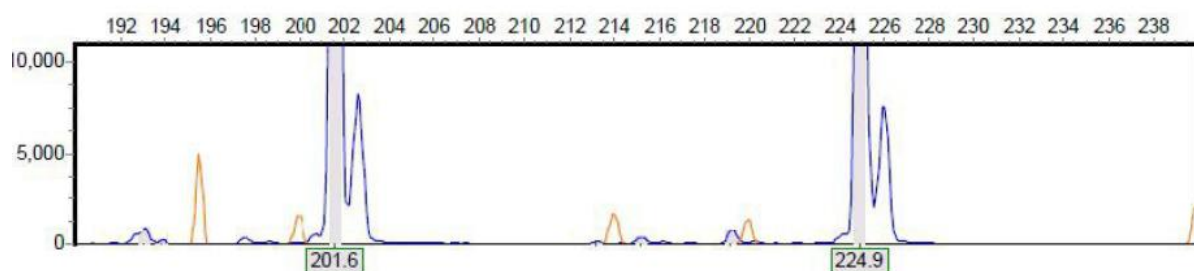
A continuación, se muestran los electroferogramas obtenidos para cada uno de los 12 cultivares estudiados con cada marcador SSR. En cada electroferograma, en el cabecero del mismo, se indican en negrita el nombre de aquellos cultivares que muestran dicho perfil alélico para el marcador estudiado:

**Figura 12. Marcador OleagenH2.** Electroferogramas para cada combinación alélica. En negrita se marca el nombre del cultivar al que pertenece concretamente dicho electroferograma.

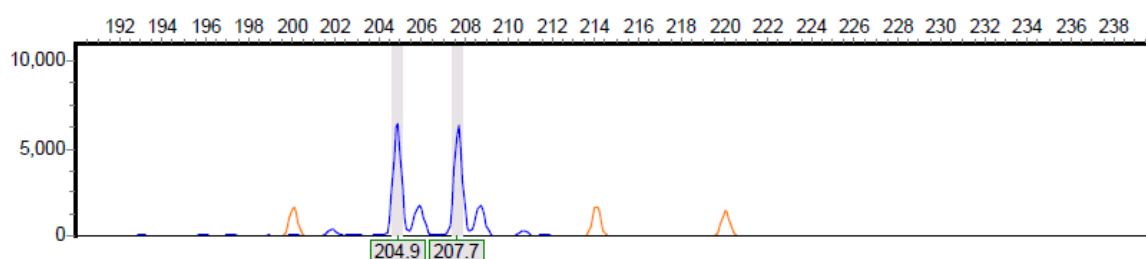
Combinación alélica: (202, 205), variedades: **Redondil**, Buidiego, Callosina, Campanil, Cañivano blanco, Cornicabra Parda de Villena, Caninese, Celina.



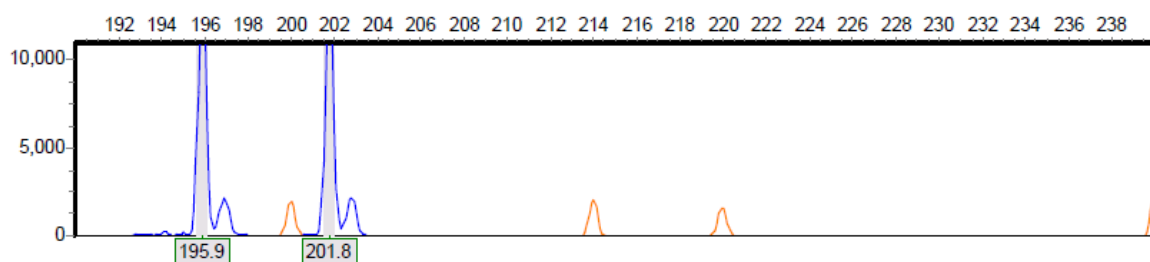
Combinación alélica: (202, 226), variedades: **Bella di Spagna**



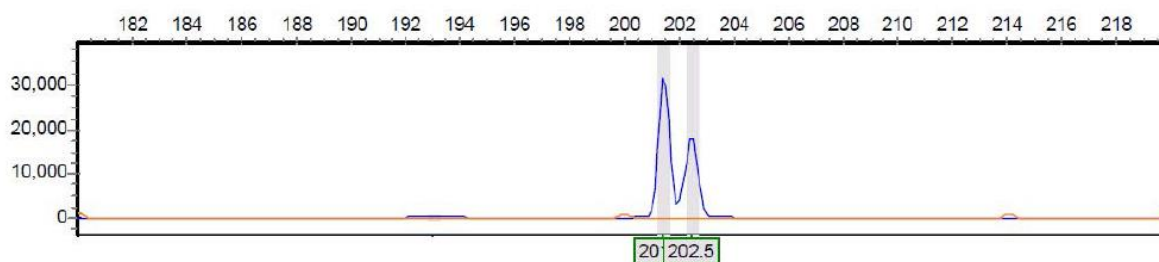
Combinación alélica: (205, 208), variedades: **Genovesa**.



Combinación alélica: (196, 202), variedades: **Golbina de Belchite**.



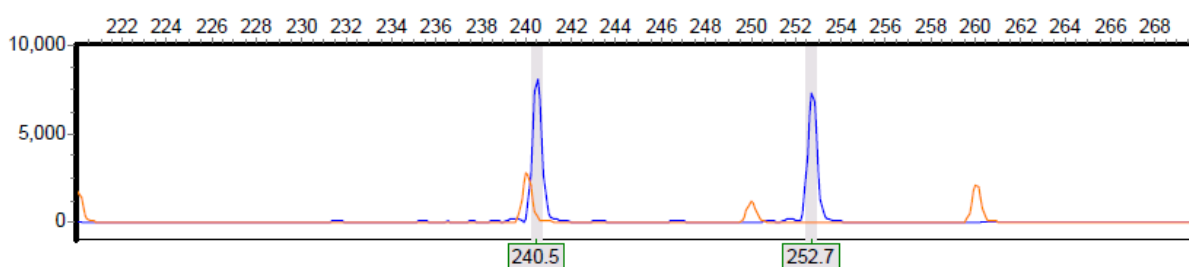
Combinación alélica: (202, 202), variedades: **Bouteillan**.



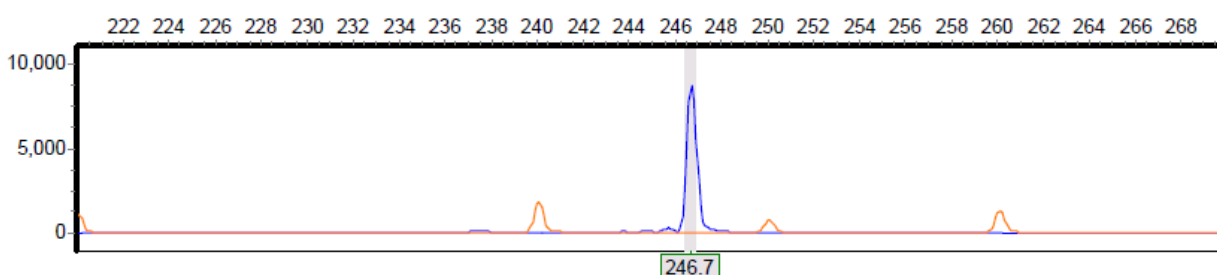
Este es un marcador hexanucleótido polimórfico con el que se han obtenido 5 genotipos diferentes, en un rango de 196 a 226 pares de bases para nuestras muestras. Como se puede observar los picos son bastante claros.

**Figura 13. Marcador OleagenH20.1.** Electroferogramas para cada combinación alélica. En negrita se marca el nombre del cultivar al que pertenece concretamente dicho electroferograma.

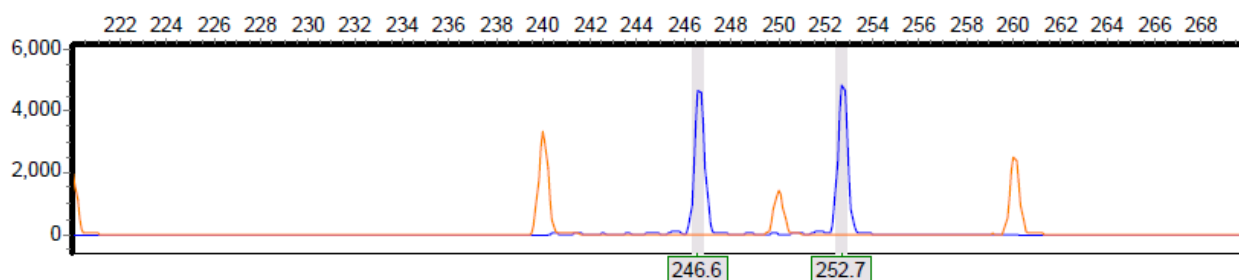
Combinación alélica: (240, 252), variedades: **Redondil**.



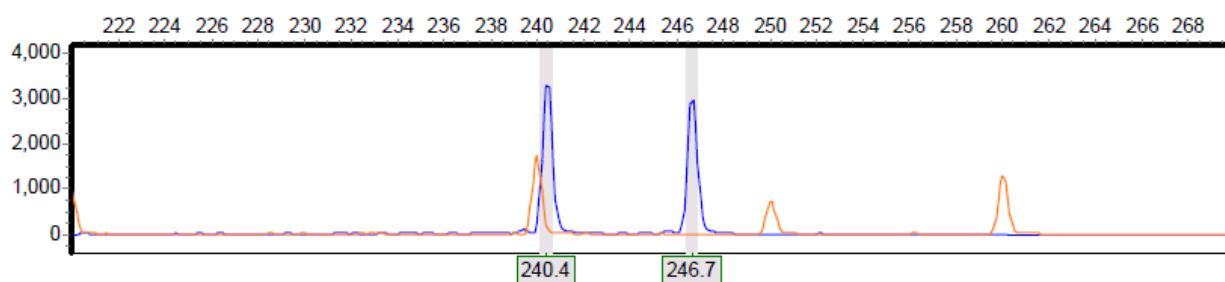
Combinación alélica: (246, 246), variedades: **Bouteillan**,



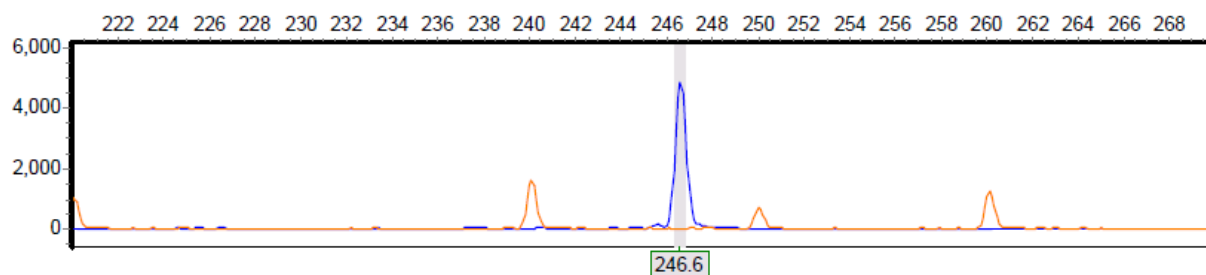
Combinación alélica: (245, 251), variedades: **Bella de Spagna**,



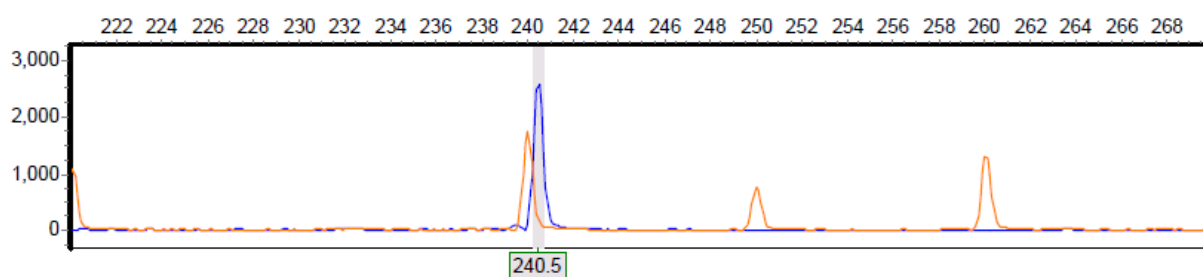
Combinación alélica: (240, 246), variedades: **Buidiego**, Callosina, Campanil, Cañivano blanco, Cornicabra parda de Villena



Combinación alélica: (246, 246), variedades: **Celina**, Caninese.



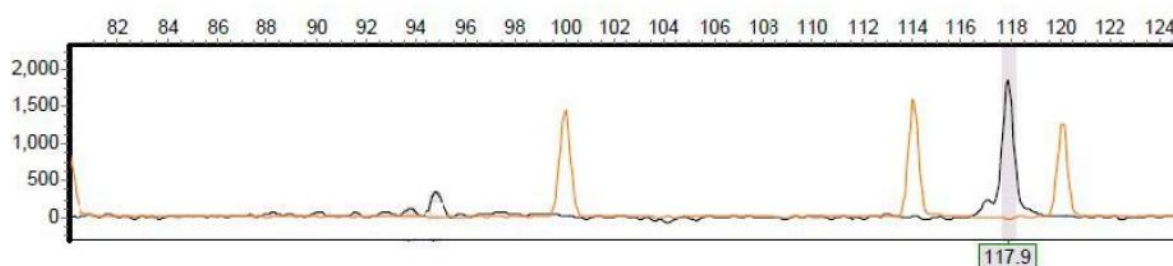
Combinación alélica: (240, 240), variedades: Genovesa, **Golbina de Belchite**.



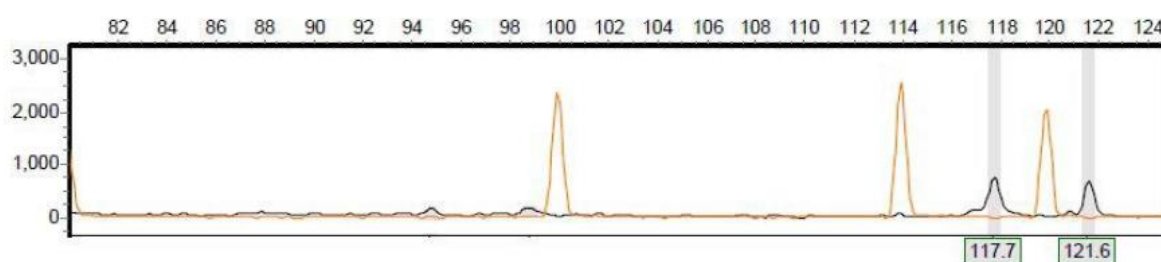
El marcador hexanucleótido H20.1 es muy polimórfico. Con él se han obtenido 6 genotipos diferentes. Además los picos se muestran muy claros en el rango de la 240 a 252 pares de bases.

**Figura 14. Marcador Olea42.31.** Electroferogramas para cada combinación alélica. En negrita se marca el nombre del cultivar al que pertenece concretamente dicho electroferograma.

Combinación alélica: (118, 118), variedades: **Redondil**, Buidiego, Callosina, Campanil, Caninese, Cañivano blanco, Cornicabra parda de Villena, Genovesa, Golbina de Belchite.



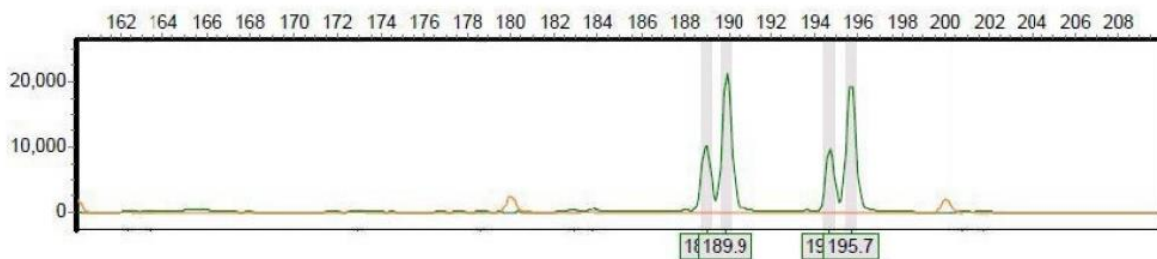
Combinación alélica: (118, 122), variedades: **Celina**, Bouteillan y Bella de Spagna.



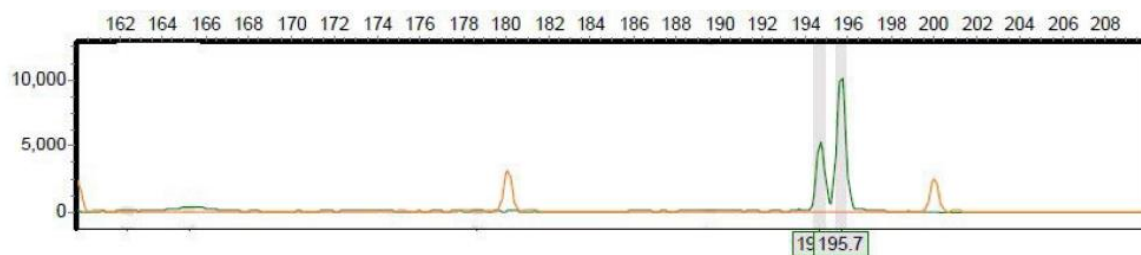
El marcador muestra menos polimorfismo para nuestras muestras, ya que solo se han encontrado dos genotipos diferentes en las 12 variedades estudiadas. Los picos aparecen entre las 118 y 122 pares de bases aunque hay perfiles alélicos en otros cultivares que muestran la presencia de amplicones en un rango oscilante entre 93 y 122pb.

**Figura 15. Marcador Olea9.4.** Electroferogramas para cada combinación alélica. En negrita se marca el nombre del cultivar al que pertenece concretamente dicho electroferograma.

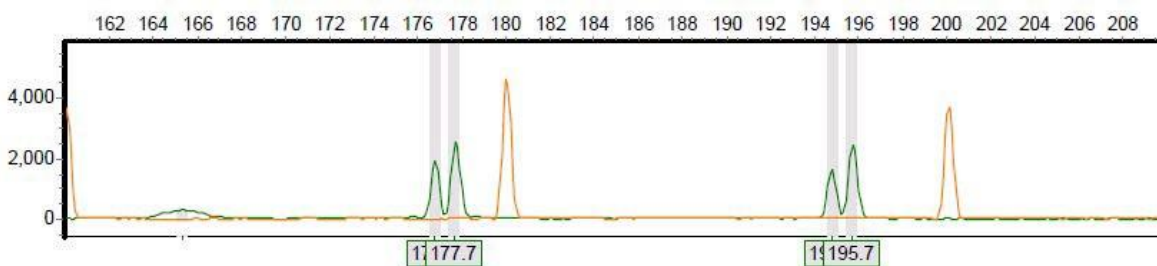
Combinación alélica: (189, 195), variedades: **Redondil**, Cañivano blanco



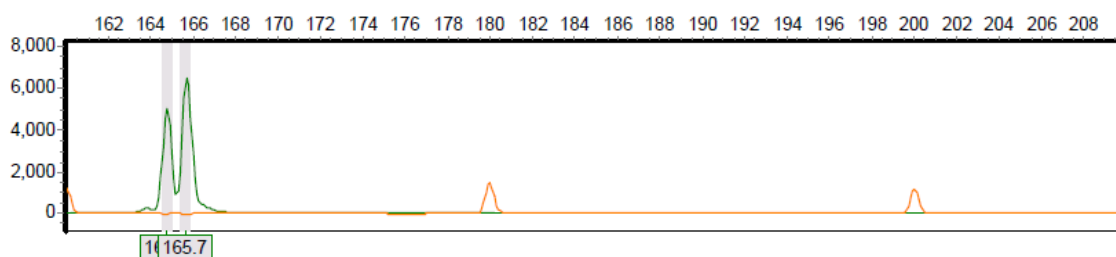
Combinación alélica: (195, 195), variedades: **Bella de Spagna**, Callosina, Cornicabra parda de Villena.



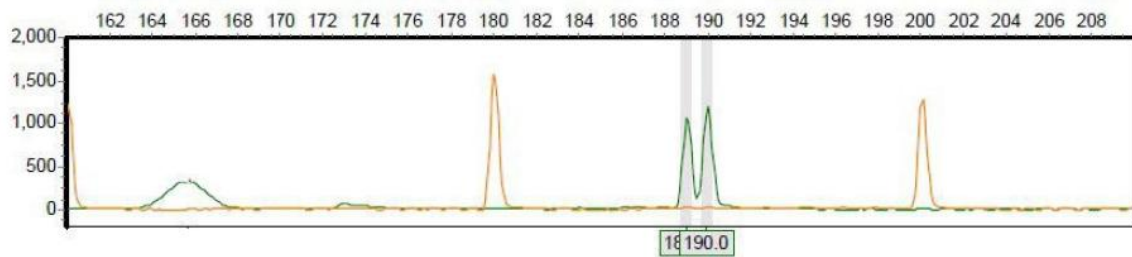
Combinación alélica: (177, 195), variedades: **Campanil**,



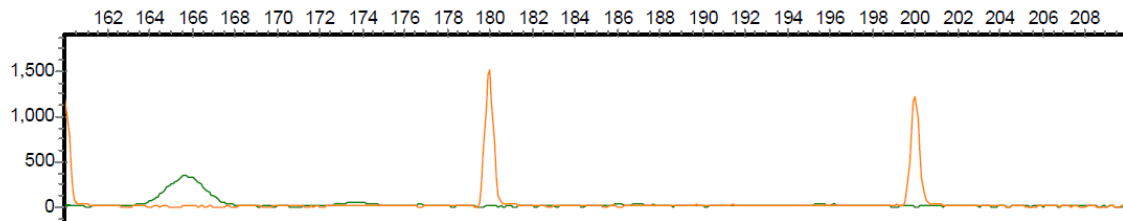
Combinación alélica: (165, 165), variedades: **Celina**,



Combinación alélica: (189, 189), variedades: **Golbina de Belchite**, Bouteillan.



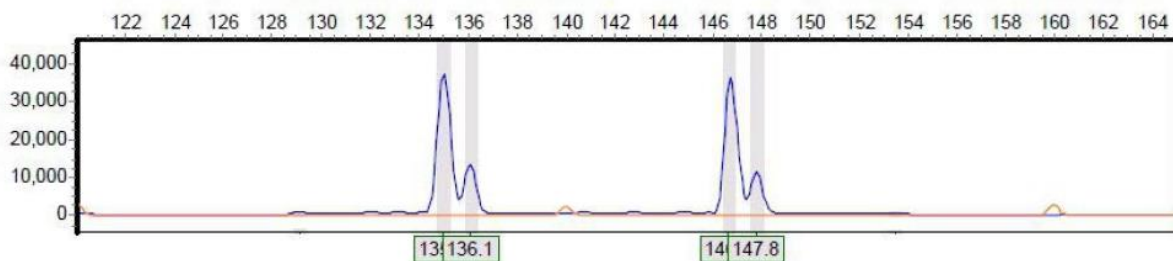
Combinación alélica: (nula), variedades: **Buidiego**, Genovesa y Caninese.



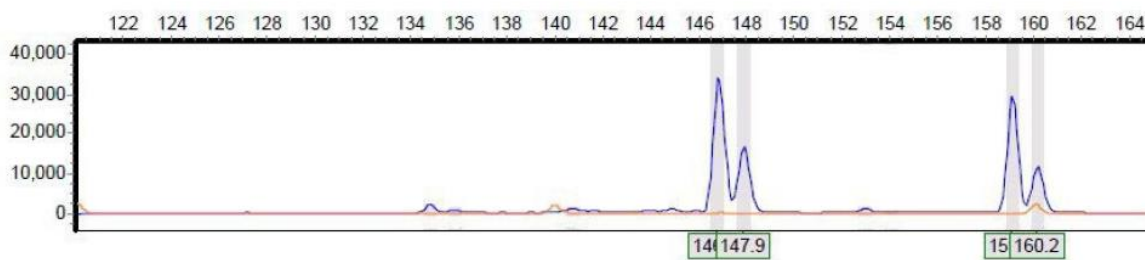
Las variedades Buidiego, Genovesa y Caninese mostraron electroferogramas nulos para este marcador hexanucleótido que se caracteriza por producir bastantes genotipos nulos en las muestras estudiadas. No obstante se trata de un marcador muy polimórfico y reproducible ya que se han encontrado 5 genotipos diferentes con picos que se encuentran entre 175 y 189 pares de bases.

**Figura 16. Marcador OleagenH4.1.** Electroferogramas para cada combinación alélica. En negrita se marca el nombre del cultivar al que pertenece concretamente dicho electroferograma.

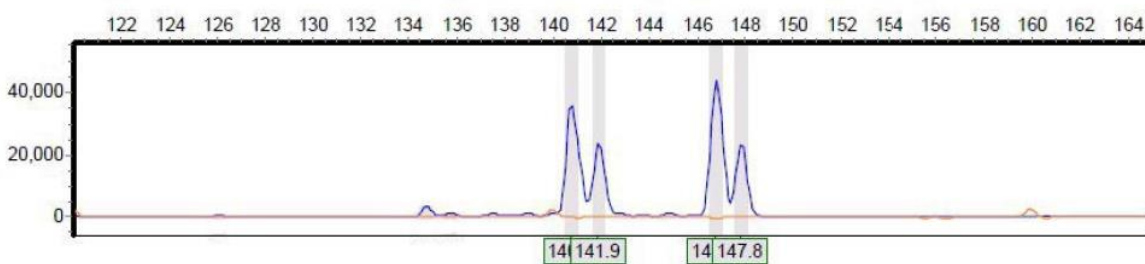
Combinación alélica: (136, 148), variedades: **Redondil**, Campanil.



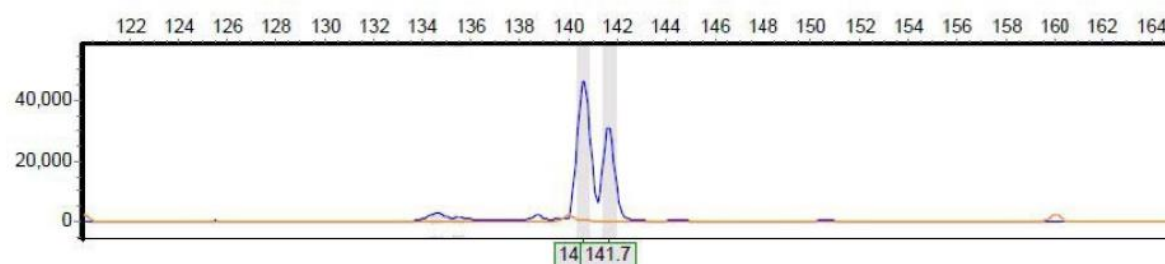
Combinación alélica: (148, 160), variedades: **Bouteillan**.



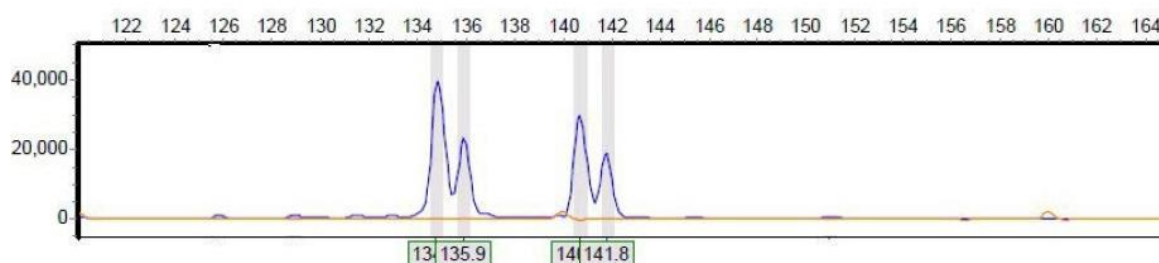
Combinación alélica: (142, 148), variedades: **Bella de Spagna**, Buidiego, Callosina, Cornicabra parda de Villena.



Combinación alélica: (142, 142), variedades: **Caninese**, Celina.

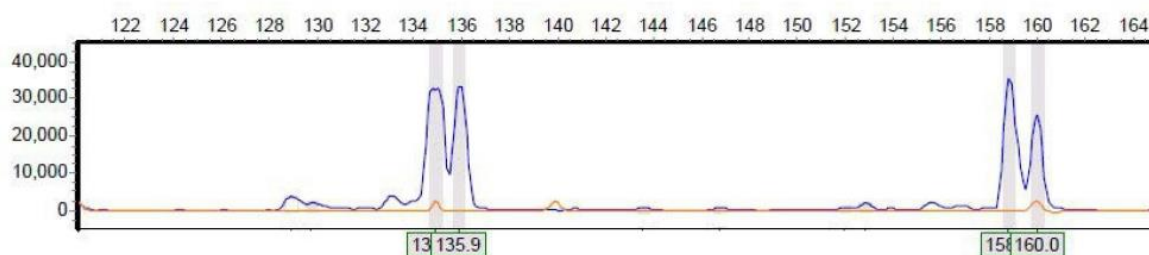


Combinación alélica: (136, 142), variedades: **Cañivano blanco**, Genovesa.



Combinación alélica: (136, 160), variedades: **Golbina de Belchite**.

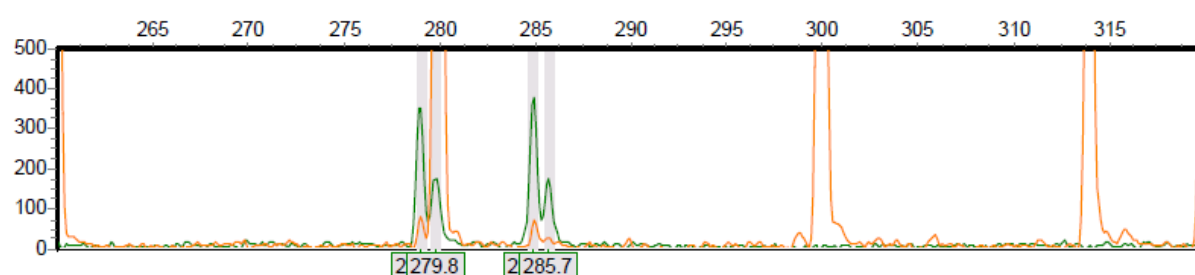




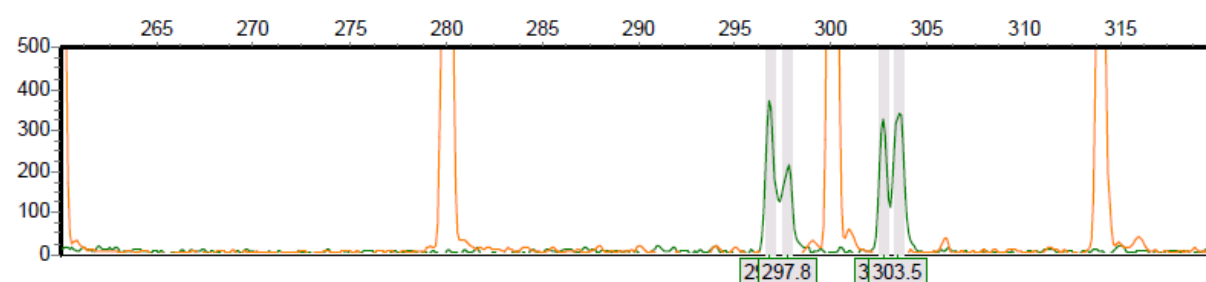
Puesto que se han encontrado 6 genotipos diferentes, H4.1 se considera un marcador hexanucleótido muy polimórfico que arroja picos muy nítidos para todas las muestras. Los picos se han encontrado en un rango de entre 136 y 160 pares de bases.

**Figura 17. Marcador OleagenH21.** Electroferogramas para cada combinación alélica. En negrita se marca el nombre del cultivar al que pertenece concretamente dicho electroferograma.

Combinación alélica: (280, 286), variedades: **Redondil**, Callosina, Cornicabra Parda de Villena.

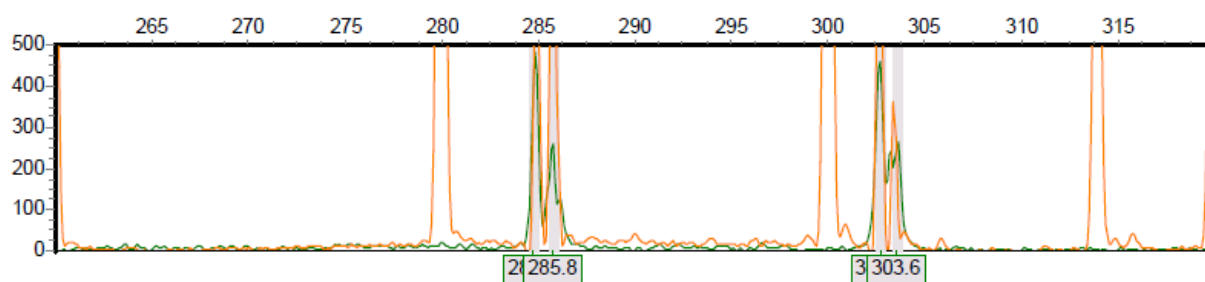


Combinación alélica: (298, 304), variedades: Bouteillan, **Buidiego**.

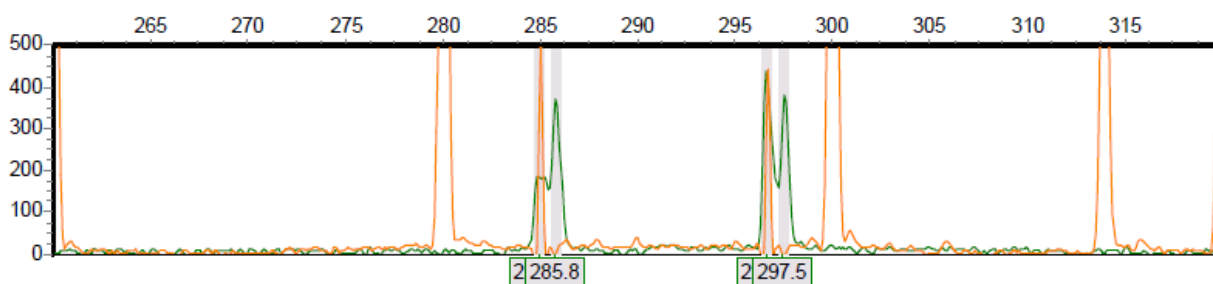


Combinación alélica: (286, 304), variedades: **Bella di Spagna**.

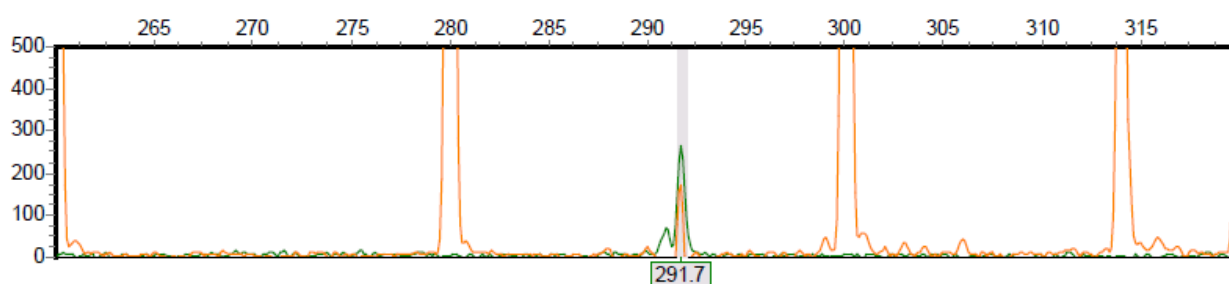




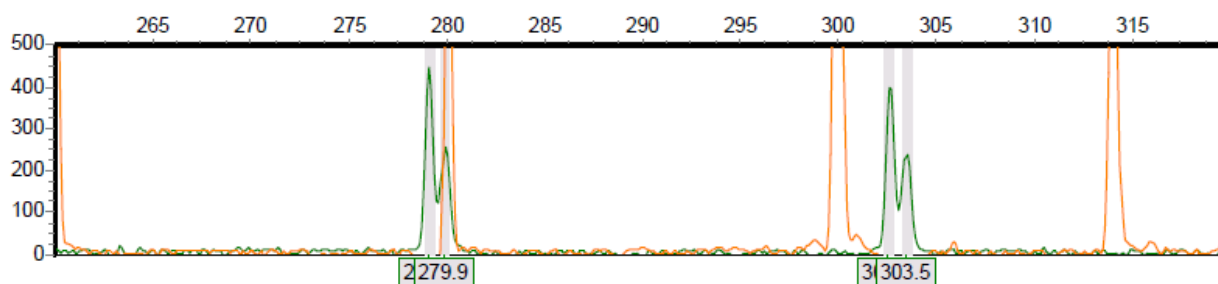
Combinación alélica: (286, 298), variedades: **Campanil**



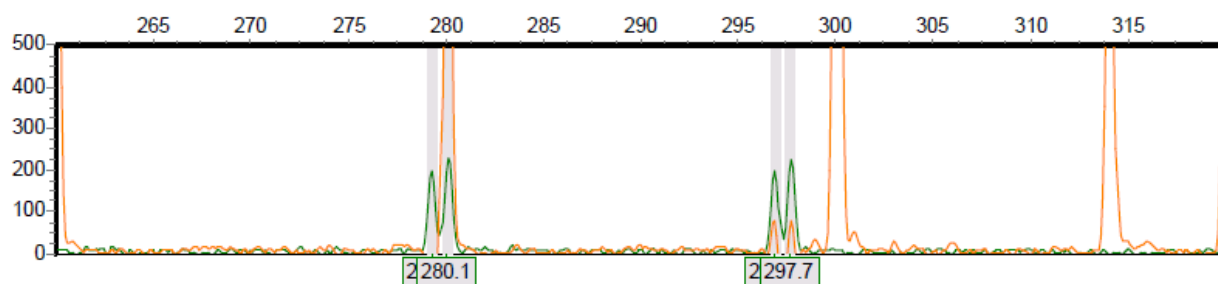
Combinación alélica: (292, 292), variedades: **Caninese**



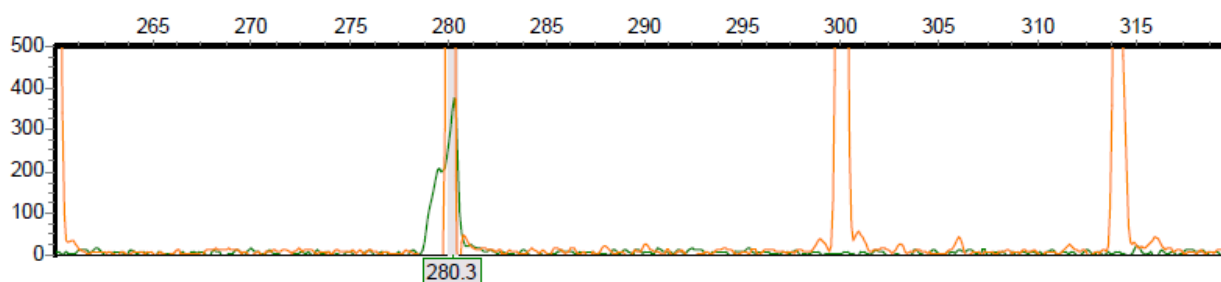
Combinación alélica: (280, 304), variedades: **Cañivano blanco**



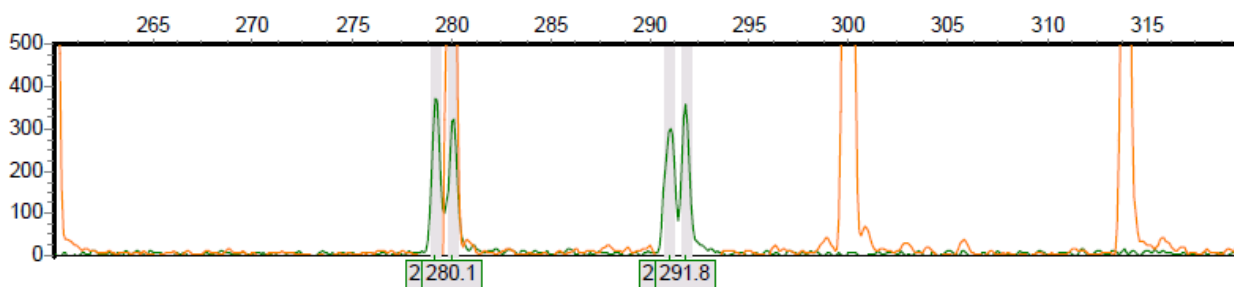
Combinación alélica: (280, 298), variedades: **Celina**



Combinación alélica: (280, 280), variedades: **Genovesa**.



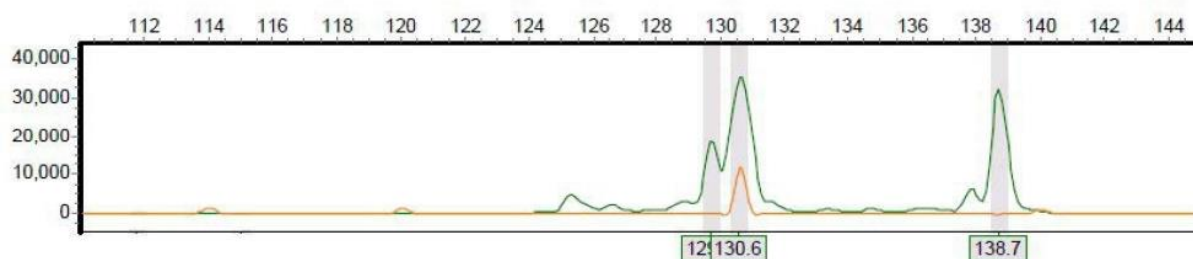
Combinación alélica: (280, 292), variedades: **Golbina de Belchite**.



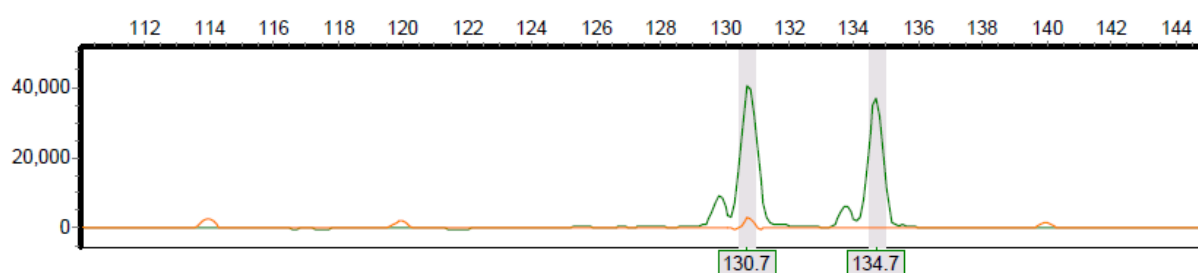
Como podemos ver en los electroferogramas el marcador hexanucleótido Oleagen H21 es muy polimórfico ya que se han obtenido 9 genotipos diferentes para las 12 variedades estudiadas. Los picos muestran un claro perfil en todos los cultivares y se encuentran entre 280 y 304 pares de bases

**Figura 18. Marcador Olea39.** Electroferogramas para cada combinación alélica. En negrita se marca el nombre del cultivar al que pertenece concretamente dicho electroferograma.

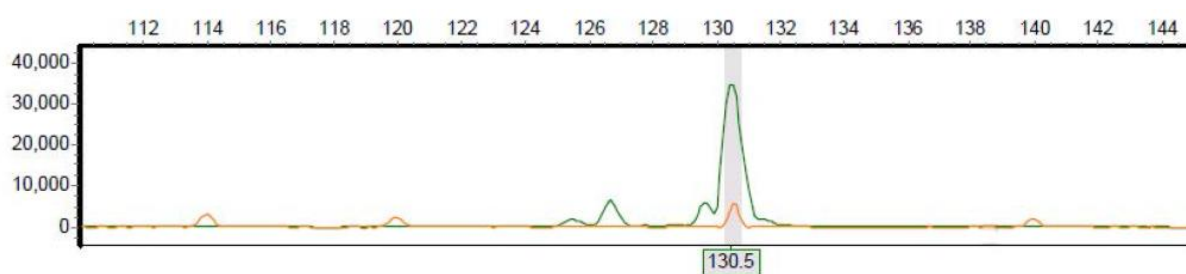
Combinación alélica: (131, 139), variedades: **Redondil**, Bella de Spagna, Buidiego, Cañivano Blanco, Genovesa.



Combinación alélica: (131, 135), variedades: **Bouteillan**, Golbina de Belchite.



Combinación alélica: (131, 131), variedades: Callosina, Campanil, **Caninese**, Cornicabra parda de Villena.



Combinación alélica: (135, 135), variedades: **Celina**.

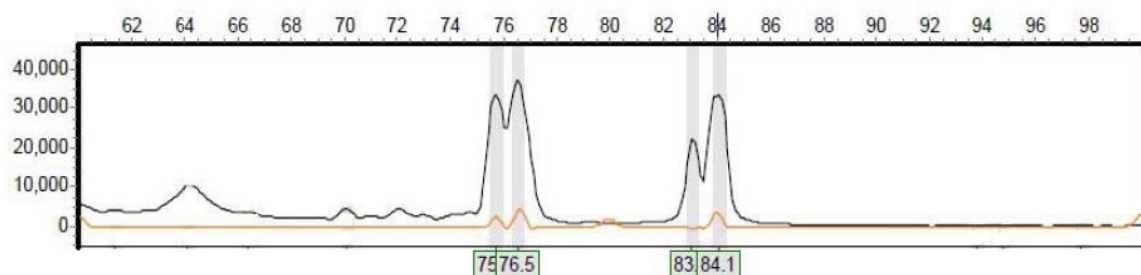


Este marcador tetranucleótido también es polimórfico puesto que se han encontrado 4 genotipos diferentes en el presente trabajo en el rango entre 131 y 139 pares de bases. En otros cultivares el patrón de amplicones que produce este

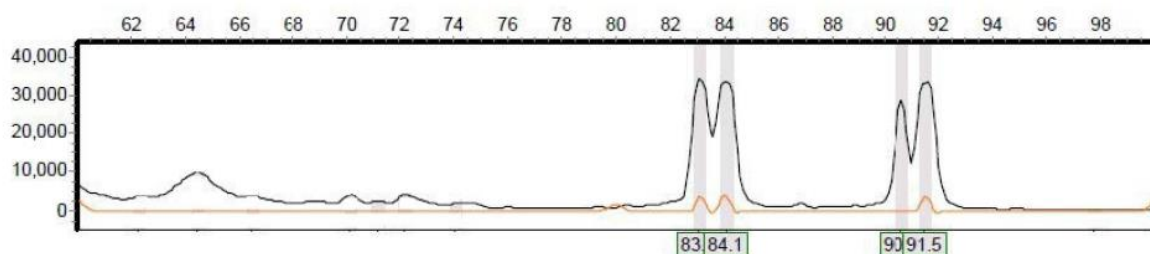
marcador oscila entre 123 y 139. Los picos obtenidos son bastante claros y totalmente reproducibles.

**Figura 19. Marcador Olea40.13.** Electroferogramas para cada combinación alélica. En negrita se marca el nombre del cultivar al que pertenece concretamente dicho electroferograma.

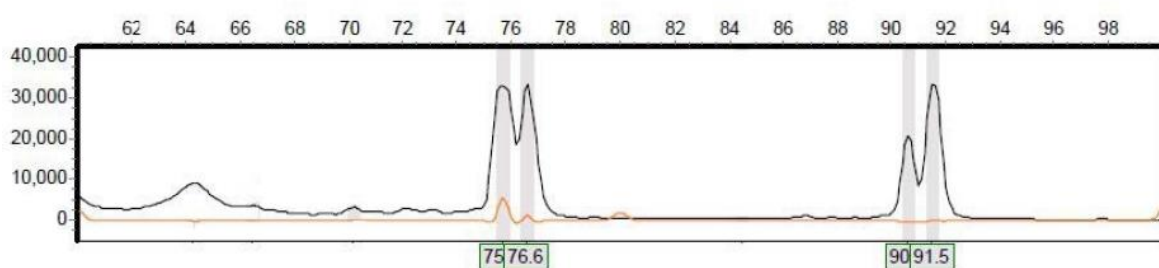
Combinación alélica: (75, 83), variedad: **Redondil**, Cañivano blanco, Cornicabra parda de Villena, Callosina.



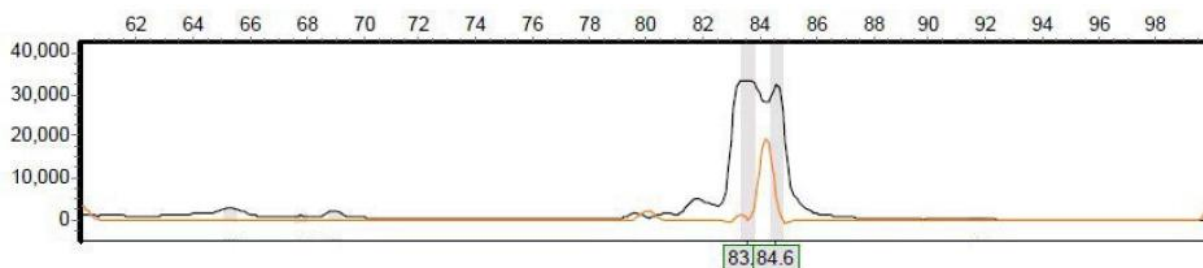
Combinación alélica: (83, 91), variedades: **Bouteillan**, Bella de Spagna, Golbina de Belchite.



Combinación alélica: (75, 91), variedades: **Buidiego**, Genovesa.



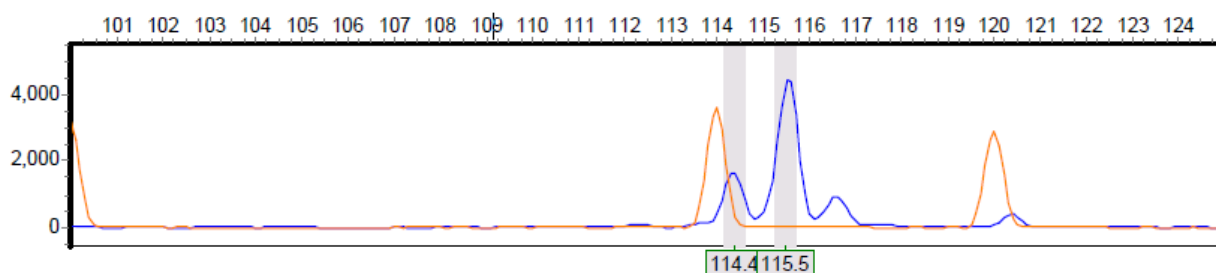
Combinación alélica: (83, 83), variedades: **Campanil**, Celina, Caninese.



Como podemos observar en los electroferogramas, nos encontramos ante un marcador polimórfico tetranucleótido ya que encontramos 4 genotipos diferentes, los picos son obtenidos en el rango de 75 a 91 pares de bases, bastante claros.

**Figura 20. Marcador Olea41.2.** Electroferogramas para cada combinación alélica. En negrita se marca el nombre del cultivar al que pertenece concretamente dicho electroferograma.

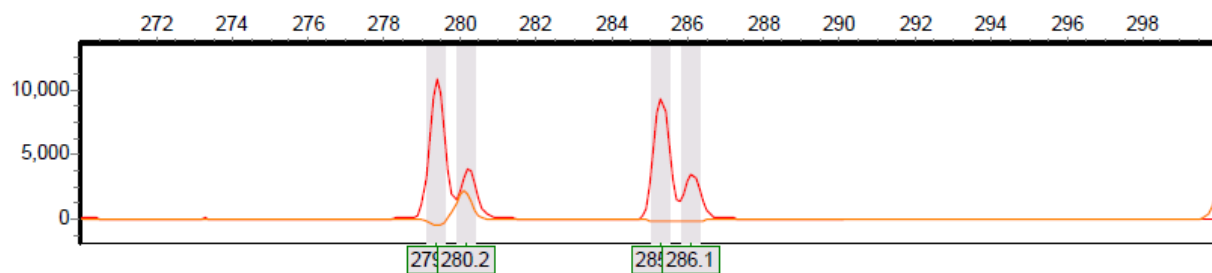
Combinación alélica: (115, 115), variedades: **Redondil**, Bouteillan, Bella di Spagna, Buidiego, Callosina, Campanil, Caninese, Cañivano Blanco, Celina, Cornicabra Parda de Villena, Golbina de Belchite, Genovesa.



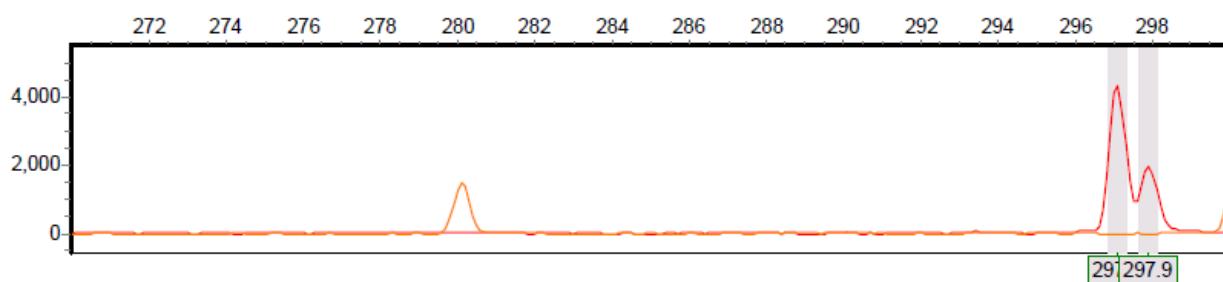
En este caso, el marcador tetranucleótido no es polimórfico para nuestras 12 muestras aunque en otros cultivares produce perfiles diferentes. Todas comparten el mismo genotipo homocigótico (115, 115). En este marcador se aprecian picos claros.

**Figura 21. Marcador Olea42.34.** Electroferogramas para cada combinación alélica. En negrita se marca el nombre del cultivar al que pertenece concretamente dicho electroferograma.

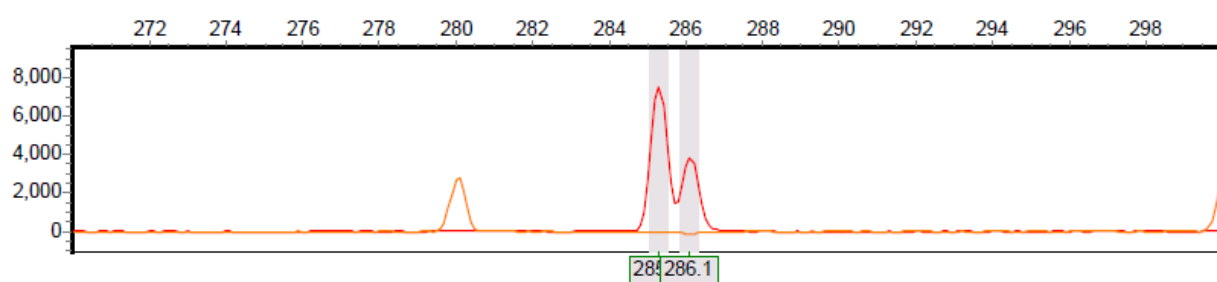
Combinación alélica: (280, 285), variedades: **Redondil**, Cornicabra Parda de Villena



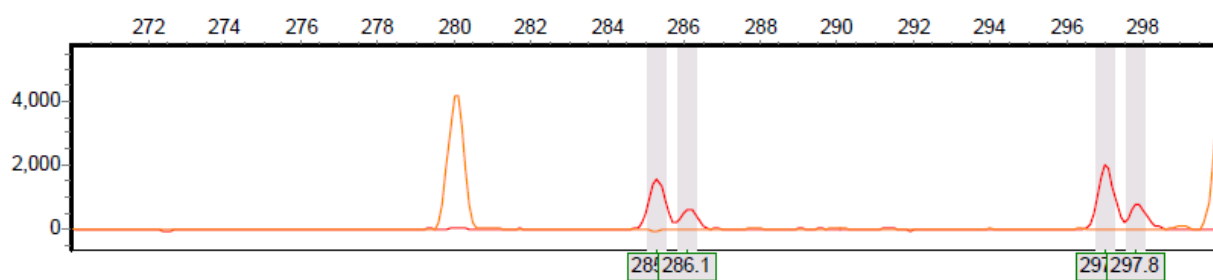
Combinación alélica: (296, 296), variedades: **Bouteillan**, Buidiego



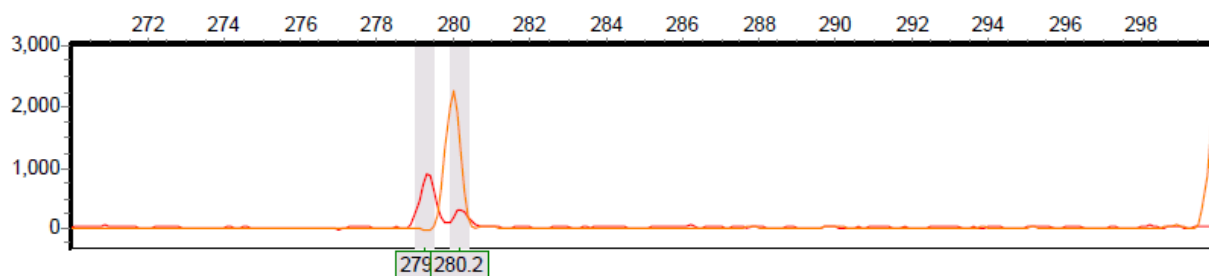
Combinación alélica: (285, 285), variedades: **Bella di Spagna**, Caninese.



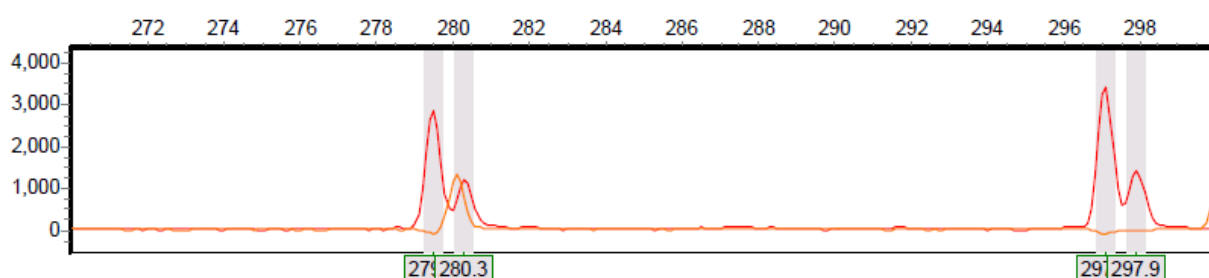
Combinación alélica: (285, 296), variedades: **Campanil**



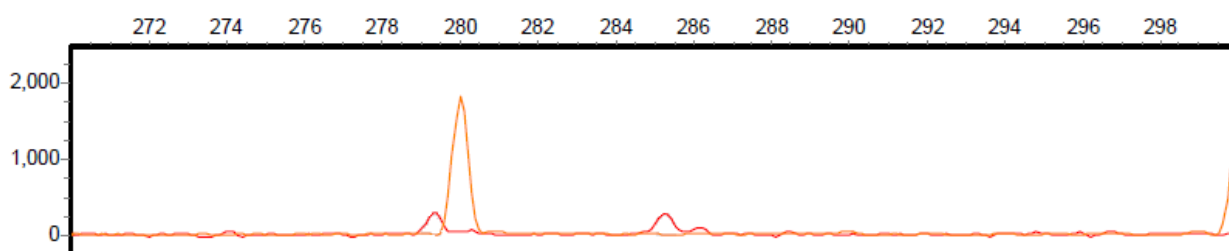
Combinación alélica: (280, 280), variedades: **Cañivano blanco**, Genovesa, Golbina de Belchite.



Combinación alélica: (280, 296), variedades: **Celina**.



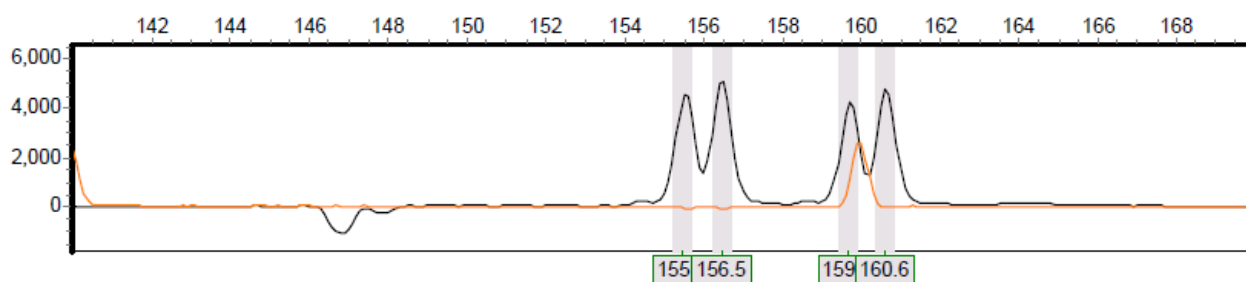
Combinación alélica: (nula), variedades: **Callosina**.



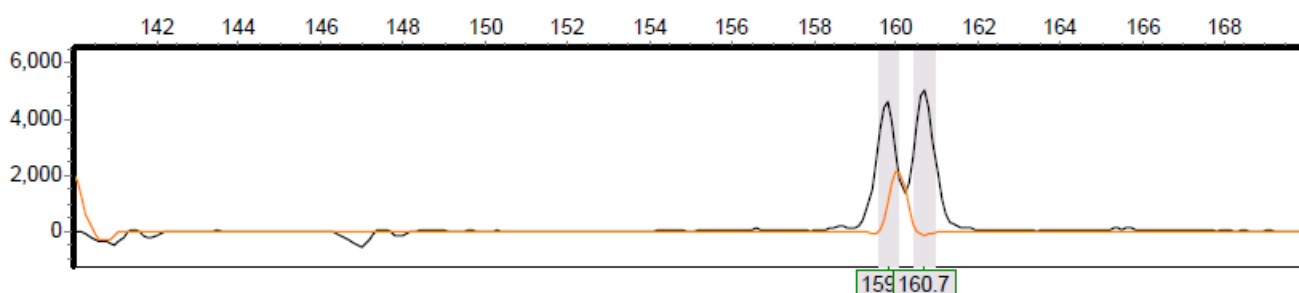
El marcador tetranucleótido representado en los electroferogramas de esta figura es muy polimórfico, de forma que encontramos hasta 6 genotipos diferentes a partir de las 12 variedades empleadas en el estudio. La variedad Callosina muestra un electroferograma nulo para este marcador. Los picos son muy claros y se encuentran en un rango de entre 280 y 296 pares de bases.

**Figura 22. Marcador Olea42.9.** Electroferogramas para cada combinación alélica. En negrita se marca el nombre del cultivar al que pertenece concretamente dicho electroferograma.

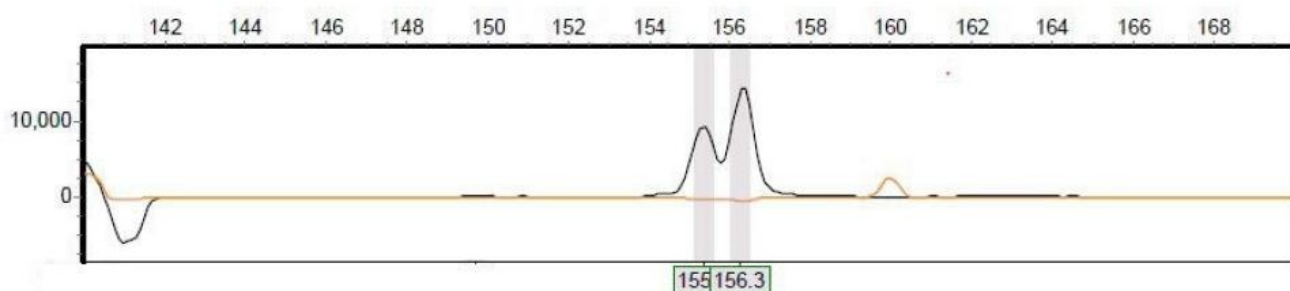
Combinación alélica: (156, 160), variedades: **Redondil**, Bouteillan, Bella de Spagna, Callosina, Campanil, Cañivano blanco, Cornicabra parda de Villena, Genovesa.



Combinación alélica: (160, 160), variedades: **Buidiego**, Caninese, Golbina de Belchite.



Combinación alélica: (156, 156), variedades: **Celina**.

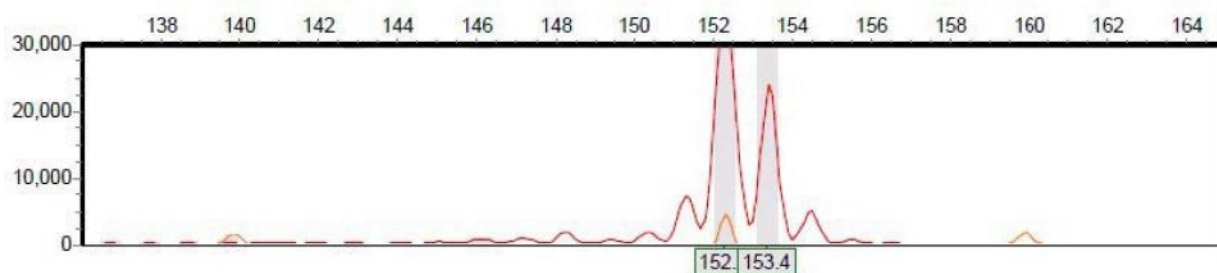


Con el presente marcador tetranucleótido se han obtenido 3 genotipos diferentes por lo que se puede considerar polimórfico. Los picos obtenidos son claros y se encuentran en el rango de las 156 a 160 pares de bases aunque su rango de comportamiento es de 148-160 pb.

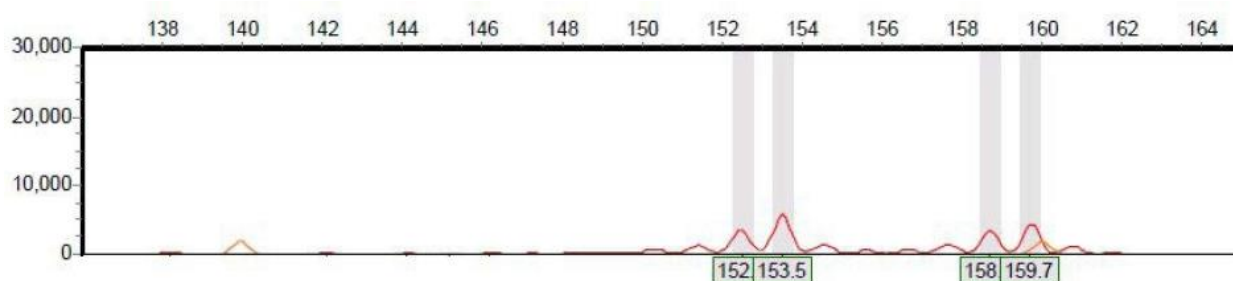
**Figura 23. Marcador 42.30.** Electroferogramas para cada combinación alélica. En negrita se marca el nombre del cultivar al que pertenece concretamente dicho electroferograma.

Combinación alélica: (152, 152), variedades: **Redondil**, Bella di Spagna, Buidiego, Genovesa.





Combinación alélica: (152, 160), variedades: **Bouteillan**, Callosina, Campanil, Cañivano Blanco, Celina, Cornicabra Parda de Villena, Golbina de Bechite, Caninese.



Como se puede observar este marcador tetranucleótido no es muy polimórfico para los 12 cultivares estudiados aunque sí lo es en el conjunto de la totalidad de las muestras que se han estudiado hasta la fecha. No obstante, es el peor de todos los marcadores puesto que con se puede observar en los electroferogramas los picos no son tan claros como en los otros marcadores que se han analizado previamente ya que hay un claro tartamudeo a la hora de arrojar los picos, que se encuentran en un rango de entre 152 y 160 pares de bases (141-160 pb en el total de los cultivares estudiados).

#### 6.4. Perfiles alélicos de las muestras para los 12 microsatélites e identificación de variedades

Los marcadores SSR fueron clasificados en base al perfil alélico que generaban (Tabla 5) utilizando los picos como criterio de selección además de los diferentes alelos y genotipos que mostraron y la presencia o ausencia de genotipos nulos.

Se estableció una clasificación de la calidad de los marcadores (alta, media y baja) en función de los picos obtenidos, de forma que los marcadores que proporcionaban picos más nítidos y claros fueron considerados de mayor calidad.

| Calidad de los marcadores SSR |          |          |          |          |          |          |          |        |          |          |          |          |
|-------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|--------|----------|----------|----------|----------|
|                               | Alta     |          |          |          | Media    |          |          |        |          |          | Baja     |          |
| Cultivar                      | H2       | H20.1    | 42.31    | 9.4      | H4.1     | H21      | 39       | 40.13  | 41.2     | 42.34    | 42.9     | 42.30    |
| Redondil                      | 202, 205 | 240, 252 | 118, 118 | 189, 195 | 136, 148 | 280, 286 | 131, 139 | 75, 83 | 115, 115 | 280, 285 | 156, 160 | 152, 152 |
| Bouteillan                    | 202, 202 | 246, 246 | 118, 122 | 189, 189 | 148, 160 | 298, 304 | 131, 135 | 83, 91 | 115, 115 | 296, 296 | 156, 160 | 152, 160 |
| Bella de Spagna               | 202, 226 | 245, 251 | 118, 122 | 195, 195 | 142, 148 | 286, 304 | 131, 139 | 83, 91 | 115, 115 | 285, 285 | 156, 160 | 152, 152 |
| Buidiego                      | 202, 205 | 240, 246 | 118, 118 | -        | 142, 148 | 298, 304 | 131, 139 | 75, 91 | 115, 115 | 296, 296 | 160, 160 | 152, 152 |
| Callosina                     | 202, 205 | 240, 246 | 118, 118 | 195, 195 | 142, 148 | 280, 286 | 131, 131 | 75, 83 | 115, 115 | -        | 156, 160 | 152, 160 |
| Campanil                      | 202, 205 | 240, 246 | 118, 118 | 177, 195 | 136, 148 | 286, 298 | 131, 131 | 83, 83 | 115, 115 | 285, 293 | 156, 160 | 152, 160 |
| Caninese                      | 202, 205 | 246, 246 | 118, 118 | -        | 142, 142 | 292, 292 | 131, 131 | 83, 83 | 115, 115 | 285, 285 | 160, 160 | 152, 160 |
| Cañivano blanco               | 202, 205 | 240, 246 | 118, 118 | 189, 195 | 136, 142 | 280, 304 | 131, 139 | 75, 83 | 115, 115 | 280, 280 | 156, 160 | 152, 160 |
| Celina                        | 202, 205 | 246, 246 | 118, 122 | 165, 165 | 142, 142 | 280, 298 | 135, 135 | 83, 83 | 115, 115 | 280, 296 | 156, 156 | 152, 160 |
| Ornicabra parda de Ville      | 202, 205 | 240, 246 | 118, 118 | 195, 195 | 142, 148 | 280, 286 | 131, 131 | 75, 83 | 115, 115 | 280, 285 | 156, 160 | 152, 160 |
| Genovesa                      | 205, 208 | 240, 240 | 118, 118 | -        | 136, 142 | 280, 280 | 131, 139 | 75, 91 | 115, 115 | 280, 280 | 156, 160 | 152, 152 |
| Golbina de Belchite           | 196, 202 | 240, 240 | 118, 118 | 189, 189 | 136, 160 | 280, 292 | 131, 135 | 83, 91 | 115, 115 | 280, 280 | 160, 160 | 152, 160 |
| Nº alelos                     | 5        | 5        | 2        | 4        | 4        | 5        | 3        | 3      | 1        | 4        | 2        | 2        |
| Nº genotipos                  | 5        | 6        | 2        | 5        | 6        | 9        | 4        | 4      | 1        | 6        | 3        | 2        |

**Tabla 5.** Tabla en la que se muestra la clasificación de los marcadores en función de su calidad y cada uno de los alelos de cada variedad para los marcadores ensayados. Además, aparecen recogidos el número de alelos y genotipos diferentes a los que da lugar cada marcador.

Uno de los objetivos del presente trabajo es encontrar marcadores que identifiquen de forma inequívoca cada variedad de olivo, empleando además el menor número de marcadores posible. Para ello, se tuvieron en cuenta el resto de variedades de olivo que ya habían sido estudiadas con estos mismos marcadores en trabajos previos, que son más de 80, estudiadas la mayoría en muestras por duplicado.

Teniendo en cuenta los datos de perfiles procedentes de estudios previos, (sometidos a su publicación y por lo tanto no disponibles), se puede afirmar que en el presente trabajo se han encontrado 4 genotipos exclusivos, es decir, genotipos que no se encuentran en ninguna otra variedad o cultivar para un marcador determinado. Estos genotipos exclusivos son:, Variedad Caninese (291, 291) con el marcador OleagenH21, Variedad Golbina de Belchite (136, 160) con el marcador

OleagenH4.1, Variedad Celina (208, 208) con el marcador OleagenH2 Bella de Spagna (202, 226) con OleagenH2. Se podrían identificar cada una de estas 4 variedades únicamente con dichos marcadores aunque no sea recomendable hacerlo así, lógicamente porque podría tratarse de otro cultivar aún no identificado y arrojar otros perfiles alélicos diferentes al usar otros marcadores diferentes de los mencionados.

Puesto que para el resto de las variedades no se han encontrado genotipos exclusivos sería necesario emplear dos o más marcadores para llevar a cabo su identificación. Para ello, se buscó que los cultivares que compartieran genotipos para un determinado marcador no compartieran genotipo con un segundo o tercer marcador. De forma que para identificar la variedad Redondil se puede utilizar el marcador OleagenH20.1 y el Olea42.31 ya que las variedades con las que comparte genotipo para el primer marcador no lo comparten con el segundo.

Siguiendo el mismo criterio, para identificar la variedad Bouteillan, también serían necesarios 2 marcadores diferentes: OleagenH4.1 cuyo genotipo para esta variedad es 148, 160 y OleagenH2 cuyo genotipo es 202, 202. Con respecto a Bella de Spagna se escogieron dos marcadores: OleagenH2 (202, 226) y OleagenH20.1 (245, 251).

En el caso de Buidiego, como podemos ver en la tabla 6, son al menos tres los marcadores que se necesitaron para distinguir esta variedad del resto: Olea40.13 (75, 91), OleagenH21 (298, 304) y OleagenH2 (202, 205). Para la correcta identificación de Callosina se necesitaron 4 marcadores OleagenH21 (280, 286), Olea39 (131, 131), OleagenH2 (202, 205) y Olea42.9 (156, 160).

Celina presenta un genotipo poco común, pero no exclusivo, porque también ha aparecido sólo en var. Frantoio en estudios previos para el marcador Olea9.4 (165, 165). Por ello es necesario emplear un segundo marcador que la diferencie de la variedad con la que comparte genotipo. El marcador escogido es OleagenH2, el cual, es uno de los marcadores con mejor calidad.

Para Cañivano Blanco se necesitaron como mínimo 4 marcadores de los 12 empleados, por tanto, es la variedad para la que más marcadores se necesitan para identificarla: OleagenH21 (280, 304), OleagenH2 (202, 205), Olea42.31 (118, 118) y

Olea9.4 (189, 195). Cornicabra Parda de Villena se puede diferenciar del resto con la ayuda del marcador Olea9.4 (195, 195) y OleagenH20.1 (240, 246).

En cuanto a Genovesa para el marcador OleagenH2 solo comparte genotipo (205, 208) para una variedad previamente estudiada por lo que se puede identificar unívocamente con la ayuda de un segundo marcador OleagenH20.1 cuyo genotipo (240, 240) no es compartido por dicha variedad.

En la tabla 5 se puede observar de manera más clara que los 12 cultivares estudiados presentan diferencias en su huella alélica. Celina es de las variedades estudiadas la que presenta una mayor cantidad de genotipos diferentes. Mientras que en el extremo contrario se encuentran Callosina y Cornicabra Parda de Villena, que con los marcadores utilizados, no se pueden diferenciar una de otra ya que presentan los mismos genotipos para cada uno de ellos a excepción del genotipo nulo que se encuentra para Callosina y el marcador Olea42.34.

| Variedad               | Genotipos | Marcadores |
|------------------------|-----------|------------|
| <b>Redondil</b>        | 240, 252  | H20.1      |
|                        | 118, 118  | 42.31      |
| <b>Bella de Spagna</b> | 202, 226  | H2         |
|                        | 245, 251  | H20.1      |
| <b>Bouteillan</b>      | 148, 160  | H4.1       |
|                        | 202, 202  | H2         |
| <b>Buidiego</b>        | 75, 91    | 40.13      |
|                        | 298, 304  | H21        |
|                        | 202, 205  | H2         |
| <b>Callosina</b>       | 280, 286  | H21        |
|                        | 131, 131  |            |
|                        | 202, 205  | 39         |
|                        | 156, 160  | H2         |
|                        |           | 42.9       |
| <b>Cañivano Blanco</b> | 280, 304  | H21        |
|                        | 202, 205  | H2         |
|                        | 118, 118  | 42.31      |
|                        | 189, 195  | 9.4        |
| <b>Celina</b>          | 165, 165  | 9.4        |
|                        | 202, 205  | H2         |

|                                            |          |       |
|--------------------------------------------|----------|-------|
| <b>Cornicabra<br/>Parda de<br/>Villena</b> | 195, 195 | 9.4   |
|                                            | 240, 246 | H20.1 |
| <b>Genovesa</b>                            | 205, 208 | H2    |
|                                            | 240, 240 | H20.1 |

**Tabla 6.** Tabla resumen con los marcadores mínimos necesarios para identificar cada variedad que no presenta genotipos únicos y sus genotipos correspondientes.

Por otra parte, como se puede observar en la tabla 7, 3 de los 12 cultivares que se han utilizado en el estudio han presentado un genotipo exclusivo para alguno de los 12 marcadores empleados siempre teniendo en cuenta los genotipos obtenidos en estudios previos.

| <b>Variedades</b> |                                | <b>Genotipo<br/>único</b> | <b>Marcador</b> |
|-------------------|--------------------------------|---------------------------|-----------------|
|                   | <b>Caninese</b>                | 292, 292                  | H21             |
|                   | <b>Campanil</b>                | 177, 195                  | 9.4             |
|                   | <b>Golbina de<br/>Belchite</b> | 136, 160                  | H4.1            |

**Tabla 7.** Tabla que muestra un resumen de los genotipos exclusivos obtenidos para cada variedad con su marcador correspondiente

## 6.5. Discusión

En este trabajo se ha llevado a cabo, la identificación genética de 12 cultivares de olivo procedentes del IFAPA Venta del Llano. Para ello se han empleado una serie de marcadores SSR long core repeat hexa- y tetra-nucleótidos. En este caso, 7 de los 12 marcadores eran tetranucleótidos (Olea42.31, Olea39, Olea40.13, Olea41.2, Olea42.34, Olea42.9, Olea42.30) y 5 eran hexanucleótidos (Olea9.4, OleagenH2, OleagenH21, OleagenH4.1 y OleagenH20.1).

Para llevar a cabo la identificación de los mismos se han realizado varias PCRs múltiples. Esta modalidad de PCR permite amplificar en un mismo tubo hasta 5 marcadores diferentes sin que haya interferencias de unos marcadores con otros o disminución de la señal por interferencias entre ellos, produciendo un claro beneficio porque repercute en el usuario en un considerable ahorro de tiempo y trabajo y también de costes en reactivos. Se han encontrado genotipos exclusivos

en 3 de las 12 variedades de olivo empleadas en la presente memoria teniendo en cuenta los genotipos de más de 80 variedades estudiadas previamente. Las variedades que presentaban los citados genotipos eran Caninese, Campanil y Golbina de Belchite.

En cuanto al resto, no se ha encontrado ningún genotipo exclusivo para ninguna de las variedades pero, como podemos ver en la tabla 6, se pueden identificar de forma inequívoca mediante la utilización de dos marcadores SSR en el caso de Redondil, Bouteillan, Cornicabra Parda de Villena, Celina, Bella de Spagna y Genovesa. Para Buidiego se necesitaron como mínimo 3 de los marcadores, mientras que en el caso de Cañivano Blanco y Callosina fueron 4 los marcadores necesarios para su correcta identificación.

## **7. Conclusiones**

Este trabajo ha supuesto la puesta a punto de una PCR multiplex para la utilización de un set de marcadores microsatélites long core repeat que nos han permitido introducir hasta 5 marcadores de forma simultánea ahorrando tiempo y costes en reactivos y obteniendo excelentes resultados.

Las conclusiones de este trabajo se pueden resumir de la siguiente manera.

Se ha llevado a cabo la puesta a punto de una PCR multiplex para la utilización de un set de doce marcadores microsatélites de núcleo largo. El número máximo de marcadores que pueden incluirse en cada tubo de reacción es de 5 o menor.

Todos los marcadores utilizados están marcados con fluoróforos y arrojan tamaños de amplicones diferentes, de manera que pueden mezclarse en el mismo tubo de PCR de forma indiscriminada sin producir errores de interpretación de unos marcadores con otros.

Se han encontrado genotipos exclusivos en 3 de las 12 variedades de olivo empleadas en la presente memoria: 292, 292 para Caninese, 177, 195 para Campanil y 136, 160 para Golbina de Belchite.

Mediante la combinación de 2, 3 o 4 marcadores diferentes podemos distinguir todos los cultivares estudiados. A pesar de esta ventaja a la hora de

identificar un cultivar, se recomienda usar todo el set de los 12 microsatélites con el fin de confirmar con una fiabilidad del 100% .

Además, mediante la realización de este trabajo se ha contribuido con los estudios de identificación de cultivares de olivo. No obstante, sería interesante continuar realizando este tipo de estudios sobre diferentes variedades ya que suponen la identificación genética de los cultivares muchos de ellos aún sin identificar en los bancos de germoplasma.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede afirmar que el set de 12 microsatélites utilizados en este trabajo representan una potente herramienta de gran utilidad para tipificar y genotipar las más de 1200 variedades de olivo existentes en el mundo.

## **8. Bibliografía**

- Amane M, Lumaret R, Hany V, Ouazzani N, Debain C, Vivier G, Deguilloux MF. 1999. Chloroplast-ADN variation in cultivated and wild olive (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.* 99. 133-139.
- Angiolillo A, Mencuccini M, Baldoni L. Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics.* 1999;98:411–421.
- Barranco, D., & Rallo, L. (1984). Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía Consejería de la Junta de Andalucía. MAPA, Madrid.
- Barranco, D. (2004). Variedades y patrones. En: El cultivo del olivo. Barranco, D., Fernández-Escobar, R. Y Rallo, L. (Eds). MundiPrensa-Junta de Andalucía. Madrid.
- Blázquez, J. M. (1996). Origen y difusión del cultivo. *Enciclopedia Mundial del Olivo*, 19-20.
- Bolivar, A. M., Rojas, A., & Garcia Lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en biomedicina*, 3(1).
- Buendía, M. R. P., & Martínez, J. M. M. (2013). Historia del cultivo del olivo y el aceite; su expresión en la biblia. *Ensayos: Revista de la Facultad de Educación de Albacete*, (28), 155-181.

- 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.
- De arce, A. T., Solís, R. S., & Bellido, F. J. F. (1999). Características morfo-anatómicas, fisiológicas y bioquímicas de plantas jóvenes de olivo (*Olea europaea* L.) obtenidas in vitro, en función de la fuente y concentración de nitrógeno.
- 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 Oleacea. *Molecular Ecology Notes.* 2. 265-267.
- 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 Genetics and Genomes.* 2. 165-175.
- Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 5(6):435-445.
- Fendri, M. (2008). Uso de marcadores microsatélites (SSRs) para el análisis de la variabilidad molecular y la identificación de las variedades de olivo del banco de germoplasma de "Boughara"(Sfax, Túnez).
- Fendri, M. (2012). *Discriminación varietal en el polen de olivo (Olea Europaea L.) mediante características morfológicas y marcadores microsatélites. Construcción de una base de datos y aplicaciones.* Granada: Universidad de Granada.
- González EG. 2003. Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia* 59(2-3):377-388.
- Guerrero, M. C. (2012). La cultura del olivo: aspectos distintivos en el cultivo del olivar entre la región de Umbría (Italia) y la provincia de Sevilla. *Espacio y Tiempo: Revista de Ciencias Humanas*, (26), 75-102.
- Gupta PK, Varshney RK (2000) The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113: 163–185.



- Hamrick JL, Godt MJW, Sherman-Broyles SL. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* 6. 95-124.
- Harding RM et al (1992) The evolution of tandemly repetitive DNA: recombination rules. *Genetics* 132:847–859.
- Hancock JM (1999) *Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms*. Oxford University Press,
- Hess J, Kadereit JW, Vargas P (2000) The colonization history of *Olea europaea* L. in Macaronesia based on internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences, randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD), and intersimple sequence repeats (ISSR). *Mol Ecol* 9:857–868.
- Joshi SP et al (1999) Molecular markers in plant genome analysis. *Curr Sci* 77:230–240
- Kantartzi, S. K. (Ed.). (2013). *Microsatellites: methods and protocols*. Humana Press.
- Kelkar YD et al (2011) A matter of life or death: how microsatellites emerge in and vanish from the human genome. *Genome Res* 21:2038–2048.
- Morgante M et al (2002) Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat Genet* 30:194–200 14.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51:263–273.
- Muñoz, J., Belaj, A., Barranco, D. y Rallo, L. (2004). *Olivos monumentales de España*. Coedición Mundi-Prensa, S.A. y Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía, Madrid, España.
- Nadir E et al (1996) Microsatellite spreading in the human genome: evolutionary mechanisms and structural implications. *Proc Natl Acad Sci* 93:6470–6475.
- Oteros, José (2014) *Modelización del ciclo fenológico reproductor del olivo* (Tesis Doctoral). Universidad de Córdoba, Córdoba, España

- Phillips, W.; Rodríguez, H.; Fritz, P. 1995. Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie técnica. Informe técnico #252. CATIE.Turrialba, Costa Rica.183 p.
- Powell W et al (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol Breed* 2:225–238.
- 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 L, Barranco D, Caballero JM, Del Rio C, Martin A, Tous J, Trujillo I (Editores). 2005. Variedades de olivo en España. Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones MundiPrensa. Madrid.
- Tachida H, Iizuka M (1992) Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage. *Genetics* 131:471–478
- Tautz D, Schlötterer C (1994) Simple sequences. *Curr Opin Genet Dev* 4:832–837.
- Temnykh S et al (2001) Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Res* 11:1441–1452
- Trujillo, I., Morales, A., Belaj, A., Valpuesta, V., Botella, M. A., Rallo, P., ... & Dorado, G. (2005). Identificación de variedades de olivo por marcadores moleculares. *Variedades del olivo en España, Junta de Andalucía. MAPA and Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.*
- Weber JL, Wong C (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet* 2: 1123–1128.
- Weber J, May P (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44:388–396.
- Zhu Y et al (2000) A phylogenetic perspective on sequence evolution in microsatellite loci. *J Mol Evol* 50:324–338.