

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE VARIEDADES
ITALIANAS DE OLIVO (*Olea europaea* L.) INSTALADAS EN EL JARDÍN DE
INTRODUCCIÓN DE INIA LAS BRUJAS

por

Jennifer BERNAL MARTÍNEZ

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo.

MONTEVIDEO

URUGUAY

2017

Tesis aprobada por:

Director: -----

Lic. MSc. Jorge Pereira

Ing. Agr. MSc. Paula Conde

Ing. Agr. MSc. José Gándara

Fecha: 4 de agosto de 2017

Autor: -----

Jennifer Bernal Martínez

AGRADECIMIENTOS

Por este medio quiero agradecer a todas las personas que hicieron posible la realización de mi tesis de grado. En primer lugar, a los directores de tesis, por su dedicación, apoyo y colaboración en la ejecución de este trabajo; principalmente a Jorge Pereira que confió en mí, con su constante dedicación y capacidad para guiar mis ideas. Le agradezco también el haberme proporcionado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas.

También, debo agradecerle a Angjelina Belaj por lograr la aceptación de mi tesis por parte de INIA Las Brujas cuando me inicié como investigadora en olivos y a Roberto Zoppolo, por permitirme realizar este trabajo a partir de su jardín de introducción.

Un agradecimiento muy especial a los integrantes del Laboratorio de Evolución y Domesticación de Plantas por dejarme desempeñar las actividades de laboratorio en él, especialmente a Magdalena Vaio y Pablo Sandro quien me auxilió, dio ánimo y aconsejó en las tareas de laboratorio.

Por último, quiero agradecer el esfuerzo y la paciencia recibida de mi familia, amigos y a Alex Machín por su complicidad y afecto.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	1
1.1.1. <u>Objetivos específicos</u>	2
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
2.1. ASPECTOS GENERALES.....	3
2.1.1. <u>Origen a nivel mundial</u>	3
2.1.2. <u>Origen en Uruguay</u>	3
2.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y SOCIAL.....	4
2.2.1. <u>A nivel mundial</u>	4
2.2.2. <u>A nivel nacional</u>	4
2.3. TAXONOMÍA.....	5
2.4. ÁRBOL.....	5
2.5. HOJA.....	5
2.6. RAÍZ.....	5
2.7. ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS.....	6
2.7.1. <u>Flor, polinización y fecundación</u>	6
2.8. FRUTO.....	6
2.9. COMPORTAMIENTO DE LAS VARIEDADES EN ESTUDIO.....	7
2.9.1. <u>Ascolana</u>	7
2.9.2. <u>Bosana</u>	8
2.9.3. <u>Canino</u>	8
2.9.4. <u>Carolea</u>	8
2.9.5. <u>Cipressino</u>	9
2.9.6. <u>Coratina</u>	9
2.9.7. <u>Frantoio</u>	9
2.9.8. <u>Grignan</u>	9
2.9.9. <u>Itrana</u>	10
2.9.10. <u>Leccino</u>	10
2.9.11. <u>Maurino</u>	10
2.9.12. <u>Moraiolo</u>	10

2.9.13. <u>Pendolino</u>	11
2.9.14. <u>Seggianese</u>	11
2.9.15. <u>Taggiasca</u>	11
2.10. PRINCIPALES TIPOS DE MARCADORES Y SU USO EN EL OLIVO.....	11
2.10.1. <u>Marcadores morfológicos</u>	12
2.10.2. <u>Marcadores moleculares</u>	13
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	15
3.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DEL MATERIAL VEGETAL.....	15
3.2. CARACTERIZACIÓN MORFO-AGRONÓMICA.....	15
3.2.1. <u>Caracteres de la hoja</u>	16
3.3.2. <u>Caracteres del fruto</u>	17
3.2.3. <u>Caracteres del endocarpo (hueso)</u>	20
3.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE MICROSATÉLITES.....	25
3.3.1. <u>Extracción y cuantificación del ADN</u>	25
3.3.2. <u>Selección de cebadores SSR</u>	26
3.3.3. <u>Amplificación por PCR, electroforesis y análisis de fragmentos</u>	27
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS MORFOLÓGICOS Y MOLECULARES.....	27
4. <u>RESULTADOS</u>	29
4.1. DESCRIPCIÓN MORFO- AGRONÓMICA.....	29
4.1.1. <u>Caracteres cualitativos</u>	29
4.1.2. <u>Caracteres cuantitativos (agronómicos)</u>	30
4.1.3. <u>Análisis de grupos</u>	34
4.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	35
4.2.1. <u>Análisis de grupos</u>	39
5. <u>DISCUSIÓN</u>	42
6. <u>CONCLUSIONES</u>	45
7. <u>RESUMEN</u>	46
8. <u>SUMMARY</u>	47
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	48
10. <u>ANEXOS</u>	58

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Características de los 10 pares de cebadores SSR utilizados.....	26
2. Información estadística de los 23 caracteres cualitativos morfológicos.....	29
3. Información estadística de los 23 caracteres cualitativos morfológicos.....	31
4. Caracteres de endocarpo estudiados en las 16 variedades.....	33
5. Tamaño (pb) de los alelos en los 10 pares de microsatélites SSR analizados en las 16 variedades italianas.....	36
6. Parámetros moleculares de los 10 pares de cebadores microsatélites seleccionados.....	37
Figura No.	
1. Panorama del jardín de introducción de INIA Las Brujas, Canelones.....	15
2. Forma de la hoja.....	16
3. Forma del fruto (posición A).....	17
4. Simetría del fruto (posición A).....	18
5. Posición del diámetro transversal máximo (posición B) del fruto.....	18
6. Forma del ápice del fruto (posición A).....	18
7. Forma de la base del fruto (posición A).....	19
8. Estados del pezón del fruto.....	19
9. Forma del endocarpo (posición A).....	21
10. Simetría del endocarpo (posición A).....	21
11. Posición del diámetro transversal máximo del endocarpo (posición B).....	22
12. Forma del ápice del endocarpo (posición A).....	22
13. Forma de la base del endocarpo (en posición A).....	23
14. Terminación del ápice del endocarpo.....	24
15. Muestras de endocarpo de variedades italianas de olivo del	

jardín de introducción de INIA Las Brujas.....	31
16. Dendrograma basado en el coeficiente de asociación de Jaccard.....	34
17. Perfiles de amplificación obtenidos mediante el análisis de fragmentos.....	35
18. Perfil de amplificación para el cebador GAPI103A para las 16 variedades italianas de olivo analizadas en gel de agarosa	39
19. Dendrograma obtenido a partir de la matriz de distancias de Dice.....	40
20. Perfiles de amplificación obtenidos mediante el análisis de fragmentos con el par de cebadores ssrOeUA-DCA9.....	41

1. INTRODUCCIÓN

El olivo (*Olea europaea* L.) es un cultivo originario de la cuenca del Mediterráneo en cuyos países se concentra más del 79% de la producción mundial siendo España e Italia donde se encuentran las principales zonas productoras (Vilar y Cárdenas, 2016). La producción media anual es 15 millones de toneladas de aceitunas (FAO, 2014) de las cuales se destinan entre 6 y 12% a la elaboración de aceituna de mesa, y el resto a la producción de aceite (Vilar y Cárdenas, 2016).

Actualmente, el cultivo del olivo no sólo se sitúa en la cuenca mediterránea, sino que se ha ido extendiendo hacia otros países (56 estados) en sitios donde el cultivo no parecía factible, como China y Pakistán en el continente asiático, y recientemente se han sumado al cultivo, países como Yemen, El Salvador, Bulgaria, Alemania, Etiopía, Paraguay y Canadá (Vilar y Cárdenas, 2016). En nuestro país, la incorporación de variedades italianas al jardín de introducción de INIA Las Brujas se realizó para ampliar la colección y evaluar el comportamiento productivo. La caracterización morfológica y molecular es una herramienta fundamental para cumplir con los objetivos del programa de introducción. A través de este trabajo se genera el ajuste del rango de variación de los descriptores para Uruguay, que son característicos de cada variedad, y resultan de la comparación con el desarrollo vegetativo que muestran en el país de origen.

El principal problema de las colecciones es la correcta identificación del material existente, así como de nuevas entradas. Esta identificación resulta crucial para cumplir con los objetivos de los programas de mejora genética por cruzamientos así como para la autenticación varietal de las plantas de vivero (Trujillo et al., 2003).

Las denominaciones se basan frecuentemente en la localidad de origen del material de propagación (Rallo, 2005). En consecuencia, las sinonimias (nombres diferentes para el mismo cultivar) y las homonimias (el mismo nombre para los diferentes cultivares) son extremadamente frecuentes entre y dentro de los países oleícolas (Barranco et al. 2000, Bartolini, citado por Rotondi 2003) y demuestran la importancia de la necesidad de la identificación varietal.

1.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar y validar morfológica y molecularmente las variedades italianas de olivo introducidas en INIA Las Brujas.

1.1.1. Objetivos específicos

a. Analizar mediante marcadores morfológicos (hoja, fruto y endocarpo) y moleculares (cebadores SSR, diseñados especialmente para olivos) al material genético objeto de estudio.

b. Análisis estadístico de los resultados.

c. Verificar y/o corregir los nombres de las variedades estudiadas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ASPECTOS GENERALES

2.1.1. Origen a nivel mundial

El olivo es originario de una zona geográfica que comprende desde la región sur del Cáucaso a Egipto hasta poblar todos los países ribereños del Mediterráneo. Según Barazani et al. (2016) el origen se ubica entre Siria y Turquía y ha sido plantado en el Mediterráneo durante siglos.

A partir del siglo XV se ha extendido por el nuevo mundo con los viajes oceánicos de Colón, Magallanes y Elcano y en la actualidad se cultiva en todos los continentes (Civantos, 2008). Aunque las referencias históricas provienen de Egipto, aún no se sabe con certeza cuál es el origen del olivo domesticado. En este sentido, se ha comprobado que dicho proceso se inició a partir del olivo silvestre (acebuche, Besnard et al., 2001).

2.1.2. Origen en Uruguay

Los inicios del cultivo del olivo en Uruguay datan del proceso fundacional de Montevideo, a partir del año 1726 cuando comenzó el reparto de solares eligiéndose las tierras próximas al arroyo Miguelete. En 1780, llegaron desde Buenos Aires unas pocas plantas (provenientes de España), cuyo cultivo fue documentado por el Presbítero y naturalista José Pérez Castellanos quien escribió el primer tratado de agricultura en Uruguay (Pérez Castellanos, 1914).

Figuras de la historia del país como Francisco Aguilar, Luis de la Torre y Francisco Piria entre otros, realizaron importantes plantaciones de olivares entre 1811 y 1890. De los miles de ejemplares iniciales, hoy quedan muy pocos, algunos de los cuales tienen más de 150 años (Pereira, 2016).

En 1937 se promulgó la “Ley del Fomento Olivícola” del Ministerio de Ganadería y Agricultura conocida como “Ley Cannesa”, y al año siguiente el Ingeniero Agrónomo Hilario Urbina publicó la “Cartilla del Cultivo del Olivo” que promovía la plantación de olivos con una serie de beneficios. A partir de dicha promulgación, entre 1940 y 1960, surgieron diversos emprendimientos en diferentes lugares del país (Pereira, 2016).

A finales de 1960 la industria aceitera toma un gran desarrollo utilizando como materia prima semillas que posibilitaban fabricar un aceite de menor coste, por lo que el cultivo del olivo fue perdiendo importancia y muchas plantaciones fueron abandonadas.

A inicios del año 2000 se retoma el cultivo iniciándose la actual etapa de auge y consolidación de la olivicultura (Pereira, 2016).

2.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y SOCIAL

2.2.1. A nivel mundial

El olivo sigue siendo una especie de gran interés en todo el mundo porque es el cultivo de árboles oleaginosos más importante desde el punto de vista económico en las zonas templadas (Díez et al., 2016). El cultivo del olivar es estratégico por ser una grasa de consumo humano conocida, comercializada y consumida en todo el mundo. Es una grasa cuyo consumo aporta muchos beneficios para la salud, sobre todo si se compara con las grasas animales. Su consumo mundial presenta un pequeño incremento anual que oscila entre el 2 % y el 3,9 % lo que hace que sea considerado un producto atractivo para empresas ajenas a él y para países no tradicionales en su cultivo (Vilar y Cárdenas, 2016). En el mundo existen 11.425.00 hectáreas de olivo cultivadas y los países con mayor área plantada son en primer lugar España con 2.623.100 ha, seguido de Túnez con 1,87 millones ha, Italia 1,23 millones ha, Grecia y Marruecos con 1.125.000 y 1.015.100 ha, respectivamente (Vilar y Pereira, 2017). España se posiciona como primer país productor logrando 4,5 millones de toneladas anuales, le siguen Italia y Grecia con 1,9 y 1,8 millones de toneladas respectivamente, Turquía 1,7 y Marruecos con 1,6 millones (FAO, 2014).

2.2.2. A nivel nacional

En el Uruguay, el desarrollo olivícola alcanzado desde el año 2002 hace que actualmente se cuente con un número cercano a las 10.000 hectáreas plantadas en todo el país marcando un crecimiento de la actividad con nuevas plantaciones, recuperación de montes e instalación de viveros y almazaras. Se han realizado plantaciones intensivas con densidades que varían entre las 300 y 400 plantas por hectárea, distribuidas en alrededor de 200 productores en todo el país (Vilar y Cárdenas, 2016).

El tamaño de las plantaciones es muy variable. Existen emprendimientos con menos de 10 hectáreas hasta productores de varios cientos. Dentro del sector frutícola, la olivicultura se ubica en segundo lugar (23,7 %) siendo la citricultura (34,7 %) el rubro de hoja perenne que ocupa la mayor superficie. Si bien la mayoría de las plantaciones se han realizado con variedades de origen español e italiano, se pueden encontrar de diversas procedencias como Israel, Grecia, Marruecos, Francia y Argentina, entre otros. Actualmente a pesar de contar con más de 20 variedades plantadas en el país, Arbequina (España) representa cerca del 50 % de la superficie y Picual (España), Coratina, Frantoio y Leccino (Italia) representan en conjunto un 40 %. De esta manera, puede afirmarse que cinco variedades componen cerca del 90 % de la producción (Vilar y Cárdenas, 2016).

2.3. TAXONOMÍA

Olea europaea L. pertenece a la familia botánica Oleaceae la cual incluye 29 géneros y más de 600 especies de plantas distribuidas por las regiones tropicales y templadas del mundo (Rapoport, 2017). En su gran mayoría las plantas de esta familia son árboles y arbustos y producen aceites esenciales en sus flores o frutos los cuales son empleados por el hombre (Barranco et al., 2008).

Hay unas 35 especies en el género *Olea*, incluida en la especie *Olea europaea* L. están todos los olivos cultivados y también los acebuches u olivos silvestres (Guerrero, 2003). *Olea europaea* L. es la única especie de la familia Oleaceae con fruto comestible (Guerrero, 2003). Es una de las plantas cultivadas más antiguas cuyos orígenes como cultivo son de unos 4000- 3000 años A.C. (Barranco et al., 2008).

2.4. ÁRBOL

El olivo cultivado tiene un tamaño mediano, de unos cuatro a ocho metros de altura según la variedad. Tiene la capacidad de permanecer vivo y productivo por cientos de años. El tronco es grueso con la corteza de color gris a verde grisáceo. La copa es redondeada, más o menos lobulada y densa cuando ramifica naturalmente (Barranco et al., 2008). Presenta un desarrollo variable según la variedad y ambiente en que se desarrolla (Guerrero, 2003).

El cultivo presenta fase juvenil y adulta, en la juvenil el potencial para enraizar es mayor y en la etapa adulta se manifiesta la capacidad reproductiva. La transición entre etapas no es solo temporal, se da en torno a los cinco- ocho años de edad del árbol (en árboles generados de estacas semileñosas), sino también espacial siendo las zonas más cercanas al suelo juveniles (Caballero y del Río, 2017).

2.5. HOJA

Las hojas son persistentes y por lo general tienen una vida útil de dos a tres años o más. Son simples, de forma lanceolada y bordes enteros. La adaptación a ambientes con alta transpiración es posible gracias a su estructura anatómica. Una gruesa cutícula presente en el haz, con color verde oscuro y el envés blanco- plateado cubierto de pelos aparasolados. De esta manera se reduce la pérdida de agua (Barranco et al., 2008).

2.6. RAÍZ

La estructura del sistema radical varía de acuerdo al tipo de propagación del material. Las plantas de semilla presentan una raíz pivotante en los primeros estadios de desarrollo (Guerrero, 2003); sin embargo, en plantaciones comerciales la mayor parte de

los árboles se obtienen por enraizamiento de estacas. Las mismas se forman en la zona basal de la estacas, generando así numerosas raíces adventicias que actúan como raíces principales múltiples (Barranco et al., 2008). La profundidad, extensión lateral y grado de ramificación dependen del tipo y características del suelo, entre ellas, contenido hídrico y capacidad de aireación (Fernández et al., citados por Barranco et al., 2008).

2.7. ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS

2.7.1. Flor, polinización y fecundación

La inflorescencia es un racimo y cada racimo tiene un número de flores variables según la variedad (Guerrero, 2003). Estas se desarrollan en las axilas foliares de los nudos del crecimiento vegetativo del año previo a la floración. Implican flores perfectas (hermafroditas) y estaminíferas (masculinas). Las flores son pequeñas y actinomorfas; están compuestas por el conjunto de sépalos, cuatro pétalos blancos o blanco- amarillentos, dos estambres insertados en la corola en orientación opuesta, pistilo en el centro de la flor, estigma bilobulado y papiloso y ovarios con dos cavidades con dos óvulos en cada una de ellas. Solamente uno de los cuatro óvulos es fecundado y seguirá su desarrollo para formar la semilla (Rapoport, 2008).

El vector de polinización es el viento y por lo tanto las condiciones climáticas son críticas para conseguir un buen cuajado (Pérez, 1995). Así es que la lluvia durante la floración producirá una reducción importante del cuajado y por otra parte, las elevadas temperaturas (principalmente si van acompañadas de vientos secos) originan el aborto y caída de los frutos jóvenes (Lavee, citado por Pérez, 1995). En Uruguay, con la alta variabilidad de humedad en las primaveras, el polen puede apelmazarse y esto dificulta la polinización. A su vez, en nuestro país se ha detectado el comportamiento alternante de las variedades (Koubournis et al., citados por Arias y Severino, 2013).

En esta especie ocurre selección gamética (unos gametos son preferidos ante otros en la fecundación) y también autoincompatibilidad ya que los tubos polínicos se retrasan en atravesar el estigma. Así es que no es posible la autofecundación (Cuevas, citado por Barranco et al., 2008). Este fenómeno tiene un control genético, y los alelos presentes en los diferentes genotipos (variedades) hace que la autoincompatibilidad sea propia de cada variedad (Breton et al., 2014).

2.8. FRUTO

En términos botánicos la oliva es una drupa (Guerrero, 2003), tiene una sola semilla y está compuesta por endocarpo, mesocarpo y exocarpo como tejidos principales. El endocarpo es el carozo o hueso, el mesocarpo la pulpa o carne y el exocarpo la piel o capa externa. El conjunto de estos tres tejidos se denomina pericarpo y tiene su origen en la pared del ovario (Rapoport, 2008).

Los tejidos del fruto se desarrollan a partir del ovario por los procesos de división, expansión y diferenciación celular, a partir de la fecundación y el cuajado inicial. Su tamaño es pequeño (1- 4 cm de longitud y 0,6- 2 cm de diámetro, Rapoport, 2008). El peso de la fruta es entre dos y cuatro gr para los árboles silvestres mientras que para algunas de las variedades cultivadas puede llegar a más de diez gr (Trujillo y Barranco, 2004). En el olivo hay formación de frutos por partenocarpia (zofairones o azofairones) que son más pequeños que los frutos fecundados normales y tienen una forma más aplastada. Generalmente estos frutos no llegan a la cosecha.

En cuanto a la maduración de los frutos, se presentan cambios cualitativos de diversa naturaleza en la composición del fruto, cuyas modificaciones externas de coloración (características de esta fase) son utilizadas como indicadores de dicha maduración. Los cambios externos en la coloración de los frutos comienzan cuando el color verde intenso pasa a un verde- amarillento. A continuación, comienzan a aparecer manchas violáceas (enverado), que se extienden hasta ocupar todo el epicarpio (Barranco et al., 1998).

Gradualmente, la pulpa adquiere coloraciones violáceas hasta llegar al endocarpo y la epidermis logra el color definitivo, que por lo general es el negro aunque recubierto de una capa blanquecina de pruina. Así, es que se considera el período de maduración al transcurrido desde que comienza el cambio de color externo del fruto hasta que el color violáceo o negro, el cual depende de la variedad, se generaliza en la epidermis (Lavee y Wodner, citados por Barranco et al., 1998). Para la mayoría de las variedades, el inicio del envero es desde el ápice y continúa hacia el extremo opuesto (final del envero). El período de maduración es variable y se ve afectado por las condiciones ambientales y las características varietales (Beltrán et al., 2008).

En frutos completamente desarrollados, el mesocarpo, endocarpo y semilla se encuentran en una proporción de 70- 90 %, 9- 27 % y 2- 3 % respectivamente del peso total del fruto. Estos porcentajes están influidos por la propia variedad de la que se trate, estado de madurez del fruto, nivel de carga en el árbol y condiciones ambientales.

Los componentes mayoritarios tanto de la pulpa como de la semilla son agua y aceite (Fernández et al., citados por Beltrán et al., 2008). Beltrán et al. (2008) afirman que el porcentaje de agua en la pulpa alcanza un valor medio de 50- 60 %, mientras que el aceite representa un 20- 30 %.

2.9. COMPORTAMIENTO DE LAS VARIEDADES EN ESTUDIO

2.9.1. Ascolana

Es la principal variedad de mesa y una de las más difundidas internacionalmente (Villamil y Conde, 2013). Es originaria de la región de Marcas en

Italia y se la emplea como aceituna de mesa debido a su bajo rendimiento en aceite (Guerrero, 2003). El cuajado puede ser mejorado con polinizadores como Itrana y Leccino (Villamil y Conde, 2013). Los frutos presentan una maduración muy temprana en verde, el tamaño de los mismos es elevado (8,8 gr aproximadamente o más) y tienen elevada relación pulpa/ carozo. La pulpa es muy delicada y fácilmente dañada en la cosecha (Guerrero 2003, Barranco et al. 2008). Es tolerante al frío, exigente en suelos de calidad, poco rústica y susceptible a la sequía (Tapia y Astorga, 2003). Presenta tres variantes: “Ascolana tenera”, “Ascolana dura” y “Ascolana semitenera” (Guerrero, 2003). Aquí se buscará identificar a cuál de las tres subvariedades corresponde la variedad denominada “Ascolana” en el jardín de introducción.

2.9.2. Bosana

Es una variedad proveniente de la zona de Cerdeña y utilizada para la elaboración de aceite. Es muy plástica, con adaptación a diferentes sitios. El vigor del árbol es medio, presenta precocidad para la entrada en producción, alta productividad y alternancia productiva. Es parcialmente autoincompatible, con fruto pequeño (2- 2,5 gr) y de fácil cosecha (Villamil y Conde, 2013). Alghero, Aligaresa, Bosano, Oliva blanca, etc., son algunos de los sinónimos para Bosana (Barranco et al., 2000).

2.9.3. Canino

Proveniente de la región de Lacio, es una variedad utilizada para producir aceite y como polinizadora. El árbol es muy vigoroso y de copa compacta. Presenta gran adaptación a diferentes situaciones agroclimáticas, el fruto es muy pequeño (1- 2 gr). Se caracteriza por la alta resistencia al desprendimiento causando dificultad en su cosecha. La maduración es escalonada y tardía, es tolerante al frío, alternante y autoincompatible (Villamil y Conde, 2013). Presenta sinonimias como Caninese, Montignoso, Oliva canina, Olivastro canino, Olivella (Barranco et al., 2000).

2.9.4. Carolea

Es una variedad originaria de Calabria (Barranco et al., 2000) y su finalidad es el doble propósito (aceite y mesa). El árbol es de gran vigor y productividad, con elevada capacidad de enraizamiento, gran tolerancia a las bajas temperaturas y alta producción de aceite. Los frutos son de tamaño elevado (4,5 gr). Se adapta muy bien a la recolección mecanizada (Barranco et al., 2008). Caroleo, Olivo de Calabria, Calabrese, Calamignana, Verdella, etc. son algunas de las sinonimias para esta variedad (Barranco et al., 2000).

2.9.5. Cipressino

Es una variedad difundida en la provincia de Taranto y luego en la región de Puglia como doble propósito. El árbol es vigoroso, adaptable a diferentes situaciones climáticas, alternante, autoestéril y el fruto es de tamaño pequeño (1,5- 2 gr, Villamil y Conde, 2013). Cipressino es conocida también como Frangivento (Mazzalupo, 2012).

2.9.6. Coratina

Originaria de la región de Puglia (Barranco et al., 2000), es una variedad utilizada para la elaboración de aceite. Presenta vigor medio, entrada en producción precoz, de productividad alta y constante. Los frutos son de tamaño medio (4 gr), de maduración tardía y fuerte retención en el árbol lo cual dificulta su recolección mecánica. El contenido de aceite es elevado y posee excelentes propiedades organolépticas y estabilidad (Barranco et al., 2008). Presenta sinonímias como Cima di Corato, Olivo a grappoli, Racemo, Racioppa, etc. (Mazzalupo, 2012).

2.9.7. Frantoio

Es la principal variedad italiana, de las más productivas en Italia central, apreciado en la región de Toscana (Guerrero, 2003). Es muy distinguida por su alta productividad y capacidad de adaptarse a diferentes condiciones medio ambientales, sin embargo, es sensible al frío del invierno (Barranco et al., 2008). Es una variedad autofértil, poco alternante y presenta alta capacidad de enraizamiento. La madurez de los frutos es escalonada y son de tamaño medio (2,5 gr), el contenido graso es medio-elevado y el aceite es muy valorado por sus excelentes aptitudes organolépticas y su estabilidad (Guerrero 2003, Barranco et al. 2008). Se la suele llamar Correggiolo, Crognolo, Frantoiano, Gentile, Infrantoio, Laurino, Nostrato, Oliva Lunga, etc. (Barranco et al., 2000).

2.9.8. Grignan

Conocida como Bersan, Gargná, Gargnano, Gargnan, Negrar, etc., es una variedad originaria de Veneto utilizada para la producción de aceite (Barranco et al., 2000). Presenta gran rusticidad y se la caracteriza por la alta producción de chupones (Villamil y Conde, 2013). Posee ramas erectas, las hojas son pequeñas y la floración es poco abundante por difícil fecundación (Mársico, 1955). Su producción mejora con la utilización de polinizadores como Leccino y Pendolino. La entrada en producción es precoz, el rendimiento es medio y constante (Barranco et al., 2000).

2.9.9. Itrana

Es una variedad de doble propósito originaria de Lacio, rústica, de rápido crecimiento y elevada capacidad de enraizamiento. La productividad es elevada y alternante, la maduración es escalonada y tardía y los frutos presentan una elevada resistencia al desprendimiento (Barranco et al., 2000). Aitana, Cicerone, Gaetana, Oliva di Gaeta, Oliva di Itri, Trana, etc. son algunas de las sinonimias que presenta esta variedad (Mazzalupo, 2012).

2.9.10. Leccino

Es sinónimo de Leccio (Guerrero, 2003), lo cual se corroborará en el presente trabajo ya que en INIA se la introdujo como una variedad diferente a Leccino. Originaria de la región de Toscana, también se la conoce como Colombina, Leccino di Belmonte, Toscano, Verolana (Mazzalupo, 2012); variedad de doble propósito (Villamil y Conde, 2013), vigorosa y de fácil adaptación a diferentes zonas de cultivo (Barranco et al., 2000). Se trata de una variedad autoestéril que requiere de la polinización de otras variedades como Frantoio, Maurino y Pendolino (Villamil y Conde, 2013). La productividad es elevada y constante, siendo sus frutos poco resistentes al desprendimiento. Presenta un bajo contenido de aceite, la separación de la pulpa del endocarpo es fácil y es particularmente tolerante al frío (Barranco et al., 2008).

2.9.11. Maurino

Es una variedad originaria de la región de Liguria, empleada para la producción de aceite, con un contenido de aceite medio (Mazzalupo, 2012) pero de excelente calidad (Villamil y Conde, 2013). De porte delicado semejante a Taggiasca, pero con ramas menos inclinadas y de ramificación abundante (Mársico, 1955). Se caracteriza por su alta producción de polen, que es compatible con un gran número de variedades comerciales. El fruto es pequeño (3- 5 gr) y de fácil desprendimiento en la cosecha (Villamil y Conde, 2013). Corno maurino, Fischiettara, Martina a cornetto, Olivo femmina, Razzola, Razzuola, etc. son algunas de las sinonimias para Maurino (Mazzalupo, 2012).

2.9.12. Moraiolo

Este olivar es originario de Toscana (Guerrero, 2003) y difundido por toda Italia empleado para elaborar aceite. El árbol es de vigor medio y hábito erecto. Mársico (1955) afirma que es una variedad que presenta un desarrollo similar a Frantoio, en Uruguay se ha llegado a confundirlas en el campo (Baccino et al., s.f.) pero la copa es más cerrada y las ramas son más verticales. Es parcialmente autoincompatible y es bien fecundada por Maurino, Frantoio (Villamil y Conde, 2013) y Morchiaio (Guerrero 2003,

Villamil y Conde 2013). El fruto es pequeño (1,5- 2 gr) y de maduración escalonada con producción elevada y constante (Villamil y Conde, 2013). Es tolerante a suelos con baja humedad (Barranco et al., 2008). Sinónimos para Moraiolo son Carboncella, Marinello, Morellino, Ogliolo, Oliva tonda, etc. (Mazzalupo, 2012).

2.9.13. Pendolino

Es una variedad de la región de la Toscana utilizada para la producción de aceite (Villamil y Conde, 2013) con fácil adaptación a diferentes condiciones ambientales y edafológicas (Barranco et al., 2000). La entrada en producción es precoz al igual que la floración. Se la utiliza como polinizadora de otras variedades ya que la floración es prolongada en el tiempo. La productividad es elevada y constante y los frutos presentan baja resistencia al desprendimiento (Villamil y Conde, 2013). Algunas de las sinonimias que presenta son: Alloro, Leccino pendulo, Leccino piangente (Mazzalupo, 2012), Maurino fiorentino, Piangente (Barranco et al., 2000).

2.9.14. Seggianese

También es una variedad de la región de Toscana, utilizada para la producción de aceite. El árbol es vigoroso y de copa densa. Es una variedad autoincompatible, con una productividad elevada y alternante (Villamil y Conde, 2013). Posee una maduración de frutos precoz; éstos son pequeños (1,5- 2 gr), con un difícil desprendimiento en la cosecha. Según Mazzalupo (2012) algunas de las sinonimias que recibe esta variedad son Olivastra seggianese, Giogliaia, Olivastra di Montalcino, Olivastra di Seggiano, etc.

2.9.15. Taggiasca

Es la variedad más difundida en la región de Liguria (Mársico 1955, Villamil y Conde 2013). El árbol alcanza buen desarrollo, tronco muy ramificado y las ramas tienen tendencia a hacerse péndulas. El fruto es cilíndrico y pequeño, de pulpa poco consistente con buen contenido de aceite (Mársico, 1955); la maduración es tardía y escalonada (Villamil y Conde, 2013). Algunas de las sinonimias que presenta esta variedad son Lavagnina, Olivo de taggia, Pignola di Oneglia (Barranco et al. 2000, Mazzalupo 2012).

2.10. PRINCIPALES TIPOS DE MARCADORES Y SU USO EN EL OLIVO

Existe una gran diversidad de cultivares y esto hace que sea necesario la conservación y el estudio de estos, por eso se crearon los bancos de germoplasma (colecciones en campo). El principal problema de las colecciones es la correcta identificación del material existente, así como de nuevas entradas. Esta identificación resulta crucial para cumplir con los objetivos de los programas de mejora genética por

cruzamientos así como para la autenticación varietal de las plantas de vivero (Trujillo et al., 2003).

Las denominaciones se basan frecuentemente en la localidad de origen del material de propagación (Rallo, 2005). En consecuencia, las sinonimias (nombres diferentes para un mismo cultivar) y las homonimias (el mismo nombre para los diferentes cultivares) son extremadamente frecuentes entre y dentro de los países oleícolas (Barranco et al. 2000, Bartolini, citado por Rotondi 2003) y demuestran la importancia de la necesidad de la identificación varietal. A su vez, la aparición de mutaciones clonales, que pueden tener o no alguna expresión fenotípica, hacen que la caracterización de los olivares sea un proceso desafiante que requiere experiencia tanto en identificación morfológica como molecular (Cantini et al. 2008, Díez et al. 2012). Debido a la riqueza del germoplasma, el olivo es un caso inusual entre los cultivos hortícolas y su biodiversidad puede representar una rica fuente de variabilidad para su mejoramiento genético (Baldoni et al., 2009).

2.10.1. Marcadores morfológicos

Los marcadores morfológicos fueron el primer tipo de marcadores que el hombre utilizó. Se consideran marcadores morfológicos a los caracteres de un individuo que se expresan en un ambiente específico y que el hombre identifica con un objetivo determinado. Este tipo de marcadores son muy utilizados para estimar la variación morfológica existente en una población (Solís y Andrade, 2005).

La caracterización agro- morfológica de las accesiones de germoplasma es fundamental para proporcionar información a programas de fitomejoramiento (Badenes, citado por Mnasri et al., 2017). Los métodos de identificación morfológica más empleados en olivo incorporan un gran número de caracteres del árbol, ramo, fruto, endocarpo, hoja y de la inflorescencia (Barranco y Rallo, 1984). Sin embargo los métodos morfológicos poseen ciertos inconvenientes, tales como su dependencia de las condiciones ambientales (Trujillo et al. 2003, Ganino et al. 2006), la necesidad de usar un número elevado de caracteres y el hecho de que requieren el empleo de órganos no siempre presentes como fruto y endocarpo (Trujillo et al., 2003).

El esquema pomológico empleado por Barranco y Rallo (1984) ha demostrado ser muy útil para la identificación de materiales y el establecimiento de las sinonimias correspondientes (Trujillo et al., 2003). Ganino, citado por Domínguez (2012), hace referencia a que ha habido 18 sistemas diferentes desde Pitton de Tournefort en el año 1719 (quien hizo la primera clasificación del olivo), usándose éstos a lo largo de las décadas para la identificación de los olivares (Barranco y Rallo 1984, Tous y Romero 1993, Cantini et al. 1999, Barranco et al. 2000). Esta evaluación permite una caracterización rápida, económica y eficaz de los genotipos.

En el caso del olivo, los órganos más frecuentes utilizados para la evaluación son: hojas, inflorescencias, frutos completos, carozos (endocarpo) y las semillas (Barranco y Rallo 1984, Barranco et al. 2000). Actualmente, el Consejo Oleícola Internacional (COI) utiliza el sistema de clasificación de variedades descrito por Barranco et al. (2005) aunque su utilidad sea frecuentemente reforzada por la utilización de marcadores moleculares (Fendri et al., 2010). En tal sentido, los caracteres del endocarpo han sido reconocidos como los más eficaces, debido a su alta capacidad de discriminación, baja sensibilidad a condiciones ambientales, capacidad de conservación a largo plazo y facilidad de intercambio entre colecciones (Cavagnaro et al. 2001, Fendri et al. 2010).

Tradicionalmente los olivos, al igual que otras especies arbóreas, se caracterizaban por rasgos morfológicos. Sin embargo, ciertas limitaciones asociadas con estos rasgos los han hecho menos populares en la caracterización de germoplasma y en el análisis de la diversidad. La disponibilidad de técnicas moleculares ha proporcionado herramientas más fuertes y confiables para la caracterización de germoplasma (Mazzalupo et al., 2014).

2.10.2. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares corresponden a cualquier gen cuya expresión permite un efecto cuantificable u observable (características fenotípicas), que además puede detectarse fácilmente. Este tipo de marcadores pueden evaluarse desde los primeros estadios de desarrollo y pueden aplicarse utilizando muestras de todo el individuo o sólo de una parte de él (Solís y Andrade, 2005).

Estos marcadores pueden representar con precisión la diversidad genética de la colección original y están libres de los problemas relacionados a las interacciones ambientales y con la falta de datos (Cavagnaro et al. 2001, Díez et al. 2012). La aplicación de herramientas moleculares ha superado las limitaciones de la descripción morfológica (Rotondi et al. 2003, D'Imperio et al. 2011, Trujillo et al. 2014).

La caracterización molecular de accesiones de olivos en colecciones ex situ representa una herramienta poderosa para distinguir diferentes genotipos y reconocer duplicaciones y errores, proporcionando así nuevos medios de identificación a los investigadores (Belaj et al., 2016).

El uso de marcadores moleculares ha arrojado luz sobre la presencia de muchos casos de homonimia en numerosas colecciones, y en todos los casos se ha demostrado que los nombres genéricos de los olivares incluyen diferentes genotipos (Fendri et al. 2010, Trujillo et al. 2014). Con el fin de distinguir entre los diferentes genotipos que

llevan el mismo nombre, se ha sugerido añadir al nombre general también el sitio de difusión principal (Barranco y Rallo, citados por Belaj et al., 2016).

Las técnicas más importantes incluyen el polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción (RFLP), polimorfismo amplificado al azar del ADN (RAPD), polimorfismo del largo del fragmento amplificado (AFLP), secuencias simples repetidas (SSR) y, más recientemente, polimorfismo del nucleótido simple (SNP, Belaj et al., 2016).

Entre los marcadores moleculares más útiles y apreciados se encuentran los denominados microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR; del inglés, “Simple Sequence Repeat”). Dichos marcadores son muy utilizados ya que poseen grandes ventajas, como el hecho de ser muy polimórficos, multi- alélicos codominantes, fáciles de interpretar y susceptibles de automatización. Además, el análisis requiere una cantidad escasa de ADN, extraído generalmente de un material disponible a lo largo del año como es el caso de las hojas en olivo. A su vez, son consistentes y sorprendentemente transferibles, traspasando en muchas ocasiones las barreras entre especies, géneros e incluso grupos bastante alejados evolutivamente (Rallo et al., 2000).

Actualmente, los microsatélites son probablemente los marcadores más apropiados para los estudios genéticos en el olivo, debido fundamentalmente, a su alto polimorfismo y reproducibilidad. Muchos autores han informado sobre el desarrollo de SSR en el olivo y varios de ellos están actualmente disponibles para el análisis de ADN (Sefc et al. 2000, Cipriani et al. 2002, de la Rosa et al. 2002).

La presencia de germoplasma redundante, es decir, accesiones que difieren sutilmente del perfil principal de cada cultivar, es frecuente de encontrar en bancos de germoplasma de olivo. Se han encontrado redundancias potenciales utilizando SSR (Haouane et al. 2011, Trujillo et al. 2014). La escasa diferencia genética que se ha encontrado entre algunos cultivares descarta muy probablemente la posibilidad de árboles que se reproduzcan sexualmente (Díez et al. 2011, Atienza, citado por Belaj et al. 2016), pero otras razones podrían explicar estas posibles redundancias (Trujillo et al., 2014). Entre ellos, la existencia de casos de sinonimia podría ser una causa plausible de una diferenciación genética tan baja entre los cultivares.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DEL MATERIAL VEGETAL

Para poder cumplir con los objetivos de este trabajo se emplearon 16 variedades italianas pertenecientes al jardín de introducción de INIA Las Brujas. Éstas fueron introducidas en el año 2002 (Frantoio y Leccino) junto con otras variedades españolas, en el año 2005 (Ascolana, Bosana, Canino, Cipressino, Coratina, Grignan, Itrana, Maurino, Moraiolo, Pendolino, Seggianese y Taggiasca) desde el CORIPRO (Italia) y en el año 2007 desde un vivero nacional la variedad Carolea. El diseño de plantación fue completo al azar, con tres repeticiones. El marco de plantación fue de 7 metros por 5 metros.



Figura No.1. Panorama del jardín de introducción de INIA Las Brujas, Canelones.

3.2. CARACTERIZACIÓN MORFO- AGRONÓMICA

La caracterización morfológica se basó en descriptores morfológicos desarrollados para el Consejo Oleícola Internacional (Barranco et al., 2000). Los caracteres morfológicos evaluados incluyeron 23 características cualitativas y 8 características cuantitativas. Cuatro de las cualitativas (longitud de hoja, ancho de hoja, peso del fruto y peso del endocarpo) fueron generadas por medidas cuantitativas. Los caracteres cuantitativos fueron analizados conjuntamente y separados de los cualitativos.

3.2.1. Caracteres de la hoja

Se muestrearon 40 hojas adultas de cada árbol tomadas de la zona media de 8-10 brotes del año, elegidos de entre los más representativos del árbol a la altura del observador. La longitud, ancho (caracteres agronómicos) y forma son caracteres cuantitativos.

Forma: determinada por la relación entre la longitud (L) y el ancho (A).

- Elíptica ($L/A < 4$ cm) _ 1
- Elíptico- lanceolada (L/A 4- 6 cm) _ 2
- Lanceolada ($L/A > 6$ cm) _ 3



Figura No.2. Forma de la hoja.

Longitud

- Corta (< 5 cm)
- Media (5- 7 cm)
- Larga (> 7 cm)

Ancho

- Estrecha (< 1 cm)
- Media (1- 1,5 cm)
- Ancha ($> 1,5$ cm)

3.2.2. Caracteres del fruto

Se colectaron 40 frutos de cada variedad en estudio. La toma de muestras se efectuó en la zona media del árbol, eligiéndose los más representativos, eliminando los pequeños y los grandes. La descripción del fruto se realizó en el estado máximo de madurez. En algunos caracteres se hace referencia a dos posiciones. Se le llama posición “A” a aquella en la que el fruto presenta generalmente mayor asimetría al sujetarlo por sus extremos entre los dedos índice y pulgar. La posición “B” es la que resulta de girar 90 grados la anterior quedando la parte más desarrollada hacia el observador.

Peso

- Bajo (< 2 gr)
- Medio (2- 4 gr)
- Alto (4- 6 gr)
- Muy alto (> 6 gr)

Forma (posición A): determinada en función de la relación entre la longitud (L) y el ancho (A).

- Esférica ($L/A < 1,25$ cm) _ 1
- Ovoidal ($L/A 1,25- 1,45$ cm) _ 2
- Alargada ($L/A > 1,45$ cm) _ 3

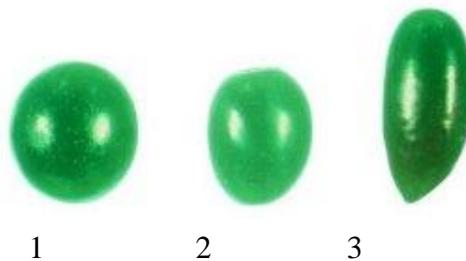


Figura No.3. Forma del fruto (posición A).

Simetría (posición A): determinada por la correspondencia entre sus dos mitades longitudinales.

- Simétrico
- Ligeramente asimétrico
- Asimétrico

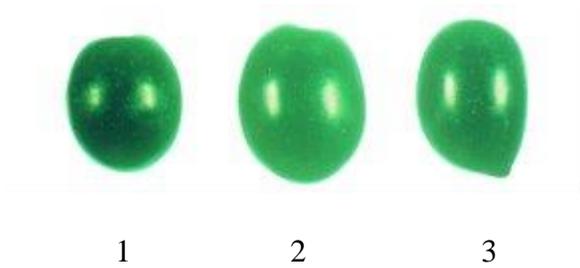


Figura No.4. Simetría del fruto (posición A).

Posición del diámetro transversal máximo (posición B): según su situación puede estar.

- Hacia la base (1)
- Centrada (2)
- Hacia el ápice (3)



Figura No.5. Posición del diámetro transversal máximo (posición B) del fruto.

Forma del ápice (posición A)

- Apuntado (1)
- Redondeado (2)



Figura No.6. Forma del ápice del fruto (posición A).

Forma de la base (posición A)

- Truncada (1)
- Redondeada (2)

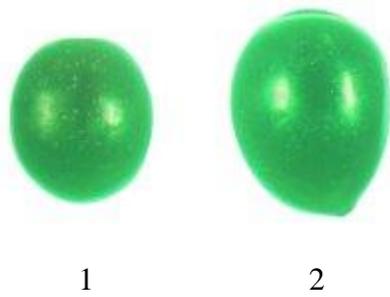


Figura No.7. Forma de la base del fruto (posición A).

Pezón: este carácter del punto estilar del fruto incluye tres categorías.

- Ausente (1)
- Esbozado (2)
- Evidente (3)



Figura No.8. Estados del pezón del fruto.

Presencia de lenticelas

- Escasas
- Abundantes

Tamaño de las lenticelas

- Pequeñas
- Grandes

3.2.3. Caracteres del endocarpo (hueso)

El endocarpo representa la porción interna, lignificada del fruto, que protege la semilla. Por lo general se denomina hueso al conjunto integrado por el endocarpo y la semilla. Al igual que en el fruto, en algunos caracteres se hace referencia a dos posiciones. La “A” corresponde normalmente a la de máxima asimetría y es aquella en que la sutura carpelar queda a la vista del observador. La posición “B” procede de un giro de 90 grados de la anterior, de modo que la porción más desarrollada queda hacia el observador.

La caracterización de los endocarpos se efectuó para la muestra de los 40 frutos antes mencionada. Para ello se los colocó en frascos, y estos a su vez fueron llevados a autoclave para lograr un fácil desprendimiento de la pulpa. Posteriormente se los puso en estufa para permitir el secado de cada endocarpo y se los cepilló para eliminar restos de pulpa en los surcos.

Los caracteres del endocarpo son de alto poder discriminante en la identificación de variedades. Peso, longitud y ancho son caracteres agronómicos al igual que para el fruto y el resto son morfológicos.

Peso

- Bajo (< 0,3 gr)
- Medio (0,3- 0,45 gr)
- Alto (0,45- 0,7 gr)
- Muy alto (> 0,7 gr)

Forma (posición A): determinada en función de la relación entre la longitud (L) y el ancho (A).

- Esférica ($L/A < 1,4$ cm) _ 1
- Ovoidal (L/A 1,4- 1,8 cm) _ 2
- Elíptica (L/A 1,8- 2,2 cm) _ 3
- Alargada ($L/A > 2,2$ cm)_ 4

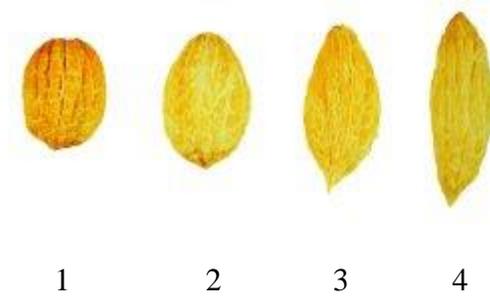


Figura No.9. Forma del endocarpo (posición A).

Simetría (posición A): determinada por la correspondencia entre sus dos mitades longitudinales.

- Simétrico (1)
- Ligeramente asimétrico (2)
- Asimétrico (3)

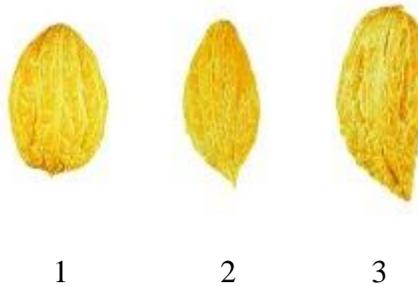


Figura No.10. Simetría del endocarpo (posición A).

Simetría (posición B)

- Simétrico
- Ligeramente asimétrico

Posición del diámetro transversal máximo (posición B).

- Hacia la base (1)
- Centrada (2)
- Hacia el ápice (3)

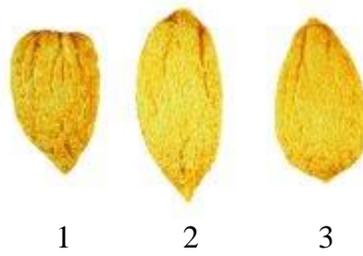


Figura No.11. Posición del diámetro transversal máximo del endocarpo (posición B).

Forma del ápice (posición A)

- Apuntado (1)
- Redondeado (2)

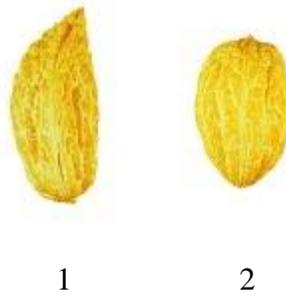


Figura No.12. Forma del ápice del endocarpo (posición A).

Forma de la base (posición A)

- Truncada (1)
- Apuntada (2)
- Redondeada (3)

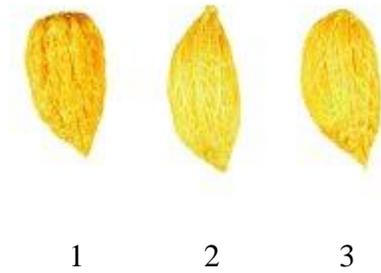


Figura No.13. Forma de la base del endocarpo
(en posición A).

Superficie (posición B): según la profundidad y abundancia de los haces fibrovasculares.

- Lisa
- Rugosa
- Escabrosa

Número de surcos fibrovasculares: los que se observan desde el punto de inserción del pedúnculo.

- Bajo (< 7)
- Medio (7- 10)
- Alto (> 10)

Distribución de los surcos fibrovasculares

- Uniforme
- Agrupados junto a la sutura

Terminación del ápice

- Sin mucrón (1)
- Con mucrón (2)

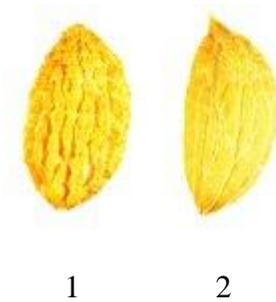


Figura No.14. Terminación del ápice del endocarpo.

La diversidad y poder discriminante de las características morfológicas fue determinado a partir del índice de Shannon's (Hj) que es una medida de la diversidad de cada característica morfológica en todas las muestras de olivo estudiadas:

$$H_j = - \sum_{k=1}^K p_k \log_2 p_k$$

Donde: p_k es la frecuencia del k ésimo estado, N es el tamaño de la muestra y K es el número total de estados del j ésimo carácter (Lewontin, 1972).

La probabilidad de confusión (C_j) de una característica morfológica es una estimación de la posibilidad que dos variedades de las 16 estudiadas para una característica muestren los mismos estados. Éste parámetro se calcula según lo descrito por Tessier et al. (1999):

$$C_j = \sum_{k=1}^K p_k \frac{Np_k - 1}{N - 1}$$

Donde: p_k es la frecuencia del k ésimo estado, N es el tamaño de la muestra y K es el número total de estados del j ésimo carácter.

El poder discriminante (D_j) del j ésimo carácter morfológico se calcula como: $D_j = 1 - C_j$ indicando la proporción de pares distinguibles de individuos (Belaj et al., 2011).

3.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE MICROSATÉLITES

Las muestras de hojas se tomaron de brotes jóvenes de 25 cm de longitud aproximadamente con suficientes hojas jóvenes, en su máximo desarrollo foliar para la mayoría de los casos. Luego de etiquetarlas y envolverlas en papel humedecido (para evitar la deshidratación), se las guardó en bolsas de plástico. Las muestras fueron transportadas lo más rápidamente posible al laboratorio donde se realizó la extracción de ADN con el material fresco.

3.3.1. Extracción y cuantificación del ADN

Se utilizó el protocolo descrito por de la Rosa et al. (2002) de uso corriente en el Laboratorio de Biotecnología.

El mismo consistió en rotular tubos eppendorf de dos mililitros a los que se le adicionó 700 µl de buffer de extracción a 60° C (Anexo 1). Por otro lado, se pesó aproximadamente 150 mg de tejido fresco por muestra, cortado en pequeños trozos con tijera desinfectada con alcohol 70 % y posteriormente colocados en un mortero para pulverizar con nitrógeno líquido. Se colocó el tejido vegetal pulverizado en los tubos con el buffer. Se homogeneizaron los tubos y se los incubó una hora a 60° C (vórtex cada 20 minutos). Se dejó enfriar a temperatura ambiente para luego agregarle 600 µl de cloroformo/ alcohol isoamílico (CIA 24:1) frío a cada muestra hasta formar una emulsión mediante vórtex (una vez) e inversión (durante diez minutos).

Luego se centrifugó por diez minutos a 13000 rpm a 4° C, se recogió el sobrenadante (fase acuosa) y se lo colocó en un nuevo tubo eppendorf de 1,5 ml rotulado previamente. Se repitió el protocolo desde el agregado de los 600 µl de cloroformo alcohol isoamílico (CIA 24:1) hasta la recogida del sobrenadante para colocarlo en un nuevo tubo, pero esta segunda vez la centrifugación fue de ocho minutos. Se estimó el volumen colectado, ya que en función de éste se determina el volumen a agregar de acetato de amonio e isopropanol; la relación fue de 0,08 volúmenes de acetato de amonio y 0,54 volúmenes de isopropanol. Se mezcló invirtiendo suavemente e incubó por toda la noche a 0° C. Al día siguiente se centrifugó durante cinco minutos a 13000 rpm a 4° C y se descartó el sobrenadante. Se le agregó 500 µl de etanol 70 % (frío), se agitó suavemente y se dejó incubar 15 minutos a -20° C para la precipitación de los ácidos nucleicos. Luego se retiró del freezer y se centrifugó por tres minutos a 13000 rpm a 4° C. Se descartó el sobrenadante cuidadosamente para no perder el pellet. Posteriormente se agregó 500 µl de etanol 95 % frío, se agitó suavemente y luego se incubó durante 15 minutos en freezer. La última centrifuga fue de tres minutos a 13000 rpm a 4° C, luego se descartó el sobrenadante teniendo cuidado de no perder el pellet. Finalmente, se dejó el pellet en la cámara de flujo hasta que se

evaporó el alcohol. Se procedió a la resuspensión en 100 µl de agua MQ autoclavada y se incubó durante toda la noche a 0° C.

Para evaluar la concentración de ADN obtenido se realizó la medición en Nanodrop 2000 Spectrophotometer- Thermo Scientific. Para ello se utilizaron dos microlitros de ADN (de la extracción) de cada muestra y se comparó con un patrón de agua MQ autoclavada. Posteriormente, se procedió a la evaluación de la calidad del ADN genómico obtenido, mediante la electroforesis en gel de agarosa (SBS, China) al 2 % y buffer TBE 1X, teñido con bromuro de etidio en una concentración final de 50 µm/ml.

3.3.2. Selección de cebadores SSR

La caracterización molecular se realizó mediante la amplificación vía PCR de diez pares de cebadores SSR, seleccionados previamente de un grupo de 33, como los de mayor poder discriminante, para variedades procedentes de bancos de germoplasma (Trujillo et al., 2014), que aseguraban una probabilidad de identificar diferencias de secuencias cercanas al 100 %.

Cuadro No.1. Características de los 10 pares de cebadores SSR seleccionados.

Fuente	Serie cebadores	Secuencia del Forward y Reverse (5' - 3')	Motivo de repetición	TR (pb) reportado
Sefc et al. (2000)	ssrOeUA-DCA3 AJ279854	F: CCAAGCGGAGGTGTATATTGTTAC R: TGCTTTTGTGCGTGTGAGATGTTG	(GA) ₁₉	227-255
	ssrOeUA-DCA9 AJ279859	F: AATCAAGTCTTCCTTCATTTTCG R: GATCCTTCCAAAAGTATAACCTCTC	(GA) ₂₃	160-214
	ssrOeUA-DCA11 AJ279861	F: GATCAAACACTGCACGAGAGAG R: TTGTCTCAGTGAACCCTTAAACC	(GA) ₂₆ (GGGA) ₄	126-185
	ssrOeUA-DCA16 AJ279865	F: TTAGGTGGGATTCTGTAGATGGTTG R: TTTTAGGTGAGTTCATAGAATTAGC	(GT) ₁₃ (GA) ₂₉	122-228
	ssrOeUA-DCA18 AJ279867	F: AAGAAAGAAAAGGCAGAATTAAGC R: GTTTTGCTCTCTACATAAGTGAC	(CA) ₄ CT(CA) ₃ (GA) ₁₉	158-193
	Carriero et al. (2002)	GAPU71B	F: GATCAAAGGAAGAAGGGGATAAAA R: ACAACAAATCCGTACGCTTG	GA(AG) ₆ (AAG) ₈
GAPU101		F: CATGAAAGGAGGGGACATA R: GCGACTTGTTGTGCAGATTG	(CT) ₉	175-215
GAPU 103A		F: TGAATTTAACTTTAAACCCACACA R: GCATCGCTCGATTTTATCC	(TC) ₂₆	133-208
Cipriani et al. (2002)	UDO99-011	F: TGCGCATGTAGATGTGAATATG R: GACTGACTCCCTTTAAATCATCAGG	(CT) ₇ (CA) ₁₀ (CT) ₂ (CA) ₂ CT(CA) ₂ CT(CA) ₉	103-142
	UDO99-043	F: TCGGCTTTACAACCCATTTTC R: TGCCAATTATGGGGCTAACT	(GT) ₁₂	182-225

(TR) Tamaño del rango reportado

3.3.3. Amplificación por PCR, electroforesis y análisis de fragmentos

Tras confirmar la presencia de ADN en la electroforesis, se diluyó cada muestra en agua MQ para lograr la concentración necesaria para la reacción de PCR. Dicha reacción o “mix” fue realizada con reactivos Invitrogen e iniciadores extendidos con M13, para 20 µl de volumen total por muestra. Se empleó 12,09 µl de agua MQ (QIAGEN), 2 µl de Buffer 10X, 0,6 µl de MgCl₂ (50 mM), 1,6 µl de dNTPs (2,5 mM de cada nucleótido), 0,11 µl de enzima Taq polimerasa (5 u/ µl), 0,8 µl de cebador forward, 0,055 µl de cebador reverse, 0,745 µl de M13 y 2 µl de ADN genómico (10 ng/ µl.). Las reacciones de amplificación se realizaron mediante un termociclador Palm Cycler (Gradient Thermal Cycling) siguiendo el siguiente perfil de temperaturas y tiempos: desnaturalización inicial a 95° C por cinco minutos (un ciclo), seguido por 35 ciclos de: 95° C por 20 segundos, 52° C por 30 segundos y 72° C por 30 segundos. Finalmente el último ciclo fue a 72° C por ocho minutos. Los productos de la amplificación fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa (SBS, China) al 3 %, empleando como buffer TBE 1X. Para poder conocer el tamaño de los fragmentos amplificados (pb) se empleó como referencia un marcador de peso molecular conocido de 20 pb (O’Range Ruler DNA Ladder, Thermo Scientific).

En las migraciones de ADN se incluyó como material de referencia a la variedad Arbequina (española) cuyo perfil de largos de fragmentos de amplificación con cada uno de los pares de cebadores SSR se conocía.

Los cebadores fluorescentes empleados (M13) fueron FAM (azul) y HEX (verde). La longitud de este cebador es de 18 pb por lo cual en el análisis post secuenciación, se debió restar este número de bases al tamaño de fragmento obtenido.

El análisis de tamaño de los fragmentos amplificados vía PCR de cada muestra con los diez pares de cebadores SSR, se llevó a cabo en la Universidad de Yale (Connecticut, EEUU) en un secuenciador modelo 3730xl 96- Capillary Genetic Analyzer y se utilizó el programa Peak Scanner 1.0 (Applied Biosystems) para el análisis de los resultados. PowerMarker V3.23 (Liu, 2002) fue utilizado para calcular los parámetros de diversidad genética para cada locus microsatélite. También se calculó el contenido de información polimórfica (PIC, Botstein et al., 1980) y el poder discriminante (Dj) para cada locus (Tessier et al., 1999).

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS MORFOLÓGICOS Y MOLECULARES

Para los caracteres morfológicos de endocarpo, las similitudes entre las muestras se estimaron utilizando el coeficiente de asociación de Jaccard (Ij, Jackson, 1989). Este coeficiente mide el grado de similitud entre dos conjuntos sea cual sea el

tipo de elementos utilizados, siempre toma los valores 0 y 1 correspondiendo este último a la igualdad total entre ambos elementos a comparar con una formulación equivalente a:

$$I_j = c / (a + b - c)$$

Donde: “a” es el número de estados de un carácter presente en una sola de las muestras (A).

“b” es el número de estados de un carácter presente en una muestra diferente a la anterior (B).

“c” es el número de estados de un carácter presentes en ambas muestras (A y B).

En este sentido 0 significa que las muestras no presentan caracteres de estados, en común y tiende a uno a medida que aumenta el número de muestras con caracteres con el mismo estado. A la matriz de similitud obtenida mediante este coeficiente se le aplicó un análisis de cluster basado en el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Average) implementado en el Software NTSYS-v2.02 (Rohlf, 1998).

Los genotipos de cada variedad fueron discriminados por comparaciones “apareadas” de sus perfiles SSR. Para evaluar las relaciones genéticas entre los diferentes genotipos, se elaboró una matriz conteniendo sólo los diferentes perfiles SSR contabilizando a los alelos amplificados presentes (1) o ausentes (0). Esta matriz fue usada para realizar un análisis de cluster basado en el algoritmo UPGMA empleando el índice de similitud de Dice (1945) implementado en el Software NTSYS-v2.02 (Rohlf, 1998).

$$\text{Índice de Dice} = 2C / (A+B)$$

Donde: “A” y “B” son el número de genotipos SSR presentes en las muestras A y B respectivamente.

“C” es el número de genotipos SSR compartidos por las dos variedades.

Este coeficiente, al igual que el anterior varía entre cero y uno según el grado de similitud (0 = nulo, 1 = total).

4. RESULTADOS

4.1. DESCRIPCIÓN MORFO- AGRONÓMICA

4.1.1. Caracteres cualitativos

Los 23 caracteres cualitativos estudiados mostraron variabilidad morfológica y el número de estados por característica fue clasificado del uno al cuatro (Cuadro No.2).

Cuadro No.2. Información estadística de los 23 caracteres morfológicos cualitativos.

No.	Carácter	Abrev.	Estado del carácter				Kj	Hj	Dj
			1	2	3	4			
1	Longitud de hoja	LH	Corta	Media	Larga		3	0,361	0,128
2	Ancho de hoja	AH	Estrecha	Media	Ancha		3	0,043	0,073
3	Forma de hoja (longitud/ ancho)	FH	Elíptica	Elíptico-lanceolada	Lanceolada		3	0,749	0,254
4	Peso del fruto	PF	Bajo (< 2 gr)	Medio (2- 4 gr)	Alto (4- 6 gr)	Muy alto (> 6 gr)	4	1,509	0,546
5	Forma del fruto	FF	Esférico	Ovoidal	Alargado		3	1,370	0,578
6	Simetría del fruto (posición A)	SF	Simétrico	Ligeramente asimétrico	Asimétrico		3	1,021	0,394
7	Diámetro máximo transversal del fruto (posición B)	DMF	Hacia la base	Centrado	Hacia el ápice		3	1,622	0,615
8	Forma ápice del fruto (posición A)	FAF	Apuntado	Redondeado			2	0,323	0,111
9	Forma base del fruto (posición A)	FBF	Truncada	Redondeada			2	0,261	0,084
10	Punto estilar del fruto	PEF	Ausente	Esbozado	Evidente		3	1,328	0,564
11	Lenticelas del fruto	LF	Escasas	Abundantes			2	0,978	0,381
12	Tamaño lenticelas fruto	TLF	Pequeñas	Grandes			2	1,221	0,527
13	Peso del endocarpo	PE	Bajo (< 0,3 gr)	Medio (0,3- 0,45 gr)	Alto (0,45- 0,7 gr)	Muy alto (> 0,7 gr)	4	1,814	0,691
14	Forma del endocarpo (posición A)	FE	Esférico	Ovoidal	Elíptico	Alargado	4	1,761	0,673
15	Simetría del endocarpo (posición A)	SEA	Simétrico	Ligeramente asimétrico	Asimétrico		3	1,176	0,501
16	Forma ápice del endocarpo (posición A)	FAE	Apuntado	Redondeado			2	0,502	0,197
17	Forma base del endocarpo (posición A)	FBE	Truncada	Apuntada	Redondeada		3	1,212	0,541
18	Simetría del endocarpo (posición B)	SBE	Simétrico	Ligeramente asimétrico			2	0,341	0,119
19	Superficie del endocarpo	SE	Lisa	Rugosa	Escabrosa		2	0,515	0,204
20	Diámetro máximo transversal del endocarpo (posición B)	DME	Hacia la base	Centrado	Hacia el ápice		3	1,025	0,446
21	Número surcos del endocarpo	NSE	Bajo (< 7)	Medio (7- 10)	Alto (> 10)		3	1,099	0,427
22	Distribución surcos del endocarpo	DSE	Uniforme	Agrupados			2	0,274	0,090
23	Terminación de ápice	TA	Sin mucrón	<u>Con mucrón</u>			1	--	--
	Total						62		
	Promedio							0,932	0,370
	Mín.							0,043	0,073
	Máx.							1,814	0,691

(Kj) número de estados observados, (Hj) índice de información de Shannon's, (Dj) poder discriminante.

A partir de los 23 caracteres cualitativos de hoja, fruta, y endocarpo (40 muestras de cada uno, de un árbol por variedad, se obtuvieron 42240 datos. Las hojas presentaron en su mayoría (93%) longitud media (LH), ancho (AH) medio (99,5 %) y forma (FH)elíptico- lanceolada (80 %). Los frutos tuvieron un peso (PF) medio (3,43 gr), forma ovoidal (FF) para más del 53 % de las muestras, simetría (SF) ligeramente asimétrica (75,7 %), diámetro máximo transversal (DMF) hacia la base (54 %), forma del ápice (FAF) y base (FBF) redondeado (94 %) y truncado (96 %) respectivamente,

punto estilar (PEF) ausente y esbozado en un 54 y 36 % respectivamente para cada uno de los estados y abundante presencia de lenticelas (76 %, LF) de tamaño pequeño (59 %, TLF).

Las características morfológicas de los endocarpos presentaron estados bien diferenciados; el peso (PE) mayoritario (42 %) fue elevado (0,58 gr), la forma (FE) elíptica (39 %) y ovoidal (37 %), simetría en posición A (SAE) y B (SBE) ligeramente asimétrica (63 % y 93 % respectivamente), forma del ápice (FAE) redondeado (89 %) mientras que la base (FBE) fue mayormente redondeada (48 %) y truncada (47 %). La superficie de los endocarpos (SE) fue mayormente rugosa (88 %), diámetro máximo transversal (DME) hacia el ápice (68,5 %), número de surcos fibrovasculares (NSE) medio (entre 7 y 11, 73 %) y su distribución (DSE) casi totalmente uniforme (95 %). Todas las variedades presentaron un único estado para terminación del ápice, con mucrón (monomórfica).

Cabe destacar que el mayor poder discriminante (Dj, Cuadro No.2) lo presentaron los caracteres del endocarpo que son muy heredables y conservados y por lo tanto, poco afectados por las condiciones ambientales (Barranco y Rallo, 1984). Peso y forma (posición A) fueron los de mayor Dj con un valor de 0,691 y 0,673 respectivamente.

De los 23 caracteres medidos y presentados en el Cuadro No.2, se observaron 62 estados y particularmente para endocarpo, las 11 características medidas mostraron 30 estados, lo cual refleja la gran variabilidad presente en la colección del jardín de introducción de INIA Las Brujas. En Anexos 3 se detallan los estados mayoritarios de los caracteres morfológicos medidos para hoja y fruto.

4.1.2. Caracteres cuantitativos (agronómicos)

El máximo coeficiente de variación se observó en el peso del fruto (PF) con un 48,08 % mientras que el más bajo fue para el ancho del endocarpo (AE) con 14,2 %. El peso (PE) y longitud del endocarpo (LE), 38,5 % y 18,8 % respectivamente, fueron caracteres que también presentaron gran variación (Cuadro No.3).

Cuadro No.3. Información estadística de los ocho caracteres morfológicos cuantitativos.

No.	Carácter	Abrev.	Promedio (desvío estándar)	Rango	CV(%)
1	Longitud de hoja (cm)	LH	6,13 (0,92)	4,30- 9,10	14,92
2	Ancho de hoja(cm)	AH	1,34 (0,20)	0,90- 2,0	14,86
3	Longitud del fruto (cm)	LF	2,12 (0,36)	1,26- 3,27	16,93
4	Ancho del fruto (cm)	AF	1,63 (0,27)	0,17- 2,58	16,52
5	Peso del fruto (gr)	PF	3,40 (1,63)	0,96- 10,03	48,08
6	Longitud del endocarpo (cm)	LE	1,48 (0,28)	0,83- 1,90	18,78
7	Ancho del endocarpo (cm)	AE	0,84 (0,12)	0,57- 1,10	14,2
8	Peso del endocarpo (gr)	PE	0,58 (0,22)	0,20- 1,21	38,45

(CV) Coeficiente de variación



(1) Ascolana (2) Bosana (3) Canino (4) Carolea (5) Cipressino (6) Coratina (7) Frantoio (8) Grignán (9) Itrana (10) Leccino (11) Leccio (12) Maurino (13) Moraiolo (14) Pendolino (15) Seggianese (16) Taggiasca.

Figura No.15. Muestras de endocarpo de variedades italianas de olivo del jardín de introducción de INIA Las Brujas.

Se pudo identificar correctamente todas las variedades estudiadas, lográndose precisar la nomenclatura de algunas de ellas que aparecían previamente como

confusas. La variedad catalogada en INIA Las Brujas como Ascolana mediante los caracteres morfológicos de hoja, fruto y mayormente endocarpo se clasificó como Ascolana semitenera o Ascolana dura (ambas con iguales características morfológicas) siendo elevado el porcentaje de coincidencias con Mazzalupo (2012) como se puede apreciar en el Cuadro No.4. El análisis comparativo basado en caracteres cualitativos tiene algunas particularidades. En el caso de endocarpo, el estado que se asigna la mayoría de las veces resulta de una observación visual (subjetiva), que depende de quien la realiza (Cavagnaro et al., 2001). Esta limitante intentó minimizarse, al realizarla una sola persona, con un entrenamiento previo sumamente riguroso a partir de la observación y clasificación de cientos de frutos y endocarpos de procedencias y variedades diversas, y siempre comparando con los catálogos respectivos como lo son Barranco et al. (2000), Mazzalupo (2012), Barranco et al. (2017). En la comparación de variedades basándose en los estados de caracteres de endocarpo, aplicando el coeficiente de Jaccard, todos los resultados obtenidos tienen el mismo “peso” en el resultado final del coeficiente (Cuadro No.4).

No obstante hay ciertos caracteres del endocarpo, como el peso, que si bien se categorizan pasando de continuos a discretos, tienen una base de caracterización sumamente precisa (peso en gramos o medidas en centímetros). De este modo se han observado cuatro estados diferentes en la muestra analizada, en frecuencias diferentes, lo que le confiere un alto poder discriminante ($D_j = 0.691$). En el mismo caso se encuentra la forma, que resulta del cociente de la medida del largo/ ancho del endocarpo que luego es convertida en estados discretos según categorías preestablecidas. También en los 640 endocarpos analizados se distinguieron cuatro categorías diferentes por lo cual el estado forma tiene un alto poder discriminante ($D_j = 0.673$).

La superficie y el peso del endocarpo son un caso diferente. La superficie se trata de un carácter discreto con categorías sumamente diferenciadas (lisa, rugosa y escabrosa). El peso, es un carácter cuantitativo que fue determinante al igual que la superficie cuando se clasificó con precisión que las muestras tomadas de la variedad Ascolana no correspondieron a la subvariedad “tenera” (que en todos los catálogos y en muestras analizadas en el Laboratorio de Biotecnología presentaron peso “muy elevado” y superficie “escabrosa”). Los endocarpos estudiados, fueron en su totalidad de superficie “rugosa”.

Cuadro No.4. Caracteres del endocarpo estudiados en las 16 variedades.

Variedad	Carácter morfológico								
	Peso	Forma (A)	Simetría (A)	Forma ápice (A)	Forma base (A)	Superficie	DMT (B)	No. surcos	Term. ápice
Ascolana	<u>Elevado</u>	<u>Ovoidal</u>	<u>Lig. asim.</u>	<u>Redondeado</u>	<u>Redondeada</u>	<u>Rugosa</u>	<u>Centrado</u>	<u>Medio</u>	<u>Con mucrón</u>
Bosana	Muy elevado	Elíptica	Lig. asim.	<u>Redondeado</u>	Truncado	Rugosa	H. ápice	<u>Medio</u>	<u>Con mucrón</u>
Canino	<u>Bajo</u>	<u>Ovoidal</u>	<u>Lig. asim.</u>	<u>Redondeado</u>	<u>Redondeada</u>	Rugosa	<u>H. ápice</u>	Medio	<u>Con mucrón</u>
Carolea	Muy elevado	<u>Elíptica</u>	Lig. asim.	Apuntado	Redondeada	<u>Rugosa</u>	H. base	<u>Medio</u>	<u>Con mucrón</u>
Cipressino	Elevado	Ovoidal	Lig. asim.	<u>Redondeado</u>	Truncada	Rugosa	H. base	Medio	<u>Con mucrón</u>
Coratina	Muy elevado	Alargada	Lig. asim.	<u>Apuntado</u>	Apuntada	<u>Rugosa</u>	H. ápice	Medio	<u>Con mucrón</u>
Frantoio	Elevado	Ovoidal	Lig. asim.	Redondeado	Redondeada	<u>Rugosa</u>	H. ápice	<u>Medio</u>	<u>Con mucrón</u>
Grignan	<u>Elevado</u>	<u>Ovoidal</u>	Asimétrico	<u>Redondeado</u>	<u>Redondeada</u>	Rugosa	H. base	<u>Alto</u>	<u>Con mucrón</u>
Itrana	Muy elevado	<u>Ovoidal</u>	Asimétrico	<u>Redondeado</u>	Redondeada	Escabrosa	H. ápice	<u>Medio</u>	<u>Con mucrón</u>
Leccino	<u>Elevado</u>	<u>Elíptica</u>	Lig. asim.	<u>Redondeado</u>	<u>Redondeada</u>	Rugosa	H. ápice	<u>Alto</u>	<u>Con mucrón</u>
Leccio	Elevado	Elíptica	Lig. asim.	Redondeado	Truncada	Rugosa	H. ápice	Medio	Con mucrón
Maurino	Medio	Ovoidal	Asimétrico	<u>Redondeado</u>	Truncada	<u>Rugosa</u>	H. ápice	<u>Medio</u>	Con mucrón
Moraiolo	Elevado	Esférica	Lig. asim.	<u>Redondeado</u>	Truncada	<u>Rugosa</u>	H. ápice	Medio	Con mucrón
Pendolino	Medio	<u>Elíptica</u>	<u>Asimétrico</u>	<u>Redondeado</u>	<u>Redondeada</u>	Rugosa	<u>H. ápice</u>	<u>Medio</u>	<u>Con mucrón</u>
Seggianese	Elevado	<u>Esférica</u>	<u>Simétrico</u>	<u>Redondeado</u>	Truncada	<u>Rugosa</u>	H. base	<u>Medio</u>	<u>Con mucrón</u>
Taggiasca	<u>Elevado</u>	<u>Elíptica</u>	<u>Lig. asim.</u>	<u>Redondeado</u>	Truncada	<u>Rugosa</u>	<u>H. ápice</u>	Medio	<u>Con mucrón</u>
Dj	0,691	0,673	0,501	0,197	0,541	0,204	0,446	0,427	0

(A) posición A (B) posición B (DMT) Diámetro máximo transversal (Term. ápice) Terminación del ápice (Lig. asim.) Ligeramente asimétrico (H. ápice) Hacia el ápice (H. base) Hacia la base (Dj) Poder discriminante.

Los estados subrayados son los que coinciden con la base de datos descripta por Mazzalupo (2012).

4.1.3. Análisis de grupos

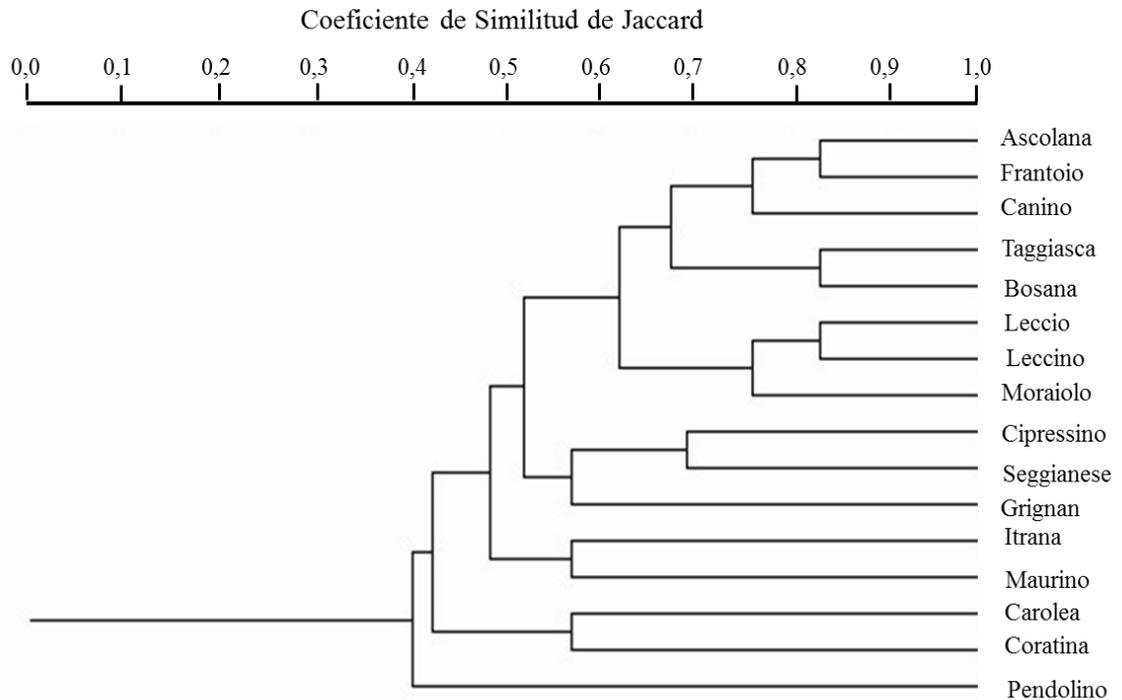


Figura No.16. Dendrograma basado en el coeficiente de asociación de Jaccard.

A partir de la matriz de distancias de Jaccard, basado en la caracterización morfológica de endocarpo, se obtuvo el dendrograma utilizando el método de aglomeración UPGMA. La diferenciación entre variedades es muy débil, ya que mayormente se basa en una o dos diferencias de estados para nueve caracteres, de los cuales uno es monomórfico. Las diferencias resultan poco claras y por lo tanto las 16 variedades no pueden ser bien diferenciadas. Ejemplos de estas situaciones son los casos de Leccio y Leccino que difieren en un solo carácter que es la forma de la base (posición A, una es truncada y la otra redondeada) y se han descrito en los antecedentes como sinonimias basadas en mutaciones moleculares. En la misma situación (diferencia en un solo carácter) se encuentran dos pares de variedades: Ascolana- Frantoio, Bosana-Taggiasca.

4.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

El análisis molecular se realizó utilizando diez pares de cebadores microsatélites de las series ssrOeUA-DCA, GAPU y UDO99 empleados en estudios

anteriores. La amplificación se realizó exitosamente para todos ellos, así como también el análisis de fragmentos SSR (Figuras No.17 y No.18).

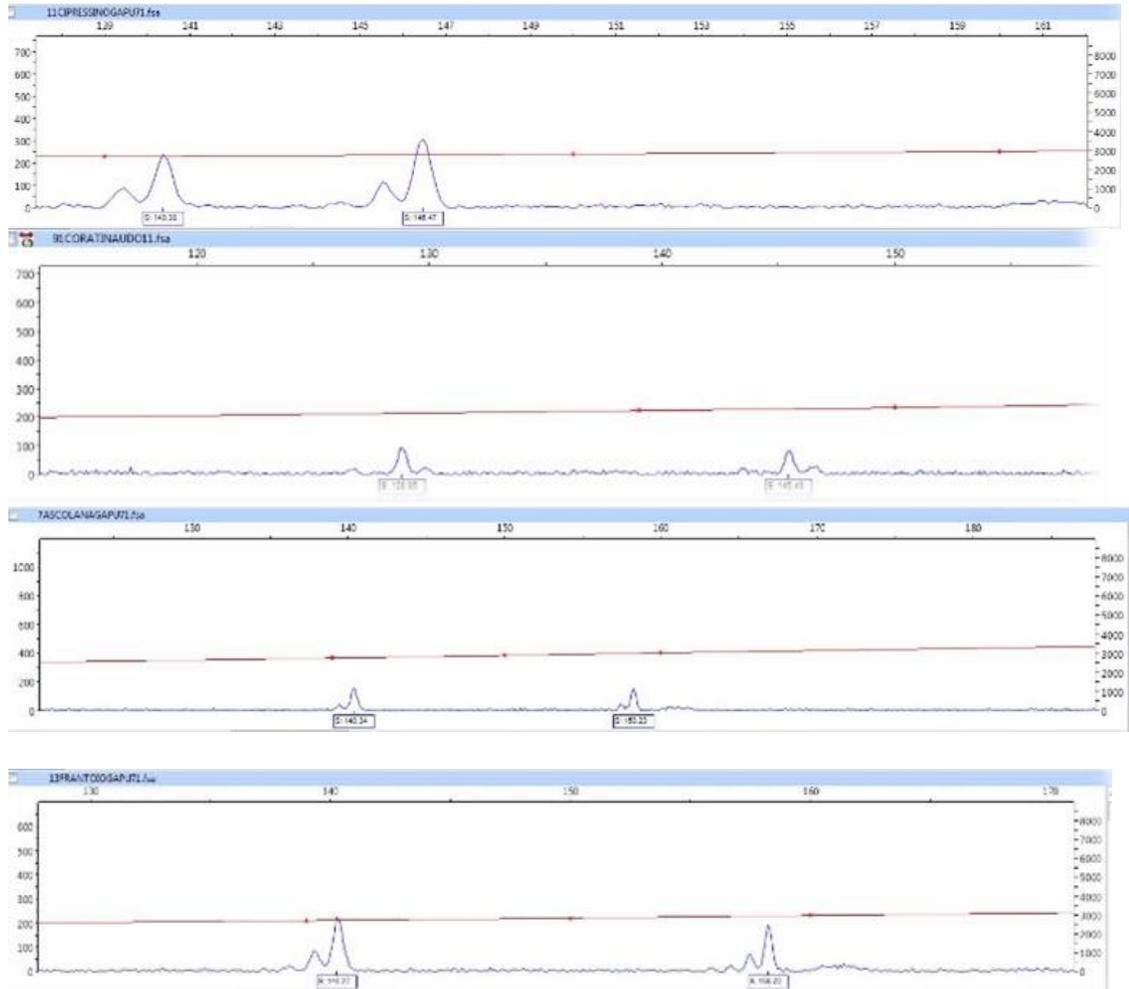


Figura No.17. Perfiles de amplificación obtenidos mediante el análisis de fragmentos.

Cuadro No.5. Tamaño (pb) de los alelos en los diez pares de microsatélites SSR analizados en las 16 variedades italianas.

Variedad	Cebador									
	DCA 3	DCA 9	DCA 11	DCA 16	DCA 18	GAPU 71B	GAPU 101	GAPU 103A	UDO99-011	UDO99-043
Ascolana	229/247	196/210	142/142	143/169	168/172	121/139	198/200	144/177	100/114	174/212
Bosana	241/243	170/184	140/178	122/152	174/180	124/127	191/205	171/171	116/134	175/187
Canino	237/237	170/182	140/146	148/161	162/174	124/141	183/197	157/171	103/125	175/185
Carolea	229/251	160/198	146/178	124/152	174/176	118/127	191/217	133/171	114/119	172/175
Cipressino	239/241	160/184	126/140	148/163	166/172	121/127	191/205	147/157	127/138	208/212
Coratina	237/241	180/192	130/170	148/171	172/176	121/141	197/217	133/159	114/131	175/198
Frantoio	234/241	180/208	130/178	148/154	172/174	121/151	183/197	159/171	114/125	175/214
Grignan	234/251	204/208	130/178	170/178	170/176	121/127	191/217	157/157	129/129	208/214
Itrana	237/247	180/192	146/178	122/124	168/176	124/141	183/199	159/186	125/127	172/176
Leccino	241/251	160/204	130/178	148/173	172/172	124/141	197/199	171/184	114/134	210/214
Leccio	241/251	160/208	130/178	148/173	172/172	124/141	197/199	171/188	114/134	210/214
Maurino	234/251	204/206	130/140	148/171	172/172	141/141	197/205	159/184	125/134	175/210
Moraiolo	229/241	182/204	110/178	144/148	177/180	121/127	191/205	147/147	116/134	172/216
Pendolino	241/251	160/204	140/174	152/171	172/174	121/141	197/199	171/184	125/134	210/214
Seggianesse	229/241	192/208	146/170	148/173	172/176	124/141	183/199	147/159	127/131	198/214
Taggiasca	234/241	180/184	130/170	122/163	172/174	121/121	183/183	133/143	114/127	175/212

Los diez pares de cebadores produjeron 122 genotipos. El número de genotipos por cebador fue muy elevado (Cuadro No.4). Los marcadores *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16* y *GAPU103A* lograron discriminar 14 genotipos; *ssrOeUA-DCA3* *ssrOeUA-DCA18* y *UDO99-043* 13 genotipos; *ssrOeUA-DCA11*, *GAPU101* y *UDO99-011* 11 genotipos mientras que el cebador de menor poder discriminante fue *GAPU71B* que permitió diferenciar nueve genotipos en los 16 materiales estudiados. El promedio de genotipos discriminados por cebador fue de 12,3.

Cuadro No.6. Parámetros moleculares de los 10 pares de cebadores microsatélites seleccionados.

Locus	TR	Na	Au	Ng	He	Ho	An	PIC	No. het.	No. hom.
<i>ssrOeUA-DCA3</i>	229-268	10	2	13	0,841	0,938	-0,09	0,795	15	1
<i>ssrOeUA-DCA9</i>	145-212	16	8	14	0,935	1,000	-0,05	0,903	16	0
<i>sssrOeUA-DCA11</i>	126-178	9	3	11	0,869	0,813	13	0,822	13	3
<i>ssrOeUA-DCA16</i>	122-173	15	8	14	0,913	1,000	-0,067	0,876	16	0
<i>ssrOeUA-DCA18</i>	162-186	12	6	13	0,879	0,750	0,064	0,837	12	4
<i>GAPU 71B</i>	118-141	8	4	8	0,792	0,938	-0,11	0,732	15	1
<i>GAPU 101</i>	172-217	13	6	11	0,907	1,000	-0,077	0,867	16	0
<i>GAPU 103A</i>	124-188	16	10	14	0,929	0,875	0,014	0,893	14	2
<i>UDO99-011</i>	100-199	14	9	11	0,895	1,000	-0,076	0,854	16	0
<i>UDO99-043</i>	147-216	15	7	13	0,923	0,938	-0,043	0,886	15	1
Media		12,8	6,3	12,2	0,8883	0,925		0,847		
Total		128	63	122					148	12

(TR) tamaño del rango esperado (Na) número de alelos (Au) alelos únicos (Ng) número de genotipos (He) heterocigosis esperada (Ho) heterocigosis observada (An) alelos nulos (PIC) contenido de información polimórfica (No. het.) número de heterocigotas (No. hom.) número de homocigotas.

Se detectaron un total de 128 alelos para los diez pares de cebadores en las 16 accesiones analizadas. El número de alelos por locus varió entre ocho (*GAPU 71B*) y 16 (*ssrOeUA-DCA9*). El número promedio de alelos por cebador fue de 12,8.

Se observó variación entre el número de alelos encontrados en este trabajo y el reportado en trabajos anteriores. Para la serie *ssrOeUA-DCA*, Sefc et al. (2000) reportaron entre cinco (*ssrOeUA-DCA11*) y nueve (*ssrOeUA-DCA16*) alelos por locus; Sorkheh y Khaleghi (2016) revelaron para la serie *GAPU* ocho y nueve alelos para *GAPU71B* y *GAPU101- GAPU103A* respectivamente. Por otro lado, Díez et al. (2000) detectaron 16 (*UDO99-011*) y 24 (*UDO99-043*) alelos para la serie *UDO99*.

Las comparaciones con trabajos previos permiten concluir que se ha obtenido un número relativamente elevado de alelos por par de cebadores SSR, para dos de las

tres series utilizadas. Por lo tanto, puede afirmarse la existencia de una gran variabilidad en la colección del jardín de introducción en INIA Las Brujas.

La heterocigosis esperada (H_e) fue calculada en base a la frecuencia de cada uno de los alelos asumiendo el principio de Hardy- Weinberg, que establece que la composición genética de una población natural permanece en equilibrio mientras no actúen la selección natural, ni ningún otro factor como la mutación o la deriva. La heterocigosidad esperada es un indicador del nivel de información del locus. Por debajo de 0,5 la heterocigosidad esperada se considera insuficiente (Fendri, 2008). En los diez pares de cebadores SSR empleados en este análisis, la heterocigosidad media tuvo un valor de 0,888 siendo el valor mínimo 0,792 para el loci GAPU71B y el máximo 0,935 para el loci *ssrOeUA-DCA9*.

La heterocigosis observada (H_o) es el número de individuos heterocigotos dividido por el número total de individuos de la población analizada por marcador SSR. Tuvo un valor promedio de 0,925 para la población analizada y el valor mínimo fue de 0,750 para el loci *ssrOeUA-DCA18* mientras que el máximo fue uno para los loci *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16*, GAPU101 y UDO99-011. La heterocigosidad esperada fue menor a la observada para todos los loci a excepción de *ssrOeUA-DCA11*, *ssrOeUA-DCA18* y GAPU103A.

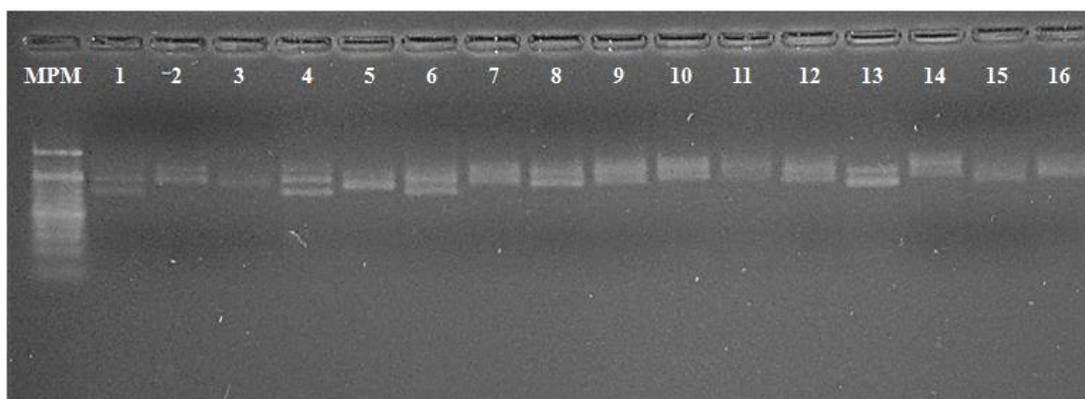
La frecuencia de alelos nulos (A_n) es un indicador importante de la garantía de los resultados del análisis de microsatélites, sobre todo en estudios genéticos de una población. La existencia de un “alelo nulo” ocurre cuando un oligonucleótido como los usados y definidos en el presente trabajo no puede hibridar con el ADN, probablemente como consecuencia de la presencia de mutaciones puntuales, de forma que no sea por tanto detectable (Pemberton, citado por Fendri, 2008). La frecuencia de alelos nulos es negativa o cero cuando la H_e es menor o igual a la H_o . Para los tres casos en que resultó positiva (0,013 para *ssrOeUA-DCA11*, 0,064 para *ssrOeUA-DCA18* y 0,014 para GAPU103A) las frecuencias fueron cercanas a cero por lo cual pueden considerarse nulas.

La elevada heterocigosidad media en la muestra estudiada (93 %) muestra la alta diversidad genética presente en la colección de variedades italianas.

El contenido en información polimórfica (PIC) representa las posibles combinaciones entre los diferentes alelos que se obtuvieron y es un índice de la capacidad informativa de cada uno de los microsatélites.

La media de este valor para los diez pares de SSR fue de 0,847, siendo el mínimo 0,732 (GAPU71B) y el máximo 0,903 (ssrOeUA-DCA9). PIC superiores a 0,5 indican que el marcador utilizado es informativo y si el PIC es superior a 0,7 indica que el marcador es especialmente de utilidad para la construcción de mapas (Bandelj et al., 2004) como es el caso de todos los marcadores utilizados en este trabajo. Por lo tanto, el elevado PIC logrado con los marcadores empleados indica el gran poder discriminante de los mismos.

Los marcadores más informativos fueron ssrOeUA-DCA3, ssrOeUA-DCA9, ssrOeUA-DCA16, ssrOeUA-DCA18, GAPU103 y UDO99-043 logrando discriminar más del 80 % de las variedades en estudio.



(MPM) Marcador de peso molecular 20 pb O'Range Ruler DNA Ladder, Thermo Scientific (1) Ascolana (2) Bosana (3) Canino (4) Carolea (5) Cipressino (6) Coratina (7) Frantoio (8) Grignan (9) Itrana (10) Leccino (11) Leccio (12) Maurino (13) Moraiolo (14) Pendolino (15) Seggianese (16) Taggiasca.
Gel de agarosa (3 %) en buffer TBE 1X.

Figura No.18. Perfil de amplificación para el cebador GAPU103A para las 16 variedades italianas de olivo analizadas en gel de agarosa.

4.2.1. Análisis de grupos

El análisis de grupos realizado para la caracterización molecular corrobora la gran variabilidad genética existente en la colección de variedades italianas del jardín de introducción en INIA Las Brujas. En la Figura No.17 se observa el agrupamiento obtenido mediante el método UPGMA (Unweighted Pair- Group Method) a partir de la matriz de distancias de Dice.

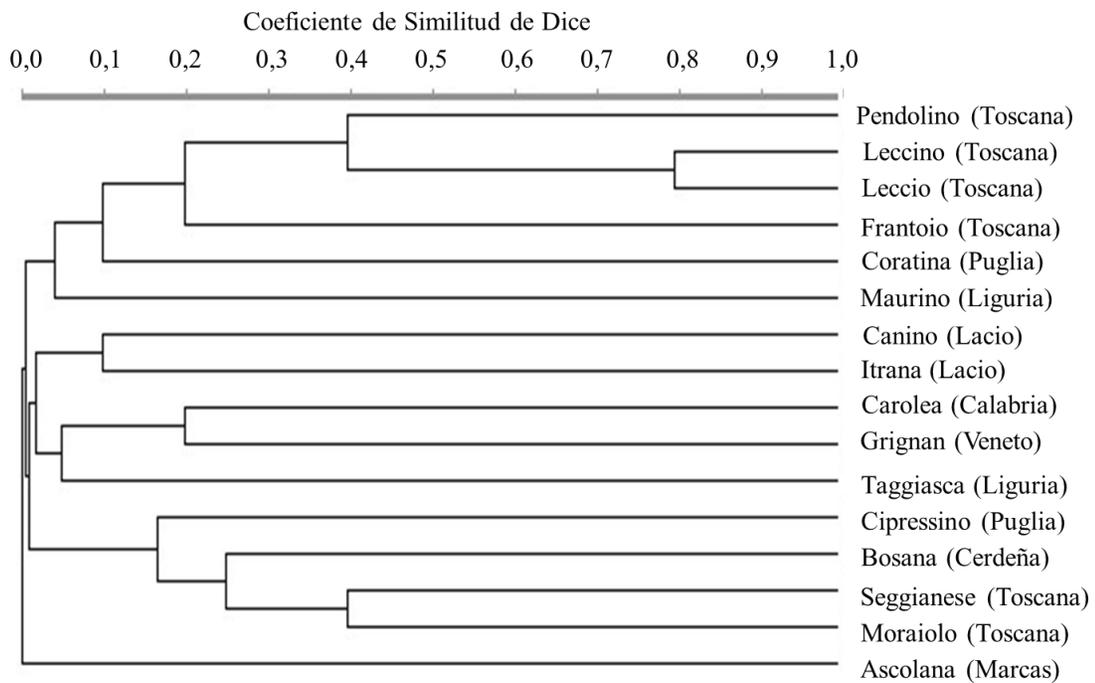
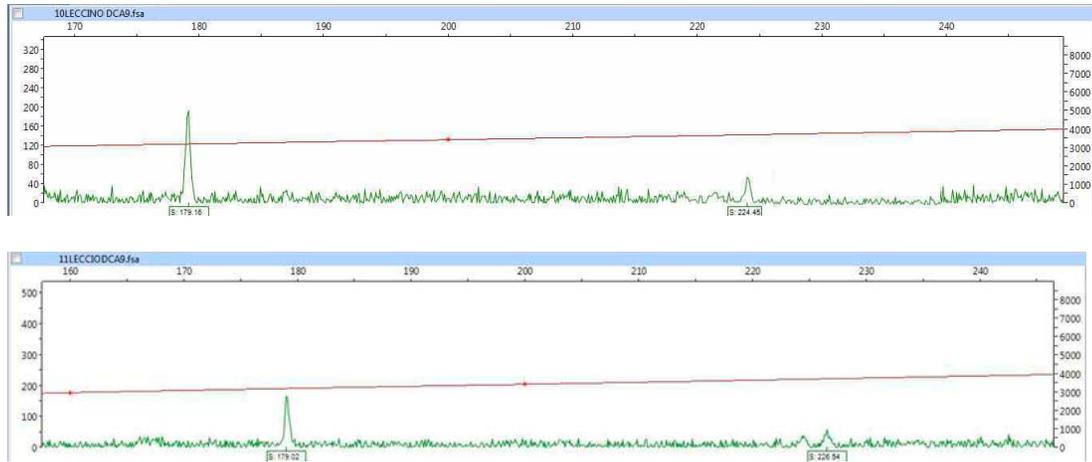


Figura No.19. Dendrograma obtenido a partir de la matriz de distancias de Dice.

Las ramas largas indican baja similitud genética entre las variedades a excepción de Leccio y Leccino. Dicha similitud puede deberse a que son variedades genéticamente similares (variantes moleculares) o a modificaciones intravarietales por causa de mutaciones somáticas (ver Figura No.20).

A partir del dendrograma pueden distinguirse dos grupos claramente marcados. El primero conformado por Pendolino, Leccio, Leccino, Frantoio, Coratina y Maurino; y el segundo por Canino, Itrana, Carolea, Grignan, Taggiasca, Cipressino, Bosana, Seggianese y Moraiolo. Ascolana se aparta de los grupos mencionados. En el primer grupo puede observarse un coeficiente de similitud de 0,4 entre Pendolino, Leccio y Leccio mientras que entre las otras variedades resulta menor la similitud genética. En el segundo, la similitud entre variedades varía desde 0,4 a menos de 0,1 lo cual indica una gran distancia genética entre ellas. Se puede concluir que el agrupamiento mediante el método UPGMA permite mostrar que algunas variedades están genéticamente muy separadas del resto de las de la colección de olivos procedentes de Italia.



Luego de la corrección por la presencia del cebador reverse M13 se obtuvieron los genotipos 160/204 en la variedad Leccino y 160/208 en Leccio para el par de cebadores sseOeUA-DCA9.

Figura No.20. Perfiles de amplificación obtenidos mediante el análisis de fragmentos con el par de cebadores ssrOeUA-DCA9.

5. DISCUSIÓN

Las características morfológicas y moleculares empleadas en el presente trabajo, se pueden clasificar en tres categorías. Las morfológicas en variables cualitativas y cuantitativas mientras que las moleculares en discretas. Las morfológicas cuantitativas resultan fáciles de medir y analizar porque permiten examinar los datos de manera numérica y las cualitativas no cuantifican sino que se basan en apreciaciones subjetivas o categorías establecidas según la variación de los valores numéricos. El mayor poder discriminante lo presentaron las características cuantitativas, ya que no varían en función del observador. Lo contrario sucedió con las características cualitativas donde por ejemplo, el endocarpo de una variedad puede parecer “ligeramente asimétrico” o “simétrico” según el observador que realice el estudio (Cavagnaro et al., 2001). Estas diferencias pueden deberse por un lado a la determinación visual de alguna característica (subjetiva), y por otro lado a que los criterios de categorías son muy sutiles. Además, las diferencias en las fotografías de la bibliografía son claras y diferenciales (Baccino et al., s.f.). En el caso de este estudio el entrenamiento previo, con materiales de olivo de diferentes procedencias y características (variedades cultivadas, olivos centenarios de Uruguay y España) ha permitido minimizar esta limitante, aunque la posibilidad de errores de apreciación es inevitable.

En caracteres foliares, se observó gran coincidencia entre el estado mayoritario para longitud y ancho entre las mediciones realizadas en este trabajo y Mazzalupo (2012), empleado como material de referencia.

En caracteres del fruto se observó una alta coincidencia para peso, forma, forma del ápice y presencia de lenticelas, en función de los datos existentes en Mazzalupo (2012). El mayor poder discriminante (D_j) lo tuvieron el peso (0,691) y forma del fruto (0,673) lo que puede ser una consecuencia de la selección basada en caracteres de interés agronómico que se ha realizado en el olivo en el proceso de domesticación y elección de genotipos como variedades comerciales.

Al contrastar los caracteres del Cuadro No.3 con los provistos por Belaj et al. (2011) en olivos monumentales de España, se observan diferencias para las tres fuentes de información morfológica estudiadas. Las hojas de los olivos antiguos españoles, presentan un largo y ancho (4,31 cm y 1,17 cm respectivamente) inferior a los olivos cultivados (6,8 cm y 1,34 cm respectivamente). La diferencia es más notoria en fruto y endocarpo donde la longitud, ancho y peso de los frutos estudiados en este trabajo presentan los valores 2,12 cm, 1,63 cm y 3,4 gr mientras que en los olivos centenarios 1,13 cm, 0,76 cm y 0,46 gr respectivamente. En los 640 endocarpos estudiados, la longitud, ancho y peso medio fue de 1,48 cm, 0,84 cm y 0,58 gr respectivamente, mientras que en los olivos centenarios fueron 0,94 cm, 0,52 cm y 0,15 gr

respectivamente. Además de revelar la diversidad encontrada en la colección de variedades italianas, el uso de estos descriptores evidencia diferencias no sólo con los olivos monumentales de España (Belaj et al., 2011), sino también con los olivos centenarios encontrados en Uruguay (Pereira et al.¹) y con variedades comerciales plantadas en todo el país.² En olivos centenarios de Uruguay Pereira et al.¹ encontraron que la longitud media de hoja, fruto y endocarpo fue 5,68 cm, 1,29 cm y 1,03 cm respectivamente mientras que en este trabajo dichas medidas fueron 6,13 cm, 2,12 cm y 1,48 cm respectivamente. Otros valores cuantitativos a considerar son los encontrados en variedades comerciales de Túnez donde el peso promedio de fruto fue 2,08 gr y de endocarpo 0,36 gr (Hannachi et al., 2008). El incremento del tamaño del fruto y la mejora de la producción de aceite han sido criterios importantes de selección multilocal durante el proceso de domesticación del olivo (Belaj et al. 2002, Breton et al. 2006). Además el tamaño de las hojas de variedades comerciales es mayor que en los olivos más antiguos (Barranco et al., 2005). Sin embargo, cuando se comparan los datos con otras variedades mejoradas como las presentadas por Sorkheh y Khaleghi (2016) no se observan diferencias de consideración.

Los caracteres de hoja y fruto varían en gran medida con las condiciones agroclimáticas, y si bien pueden permanecer estables durante años, pueden sufrir cambios temporales consecutivos debido a fluctuaciones en el clima, especialmente la sequedad excesiva. Coupin, citado por Idrissi y Ouazzani (2004), reportó cambios en la forma del fruto debido al período de lluvias anterior. El presente trabajo se realizó mediante la colecta de hojas y frutos en un solo año, por lo cual se desconoce la variabilidad interanual de estos atributos.

La mayoría de los estudios realizados anteriormente han demostrado que, para una variedad determinada, los caracteres del endocarpo son más estables que los de fruta y hoja. La naturaleza del endocarpo muestra una variación significativa entre las variedades (Bari et al., citados por Idrissi y Ouazzani, 2004).

Al analizar los fragmentos microsátélites obtenidos se encontró que las variedades Ascolana, Canino, Carolea, Cipressino, Coratina, Frantoio, Itrana, Maurino, Moraiolo y Pendolino coincidieron con los de Trujillo et al. (2014). Además, la variedad Leccio, que en Trujillo et al. (2014) era catalogada como una variante molecular de Leccino, difirió en el comportamiento de dos cebadores (Cuadro No.5), *ssrOeUA-DCA9* (Leccino 160/ 204, Leccio 160/ 208) y *GAPU 103A* (Leccino 171/ 184, Leccio 171/ 188, Cuadro 5).

¹Pereira, J.; Bernal, J.; Martinelli, L.; Villamil, J. J.; Conde, P. Original olive genotypes found in Uruguay identified by morphological and molecular markers. (en prensa).

²Pereira, J. 2016. Com. personal.

Por otro lado, por primera vez se analizaron variedades con estos diez pares de cebadores; Bosana, Grignan, Seggianese y Taggiasca, y ello representa un aporte sustancial para su identificación.

Conforme a lo esperado (Breton et al. 2006, Belaj et al. 2007, 2010, Boucheffa et al. 2017), se detectó alta diversidad mediante el uso de marcadores microsatélites. El número promedio de alelos (12,8) y los valores PIC (0,85) fueron similares a los encontrados en estudios similares en el Banco de Germoplasma de Córdoba (14,2 y 0,65 respectivamente, Trujillo et al., 2014). El elevado PIC se explicaría por la utilización de cebadores de alto poder discriminante, anteriormente empleados en el análisis del Banco Mundial de Germoplasma.

El análisis de agrupamiento de clusters UPGMA (Figura No.19) fue altamente discriminante y únicamente Leccio y Leccino mostraron una diferencia reducida en sus genotipos multiloci (0,8). Las otras variedades se distinguieron claramente y se encontraron agrupamientos por procedencia geográfica: Pendolino, Leccio, Leccino, Frantoio, Seggianese y Moraiolo de la región Toscana. Esto podría deberse a diversos factores como la existencia de germoplasma nativo de características similares antes del proceso de domesticación y a la selección con criterios similares a los utilizados para la obtención de variedades comerciales. Esto también se observó con las variedades Canino e Itrana de la zona de Lacio.

Las diferencias entre el número de genotipos detectados (128) y el número de estados en descriptores morfológicos (62), evidencia la eficiencia de cada tipo de marcador en la discriminación varietal en olivos italianos. No obstante, ambas metodologías permitieron identificar variedades. Por otro lado, si bien ambos tipos de marcadores han sido suficientes para distinguir estas variedades, el dendrograma basado en SSR identificó claramente la estructura del germoplasma italiano del jardín de introducción de olivos de INIA Las Brujas. La variación detectada en el ADN con los microsatélites a menudo no se la correlaciona con la variación agronómica y fenotípica (Sorkheh y Khaleghi, 2016).

Sin embargo, a pesar del alto poder discriminante de los marcadores SSR para detectar variabilidad y relaciones entre genotipos, no deben considerarse como un sustituto de los descriptores morfo- agronómicos (Karp et al., 1997). Por ello, resulta sumamente práctico la aplicación de ambos tipos de marcadores que deben ser considerados como herramientas complementarias para proporcionar una comprensión más completa de la diversidad, tanto en las variedades cultivadas como en las poblaciones centenarias.

6. CONCLUSIONES

En el trabajo se logró la caracterización primaria de las 16 variedades italianas de olivo del jardín de introducción de INIA Las Brujas. Tanto la caracterización morfológica como la molecular, corroboraron la identidad genética de las variedades presentes y aclararon problemas de sinonimias y homonimias.

Todos los marcadores microsatélites empleados en este trabajo presentaron un elevado grado de polimorfismo. Los cebadores UDO99-043, *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16*, *ssrOeUA-DCA3*, GAPU101 y *ssrOeUA-DCA11* fueron los que lograron discriminar cerca del 100 % de las variedades.

Las variedades fueron identificadas utilizando diferentes cebadores y se logró corroborar la variabilidad genética y morfológica de una misma variedad de diferente procedencia (Leccio y Leccino) de acuerdo a las bases de datos morfológicas y moleculares.

De acuerdo al análisis morfológico, la variedad Ascolana se identificó como Ascolana dura o Ascolana semitenera ya que ambas presentan características morfo-agronómicas semejantes.

La mayoría de las variedades en cuestión coincidieron con la base de datos mientras que Cipressino, Maurino, Pendolino, Seggianese y Taggiasca fueron encontradas a través de sus sinonimias: Frangivento, Razzola, Piangente, Olivastra seggianese y Lavagnina respectivamente.

7. RESUMEN

La olivicultura se desarrolla en Uruguay desde fines del siglo XVIII, y a partir del año 2000 creció considerablemente debido fundamentalmente a variedades introducidas desde la cuenca Mediterránea. En 2002, el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria comenzó la instalación de un jardín de introducción de variedades de diversas procedencias, con la finalidad de evaluarlas agronómicamente en las condiciones de nuestro país. Con el objetivo de asegurar la identidad genética a esas variedades se realizaron análisis que permitieran corroborar los nombres de las mismas. Este requisito es corriente en cualquier banco de germoplasma o jardín de introducción, a los efectos de darle mayor seguridad a los resultados de las evaluaciones de estos materiales genéticos, ya que son frecuentes en el proceso de importación, errores de etiquetado o nomenclatura. En este trabajo se caracterizaron plantas de dieciséis variedades italianas de entre trece y diecisiete años de edad. Se analizaron características morfológicas de hoja, fruto y endocarpo en 40 muestras por variedad. Asimismo, se aplicaron diez pares de marcadores microsatélites diseñados para olivos, evaluados en otros ensayos realizados en bancos de germoplasma de referencia como los más discriminantes para el objetivo propuesto. Los resultados morfológicos y moleculares, al ser comparados con la base de datos del Banco Mundial de Germoplasma de Córdoba (España) y el Catálogo Italiano de Variedades de Olivo, detectaron errores en la denominación de algunas variedades que fueron posteriormente corregidos. Esta caracterización brinda mayor certeza a los resultados de las evaluaciones agronómicas en curso en el Uruguay.

Palabras clave: *Olea europaea* L.; Caracteres morfológicos; Marcadores microsatelites; Variedades italianas

8. SUMMARY

Olive plantation has developed in Uruguay since the late 18th. century, but it has increased significantly during the last 20 years, largely by the introduction of varieties from the Mediterranean basin. In 2002, the National Institute of Agricultural Research installed a variety introduction garden with several provenances, for evaluating them under local environmental conditions. In order to ensure their genetic identity, morphological and molecular analyses were carried out to validate their identification. These kind of studies are commonly required for ensuring genetic identity and for avoiding labeling mistakes in Germplasm banks and introduction gardens. Sixteen italian varieties between thirteen and seventeen years old were studied. Leaf, fruit and stone morphological characters were analyzed in 40 samples of each variety. Likewise, ten pairs of microsatellite markers designed for olive trees were used to perform molecular analyses in reference germplasm, being known by their high discriminating ability. Morphological and molecular data were compared to that of World Bank of Germplasm Database from Córdoba (Spain) and Catalog of Italian Olive Varieties. As a result, some identification mistakes were observed, which led to further correction. These data are very helpful to the ongoing agronomical research in Uruguay, since they bring certainty about results obtained so far.

Key words: *Olea europaea* L.; Morphological characters; Microsatellite markers; Italian varieties

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Arias, M.; Severino, V. 2013. Fisiología de la fructificación; producción del olivo en las condiciones climáticas del Uruguay. In: Grompone, M.; Villamil, J. eds. Aceites de oliva; de la planta al consumidor. Montevideo, Hemisferio Sur. pp. 253-258.
2. Baccino, E.; Scaltritti, J.; Silveira, A.; López, S.; Gándara, J.; Pereira, J. s.f. Evaluación de descriptores moleculares y morfológicos de variedades de olivo en Uruguay. In: Jornada de Divulgación (2013, Las Brujas, Canelones, UY). Resultados experimentales en el cultivo de olivo. Montevideo, INIA. pp. 9-20 (Actividades de Difusión no. 721).
3. Baldoni, L.; Cultrera, N.; Mariotti, R.; Ricciolini, C.; Arcioni, S.; Vendramin, G.; Buonamici, A.; Porceddu, A.; Sarri, V.; Ojeda, M.; Trujillo, I.; Rallo, L.; Belaj, A.; Perri, E.; Salimonti, A.; Mazzalupo, I.; Casagrande, A.; Lain, O.; Messina, O.; Testolin, R. 2009. A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping. (en línea). *Molecular Breeding*. 24(3): 213-231. Consultado 15 mar. 2017. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/s11032-009-9285-8>
4. Bandelj, D.; Jakše, J.; Javornik, B. 2004. Assessment of genetic variability of olive varieties by microsatellite and AFLP. (en línea). *Euphytica*. 136(1): 93-102. Consultado 2 jun. 2017. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1023%2FB%3AEUPH.0000019552.42066.10?LI=true>
5. Barazani, O.; Keren-Keiserman, A.; Westberg, E.; Hanin, N.; Dag, A.; Ben-Ari, G.; Fragman-Sapir, O.; Tugendhaft, Y.; Kerem, Z.; Kadereit, J. 2016. Genetic variation of naturally growing olive trees in Israel; from abandoned groves to feral and wild (en línea). *BMC Plant Biology*. 16(261): 1-11. Consultado 12 jun. 2017. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/311627315_Genetic_variation_of_naturally_growing_olive_trees_in_Israel_From_abandoned_groves_to_feral_and_wild
6. Barranco, D.; Rallo, L. 1984. Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía. Madrid, Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación. 387 p.
7. _____; de Toro, C.; Rallo, L. 1998. Épocas de maduración de cultivares de olivo en Córdoba. (en línea). *Investigación Agraria. Producción y Protección*

Vegetales. 13(3): 359-368. Consultado 10 mar. 2017. Disponible en http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/2406/Rallo_Romero_6.pdf?sequence=1&isAllowed=y

8. _____; Cimato, A.; Fiorino, P.; Rallo, L.; Touzani, A.; Castañeda.; C.; Serafini, F.; Trujillo, I. 2000. Catálogo mundial de variedades de olivo. Madrid, Consejo Oleícola Internacional. 360 p.
9. _____; Trujillo, I.; Rallo, L. 2005. Elaiografía hispánica. *In*: Rallo, L.; Barranco, D.; Caballero, J. M.; Del Rio, C.; Martin, A.; Tous, J.; Trujillo, I. eds. Variedades de olivo en España. Madrid, Mundi-Prensa. s.p.
10. _____. 2008. Variedades y patrones. *In*: Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L. eds. El cultivo del olivo. 6a. ed. Madrid, Mundi-Prensa. pp. 84-86.
11. Belaj, A.; Satovic, Z.; Rallo, L.; Trujillo, I. 2002. Genetic diversity and relationships in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. *Theoretical and Applied Genetics*. 105(4): 638-44.
12. _____.; Díez, C. M.; Baldoni, L.; Porceddu, A.; Barranco, D.; Satovic, Z. 2007. Genetic diversity and population structure of wild olives from the north-western Mediterranean assessed by SSR markers. *Annals of Botany*. 100(3): 449-458.
13. _____.; _____.; _____.; Satovic, Z.; Barranco, D. 2010. Genetic diversity and relationships of wild and cultivated olives at regional level in Spain. (en línea). *Scientia Horticulturae*. 124(3): 323-330. Consultado 13 abr. 2017. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423810000130>
14. _____.; León, L.; Satovic, Z.; de la Rosa, R. 2011. Variability of wild olives (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) analyzed by agromorphological traits and SSR markers. (en línea). *Scientia Horticulturae*. 129(4): 561-569. Consultado 12 abr. 2017. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423811002251>
15. _____.; Gurbuz Veral, M.; Sikaoui, H.; Moukhli, A.; Khadari, B.; Mariotti, R.; Baldoni, L. 2016. Olive Genetic Resources. *In*: Rugini, E.; Baldoni, L.; Muleo, R.; Sebastiani, L. eds. Compendium of plant genomes. The olive tree genome. Cham, SW, Springer. pp. 27-54.
16. Beltrán, G.; Uceda, M.; Hermoso, M.; Frías, L. 2008. Maduración. *In*: Barranco, D.;

Fernández-Escobar, R.; Rallo, L. eds. El cultivo del olivo. 6a. ed. Madrid, Mundi-Prensa. pp.163 -187.

17. Besnard, G.; Baradat, P.; Berville, A. 2001. Genetic relationships in the olive (*Olea europaea* L.) reflect multilocal selection of cultivars. (en línea). Theoretical and Applied Genetics. 102(2-3): 251-258. Consultado 20 abr. 2017. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs001220051642?LI=true>
18. Botstein, D.; White, R. L.; Skolnick, M.; Davis, R. W. 1980. Construction of a genetic-linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. (en línea). American Journal of Human Genetics. 32(3): 314-331. Consultado 30 may. 2017. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1686077/>
19. Boucheffa, M.; Miazzi, M. M.; di Rienzo, V.; Mangini, G.; Fanelli, V.; Tamendjari, A.; Pignone, D.; Montemurro, C. 2017. The coexistence of oleaster and traditional varieties affects genetic diversity and population structure in Algerian olive (*Olea europaea*) germplasm. Genetic Resources and Crop Evolution. 64(2): 379- 390.
20. Bracci, T.; Busconi, M.; Fogher, C. 2010. Molecular studies in olive (*Olea europaea* L.); overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis. (en línea). Plant Cell Reports. 30(4): 449-462. Consultado 13 mar. 2017. Disponible en <https://link.springer-com.proxy.timbo.org.uy:88/article/10.1007/s00299-010-0991-9>
21. Breton, C.; Tersac, M.; Bervillé, A. 2006. Genetic diversity and gene flow between the wild olive oleaster (*Olea europaea* L.) and the olive; several Plio-Pleistocene refuge zones in the Mediterranean basin suggested by simple sequence repeats analysis. Journal of Biogeography. 33(11): 1916-1928.
22. _____; Farinelli, D.; Shafik, S.; Sedgley, M.; Heslop-Harrison, J. S.; Bervillé, A. J. 2014. The self-incompatibility mating system of the olive (*Olea europaea* L.) functions with dominance between S-alleles. (en línea). Tree Genetics & Genomes. 10(4): 1055-1067. Consultado 14 abr. 2017. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/s11295-014-0742-0>
23. Caballero, J. 2013. La olivicultura en Iberoamérica. In: Grompone, M; Villamil, J. eds. Aceites de oliva; de la planta al consumidor. Montevideo, Hemisferio Sur. pp. 15-35.
24. _____; del Río, C. 2017. Métodos de multiplicación. In: Barranco, D.;

Fernández-Escobar, R.; Rallo, L. eds. El cultivo del olivo. 7a. ed. Madrid, Mundi-Prensa. pp. 99-144.

25. Cantini, C.; Cimato, C.; Sani, G. 1999. Morphological evaluation of olive germplasm present in tuscan region. (en línea). *Euphytica*. 109(3): 173-181. Consultado 15 mar. 2017. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1003728800464?LI=true>
26. _____; Cimato, C.; Autio, A.; Redi, A.; Cresti, M. 2008. Assessment of the tuscan olive germplasm by microsatellite markers reveals genetic identities and different discrimination capacity among and within cultivars. (en línea). *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 133(8): 598-604. Consultado 10 mar. 2017. Disponible en <http://journal.ashspublications.org/content/133/4/598.full>
27. Cavagnaro, P.; Juárez, J.; Bauzá, M.; Masuelli, R. W. 2001. Discriminación de variedades de olivo a través del uso de caracteres morfológicos y de marcadores moleculares. (en línea). *Agriscientia*. 18: 27-35. Consultado 15 mar. 2017. Disponible en <http://www.agriscientia.unc.edu.ar/volumenes/pdf/v18n01a04.pdf>
28. Cipriani, G.; Marrazzo, M. T.; Marconi, R.; Cimato, A.; Testolin, R. 2002. Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. (en línea). *Theoretical and Applied Genetics*. 104(2): 223-228. Consultado 17 mar. 2017. Disponible en <http://sci-hub.cc/10.1007/s001220100685>
29. Civantos, L. 2008. La Olivicultura en el mundo y en España. In: Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L. eds. El cultivo del olivo. 6a. ed. Madrid, Mundi-Prensa. pp. 19-35.
30. de la Rosa, R.; James, C.; Tobutt, K. R. 2002. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite in olive *Olea europaea* L. and their transferability to other genera in the Oleaceae. (en línea). *Molecular Ecology Notes*. 2(3): 265-267. Consultado 16 mar. 2017. Disponible en <http://sci-hub.cc/10.1046/j.1471-8286.2002.00217.x>
31. Dice, L. R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. (en línea). *Ecology*. 26(3): 297-302. Consultado 3 jun. 2017. Disponible en https://www.jstor.org/stable/1932409?seq=1#page_scan_tab_contents
32. Díez, C. M.; Trujillo, I.; Barrio, E.; Belaj, A.; Barranco, D.; Rallo, L. 2011. Centennial olive trees as a reservoir of genetic diversity. (en línea). *Annals of*

- Botany. 108(5): 797-807. Consultado 15 abr. 2017. Disponible en <https://academic.oup.com/aob/article/108/5/797/200570/Centennial-olive-trees-as-a-reservoir-of-genetic>
33. _____.; Imperato, A.; Rallo, L.; Barranco, D.; Trujillo, I. 2012. Worldwide core collection of olive cultivars based on simple sequence repeat and morphological markers. (en línea). *Crop Science*. 52(1): 211-221. Consultado 15 mar. 2017. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/257641862_Worldwide_Core_Collection_of_Olive_Cultivars_Based_on_Simple_Sequence_Repeat_and_Morphological_Markers
34. _____.; Moral, J.; Barranco, D.; Rallo, L. 2016. Genetic diversity and conservation of olive genetic resources. In: Ahuja, M. R.; Mohan Jain, S. eds. *Genetic diversity and erosion in plants, sustainable development and biodiversity*. s.l., Springer. pp. 337-356.
35. D'imperio, M.; Viscosi, V.; Scarano, M. T.; D'andrea, M. S.; Zullo, B. A.; Pilla, F. 2011. Integration between molecular and morphological markers for the exploitation of olive germoplasm (*Olea europaea*). (en línea). *Scientia Horticulturae*. 130(1): 229–240. Consultado 11 mar. 2017. Disponible en <http://sci-hub.cc/10.1016/j.scienta.2011.06.050>
36. Domínguez García, M. 2012. Marcadores moleculares de ADN; análisis de la variabilidad, relaciones genéticas y mapeo en olivo (*Olea europaea* L.). Tesis doctoral Lic. Biol. Córdoba, España. Universidad de Córdoba. 163 p.
37. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2014. The statistical database (FAOSTAT). (en línea). Rome. s.p. Consultado 12 mar. 2017. Disponible en <http://faostat.fao.org/>
38. 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 “Boughrara” (Sfax, Túnez). Tesis de Master en Olivicultura y Elaiotecnia. Córdoba, España. Universidad de Córdoba. 146 p.
39. _____.; Trujillo, I.; Trigui, A.; Rodríguez-García, M. I.; Ramírez, J. D. A. 2010. Simple sequences repeat identification and endocarp characterization of olive tree accessions in a tunisian germplasm collection. (en línea). *HortScience*. 45(10): 1429-1436. Consultado 14 mar. 2017. Disponible en <http://eds.a.ebscohost.com/eds/detail/detail?vid=1&sid=fb2210b8-926a-4a2d-90ce-074c66aefb02%40sessionmgr4010&hid=4203&bdata=Jmxhbmc9ZXMmc21>

[0ZT11ZHMtbG12ZQ%3d%3d#AN=edselec.2-52.0-77958550199&db=edselec](https://www.researchgate.net/publication/234115822_The_classification_of_olive_germplasm_-_A_review)

40. Ferreira, M.; Grattapaglia, D. 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ª. ed. Brasília, EMBRAPA. 220 p.
41. Ganino, T.; Bartolini, G.; Fabbri, A. 2006. The classification of olive germplasm; a review. (en línea). HortScience. 81(3): 319-334. Consultado 15 mar. 2017. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/234115822_The_classification_of_olive_germplasm_-_A_review
42. Guerrero García, A. 2003. Implantación del olivar. Nueva olivicultura. 5ª. ed. rev. y ampl. Madrid, Mundi-Prensa. 304 p.
43. Hannachi, H.; Breton, C.; Msallem, M.; Ben El Hadj, S.; El Gazzah, M.; Bervillé, A. 2010. Genetic relationships between cultivated and wild olive trees (*Olea europaea* L. var. *europaea* and var. *sylvestris*) based on nuclear and chloroplast SSR markers. Scientific Research. 1: 95-103.
44. Haouane, H.; El Bakkali, A.; Moukhli, A.; Tollon, C.; Santoni, S.; Oukabli, A.; El modafar, C.; Khadari, B. 2011. Genetic structure and core collection of the world olive germplasm bank of Marrakech; towards the optimised management and use of mediterranean olive genetic resources. (en línea). Genetica. 139(9): 1083-1094. Consultado 13 mar. 2017. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10709-011-9608-7>
45. Idrissi, A.; Ouazzani, N. 2004. Apport des descripteurs morphologiques à l'inventaire et à l'identification des variétés d'olivier (*Olea europaea* L.). (en línea). PGR Newsletter. no. 36: 1-10. Consultado 13 may. 2017. Disponible en http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:oWkoCswVjY0J:www.bioversityinternational.org/fileadmin/PGR/article-issue_136-art_1-lang_fr.html&num=1&hl=es&strip=1&vwsrc=0
46. Jackson, D. A.; Somers, K. M.; Harvey, H. H. 1989. Similarity coefficients; measures of co-occurrence and association or simply measures of occurrence? (en línea). American Naturalist. 133(3): 436-453. Consultado 5 jun. 2017. Disponible en <http://www.labs.eeb.utoronto.ca/jackson/amnat133.pdf>
47. Karp, A.; Edwards, K.; Bruford, M.; Funk, S.; Vosman, B.; Morgante, M.; Seberg, O.; Kremer, A.; Boursot, P.; Arcander, P.; Tautz, D.; Hewitt, G. 1997. Newer molecular technologies for biodiversity evaluation; opportunities and

- challenges. *Nature Biotechnology*. 15: 625-628.
48. Lewontin, R. C. 1972. The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology*. 6: 381-398.
49. Liu, J. 2002. PowerMarker; a powerful software for marker data analysis. Raleigh, NC, North Carolina State University. Bioinformatics Research Center. 33 p.
50. Mársico, D. F. 1955. *Olivicultura y elaiotecnia*. Madrid, Salvat. 582 p.
51. Mazzalupo, I. 2012. Olive germplasm; italian catalogue of olive varieties. (en línea). s.l., InTech. 420 p. Consultado 15 oct. 2016. Disponible en <https://www.intechopen.com/books/olive-germplasm-italian-catalogue-of-olive-varieties/olive-germplasm-italian-catalogue-of-olive-varieties>
52. _____; Vendramin, G. G.; Chiappetta, A. 2014. Genetic biodiversity of italian olives (*Olea europaea*); germplasm analyzed by SSR markers. (en línea). *Scientific World Journal*. 2014: 1-12. Consultado 10 mar. 2017. Disponible en <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/296590/abs/>
53. Mnasri, S. R.; Saddoud, O. D.; Rouz, S.; Ben Saleh, M.; Ferchichi, A. 2017. Morphological analysis of the autochthon olive varieties cultivated in the north west of Tunisia. (en línea). *Journal of New Sciences*. 37(4): 2042-2048. Consultado 15 mar. 2017. Disponible en <http://www.jnsociences.org/agri-biotech/53-volume-37/284-morphological-analysis-of-the-autochtho-olive-varieties-cultivated-in-the-north-west-of-tunisia.html>
54. Pereira, J. 2016. Historia de la olivicultura en Uruguay. *Mercacei América*. no. 87: 168-174.
55. Pérez, F. 1995. Biología floral; polinización. *In*: Porras, A.; Cabrera de la Colina, J.; Soriano, L. eds. *Olivicultura y elaiotecnia*. Castilla, La Mancha, España, Compobell. pp. 69-74.
56. Pérez Castellanos, J. M. 1914. Observaciones sobre agricultura. Montevideo, Barreiro y Ramos. pp. 206-225.
57. Rapoport, H. 2008. Botánica y morfología. *In*: Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L. eds. *El cultivo del olivo*. 6a. ed. Madrid, Mundi-Prensa. pp. 39-62.
58. _____. 2017. Botánica y morfología. *In*: Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L. eds. *El cultivo del olivo*. 7a. ed. Madrid, Mundi-Prensa. pp. 37-64.

59. Rallo, L. 2005. Variedades de olivo en España; una aproximación cronológica. *In*: Rallo, L.; Barranco, D.; Caballero, J.; del Río, C.; Martín, A.; Tous, J.; Trujillo, I. eds. Variedades de olivo en España. Madrid, Mundi-Prensa. pp. 17-44.
60. Rallo, P.; Dorado, G.; Martín, A. 2000. Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). (en línea). *Theoretical and Applied Genetics*. 101(5-6): 984-989. Consultado 10 mar. 2017. Disponible en <http://sci-hub.cc/10.1007/s001220051571>
61. Rohlf, F. J. 1998. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.0. New York, Stauket. s.p. (Applied biostatistics).
62. Rotondi, A.; Magli, M.; Ricciolini, C.; Baldoni, L. 2003. Morphological and molecular analyses for the characterization of a group of italian olive cultivars. (en línea). *Euphytica*. 132(2): 129-137. Consultado 7 mar. 2017. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1024670321435>
63. Sefc, K. M.; Lopes, S.; Mendonca, D.; Dos Santos, M. R.; Machado, M. L. D.; Machado, A. D. 2000. Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in italian and iberian olive trees. (en línea). *Molecular Ecology*. 9(8): 1171-1193. Consultado 12 mar. 2017. Disponible en <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-294x.2000.00954.x/pdf>
64. Solís, L.; Andrade, A. 2005. ¿Qué son los marcadores moleculares?. (en línea). *Ciencia y el Hombre*. 18(1): 41-46. Consultado 15 mar. 2017. Disponible en http://www.academia.edu/730385/Qu%C3%A9_son_los_marcadores_moleculares
65. Sorkheh, K.; Khaleghi, E. 2016. Molecular characterization of genetic variability and structure of olive (*Olea europaea* L.) germplasm collection analyzed by agromorphological traits and microsatellite markers. (en línea). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 40: 583-596. Consultado 9 abr. 2017. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/304001726_Molecular_characterization_of_genetic_variability_and_structure_of_oliveOlea_europaea_L_germplasm_collection_analyzed_by_agromorphologicaltraits_and_microsatellite_markers
66. Tapia, F.; Astorga, M. 2003. Variedades y portainjertos. *In*: Tapia, F.; Astorga, M.; Ibacache A.; Marínez, L.; Sierra, C.; Quiroz, C.; Larraín, P.; Riveros, F. eds. Manual del cultivo del olivo. La Serena, Instituto de Investigaciones

Agropecuarias Intihuasi. pp. 27-40.

67. Tessier, C.; David, J.; This, P.; Boursiquot, J. M.; Charrier, A. 1999. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L.. Theoretical and Applied Genetics. 98(1): 171-177.
68. Tous, J.; Romero, A. 1993. Variedades del olivo; con especial referencia a Cataluña. Barcelona, Fundación "La Caixa". 172 p.
69. Trujillo, I.; Barranco, D.; Belaj, A.; Rallo, L. 2003. Identificación y catalogación del banco de germoplasma mundial del olivo de Córdoba mediante marcadores morfológicos y moleculares. In: Jornadas Técnicas del Aceite de Oliva-Expoliva (2as., 2003, Jaén). Memorias. Jaén, s.e. pp. 23-30.
70. _____; Barranco, D. 2004. Botánica. (en línea). Córdoba, Universidad de Córdoba. Departamento de Agronomía. s.p. Consultado 10 mar. 2017. Disponible en <http://www.museoaceite.com/docum/docs/3-botanica%20.doc>
71. _____; Ojeda, M.; Urdiroz, N.; Potter, D.; Barranco, D.; Rallo, L.; Díez, C. 2014. Identification of the worldwide olive germplasm bank of Córdoba (Spain) using SSR and morphological markers. (en línea). Tree Genetics & Genomes. 10(1): 141-155. Consultado 10 mar. 2017. Disponible en <http://sci-hub.cc/10.1007/s11295-013-0671-3>
72. Vilar, J; Cárdenas, J. 2016. El sector internacional de elaboración de aceite de oliva; un estudio descriptivo de los 56 países productores. Jaén, ES, GEA- Centro Internacional de Excelencia para Aceite de Oliva. 171 p.
73. _____; Pereira, J. 2017. Informe "Caja Rural de Jaén" sobre coyuntura para la olivicultura internacional. (en línea). Mercacei América. no. 91: s.p. Consultado 10 jun. 2017. Disponible en <http://www.mercacei.com/noticia/47191/Actualidad/solidez-precios-crecimiento-exponencial-olivar-superintensivo-claves-informe-caja-rural-ja%C3%A9n-sobre-coyuntura-olivicultura.html>
74. Villamil, J; Conde, P. 2013. Variedades. In: Grompone, M.; Villamil, J. eds. Aceites de oliva; de la planta al consumidor. Montevideo, Hemisferio Sur. pp. 51-74.

9. ANEXOS

Anexo 1

- CTAB

Para un litro de CTAB Buffer:

- 100 ml Tris (Hidroximetil- aminometano) 1M, pH 8,0
- 280 ml NaCl 5M
- 40 ml EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) 0,5M
- 20 gr CTAB

- Preparación del buffer de extracción

Para 20 muestras:

- 20 ml CTAB Buffer
- 0,8 gr PVP
- 100 µl β- mercaptoetanol

- TBE Buffer (10X)

- 108 gr Tris
- 55 gr Ácido Bórico
- 40 ml EDTA 0,5M
- 1 litro de agua destilada

Anexo2

Ascolana



Bosana



Canino



Carolea



Cipressino



Coratina



Frantoio



Grignan



Itrana



Leccino



Leccio



Maurino



Moraiolo



Pendolino



Seggianese



Taggiasca



Anexo 3

Estados mayoritarios para los caracteres morfológicos en hoja.

Variedad	Carácter morfológico		
	Largo	Ancho	Forma
Ascolana	<u>Media</u>	<u>Media</u>	<u>Elíp.-lanc.</u>
Bosana	<u>Media</u>	Media	Elíp.-lanc.
Canino	<u>Media</u>	<u>Media</u>	<u>Elíp.-lanc.</u>
Carolea	<u>Media</u>	<u>Media</u>	<u>Elíp.-lanc.</u>
Cipressino	<u>Media</u>	<u>Media</u>	<u>Elíp.-lanc.</u>
Coratina	<u>Media</u>	<u>Media</u>	<u>Elíp.-lanc.</u>
Frantoio	<u>Media</u>	Media	Elíp.-lanc.
Grignan	Corta	<u>Media</u>	Elíptica
Itrana	<u>Media</u>	<u>Media</u>	<u>Elíp.-lanc.</u>
Leccino	<u>Media</u>	Media	Elíp.-lanc.
Leccio	<u>Media</u>	<u>Media</u>	<u>Elíp.-lanc.</u>
Maurino	<u>Media</u>	Media	Elíp.-lanc.
Moraiolo	<u>Media</u>	<u>Media</u>	<u>Elíp.-lanc.</u>
Pendolino	<u>Media</u>	<u>Media</u>	Elíp.-lanc.
Seggianese	<u>Media</u>	<u>Media</u>	<u>Elíp.-lanc.</u>
Taggiasca	<u>Media</u>	<u>Media</u>	Elíptica
Dj	0,128	0,073	0,254

(Elíp.-lanc.) Elíptico- lanceolada (Dj) Poder discriminante

Los estados subrayados son los que coinciden con la base de datos descripta por Mazzalupo (2012).

Estados mayoritarios para los caracteres morfológicos en fruto.

Variedad	Carácter morfológico								
	Peso	Forma	Simetría (A)	Forma ápice (A)	Forma base (A)	DMT (B)	Pezón	Lenticelas	Tam. lenticelas
Ascolana	Elevado	Esférica	<u>Lig. asim.</u>	<u>Redondeado</u>	Truncada	H. base	Ausente	Escasas	<u>Pequeñas</u>
Bosana	<u>Medio</u>	Ovoidal	<u>Lig. asim.</u>	<u>Redondeado</u>	Truncada	H. ápice	Esbozado	<u>Abundantes</u>	Grandes
Canino	<u>Bajo</u>	Esférica	<u>Lig. asim.</u>	<u>Redondeado</u>	<u>Truncada</u>	H. base	Esbozado	<u>Abundantes</u>	<u>Pequeñas</u>
Carolea	Muy elevado	<u>Ovoidal</u>	Lig. asim.	<u>Redondeado</u>	Truncada	H. base	<u>Evidente</u>	Abundantes	<u>Grandes</u>
Cipressino	<u>Medio</u>	<u>Esférica</u>	Lig. asim.	<u>Redondeado</u>	<u>Truncada</u>	H. base	<u>Ausente</u>	<u>Abundantes</u>	<u>Pequeñas</u>
Coratina	<u>Medio</u>	Alargada	Lig. asim.	<u>Redondeado</u>	Truncada	H. base	<u>Ausente</u>	<u>Abundantes</u>	Grandes
Frantoio	<u>Medio</u>	<u>Ovoidal</u>	<u>Lig. asim.</u>	<u>Redondeado</u>	Truncada	H. ápice	Esbozado	<u>Abundantes</u>	Grandes
Grignan	Medio	<u>Esférica</u>	<u>Lig. asim.</u>	<u>Redondeado</u>	<u>Truncada</u>	H. base	<u>Esbozado</u>	<u>Escasas</u>	<u>Pequeñas</u>
Itrana	Elevado	Ovoidal	<u>Lig. asim.</u>	<u>Redondeado</u>	Truncada	<u>Centrado</u>	<u>Esbozado</u>	<u>Abundantes</u>	Grandes
Leccino	<u>Medio</u>	<u>Ovoidal</u>	<u>Lig. asim.</u>	<u>Redondeado</u>	Truncada	<u>Centrado</u>	<u>Ausente</u>	Escasas	<u>Pequeñas</u>
Leccio	<u>Medio</u>	<u>Ovoidal</u>	<u>Lig. asim.</u>	<u>Redondeado</u>	Truncada	<u>Centrado</u>	<u>Ausente</u>		
Maurino	<u>Medio</u>	<u>Ovoidal</u>	<u>Lig. asim.</u>	<u>Redondeado</u>	Truncada	H. base	Esbozado	<u>Abundantes</u>	<u>Pequeñas</u>
Moraiolo	<u>Medio</u>	<u>Esférica</u>	<u>Lig. asim.</u>	<u>Redondeado</u>	Truncada	H. base	<u>Ausente</u>	<u>Abundantes</u>	Grandes
Pendolino	<u>Medio</u>	<u>Ovoidal</u>	<u>Lig. asim.</u>	<u>Redondeado</u>	<u>Truncada</u>	<u>H. ápice</u>	<u>Ausente</u>	<u>Abundantes</u>	<u>Pequeñas</u>
Seggianese	<u>Medio</u>	<u>Esférica</u>	<u>Simétrico</u>	<u>Redondeado</u>	<u>Truncada</u>	H. base	<u>Ausente</u>	<u>Abundantes</u>	<u>Pequeñas</u>
Taggiasca	<u>Medio</u>	<u>Ovoidal</u>	Lig. asim.	<u>Redondeado</u>	Truncada	H. ápice	<u>Esbozado</u>	<u>Abundantes</u>	<u>Pequeñas</u>
Dj	0,546	0,578	0,394	0,111	0,084	0,615	0,564	0,381	0,527

(A) posición A (B) posición B (DMT) diámetro máximo transversal (Tam. lenticelas) tamaño de lenticelas (Lig. asim.) ligeramente asimétrico (H. ápice) hacia el ápice (H. base) hacia la base (Dj) poder discriminante.

Los estados subrayados son los que coinciden con la base de datos descrita por Mazzalupo (2012).